Université Bordeaux 2

Année 2013 Thèse n° 2131

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Œnologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 19 décembre 2013

*Par **Adrien ZIMMER***

Né le 19/03/1985 à Sainte Foy Les Lyon (69)

Etude du déterminisme génétique de la phase de latence chez *Saccharomyces cerevisiae* en conditions œnologiques. Impact des mécanismes de résistance au SO_2

Membres du Jury

M. D. DUBOURDIEU, Professeur à l'université Bordeaux 2 ..... Président
Mme. D. SICARD, Maitre de Conférence à l'université Paris XI ..... Rapporteur
M. B. DIVOL, Senior Lecturer à l'université de Stellenbosch ..... Rapporteur
Mme. I. MASNEUF-POMAREDE, Professeur à l'ENITA ..... Examinateur
M. T. BERGES, Professeur à l'université de Poitiers ..... Examinateur
M. P. MARULLO, Chargé de Recherche BIOLAFFORT..... Directeur de Thèse

Université Bordeaux 2

Année 2013 Thèse n° 2131

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Œnologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 19 décembre 2013

*Par **Adrien ZIMMER***

Né le 19/03/1985 à Sainte Foy Les Lyon (69)

Etude du déterminisme génétique de la phase de latence chez *Saccharomyces cerevisiae* en conditions œnologiques. Impact des mécanismes de résistance au SO_2

Membres du Jury

M. D. DUBOURDIEU, Professeur à l'université Bordeaux 2 ..... Président
Mme. D. SICARD, Maitre de Conférence à l'université Paris XI ..... Rapporteur
M. B. DIVOL, Senior Lecturer à l'université de Stellenbosch ..... Rapporteur
Mme. I. MASNEUF-POMAREDE, Professeur à l'ENITA ..... Examinateur
M. T. BERGES, Professeur à l'université de Poitiers ..... Examinateur
M. P. MARULLO, Chargé de Recherche BIOLAFFORT..... Directeur de Thèse

À ma famille et à Charline,

(Et à moi, j'ai fait tout le travail)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Denis DUBOURDIEU, Directeur Général de l'Intitut Scientifique de la Vigne et du Vin pour m'avoir accuillie au sein de son institut, mais également pour avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse, pour cela je lui exprime ma plus grande gratitude. Je remercie également Philippe DARRIET directeur de l'unité de recherche œnologie qui m'a accuillie au sein de son laboratoire

J'exprime toute ma gratitude à Luc LAFFORT pour le financement de cette thèse et la confiance qu'il m'a accordée pour la réalisation de celle-ci.

Le Docteur Philippe MARULLO chercheur de la société LAFFORT détaché à l'ISVV m'a offert l'opportunité de réaliser cette thèse sur un sujet aussi complexe que passionnant. Grâce à son encadrement, son aide et son soutien durant ces trois années, j'ai pu mener à bien ce travail qui m'a été confié. Son aide a également été la bienvenue lors de la rédaction de cette thèse. Pour cela, je tiens à lui exprimer mes plus sincères remerciements.

Je tiens également à remercier le personnel des sociétés LAFFORT et SARCO. En particulier Virginie MOINE et Joanna COULON pour leur aide et leur soutien durant ce travail, mais aussi pour avoir assisté à toutes mes présentations. Mais aussi Stéphane LAGUERCHE et Phillipe LOUAZIL pour les nombreuses analyses réalisées et les conseils pour la réalisation de certaines manipulations délicates. Je remercie tout particulièrement Chantal MANSOUR pour son aide, son soutien et les bons moments passés.

Je remercie tout le personnel de l'ISVV et particulièrement Marina BELY et Warren ALBERTIN qui m'ont apporté leur aide tout au long de ma thèse.

J'exprime ma plus profonde gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'examiner mon travail, les rapporteurs : Delphine SICARD, Maitre de Conférence à l'université de Paris XI, Benoit DIVOL, Senior Lecturer à l'université de Stellenbosh (Afrique du Sud), les examinateurs : Isabelle MASNEUF-POMAREDE Professeur à l'ENITA et Thierry BERGES Professeur à l'université de Poitiers.

Je remercie le Chateau Reynon (Professeur DENIS DUBOURDIEU) pour m'avoir fourni du moût et permis de réaliser de nombreux essais.

Je remercie également ma stagiaire récurrente, Cécile PHILIPPE pour ces travaux qui m'ont permis de compléter les résultats de cette thèse.

J'exprime ma plus profonde et sincère amitié aux deux autres mousquetaires, Axel « Athos » MARCHAL, Maitre de Conférence à l'université de Bordeaux et Marine « Porthos » GAMMACURTA, futur Docteur en Sciences de l'université de Bordeaux pour tous les bons moments partagés durant ces trois années et même après, mais aussi pour leur aide durant ma thèse et la rédaction de celle-ci.

J'exprime également toute mon amitié au Docteur Philippe-Emmanuel RENAULT, partenaire de chant et de golf, au Docteur Sophie TEMPERE même si je ne l'aime pas trop, au Docteur Guillaume ANTALICK pour sa bouteille offerte généreusement, à Telma DA SILVA pour ses conversations passionnantes et les cours de salsa, mais aussi à Elodie GUITTARD pour son amitié tout simplement.

Je tiens également à remercier chaleureusement le Docteur Julien MICHEL, le Docteur Isabelle KI, le Doteur Maroula DIMOPOULOU, Fety JAOMANJAKA, Mariette EL KHOURY, Magali PICARD, Maxime BRETTE pour leurs aides plus ou moins utile, mais surtout pour leur amitié.

Merci à tous pour votre aide, votre soutien, les soirées et votre amitié.

Pour finir je remercie Charline qui m'a supporté durant ces trois années et surtout durant la rédaction de cette thèse. Je remercie également ma famille à qui je dois tout et qui m'a soutenu même si celle-ci était à plus de 400 km.

Liste des abréviations

4MSP :	4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one
3SH :	3-sulfanylhexan-1-ol
A3H :	Acétate de 3-sulfanylhexan-1-ol
ADN :	Acide Désoxyribo-Nucléique
ARN :	Acide Ribo-Nucléique
ATP :	Adénosine TriPhosphaste
AV :	Acidité Volatile
BET :	Bromure d'Ethydium
CHEF :	Contour-clamped Homogenous Electric Field
CO_2 :	Dioxyde de carbone
dNTP :	DésoxyriboNucléotide-5-TriPhosphate
EDTA :	Ethylène-Diamine Tétra-Acétate
FA :	Fermentation Alcoolique
LSA :	Levure Sèche Active
NAD^+/NADH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
$NADP^+$/NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
PCR :	Réaction de Polymérisation en Chaine
POF :	Phenolic Off-Flavour
QTL :	Quantitative Trait Loci
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorphisme de taille des fragments de restriction)
rpm :	rotation par minutes
SAP :	Single Amino acid Polymorphism
SNP :	Single Nucléotide Polymorphism
SO_2 :	Dioxyde de soufre
TAV :	Titre Alcoométrique Volumique
TBE :	Tampon Tris-acide Borique-EDTA
TE :	Tris-HCl/EDTA
WEC :	Wine Experimental Center

Unités :

g, mg, µg :	gramme, milligramme, microgramme
h, min, s :	heure, minute, seconde
hl, L, ml, µl :	hectolitre, litre, millilitre, microlitre
M, mM :	molaire, millimolaire
NTU :	Nephelometric Turbidity Unit
°C :	degré Celsius

Table des matières

Introduction 1

Matériels et méthodes 4

1. Méthodes de microbiologie 4
   a. Souches utilisées 4
   b. Milieux de culture 4
   c. Production d'H_2S 6
   d. Résistance au SO_2 6
   e. Micro-dissection 8
   f. Croisement 8
   g. Conservation des souches 10
2. Fermentation alcoolique au laboratoire 10
   a. Milieu synthétique modèle 10
   b. Moûts de raisins utilisés 12
   c. Pré-culture et inoculation 12
   d. Fermentations 12
   e. Suivi de fermentations par pesée 14
   f. Suivi des populations par cytométrie en flux 14
   g. Contrôle d'implantation 14
3. Fermentations en chai 16
   a. Préparation des cultures 16
   b. Suivi de fermentations 16
4. Analyses moléculaires 16
   a. Extraction d'ADN 16
   b. Réaction de polymérisation en chaine PCR 19
   c. Migration sur gel d'agarose et électrophorèse capillaire 23
   d. Electrophorèse à champs pulsé (ECP) 23
5. Séquençage 25

6. Extraction d'ARN et préparation d'ADNc 26
7. PCR en temps réel 28
8. Transformation génétique de levures 29
9. Production de levures sèches actives 29
a. Propagation des levures 29
b. Séchage des levures 30
10. Analyse des échantillons en laboratoire 31
a. Sucres, alcool, acidité volatile, dioxyde de soufre 31
b. Thiols volatiles 31
11. Dégustations 32
12. Analyses statistiques 32
Contexte Bibliographique 34
1. Le rôle de la fermentation alcoolique dans la vinification 34
2. La phase pré-fermentaire 35
3. Les différentes phases de la fermentation alcoolique 39
a. Phase de latence 39
b. Phase de croissance 40
c. Phase stationnaire 40
4. Les levures d'intérêt en oenologie 41
a. Eléments de taxonomie 41
b. Levures du genre *Saccharomyces* 42
c. Levures non-*Saccharomyces* 42
5. Eléments de bibliographie sur la phase de latence 43
a. La phase de latence en microbiologie 43
b. Facteurs influençant la phase de latence durant la fermentation alcoolique 44

Partie I

Détection d'un QTL associé à la phase de latence

Revue Bibliographique 47

1. Introduction aux méthodes de cartographie de QTL chez la levure 47
2. Principes de bases de la cartographie de QTL 47
   a. Les marqueurs génétiques 48
   b. Dispositif génétique et étude phénotypique 53
   c. Analyse de liaison 53
   d. La dissection de QTL 54
   e. Application à la levure 54

Résultats et discussion 57

1. Description du phénotype de la phase de latence 57
   a. Présentation du phénotype et de la méthode de travail 57
   b. Validation du modèle d'étude dans du moût 59
   c. Etude de l'impact du SO_2 sur le phénotype 59
2. Validation du QTL dans différents fonds génétiques 62
   a. Description du marqueur *YOL083w* 62
   b. Recherche de la mutation H296N dans les souches du projet Heterosyeast 62
   c. Description de la stratégie en pool 65
   d. Fonds génétiques utilisés 67
   e. Résultats 67
   f. Conclusion 68
3. Dissection du QTL par une approche gènes candidats 70
   a. Présentation du QTL de la phase de latence 70
   b. Analyse de séquence et proposition de gènes candidats 72
   c. Etude de l'effet de *HAL9* et *ATG34* dans le déterminisme de la phase de latence 76
   d. Construction des souches 76
   e. Impact d'*ATG34* et d'*HAL9* sur le phénotype 80

f. Conclusion 84
4. Conclusion générale 85

Partie II

Mécanismes de translocations impliqués dans la résistance au SO_2

Revue Bibliographique 86
1. Le dioxyde de soufre en œnologie 88
a. Propriétés physico-chimiques 88
b. SO_2 libre 88
c. La combinaison du SO_2 88
d. Toxicité chez l'homme et réglementation 89
e. Propriétés anti-oxydantes et anti-oxydasique 89
f. Propriétés anti-microbiennes et mécanismes d'inhibitions 89
2. Les mécanismes de résistances au SO_2 chez les levures 91
a. Variabilité intra et interspécifique 91
b. Mécanismes de résistances mis en jeu. 93
Résultats et discussion 97
1. Mise en évidence d'une nouvelle translocation XV-XVI 97
2. Etude de l'impact de la translocation XV-XVI 101
a. Mise en place des PCR 101
b. Effet des translocations sur la phase de latence chez les souches parentales du projet heterosyeast 101
c. Effet des translocations chez les hybrides du projet heterosyeast 103
d. Retour sur les ségrégants de EW31 105
3. Impact de l'allèle *SSU1* dans la durée de la phase de latence 107
4. Mesure de l'expression de gène *SSU1* en conditions œnologiques 109
a. Durant la phase de latence 109
b. Au cours de la fermentation alcoolique 111

5. Avantage sélectif 113
a. Fréquence de la translocation 113
b. Impact sur la tolérance en SO_2 test sur boîte 115
c. Compétition en LPl et LPc 115
6. Conclusion 117

Partie III

Sélection de levures et impact sensoriel

Revue Bibliographique 119
1. Méthode de sélection génétique des levures 119
a. Les différentes méthodes de sélection 119
2. Cibles de la sélection 123
a. Capacités fermentaires 123
b. L'élimination des défauts olfactifs 124
c. Amélioration des qualités organoleptiques 125
Résultats et discussion 126
1. Etude de l'impact de la phase de latence sur la production de thiols volatils en Sauvignon Blanc 127
a. Description des deux fonds génétiques utilisés 127
b. Fonds génétique BV et validation de l'impact de la translocation sur la durée de la phase de latence. 127
c. Fonds génétique XPM43 et validation de l'impact de la translocation sur la durée de la phase de latence. 129
d. Impact de la phase de latence sur la production de thiols volatils 131
e. Conclusion 132
2. Projet PREFERMENTet impact organoleptique 133
a. Comparaison des souches XAZ11 et XAZ19 136

b. Construction des souches XAZ25 et XAZ26 isogéniques de X5 138
c. Essais en chais 139
3. Etude de l'impact de la translocation VIII-t-XVI sur l'acidité volatile 140
a. XMC27 et la production d'acidité volatile 140
b. XMC28 et production d'acidité volatile 143
c. Conclusion 147
4. Vérification de la production d'H_2S 149
5. Conclusion générale 149
Synthèse générale et perspectives 150
Références bibliographiques 153

Liste des tableaux

Tableau 1. Tableau des souches utilisées. 3
Tableau 2. Recapitulatif des PCR. 20
Tableau 3. Enzymes de restrictions. 21
Tableau 4. PCR chromosomes non transloqués 22
Tableau 5. PCR translocations. 24
Tableau 6. PCR en temps réel. 27
Tableau 7. Liste des différents SNP et SAP 71
Tableau 8. Profil des transformants. 77
Tableau 9. Séquençage et contig *de novo* 97
Tableau 10. Tableau de ségrégants. 104
Tableau 11. Analyse de variance la phase de latence, de la Viabilité durant la phase de latence et de l'expression de *SSU1* 108
Tableau 12. Résistance au SO_2. 114
Tableau 13. Dégustation Ducourt. 137
Tableau 14. Dégustation Reynon. 137

Liste des Figures

Figure 1. Fermentation alcoolique. 33
Figure 2. Cinétiques d'une fermentation alcoolique standard. 38
Figure 3. Séquençage illumina 49
Figure 4. Le pyroséquençage et un pyrograme. 50
Figure 5. Mise en évidence d'un QTL. 52
Figure 6. Détection de QTL. 56
Figure 7. Croissance et CO2 58
Figure 8. Validation du modèle synthétique. 58
Figure 9. Phénotype des parents pour le paramètre étudié 60
Figure 10. Analyse de liaison du QTL 61
Figure 11. Mutation sur la protéine finale du gène *ATG34* 61
Figure 12. Profil PCR –RFLP pour *YOL083w* 61
Figure 13. PCR-RFLP pour l'allèle *YOL083w* 62
Figure 14. Variation de la phase de latence 63
Figure 15. Stratégie d'obtention des ségrégants 64
Figure 16. Variation de la phase de latence 66
Figure 17. Présentation du QTL. 69
Figure 18. Complexe d'autophagocytose. 73
Figure 19. Séquence de la protéine Atg34p. 73
Figure 20. Rôle centrale de l'acétaldéhyde dans la glycolyse. 73
Figure 21. Illustration d'un hémizygote. 75
Figure 22. Principe de la recombinaison homologue 75
Figure 23. PCR de vérifications. 75
Figure 24. Profil de délétion et d'insertion. 77
Figure 25. Croissance et dégagement de CO_2. 79
Figure 26. Phase de latence et viabilité. 79
Figure 27. Croissance et dégagement de CO_2. 81
Figure 28. Phase de latence et viabilité. 81

Figure 29. Croissance et dégagement de CO_2. 82
Figure 30. Phase de latence et viabilité. 82
Figure 31. Croissance et dégageement de CO_2. 83
Figure 32. Phase de latence et viabilité. 83
Figure 33. Solubilité du SO_2. 87
Figure 34. Formes du SO_2. 87
Figure 35. Mécanimses de résistance au SO_2 92
Figure 36. Translocation entre les chromosomes VIII et XVI. 95
Figure 37. Résistance aux sulfites. 95
Figure 38. BLAST des contigs *de* novo. 97
Figure 39. Translocation XV-t-XVI. 98
Figure 40. Nombre de reads 294. 99
Figure 41. Profils PCRs. 100
Figure 42. Souches parentales. 100
Figure 43. Durée des phases de latence. 102
Figure 44. Impact de l'allèle SSU1 sur la phase de latence. 106
Figure 45. Effet des translocations XV-t-XVI et VIII-t-XVI sur la phase de latence, la viabilité durant la phase de latence et l'expression de *SSU1*. 108
Figure 46. Expression de SSU1 à 40% de la fermentation alcoolique. 110
Figure 47. Distribution des différentes formes du chromosome XVI. 112
Figure 48. Implantation de la souche à phase de latence courte. 116
Figure 49. Impact allélique du gène *YOL083* sur BV. 128
Figure 50. Phase de latence XPM43. 128
Figure 51. Phase de latence et production de thiols. 130
Figure 52. Fermentations PREFERMENT. 134
Figure 53. Analyse sensorielle. 135
Figure 54. Analyse en Composantes Principales. 135
Figure 55. Phases de latences. 137
Figure 56. Backcross. 140
Figure 57. Production d'acidité volatile et translocations. 140

Figure 58. Caryotype XMC28. 142
Figures 59. Phase de latence en moûts rouges 142
Figure 60. Facteurs impactant la production d'acidité volatile. 144
Figure 61. ANOVA jus de raisin. 144
Figure 62. ANOVA moût Thermo. 144
Figure 63. Cinétiques fermentaires. 146
Figure 64. Production d'H_2S. 148

INTRODUCTION

Introduction

La fabrication du vin est une activité humaine très ancienne faisant intervenir de nombreux savoir-faire. La culture de la vigne, sa taille, son enracinement dans un terroir, le choix des cépages utilisés ont au cours des siècles permis l'émergence de vignobles et de vins aux caractéristiques bien spécifiques. Les pratiques œnologiques, tels que le pressurage, la date des vendanges, la conduite de la fermentation alcoolique ou les pratiques d'élevage sont d'autres paramètres importants que le vinificateur contrôle et module pour façonner le produit final. Il y a encore une trentaine d'années, la levure qui réalise pourtant la fermentation alcoolique n'était pas considérée comme un élément déterminant dans la fabrication des vins. Depuis l'essor des levures industrielles, la souche de levure est devenue un paramètre supplémentaire, non négligeable dans certains cas, qui participe à la qualité des vins.

La fermentation alcoolique est accompagnée d'une formation de plusieurs centaines de composés issus du métabolisme de la levure. Ces produits secondaires peuvent avoir un impact positif comme négatif sur les qualités organoleptiques du vin. La production de ces composés varie selon le mode de vinification, mais également, selon la souche de levure utilisée. Les souches de levures tout d'abord utilisées pour leurs bonnes capacités fermentaires et l'absence de production de défauts organoleptiques sont désormais recherchées pour leur impact organoleptique et sont soumises à la concurrence de marché de l'industrie œnologique.

La sélection de nouvelles levures est donc une étape primordiale pour l'essor de cette industrie. La levure œnologique, dont l'espèce principale est *Saccharomyces cerevisiae,* présente un polymorphisme génétique et technologique très important. La sélection de nouvelles souches fait appel à des approches génétiques de plus en plus pointues telles que la sélection assistée par marqueurs utilisés depuis de nombreuses années dans les programmes de sélection agronomiques. La détection de ces marqueurs génétiques contrôlant des paramètres technologiques est réalisée par différentes approches dont celle de la cartographie de QTL (Quantitative Trait Loci). Cette stratégie initiée pour les levures industrielles au sein du laboratoire qui m'acceuille est maintenant utilisée par de nombreuses équipes pour sélectionner et améliorer des souches industrielles.

L'objectif de cette thèse consistait à étudier un QTL associé à la durée de la phase de latence afin d'identifier les mutations génétiques expliquant les différences de phénotype observées. Les résultats de ces travaux ont permis de mettre en évidence les causes génétiques et les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans le contrôle de la phase de latence. La compréhension de ces mécanismes peut dans certain cas améliorer les méthodes de vinification.

Sur le plan de la sélection, la phase de latence est la première phase de la fermentation alcoolique, le contrôle de sa durée est primordial car il détermine le développement rapide d'une souche dans le moût. Son contrôle génétique est donc important pour le sélectionneur qui désire proposer des levures s'implantant efficacement dans un moût non stérile.

Le contrôle de la phase de latence chez *Saccharomyces cerevisiae* peut également permettre l'étude du développement d'autres espèces de levures dites non-*Saccharomyces*. Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à l'impact significatif et positif de ces espèces sur les qualités organoleptiques du vin. Ces espèces de levures, majoritairement présentes sur la baie de raisin et dans les moûts, disparaissent dès le début de la fermentation alcoolique, supplantées par *Saccharomyces cerevisiae*. Disposer de souches de *Saccharomyces cerevisiae* ayant une phase de latence longue permettrait donc de pouvoir étudier plus précisement le développement et l'impact des levures non-*Saccharomyces* sur les qualités du vin.

La présentation des travaux de cette thèse commence par une partie bibliographique présentant le contexte oenologique de la phase de latence. Les résultats obtenus sont ensuite présentés en trois parties précédées d'une courte étude bibliographique donnant au lecteur des éléments plus spécifiques.

MATERIELS ET METHODES

Tableau 1. Tableau des souches utilisées.

Liste des souches utilisées durant cette étude.

Souche	Fonds génétique/Origine	Génotype	Origine
Y02160	*S288c*	BY4741; *Mat a*; *his3Δ1*; *leu2Δ°*; *met15Δ°*; *ura3Δ°*; *YPL092w*::*kanMX4*	Euroscarf
Y01774	*S288c*	BY4741; *Mat a*; *his3Δ1*; *leu2Δ°*; *met15Δ°*; *ura3Δ°*; *YOL083w*::*kanMX4*	Euroscarf
Y01865	*S288c*	BY4741; *Mat a*; *his3Δ1*; *leu2Δ°*; *met15Δ°*; *ura3Δ°*; *YOL089c*::*kanMX4*	Euroscarf
Y03925	*S288c*	BY4741; *Mat a*; *his3Δ1*; *leu2Δ°*; *met15Δ°*; *ura3Δ°*; *HO*::*kanMX4*	Euroscarf
GN	Clône monosporique de VL1	*HO/HO*; chr: VIII; chr: XV-t-XVI;	Marullo *et al.* 2007b
SB	Clône monosporique de BO213	*HO/HO*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Marullo *et al.* 2007b
hoGN	GN	haploïde dérivé de GN, ho::NATMX4, *mat a*	Albertin *et al.* 2013
GΔ083	GN	*HO/HO*; $YOL083^{GN}$::*kanMX4*/$YOL083^{GN}$::*kanMX4*	Cette étude
GΔ089	GN	*HO/HO*; $YOL089^{GN}$::*kanMX4*/$YOL089^{GN}$::*kanMX4*	Cette étude
GΔ092	GN	*HO/HO*; $YPL092^{GN}$::*kanMX4*/$YPL092^{GN}$::*kanMX4*	Cette étude
hoSB	SB	haploïde dérivé de SB, *ho::kanMX4*, *mat* α	Albertin *et al.* 2013
RG13	SB	haploïde dérivé de SB, *ho::NATMX4*, *mat a*	Richard Gardner (Auckland university)
SΔ083	SB	*HO/HO*; $YOL083^{SB}$::*kanMX4*/$YOL083^{SB}$::*kanMX4*	Cette étude
SΔ089	SB	HO/*HO*; $YOL089^{SB}$::*kanMX4*/$YOL089^{SB}$::*kanMX4*	Cette étude
SΔ092	SB	*HO/HO; YPL092*^{SB}::*kanMX4*/$YPL092^{SB}$::*kanMX4*	Cette étude
BN	Hybride F1	Hybride SB x GN hybride, chr: VIII, chr : XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Marullo *et al.* 2007b

Matériels et méthodes

1. Méthodes de microbiologie

a. Souches utilisées

Les souches utilisées durant ce travail appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et sont présentées dans le Tableau 1.

b. Milieux de culture

La composition des différents milieux de culture utilisés pour la croissance des levures est donnée ci-dessous. Lorsque cela s'est avèré nécessaire, différents antibiotiques ont été ajoutés : G418 (100µg/ml) (Sigma, France), Nourceothricine (100µg/ml) (Werner Bio Agent, Allemagne). Les cultures sont réalisées à 30°C sauf pour les milieux ACK et BIGGY qui sont incubés à 24°C. Pour un milieu solide, de l'agar est ajouté à raison de 20g/L.

<u>YPD Milieu complet utilisé pour la propagation des levures :</u>

Extrait de levure 10g/L

Bactopeptone 10g/L

Glucose 20g/L

(Agar 20g/L)

<u>YPG Milieu complet utilisé pour vérifier la capacité des levures à respirer :</u>

Extrait de levure 10g/L

Bactopeptone 10g/L

Glycérol 20g/L

(Agar 20/L)

<u>YNB Milieu Minimum :</u>

YNB without amino acid and ammonium sulfate (Difco) 1,7 g/L

Sulfate d'amonium 200 µg/L

Glucose 20 g/L

(Agar 20 g/L)

Souche	Fonds génétique/Origine	Génotype	Origine
GΔS-083	BN	Hybride hémizygote *YOL083^{GN}::kanMX4/YOL083^{SB}*	Cette étude
SΔG083	BN	Hybride hémizygote *YOL083^{GN}/YOL083^{SB}::kanMX4*	Cette étude
GΔS089	BN	Hybride hémizygote *YOL089^{GN}::kanMX4/YOL089^{SB}*	Cette étude
SΔG089	BN	Hybride hémizygote *YOL089^{GN}/YOL089^{SB}::kanMX4*	Cette étude
GΔS092	BN	Hybride hémizygote *YPL092^{GN}::kanMX4/YPL092^{SB}*	Cette étude
SΔG092	BN	Hybride hémizygote *YPL092^{GN}/YPL092^{SB}::kanMX4*	Cette étude
F10-4A	Clône monosporique de F10	*HO/HO, YOL083^{SB} /YOL083^{SB}*, chr: XV, chr: XVI, chr: VIII-t-XVI	Marullo *et al.* 2009
Hirondelle	Boulangerie	*HO/HO, YOL083^{SB} /YOL083^{SB}*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Lesaffre
Levante	Boulangerie	*HO/HO, YOL083^{SB} /YOL083^{SB}* chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Puratos
SBA	Boulangerie	*HO/HO, YOL083^{SB} /YOL083^{SB}* chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Lesaffre
CLIB 650	Brasserie	*HO/HO, YOL083^{SB} /YOL083^{SB}* chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	CLIB
Prem. Gold	Brasserie	*HO/HO, YOL083^{SB} /YOL083^{SB}* chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Muntons Etavobra
S04	Brasserie	*HO/HO, YOL083^{SB} /YOL083^{SB}* chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Satale Etavobra
US-56	Brasserie	*HO/HO, YOL083^{SB} /YOL083^{SB}* chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Satale Etavobra
NRRL 7327	Brasserie	*ho/ho, YOL083^{SB} /YOL083^{SB}* chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NRRL
522 Davis	Œnologie commerciale	*HO/HO,* chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: VIII-t-XVI, chr: XV-t-XVI	Laffort

ACK Milieu de sporulation :

Acétate de potassium 10g/L

(Agar 20g/L)

BIGGY :

BIGGY (Difco) 45g/L

Les milieux YPD et YPG sont stérilisés 15 min à 120°C. Les milieux YNB et ACK sont stérilisés 20 minutes à 115°C. Le milieu BIGGY est porté à ébullition pendant 45s.

c. Production d'H_2S

Pour évaluer la production de sulfure d'hydrogène (H_2S), une technique de culture sur boîte a été utilisée. Cette méthode est initialement prévue pour la taxonomie de l'espèce *Candida albicans* (Nickerson 1953) mais a été utilisée dans plusieurs travaux pour évaluer la production d'H_2S de levures industrielles de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Jiranek *et al.* 1995a). Le milieu BIGGY (Bismuth, Glucose, Glycine, agar de levure) va permettre de mettre en évidence cette production. La méthode pour évaluer la production d'H_2S des souches de levures est basée sur la formation de précipité métallique noir lors de la mise en contact des ions sulfites produits par la levure avec les ions bismuth contenus dans le milieu. L'intensité de ce précipité est corrélée avec la quantité d'H_2S formé par les levures. L'H_2S produit par les levures va former un précipité noir avec les ions bismuth du milieu et colorer les colonies de façon proportionnelle à l'intensité de la production d'H_2S.

d. Résistance au SO_2

Le protocole du test de résistance des levures au dioxyde de soufre (SO_2) a été décrit dans la littérature (Park and Bakalinsky 1999). Celui-ci a été adapté à la réalisation d'un test en gouttes.

Plusieurs solutions sont utilisées :

- YPD
- Acide tartrique à 750 mM tamponné à pH 2,8, en utilisant de l'acide tartrique et du bitartrate de sodium monohydraté.
- Une solution de Na_2SO_3 à 40g/L extemporanée.

Souche	Fonds génétique/Origine	Génotype	Origine
BJL	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: VIII-t-XVI, chr: XV-t-XVI	Laffort
BR115	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Laffort
Exc C1	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: VIII-t-XVI	Lamothe Abiet
F10	Œnologie commerciale	chr: XV, chr : VIII-t-XVI	Laffort
F15	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr : XV, chr: VIII-t-XVI	Laffort
F33	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: VIII-t-XVI, chr: XV-t-XVI	Laffort
F5	Œnologie commerciale	chr: XV, chr: VIII-t-XVI	Laffort
F83	Œnologie commerciale	chr: XV, chr: VIII-t-XVI	Laffort
FW	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: XV-t-XVI	Lamothe Abiet
FX10	Œnologie commerciale	chr: XV, chr: VIII-t-XVI	Laffort
RB2	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr :VIII-t-XVI	Laffort
RB4	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: VIII-t-XVI, chr: XV-t-XVI	Laffort
RMS2	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr:XV-t-XVI	Laffort
RX60	Œnologie commerciale	chr :VIII, chr : XV-t-XVI	Laffort
SP	Œnologie commerciale	chr :VIII, chr :XV, chr :VIII-t-XVI, chr :XV-t-XVI	Lamothe Abiet
SPARK	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: VIII-t-XVI, chr:XV-t-XVI	Laffort
ST	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: VIII-t-XVI	Laffort

Le milieu YPD et l'acide tartrique sont stérilisés par autoclave puis mélangés afin d'obtenir un milieu YPD+TA 75mM alors tamponné à pH 3,45. 25 ml de ce milieu est coulé en boîte de Petri. Un volume déterminé (pour 25ml de milieu) de la solution de Na_2SO_3 à 40g/L est étalé à l'aide d'un râteau. Une gamme de concentration en SO_2 total est ainsi réalisée. Le test en goutte avec un témoin sans SO_2 a été effectué avec 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 et 10 cellules viables/ ml.

e. Micro-dissection

La sporulation est induite par dépôt sur milieu minimum (10g/L d'acétate de potassium, 20g/L d'agar) après 3 jours à température ambiante. Les asques sont digérées par de la cytohélicase (Sigma-Aldrich) à 2mg/ml final pendant 1h30 à 30°C. Les spores sont finalement isolées par un micromanipulateur Singer MSM Manual (Singer Instrument, Witchet, Somerset, UK) sur YPD-agar selon la méthode décrite par Wickner (1991).

f. Croisement

i. Croisement en masse

Les croisements sont effectués en mélangeant 2 souches de signe sexuel opposé sur YPD-agar puis en incubant 6 à 18h à 30°C. Les zygotes formés par la fusion de deux cellules haploïdes sont ensuite isolés sur YPD-agar à l'aide d'un micromanipulateur. Si les deux parents possèdent une résistance à un antibiotique différent, il est possible d'étaler le mélange sur YPD + antibiotiques après les 18h d'incubation ce qui permettra de sélectionner plus rapidement les cellules diploïdes nouvellement formées.

Les types sexuels sont déterminés en mélangeant les souches à tester avec les souches de référence de signe sexuel connu et en observant la formation de zygotes après 6h.

ii. Croisement au micro-manipulateur

Les spores des souches à croiser sont déposées par paire sur la gélose à l'aide du micro-manipulateur. Une quarantaine de croisements sont nécessaires à l'obtention d'un à cinq zygotes. Cette technique a été décrite par Naumov (1986).

Souche	Fonds génétique/Origine	Génotype	Origine
VL1	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Laffort
VL2	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: VIII-t-XVI, chr: XV-t-XVI	Laffort
VL3	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: XV-t-XVI	Laffort
X16	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: VIII-t-XVI, chr: XV-t-XVI	Laffort
XR	Œnologie commerciale	chr: VIII, chr: XV, chr: VIII-t-XVI, chr: XV-t-XVI	Lamothe Abiet
YB-427	Distillerie	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NRRL
CLIB 294	Distillerie	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	CLIB
A24	Distillerie	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Alcotech
12A2	Isolée moût/vin	chr: XV, chr: VIII-t-XVI	Bourgogne
4D2	Isolée moût/vin	chr: XV, chr: VIII-t-XVI	Bourgogne
6A1	Isolée moût/vin	chr: VIII, chr:XV, chr :XVI, chr: VIII-t-XVI	Bourgogne
8A1	Isolée moût/vin	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: VIII-t-XVI	Bourgogne
F7 2	Isolée moût/vin	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Sauterne
Lg'ld	Isolée moût/vin	chr: XV, chr: VIII-t-XVI	NA
LMPR2	Isolée moût/vin	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: VIII-t-XVI	Bourgogne
OLF II	Isolée moût/vin	chr: XV, chr: VIII-t-XVI	Bourgogne
OLF III	Isolée moût/vin	chr: VIII, chr: XV, chr: VIII-t-XVI	Bourgogne

g. Conservation des souches

Les souches sont préservées dans des cryotubes individuels contenant un milieu liquide YPD à 50% de glycérol à -80°C après être restées 24h à température ambiante.

2. Fermentation alcoolique au laboratoire

a. Milieu synthétique modèle

Afin d'être en mesure de comparer les différentes fermentations effectuées au cours de ces trois années de thèse et d'être sûr que seuls certains paramètres choisis varient, l'utilisation d'un milieu synthétique modèle (MSM) est indispensable. Ce milieu mime les caractéristiques d'un moût blanc. Il a été mis au point par Bely (1990) puis modifié par Marullo (2006). Ce milieu est composé de :

- Sucres : D-glucose (115g/L), D-fructose (115g/L)
- Acides organiques : acide L-tartrique (3g/L); acide citrique (0.3g/L); acide L-malique (0.3g/L)
- Sels minéraux : KH_2PO4 (2g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (200mg/L), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (4mg/L), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (4mg/L), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1mg/L), KI (1mg/L), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.4mg/L), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (1mg/L), H_3BO_3 (1mg/L);
- Vitamines : myo-inositol (300µg/L), biotin (0,04µg/L), thiamine hydrochloride (1µg/L), pyridoxine hydrochloride (1µg/L), acide nicotinique (1µg/L), panthothénate de calcium (1µg/L), para-amino benzoic acid (1µg/L);
- Facteurs anaérobie : ergostérol (1,5mg/L), oléate de sodium (0,5mg/L), 0,05 mL de Tween 80/éthanol (1:1, v/v)
- Sources d'azote : 190 mg/L provenant de 300 mg/L $(NH_4)_2SO_4$ (correspondant à 63,6 mg d'azote) et un mélange de 18 acides aminés (mg/L) correspondant à 126,4 mg/L d'azote.

Le milieu est tamponné à un pH de 3,3 par ajout de pastilles de KOH, puis stérilisé par filtration sur membrane de nitrate de cellulose 0,45µm (Millipore, Molsheim, France). Au moment de l'inoculation des levures le milieu est enrichi en facteurs d'anaérobie (ergostérol

Souche	Fonds génétique/Origine	Génotype	Origine
S328	Isolée moût/vin	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
OS104	Nature	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Exudat de chêne
S67	Isolée moût/vin	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
XMC30	Souche sélectionnée au laboratoire		NA
XPM43	Hybride XMC13-1C x VL3-1D	*URE2/ure2*, POF/pof-, HO/ho, YOL083*$^{SB/GN}$, chr :VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	NA
XPM43-T1B	Ségrégant XPM43	*ure2*, pof , IRC7*^{LT}*, mat* α*, YOL083*^{SB}, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
XPM43-T3A	Ségrégant XPM43	*URE2, pof , IRC7*^{LT}*, mat* α*, YOL083*^{SB}, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
XPM43-T3D	Ségrégant XPM43	*ure2*, pof , IRC7*^{LT}*, mat* α*, YOL083*^{SB}, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
XPM43-T4A	Ségrégant XPM43	*URE2, pof , IRC7*^{LT}*, mat* α, YOL083^{GN}, chr: VIII, chr: XV-t-XVI	NA
XPM43-T4B	Ségrégant XPM43	*ure2*, pof , IRC7*^{LT}*, mat a, YOL083*^{SB}, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
XPM43-T5A	Ségrégant XPM43	*URE2, pof , IRC7*^{LT}*, mat a, YOL083*^{SB}, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
XPM43-T7B	Ségrégant XPM43	*URE2, pof , IRC7*^{LT}*, mat a, YOL083*^{SB}, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
XPM43-T8D	Ségrégant XPM43	*ure2*, pof , IRC7*^{LT}*, mat a, YOL083*^{GN}, chr: VIII, chr: XV-t-XVI	NA
XPM43-T9B	Ségrégant XPM43	*ure2*, pof , IRC7*^{LT}*, mat a, YOL083*^{GN}, chr: VIII, chr: XV-t-XVI	NA
XPM43-T16B	Ségrégant XPM43	*ure2*, pof , IRC7*^{LT}*, mat* α*, YOL083*^{GN}, chr: VIII, chr: XV-t-XVI	NA
XPM43-T23D	Ségrégant XPM43	*URE2, pof , IRC7*^{LT}*, mat* α*, YOL083*^{SB}, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA

1,5mg/L, oléate de sodium 0,5mg/l et Tween 80 0,05mL/L) et en SO_2 à partir d'une solution saturée à 10% (Laffort). La concentration en SO_2 dépend de la modalité de l'expérience et est indiquée dans le texte.

b. Moûts de raisins utilisés

Trois moûts de Sauvignon blanc ont été utilisés, provenant des domaines Ducourt (2011), Tutiac (2012) et Reynon (2012). Un moût rouge de merlot obtenu par thermo-extraction a également été utilisé, provenant du domaine Ducourt (2012). Du jus de raisin Casino® a également été utilisé dans les fermentations en moûts rouges. Les moûts blancs ont été ajustés à 200 NTU. La concentration en azote a été ajustée à 200mg/L d'azote assimilable par ajout de Thiazote® (Laffort), un mélange de sulfate d'ammonium (source d'azote) et de thiamine (vitamine B1) après dosage enzymatique par le laboratoire SARCO. Tous les moûts utilisés étaient congelés. Les caractéristiques des mouts seront précisées pour chaque expérience.

c. Pré-culture et inoculation

Lors des expériences de fermentation, une pré-culture est réalisée pour chaque souche à tester. Cette culture a pour but de faciliter l'adaptation des levures lors de la fermentation (Passage d'un milieu gélosé à un milieu de fermentation liquide) et d'augmenter la quantité de levure disponible pour l'ensemencement des fermenteurs. Celle-ci est faite à partir du milieu de fermentation dilué à 50% avec l'eau Milli-Q stérile pendant 24h à 24°C sous agitation mécanique (Table Orbital shaker S01, Stuart Scientific). Le milieu ne contient ni de SO_2 ni de facteurs d'anaérobie. Les fermenteurs sont inoculés à une concentration de 1.10^6 cellules viables/ml après quantification par cytométrie en flux (p.14).

d. Fermentations

Pour réaliser ces micro-vinifications, des fermenteurs de 150ml contenant 125ml de milieu synthétique ou de moût ont été utilisés et fermés hermétiquement pour maintenir l'anaérobiose et éviter toute contamination. Une sortie pour le dégagement de CO_2 est aménagée. Les fermentations sont réalisées sous agitation permanente (300 rpm) dans des étuves à 18°C, 20°, 24°C ou 26°C.

Souche	Fonds génétique/Origine	Génotype	Origine
XPM43-T25B	Ségrégant XPM43	*ure2*,pof-, IRC7^{LT}, mat a YOL083^{GN}*, chr: VIII, chr: XV-t-XVI	NA
XAZ1	Hybride F2 XPM43	T4B x T1B *ure2*/ure2*, pof-, YOL083^{SB}*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Cette étude
XAZ2	Hybride F2 XPM43	T8D x T16B *ure2*/ure2*, pof-, YOL083^{GN}*, chr: VIII, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ3	Hybride F2 XPM43	T9B x T16B *ure2*/ure2*, pof-, YOL083^{GN}*, chr: VIII, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ4	Hybride F2 XPM43	T25B x T16B *ure2*/ure2*, pof-, YOL083^{GN}*, chr: VIII, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ5	Hybride F2 XPM43	T8D x T3D *ure2*/ure2*, pof-, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ6	Hybride F2 XPM43	T9B X T3D *ure2*/ure2*, pof-, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ7	Hybride F2 XPM43	T25B x T3D *ure2*/ure2*, pof-, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ8	Hybride F2 XPM43	T8D x T1B *ure2*/ure2*, pof-, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ9	Hybride F2 XPM43	T9B x T1B *ure2*/ure2*, , pof-, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ10	Hybride F2 XPM43	T25B x T1B *ure2*/ure2*, pof-, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ11	Hybride F2 XPM43	T4A x T8A *URE2/URE2, pof-, YOL083^{GN}*, chr: VIII, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ12	Hybride F2 XPM43	T5A x T8A *URE2/URE2, pof-, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ13	Hybride F2 XPM43	T7B xT8A *URE2/URE2, pof-, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ14	Hybride F2 XPM43	T4A x T3A *URE2/URE2, pof-, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ15	Hybride F2 XPM43	T5A x T3A *URE2/URE2, pof-, YOL083^{SB}*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Cette étude

Certaines fermentations, notamment celles réalisées en vue d'une dégustation, nécessitent de plus grands volumes et ont donc été réalisées en bouteilles de 75cl. L'agitation est alors impossible.

e. Suivi de fermentations par pesée

Le suivi de la fermentation est effectué via la mesure du dégagement de CO_2 par pesée régulière des fermenteurs exprimée en g/L. Les données brutes sont alors lissées par une fonction *Loess* permettant d'estimer la phase de latence (en h) qui correspond au temps entre l'inoculation et le dégagement de 2g/L de CO_2. Toutes les fermentations sont faites en triplicatas.

f. Suivi des populations par cytométrie en flux

Le suivi de croissance et de viabilité des levures au cours de la fermentation est réalisé par des prélèvements réguliers effectués sous hotte à flux laminaire et sous agitation à l'aide d'une seringue. Les échantillons sont dilués dans du tampon McIlvaine pH=4.0 (0.1M acide citrique, 0.2M phosphate de sodium dibasique) auquel de l'iodure de propidium a été ajouté (0.3% v/v) pour marquer les cellules mortes. La quantification des levures est effectuée en utilisant un cytomètre de flux (Quanta SC MPL, Beckman Coulter, Fullerton, Californie). L'appareil est équipé d'un laser de 488nm (22mW) permettant d'exciter les cellules et de mesurer des paramètres physiques tels que la réfringence et la fluorescence. La taille de chaque cellule est estimée par une mesure d'impédance proportionnelle au volume. La mortalité est déterminée en mesurant la proportion de cellules fluorescentes dans le canal FL3 équipé d'un filtre à 670 nm.

g. Contrôle d'implantation

En fin de fermentation alcoolique, un prélèvement est effectué et déposé sur boîte YPD. Après 24°C de développement à 30°C, une extraction d'ADN sur 5 colonies ou un dépôt sur carte FTA est effectué et des tests PCR (voir section 4. Analyses moléculaires) sont réalisés afin de vérifier la bonne implantation de la souche à étudier.

Souche	Fonds génétique/Origine	Génotype	Origine
XAZ16	Hybride F2 XPM43	T7B x T3A *URE2/URE2, pof⁻, YOL083^{SB}*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Cette étude
XAZ17	Hybride F2 XPM43	T4A x T23D *URE2/URE2, pof⁻, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ18	Hybride F2 XPM43	T5A xT23D *URE2/URE2, pof⁻, YOL083^{SB}*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Cette étude
XAZ19	Hybride F2 XPM43	T7B xT23D *URE2/URE2, pof⁻, YOL083^{SB}*, chr: VIII, chr XV, chr: XVI	Cette étude
XAZ25a	XMC13-1C x XPM43-T3D	*ure2*/ure2*, YOL083^{SB}*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Cette étude
XAZ25b	XMC13-1C x XPM43-T3D	*ure2*/ure2*, YOL083^{SB}*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Cette étude
XAZ25c	XMC13-1C x XPM43-T3D	*ure2*/ure2*, YOL083^{SB}*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	Cette étude
XAZ26a	XMC13-1C x XPM43-T16B	*ure2*/ure2*, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ26b	XMC13-1C x XPM43-T16B	*ure2*/ure2*, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
XAZ26c	XMC13-1C x XPM43-T16B	*ure2*/ure2*, YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Cette étude
X5	Œnologie commerciale	*URE2/URE2 YOL083$^{SB/GN}$*, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	Laffort
Vin 13-22D	Souche sélectionnée au laboratoire	*URE2/URE2, IRC7/IRC7, HO/HO*	(Dufour *et al.* 2013)
VL3-1D	Clône monosporique de VL3	*URE2/URE2, IRC7^{LT}/IRC7^{LT}, HO/HO,* chr: XV-t-XVI	(Thibon *et al.* 2008)
VIN-BC4	Hyrbide YPM23 x VIN-BC3-1A	*URE2/ure2*, IRC7/IRC7, HO/ho*	(Dufour *et al.* 2013)
VC6-4	Clône monosporique de VL1	chr:XV-t-XVI	NA

3. Fermentations en chai

a. Préparation des cultures

Les essais réalisés en chai ont été inoculés à partir de levures sèches actives (LSA) à 10g/hL soit environ $2,3.10^6$ cellules viables/ml.

b. Suivi de fermentations

Les fermentations en chais ont été faites au château Reynon dans des fûts en inox de 50L afin de reproduire les conditions réelles de vinification. Le suivi de fermentation est alors effectué par une mesure journalière de la densité couplé à une mesure de la température du moût. D'autres fermentations ont été faites au Wine Experimental Center (WEC, Château Goudichaud, 17 Chemin de Goudichaud, 33750 Saint-Germain-du-Puch) dans des cuves inox de 25L avec un suivi de la fermentation par mesure journalière de la densité.

4. Analyses moléculaires

a. Extraction d'ADN

i. Extraction par kit FTA (*Whatman®*)

Lorsque seuls quelques tests PCR sont nécessaires, une extraction rapide via les cartes FTA® CloneSaver™ (Whatman®BioSience, USA) peut être réalisée. Cette technique permet de traiter un grand nombre (96 échantillons par carte), rapidement (environ 1h) et de les conserver sur le long terme à température ambiante. Une formule chimique brevetée qui lyse les membranes cellulaires et dénature les protéines imprègne ces cartes.

Avec une pointe de cône stérile, un prélèvement sur la colonie à analyser est mis en suspension dans 50µL d'eau Milli-Q stérile. Un dépôt de 7µL est alors effectué sur la membrane FTA (Whatman®) et laissé sécher à l'air libre pendant 1h. Un disque (punch) est alors poinçonné à l'aide d'un emporte-pièce (Harris Micro-Punch™ 1,2mm) et placé dans un

Souche	Fonds génétique/Origine	Génotype	Origine
XMC13-1C	Clône monosporique de VIN-BC4	*ure2*, IRC7, mat a , YOL083*^{SB}, chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
XMC27	5ème backcross FX10 x F33	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI, chr: XV-t-XVI	NA
XMC28-1A	Ségrégant 6ème backcross FX10 x F33	chr:XV-t-XVI	NA
XMC28-1B	Ségrégant 6ème backcross FX10 x F33	chr:XV-t-XVI	NA
XMC28-1C	Ségrégant 6ème backcross FX10 x F33	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
XMC28-1D	Ségrégant 6ème backcross FX10 x F33	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
XMC28-2A	Ségrégant 6ème backcross FX10 x F33	chr: XV-t-XVI	NA
XMC28-2B	Ségrégant 6ème backcross FX10 x F33	chr: XV-t-XVI	NA
XMC28-2C	Ségrégant 6ème backcross FX10 x F33	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA
XMC28-2D	Ségrégant 6ème backcross FX10 x F33	chr: VIII, chr: XV, chr: XVI	NA

Chr = conformation chromosomique : VIII = chromosome VIII non transloqué ; XV = chromosome XV non transloqué ; XVI = chromosome XVI non transloqué ; VIII-t-XVI = translocation entre les chromosomes VIII et XVI ; XV-t-XVI = translocation entre les chromosomes XV et XVI

tube PCR. Deux lavages au Tris-HCl 10mM sous agitation pendant 5 minutes et un lavage à l'eau Milli-Q stérile pendant 5 minutes sans agitation sont effectués. Après avoir retiré le surnageant et laissé sécher le disque environ 15 minutes à température ambiante celui-ci est prêt pour la PCR.

ii. Extraction d'ADN génomique de levure

Pour obtenir une extraction d'ADN génomique de qualité pour des transformations, des séquençages ou des PCR sensibles, le kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) est utilisé. Ce kit repose sur quatre étapes : lyse des cellules, précipitation des protéines, concentration et purification de l'ADN. Ce kit utilise des solutions brevetées qui permettent la lyse des cellules et la précipitation des protéines. Le protocole a été modifié comme suit :

Les cellules sont mises en suspension dans 300 µl de Nuclei Lyse Solution® et 200 µl de billes de verres sont ajoutées, les tubes sont alors passés deux fois au Fastprep-24 (MP Biomedical, Santa Ana, California, USA) pendant 45s à 6,5 m/s alternés avec un passage de 2 minutes dans de la glace. Après avoir centrifugé les tubes 2 minutes à 3000 rpm le surnageant est récupéré et 100 µl de Precipitation Solution® sont ajoutés. Les tubes sont passés au vortex et laissés dans la glace 5 minutes. Après avoir centrifugé les tubes 3 minutes à 13000 rpm le surnageant est récupéré et ajouté à 300 µl d'isopropanol avant d'être mélangé par inversion. Après une étape de centrifugation, le surnageant est éliminé et 300 µl d'éthanol à 70% sont ajoutés au culot et remis en suspension. Une dernière centrifugation est effectuée, le surnageant est éliminé, le culot est séché à l'air libre puis repris dans 50 µl d'eau Milli-Q. Une ultime étape est effectuée en ajoutant 1,5 µl de RNAse A à la solution qui est incubé 15 min à 37°C avant de subir une inactivation d'1h à 65°C.

b. Réaction de polymérisation en chaine PCR

Différents types de PCR ont été réalisés pour identifier des souches ou des caractères génotypiques. Ils ont en commun l'utilisation des thermocycleurs i-cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) et PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA, USA), mais aussi du mix de PCR comprenant Taq Polymerase et dNTP, Taq-&GO™ Ready-to-use PCR Mix (MP Biomedicals, USA). De la Taq polymerase pure est ajoutée en complément lorsque cela s'avère nécessaire Taq Polymerase VWR (VWP International, USA). Toutes les amorces sont reçues sèches (MWG-Biotech, Allemagne) et sont réhydratées avec de l'eau Milli-Q stérile pour obtenir une concentration finale des 100pmol/µl.

Mix PCR :

Amorce 1 : 0,2 ou 0,4µL

Amorce 2 : 0,2 ou 0,4µL

Mix Taq : 4µL

Taq (si nécéssaire) : 1U soit 0,1µL

ADN : 0,5µL ou 1 disque

H_2O : qsp 20µL

i. PCR inter-δ

La PCR inter-δ permet de différencier les différentes souches de *S. cerevisiae* entre elles. Cette PCR nous sert de contrôle d'implantation. Elle repose sur l'amplification des séquences d'ADN génomique comprises entre les éléments répétées inter-Δ (Legras and Karst 2003).

Amorce δ12 : $^{5'}$TCAACAATGGAATCCAAC$^{3'}$

Amorce δ21 : $^{5'}$CATCTTAACACCGTATATGA$^{3'}$

Le programme est constitué d'un cycle de dénaturation (95°C, 5 min), de 35 cycles (95°C, 30s ; 47°C, 30s ; 72°C, 90s) et d'un cycle d'élongation (72°C, 10 min).

Tableau 2. Recapitulatif des PCR.
Liste des PCR RFLP avec séquences des amorces et cycles utilisés.

Allèle	Amorces				Cycles PCR			
	Sens	Séquence	Anti-sens	Séquence	Dénaturation	Cycles	Nombre de cycles	Elongation
URE2	p273	AAAGCTTGTCCAATCATTGGC	p274	TTTTCTCTCACAGGTCTGCG	94°C, 5 min	D: 95°C, 35 s H: 54°C, 35 s E: 72°C, 1 min	30	72°C, 10 min
POF	p217	AAGATTGGTGATGGATAGAATTTCA	p218	CAACTCTATTAGTAGTTGAGTAACGTA	95°C, 5 min	D: 95°C, 30 s H: 55°C, 35 s E: 72°C, 1 min	30	72°C, 10 min
Type-Sex	p301	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG	p302 p303	GCACGGAATATGGGACTACTTCG ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG	92°C, 5 min	D: 92°C, 1 min H: 58°C, 2 min E: 72°C, 1 min	30	72°C, 10 min
YOL083	p118	CGAGTGTTCAGTTACAGGAGG	p119	TGCTTGATTCATCAGGGGAA	95°C, 4 min	D: 95°C, 30 s H: 56°C, 35 s E: 72°C, 1 min	33	72°C, 10 min
IRC7	p693	TCTTCTGCGAGACGTTCAAA	p694	GGATTTGGCTGCTTGGCT	95°C, 4 min	D: 95°C, 30 s H: 55°C, 35 s E: 72°C, 1 min	30	72°C, 10 min

ii. PCR locus mat, *IRC7* suivi de RFLP

Plusieurs marqueurs PCR-RFLP ont été utilisés en tant que contrôle d'implantation ou lors des programmes de croisement. Une PCR pour déterminer le type sexuel des levures a également été utilisée. Les amorces et programmes de PCR sont décrits dans le Tableau 2 et les digestions dans le Tableau 3. Les digestions des PCR-RFLP sont effectuées dans le mix suivant :

- Enzyme de restriction : 0,2 µL (1U)
- BSA 10X : 0,2 µL
- Tampon 10X : 2 µL
- ADN : 5 µL
- H_2O qsp 20 µL : 12,6 µL

Tableau 3. Enzymes de restrictions.
Liste des enzymes de restrictions utilisées avec la séquence reconnue et l'allèle digérée.

locus	Enzyme de restriction	Séquence	Allèle digérée
URE2	*Mnl I*	CCTC(N)$_7$ ▲	*ure2**
POF	*Bgl I*	GCCNNNN▲NGGC	*pof*
YOL083	*Nla III*	CATG▲	*YOL083*^{SB}

Tableau 4. PCR chromosomes non transloqués
Liste des PCR pour identifer les chromosomes sauvages avec les séquences des amorces et les cycles.

Nom	Amorces				Cycles PCR			
	Position Sens	Séquence	Position Anti-Sens	Séquence	Dénaturation	Cycles	Nombre de cycles	Elongation
VIII-WT	p764 14312 - 14332 Chr VIII	CGCATCCAGTACAAAGAAATG	p763 15268 - 15287 Chr VIII	CTGAGTGATTTGTTTCCCGA	95°C, 5 min	D: 95°C, 35 s H: 55°C, 35 s E: 72°C, 1 min	34	72°C, 10 min
XV-WT	p758 160994 - 161013 Chr XV	AAAGAAGTTGCATGCGCCTA	p761 161811 - 161830 Chr XV	AATGCAGGCGCAAAAAACTC	95°C, 5 min	D: 95°C, 35 s H: 55°C, 35 s E: 72°C, 1 min	34	72°C, 10 min
XVI-WT	p788 373007 - 373026 Chr XVI	TCTTTTTGGGCTGGTAGGAT	p789 373966 - 373985 Chr XVI	ATATTTGTAGTGCCTGCACA	95°C, 5 min	D: 95°C, 35 s H: 55°C, 35 s E: 72°C, 1 min	34	72°C, 10 min
XVI-WT Δ *ssu1*	p788 373007 - 373026 Chr XVI	TCTTTTTGGGCTGGTAGGAT	p1032 373687-373707 Chr XVI	GGGGAAAGCTGTAATTTGTGT	95°C, 5 min	D: 95°C, 35 s H: 55°C, 35 s E: 72°C, 1 min	34	72°C, 10 min

iii. PCR de translocation

Les PCR de translocation ont été développées lors de cette thèse afin de déterminer si les différentes souches de *S. cerevisiae* possèdent une translocation entre les chromosomes XV et XVI et/ou des chromosomes non transloqués. Le Tableau 4 indique la séquence des amorces, leur position ainsi que les cycles utilisés lors de la PCR pour amplifier ces séquences des chromosomes non transloqués. Le Tableau 5 (verso page 23) indique les conditions pour les chromosomes transloqués. Les amorces de la PCR VIII-WT sont celles déjà utilisées pour la translocation entre les chromosomes VIII et XVI précédemment décrites (Perez-Ortin 2002).

c. Migration sur gel d'agarose et électrophorèse capillaire

L'ADN amplifié par PCR est séparé selon sa taille par électrophorèse (Wide Mini-Sub Cell GT Cell, Biorad, USA) en gel d'agarose. La concentration du gel varie entre 1% et 1,8% en fonction de la taille du produit de PCR, dissous dans du tampon TBE 1X (Tris pH = 8 0,09M ; acide borique 0,09M ; EDTA 2mM). La migration est effectuée à 90V. La coloration du gel est faite dans le même tampon TBE avec du bromure d'éthidium (BET) à 0,7µg/mL. Le gel est visualisé grâce au système Ingenius 3 (Syngene, India). Les produits de PCR ont également été séparées par électrophorèse capillaire via un MCE®-202 MultiNA (Shimadzu, Noisiel, France) avec un kit DNA-1000bp pour définir la taille des amplifias.

d. Electrophorèse à champs pulsé (ECP)

L'ECP permet de séparer les fragments d'ADN de moins de 1Kb jusqu'à une dizaine de Mb. Ici nous l'utilisons de manière à séparer les différents chromosomes des souches de levures pour la validation des hybrides inter ou intra-spécifiques (Schwartz et Cantor 1984). Il s'agit d'une électrophorèse lors de laquelle on fait varier l'orientation du champ électrique. Chaque changement électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi sa propagation à travers ce dernier. Dans ces conditions, le temps mis par la molécule d'ADN pour se positionner dépend de sa longueur. Ainsi, une molécule d'ADN très longue (2 000 kb) passera plus de temps à se réorienter qu'à se déplacer, tandis qu'une plus petite molécule (200 kb) migrera plus rapidement.

Tableau 5. PCR translocations.

Liste des PCR pour identifier les chromosomes translocquer avec les séquences des amroces et les cycles.

Nom	Amorces				Cycles PCR			
	Position Sens	Séquence	Position Anti-sens	Séquence	Dénaturation	Cycle	Nombre de cycles	Elongation
VIII-t-XVI	p764 14697 - 14719 Chr VIII	TCGAACATCGAGCATGCA	p765 373848 - 373864 Chr XVI	GACACCCATGACCATCAC	95°C, 5 min	D: 95°C, 35 s H: 53°C, 35 s E: 72°C, 90 s	34	72°C, 10 min
XV-t-XVI	p758 160994 - 161013 Chr XV	AAAGAAGTTGCATGCGCCTA	p765 373848 - 373864 Chr XVI	GACACCCATGACCATCAC	95°C, 5 min	D: 95°C, 35 s H: 57°C, 35 s E: 72°C, 90 s	34	72°C, 10 min
XV-t-XVI Δ *ssu1*	p1031 161208-161227 Chr XV	CATGTTAGGGAGACCAACGA	p1032 373687-373707 Chr XVI	GGGGAAAGCTGTAATTTGTGT	95°C, 5 min	D: 95°C, 35 s H: 55°C, 35 s E: 72°C, 90 s	34	72°C, 10 min

Pour séparer les chromosomes, la préparation de plug contenant des levures lysées dont les chromosomes sont prêts à migrer est nécessaire. La technique utilisée est un dérivé de celle proposée par Bellis (1987).

Après croissance sur une nuit dans du milieu YPD liquide, les levures sont centrifugées et lavées deux fois dans un tampon EDTA 0,05M, pH 8,5 puis ajustées à la concentration de 1.10^9 cellules/ml. De l'agarose à 1% (55°C) est alors ajoutée à la suspension pour obtenir une concentration finale en agarose de 0,5%. Le mélange encore chaud est alors coulé dans des moules puis les blocs ainsi obtenus sont placés dans un tampon de lyse (NaCl 0,5M ; EDTA 0,25M ; Tris HCl 0,125M ; Beta-Me 0,5M) et laissé 6h-18h à 37°C .Le tampon de lyse est ensuite remplacé par un tampon pronase (Pronase E de *Streptomyces griseus* 1mg/1mL ; Sacarosyl 1% ; EDTA 0,45M) pendant 72h à 42°C. Finalement, les plugs sont lavés 4 fois 30 minutes dans du TE à 50°C puis 4 fois 30 minutes à T°C ambiante.

Les « plugs » sont alors déposés dans un gel d'agarose spécial (Pulse Field Certified Agarose, Biorad) de 300ml à 0,8%, dissous dans du TBE. Le gel avec les plugs migre dans une cuve CHEF-DR® III Variable Angle System (Biorad, USA) dans 2L du même tampon TBE 0,5X. La migration dure 27h, 200V ; 60s pendant 16h puis 200V ; 105s pendant 9h. Le gel est coloré pendant 1h dans du tampon TBE avec 0,7µg/mL de BET puis visualisé avec le système Ingenius 3.

5. Séquençage

Deux techniques ont été utilisées dans cette étude :

Séquence par la méthode de Sanger (Sanger *et al.* 1977) chez GATC (Hanovre, Allemagne) : les portions d'ADN génomique de 1000 bp à séquencer sont amplifiées par PCR. Un échantillon de 100µL à une concentration de 50ng/µL est envoyé ainsi que les amorces.

Séquençage des génomes par la technique Illumina : une extraction d'ADN génomique est réalisée sur une culture de levures en YPD liquide de 100ml avec le kit genomic tip-100 (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les séquences ont été préparées selon le protocole du fournisseur (Genomic DNA Sample Preparation) par la plateforme de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux. Le séquençage a été réalisé sur un Illumina Genome Analyzer IIx (Illumina, CA) avec une lecture de 54pb. Le génome séquencé a ensuite été cartographié sur le génome de référence en utilisant le programme Stampy.

La détection de SNP ou d'INDEL a été faite en fonction de l'alignement, de la couverture des lectures en utilisant les programmes *mpileup* et *vcftools*. L'impact des SNP sur les protéines a été déterminé par le programme snpEff.

6. Extraction d'ARN et préparation d'ADNc

Afin de déterminer les niveaux d'expression des gènes d'intérêt, les ARN totaux sont extraits puis transformés en ADNc en vue d'une PCR en temps réel. Pour ce faire, le protocole suivant a été utilisé.

L'eau utilisée est traitée au DEPC (Sigma, USA) : 1ml de DEPC est ajouté à 1L d'eau Milli-Q puis est laissé agiter une nuit sous la hotte pour être autoclavé 15 min à 120°C le lendemain.

Après croissance des levures pendant 24h dans un milieu YPD liquide, 10 ml de suspension sont centrifugés 15 minutes à 5000 rpm à 4°C. Les culots sont lavés à l'eau DEPC et repris dans 1 ml de Tri Reagent (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) puis passés deux fois au Fastprep-24 (MP Biomedical, Santa Ana, California, USA) pendant 45s, vitesse 6,5 m/s avec un passage alterné dans la glace pendant 2 minutes. Une étape de centrifugation à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C est faite puis le surnageant est repris dans 300 µl de chloroforme et passé au vortex 10 seconde avant d'être de nouveau centrifugé à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est repris dans 500 µl d'éthanol absolu froid et laissé au moins 30 minutes à -20°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à 1300O rpm pendant 5 minutes à 4°C et deux lavages à l'éthanol 75% (dilué dans de l'eau DEPC) sont faits. Le culot a été séché à l'air libre 15 minutes avant d'être repris dans 20 µl d'eau DEPC.

Avant de préparer les ADNc à partir de cette extraction d'ARN, il est nécessaire d'éliminer toute trace d'ADN. Pour cette étape, le kit DNA-free™ (Invitrogen, USA) est utilisé. Ce kit permet d'éliminer toutes traces d'ADN via l'utilisation de la DNAse I dans un échantillon contenant jusqu'à 5µg d'ARN.

Pour visualiser le bon déroulement de l'extraction, une observation par électrophorèse des ARN est réalisée. La migration est faite avec un gel d'agarose à 1,5%

Tableau 6. PCR en temps réel.
Amorces et cycles utilisés pour la Q-PCR. Les nucléotides en rouge sont les modifications apportées à ceux de Teste *et al.* (2009).

	Amorces		**Cycles PCR**			
Nom du gène	Séquence Sens	Séquence Anti-sens	Dénaturation	Cycle	Nombre de cycles	Melt curve
SSU1	TTTGCGTTTGTTGGTCAATTCTATGCCTTTTA	TCCACGCTTTCAATGCTGTTATACGGAGAA	95°C, 3 min	D: 95°C, 10 s H: 58°C, 30 s E: 72°C, 30 s	40	36 cycles de 10 s. Départ à 65°C et augmentation de 0,5°C à chaque cycle.
ACT1	TACCGGCCAAATCGATTCTC	CACTGGTATTGTTTTGGATACC		D: 95°C, 10 s H: 58°C, 30 s E: 72°C, 30 s		
ALG9	CACGGATAGTGGCTTTGGTGAACAATTAC	TATGATTATCTGGCAGCAGGAAAGAACTTGGG		D: 95°C, 10 s H: 64°C, 30 s E: 72°C, 30 s		
TAF10	ATATTCCAGGATCAGGTCTTCCGTAGC	GTAGTCTTCTCATTCTGTTGATGTTGTTGTTG		D: 95°C, 10 s H: 64°C, 30 s E: 72°C, 30 s		

dissous dans du TBE 1X à 50V pendant 1h. Le mix de charge diffère de celui réalisé pour l'ADN. Il est composé de 10µL de Formamide (QBiogene, USA), 4µL de Formaldéhyde (ACROS, USA) et de 1 ou 2µL d'extraction d'ARN, le tout dénéturé pendant 10 min à 65°C puis refroidi 1 min dans la glace. Un témoin négatif ayant été traité à la RNAse est également effectué.

La préparation des ADNc est effectuée avec le kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-rad, USA) selon les instrutions du fabricant.

7. PCR en temps réel

La PCR en temps réel (qPCR) permet de suivre la quantité d'ADN présente dans le tube de réaction à tout instant grâce à la fixation de sonde fluorescente sur l'ADN double brin.

La qPCR est réalisée à l'aide du kit IQ SYBR Green Super mix (Bio-Rad, USA). Ce kit est composé d'un tampon de réaction (KCl 100mM, Tris-HCl 40mM, pH = 8,4), des désoxyribonucléotides (400µM chacun), une iTaq DNA polymerase, du $MgCl_2$ (6mM) du SYBR Green et de fluoréscéine (20nM). La PCR est réalisée dans un volume final de 25µL contenant 0,01µM de chaque amorce, 50ng d'ADN et 12,5µL du mix. Un iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, CA) a été utilisé pour réaliser les PCR.

Pour quantifier correctement l'expression d'un gène il est nécessaire d'utiliser des gènes de références dont l'expression ne varie pas. Pour ce faire, *ACT1*, *ALG9* et TAF10 ont été choisis (Teste *et al.* 2009) (Divol *et al.* 2006) (Tableau 6).

Les efficacités de PCR ont été de 80,2%, 89,7% et 88,7% pour *SSU1*, *ACT1* et *ALG9*. Une courbe standard a été déterminée pour chaque gène ou X est le nombre de cycle et Y est le log de la valeur de la quantité de départ (en ng) : *SSU1* ($y=-3.90x + 21.44$, $R^2= 0.995$); *ACT1* ($y=-3.62x + 22.44$, $R^2=0.985$); *ALG9* ($y=-3.65 + 23.81$, $R^2=0.994$). Ces courbes ont été obtenues à partir de 8 points réalisés en triplicata et la linéarité a été observée pour des quantités d'ADN allant de 0,0366 ng à 183 ng. La valeur de Ct pour la fluorescence a été déterminée de façon manuelle pour tous les échantillons pour conserver la même valeur pour toutes les manipulations.

8. Transformation génétique de levures

La transformation génétique des levures permet d'intégrer dans une souche de levure un fragment d'ADN. Les premières transformations de levures avec de l'ADN exogène datent de la fin des années 70 (Hinnen *et al.* 1978 ; Beggs 1978).

Le protocole utilisé est dérivé de celui de Gietz (2006). Un Erlenmeyer d'YPD liquide est ensemencé pour obtenir une DO comprise entre 0,6 et 1. Le milieu est centrifugé à 4°C pendant 5 minutes à 3000 rpm puis les cellules sont lavées au TE 1X/LiAc 1X (TE 10X = Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M, pH 7,5. LiAc 10X = 1M). Les levures sont ressuspendues dans un volume de TE/LiAc permettant d'obtenir une concentration finale de 2.10^9 cellules/ml et incubées 15 min à 30°C sans agitation. Pour chaque transformation le mélange suivant est préparé:

- 240µL de PEG (50% p/v de PEG 3350 ou 3500 à diluer dans l'eau et autoclavé)
- 36µL de LiAc
- 50µL de « carrier DNA » (Sigma, USA) (Concentration finale = 2mg/ml), 5min à 95°C puis dans la glace
- 3,6µL de DMSO

2µg (Pour un volume maximum de 30,4µL) d'ADN sont ajoutés au mix ainsi que 50µl de suspension cellulaire. La suspension est incubée 30 min à 30°C sans agitation avant de provoquer un choc thermique de 40 min à 42°C. La suspension est alors centrifugée 30s à 13000 rpm et les levures remises en suspension avec 1mL d'YPD. Une étape d'expression est effectuée en incubant 4h à 30°C avant d'étaler 200µL sur un milieu sélectif contenant un antibiotique identique à celui de la casette de résistance utilisée.

9. Production de levures sèches actives

a. Propagation des levures

Les fermentations en chais ont été réalisées dans des barriques bordelaises de 225L et nécessitent des quantités de levures importantes pour être inoculées. Pour obtenir les quantités de levures souhaitées, une production est nécessaire. Un fermenteur Bioflo® 110 (New Brunswick Scientific Co., Inc Edison, New Jersey, USA) de 7,5 L a été utilisé. Ce dernier est relié à un contrôleur qui permet de surveiller les différents paramètres (pH, température, pression d'oxygène) et de les ajuster à la consigne.

Une pré-culture en milieu synthétique (Glucose 50 g/L ; KH_2PO_4 7 g/L ; $CaCl_2,H_2O$ 0.25 g/L ; NaCl 0.5 g/L ; $MgCl_2,6H_2O$ 6 g/L ; Extrait de levure 5.5 g/L ; $(NH_4)_2SO_4$ 15 g/L) est réalisée durant 24h à 24°C sous agitation magnétique à 300 rpm. Le milieu de culture synthétique (Glucose 50 g/L ; KH_2PO_4 7 g/L ; $CaCl_2,H_2O$ 0.25 g/L ; NaCl 0.5 g/L ; $MgCl_2,6H_2O$ 6 g/L ; Extrait de levure 8 g/L ; $(NH_4)_2SO_4$ 37,5 g/L de sulfate d'ammonium est autoclavé à part pour éviter les réactions de Maillard) contenue dans le fermenteur est complémentée avec une solution de vitamines (Biotine 3,3 mg/L ; Panthoténate 43,5 mg/L ; Inositol 271mg/L ; Thiamine 108,7 mg/L ; Pyridoxine 54,3 mg/L, la solution est stérilisée par filration) et une solution de minéraux ($FeSO_4,7H_2O$ 604,3 mg/L; $ZnSO_4,7H_2O$ 626 mg/L; $CuSO_4$,16,3 mg/L; Na_2MoO_4,H_2O 54,3 mg/L; $CoCl_2,6H_2O$ 53 mg/L; $MnSO_4,H_2O$ 367 mg/L, quelques gouttes d' H_2SO_4 pour stabiliser le milieu) et la pré-culture réalisée la veille. Une croissance de 24h, à 30°C, à pH = 5 et sous une pression d'oxygène de 20% est effectuée. Le pH est régulé avec de la soude 2N.

Un batch de milieu synthétique (Glucose 148 g/L ; KH_2PO_4 20,72 g/L ; $CaCl_2,H_2O$ 0,74 g/L ; NaCl 1,48 g/L ; $MgCl_2,6H_2O$ 17,76 g/L ; Extrait de levure 0,8 g/L ; $(NH_4)_2SO_4$ 44,4 g/L le sulfate d'ammonium est autoclavé à part pour éviter les réactions de Maillard), est ajouté sur 20h. Le pH est cette fois ci régulé par du NH_3 à 20%. Les levures sont laissées 2h sans alimentation afin d'augmenter l'accumulation de tréhalose dans les cellules pour les protéger lors du séchage. Le milieu est soutiré et une estimation de la concentration et de la viabilité est effectuée par cytométrie en flux ainsi qu'un dépôt sur boîte en vue d'un contrôle d'implantation. Un 2ème batch est réalisé puis soutiré dans des conditions identiques. Les deux batchs sont centrifugés à 5000 rpm pendant 10 min et les culots remis en suspension dans le minimum d'eau physiologique (NaCl 9 g/L) afin d'obtenir une crème.

b. Séchage des levures

Une estimation du pourcentage de matière sèche de la crème précédemment obtenue est réalisée à l'aide d'un dessiccateur. Du sorbitan de monostéarate est ajouté à la crème à 6% de la matière sèche. Ce dernier va jouer un rôle de protecteur pour les levures lors du séchage. La crème de levure est passée dans un atomiseur de séchage B-290 (BUCHI, Suisse) pour récupérer au final des LSA.

Une détermination de la concentration et de la viabilité est effectuée en réhydratant 1 g de LSA dans 100 mL d'une solution de saccharose à 5% dans l'eau à 37 °C pendant environ 30 minutes. La suspension est alors soniquée pendant 15 min à 35 kHz. Une gamme de dilution est effectuée, suivi d'un dépôt stérile sur YPD et d'une incubation de 2 jours à 24°C. Un comptage est réalisé pour déterminer la concentration et la viabilité d'1g de LSA.

10. Analyse des échantillons en laboratoire

a. Sucres, alcool, acidité volatile, dioxyde de soufre

Les échantillons à traiter sont envoyés à analyser directement en fin de fermentation ou congelés à -20°C (sauf pour le SO_2) au laboratoire SARCO (11 Rue Aristide Berges, 33270 Floirac), accrédité COFRAC (comité français d'accréditation) depuis 1995 (programme 78, acréditation N°1-0588).

Le dosage des sucres réducteurs résiduels est réalisé par colorimétrie en flux continu (Sanimat, Motauban, France).

Le titre alcoométrique volumique (TAV % vol) est mesuré par transflexion dans le proche infrarouge (1000 à 2700 nm) (Spectra Alyser, Axflow, France). La transflexion réunit deux techniques d'analyse : la transmission et la réflexion. Pour le dosage de l'alcool, quatre longueurs d'ondes sont utilisées et sélectionnées par 4 filtres.

L'acidité volatile (AV) est constituée par la partie des acides gras appartenant à la série acétique qui se trouve dans les vins soit à l'état libre, soit à l'état salifié. Les acides concernés sont principalement l'acide acétique (95%), formique, propionique et butyrique. L'acidité volatile est déterminée chimiquement après distillation par une méthode colorimétrique (absorption à 460 nm) à l'aide d'un appareil à flux continu (Sanimat, Montauban, France) et exprimé en g/L dH_2SO_4.

Le dosage du dioxyde de soufre total et libre est également effectué par dosage colorimétrique en flux continu (Sanimat, Montauban, France).

b. Thiols volatiles

Le dosage des thiols volatiles 3SH (3-sulfanylhexan-1-ol), A3SH (acétate de 3-sulfanylhexyl) et 4MSP (4-méthyl-4sulfanylpentan-2-one) est effectué par le laboratoire SARCO. La méthode utilisée est une version modifiée de celle mise au point par

Tominaga (2000). Après extraction, les échantillons sont injectés dans un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (Hawlett-Packard 5890-II). L'analyse en chromatographie est effectuée sur une colonne BP20 (SGE, 60 m x 0,25 mm, 0,25 µm).

11. Dégustations

Les dégustations sont faites sous forme de test triangulaire. Cette méthodologie permet de mettre en évidence des différences perçues par les consommateurs entre deux produits alimentaires à priori identiques. Trois produits sont présentés au dégustateur en lui indiquant que 2 sont identiques et qu'il doit obligatoirement indiquer un produit différent même s'il ne perçoit aucune différence notable. Des verres noirs sont utilisés lors de la dégustation pour éviter toute perception autre que celle organoleptique.

12. Analyses statistiques

Les tests statistiques classiquement utilisés pour l'analyse de résultat (analyse de variance à un ou plusieurs facteurs, Test de Student, Test de Duncan ou Test de Wilcoxon-Mann-Whithney (Au moins 5 répétitions indépendantes) ont été réalisés avec le tableur Excel (Microsoft, USA) ou avec le logiciel R-software (www.R.project.com) après avoir vérifié la normalité de distribution des résidus par le test de Shapiro-Wilk et l'homogénéité des variances avec le test de Levene (R's car package v 2.15.1). Le test de Duncan a lui été réalisé avec le package agricolae. Le traitement des résultats de dégustation est fondé sur la loi binomiale (1/3) (Norme NF V09-013).

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

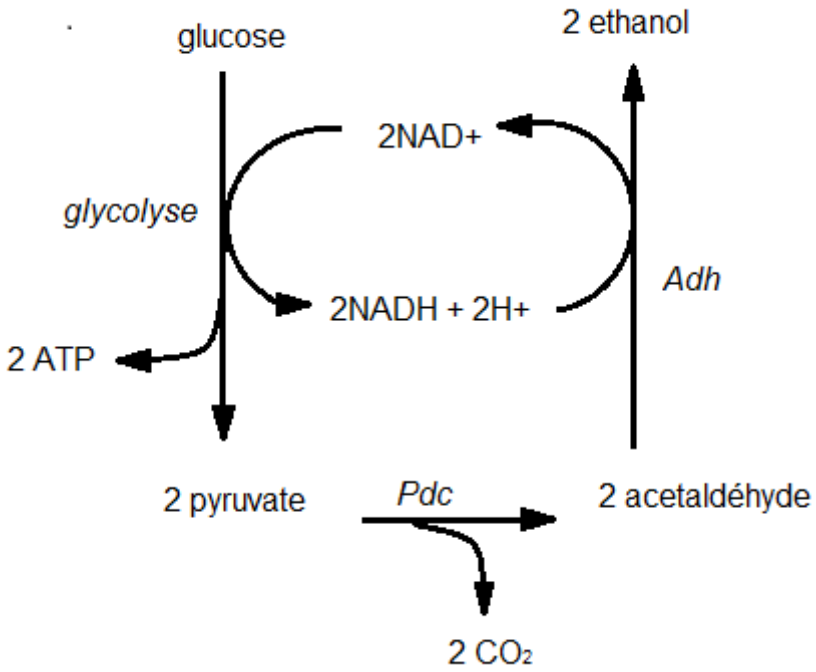


Figure 1. Fermentation alcoolique.
Représentation schématique de la transformation biochimique du glucose en éthanol. *Pdc* = Puruvate décarboxylase, *Adh* = Alcool Déshydrogénage

Contexte Bibliographique

1. Le rôle de la fermentation alcoolique dans la vinification

La fermentation alcoolique est une étape essentielle de la vinification. Elle consiste à transformer le moût de raisin en vin sous l'action de levures. Sur le plan biochimique, la fermentation alcoolique est réalisée par l'action des levures qui métabolisent le glucose et le fructose pour former du pyruvate via la glycolyse. Le pyruvate est alors décarboxylé par la pyruvate décarboxylase pour former de l'acétaldéhyde. La décarboxylation du pyruvate par la voie oxydative du cycle de Krebs est en effet impossible à cause de la très forte teneur en sucre du jus de raisin et de la très faible concentration en oxygène dissous. L'acétaldéhyde produit est alors réduit en éthanol ce qui permet de régénérer le cofacteur NADH en NAD^+ (Remize *et al.* 2000). Le bilan simple de cette réaction est présenté dans la Figure 1.

Au-delà de cette simple réaction biochimique, la fermentation alcoolique est un processus complexe qui va profondément modifier la structure chimique du jus de raisin pour le transformer en vin. « Le vin, c'est la révélation du caractère caché du fruit. » disait Emile Peynaud. Le métabolisme secondaire des levures contribue en grande partie à cette transformation, en libérant de nombreuses molécules volatiles ayant des propriétés sensorielles (Marullo *et al.* 2010). Des études métaboliques et génétiques ont permis d'élucider les principales fonctions enzymatiques et les gènes impliqués dans la production de composés secondaires dans un contexte œnologique. De manière non-exhaustive, nous pouvons citer des travaux portant sur la production de glycérol et d'acide acétique (Remize *et al.* 1999; Michnick *et al.* 1997; Delfini and Costa 1993), de composés soufrés légers (Jiranek *et al.* 1995b; Lavigne *et al.* 1998), d'arômes fermentaires tels que les esters et les alcools supérieurs (Swiegers *et al.* 2006) ou d'arômes variétaux tels que les thiols volatils (Tominaga, Murat, and Dubourdieu 1998; Murat *et al.* 2001; K. S. Howell *et al.* 2005; Thibon *et al.* 2008) et les molécules terpéniques (Darriet *et al.* 2013; Zoecklein *et al.* 1997; Fernández-González *et al.* 2003a). L'étude du métabolisme des levures a surtout été réalisée pendant les phases actives de la fermentation alcoolique. Cependant d'autres étapes de la vinification impliquant les levures peuvent avoir un rôle important sur la qualité du produit final. Il s'agit d'une part de la phase pré-fermentaire et d'autre part de l'élevage sur lies en fin de fermentation alcoolique.

Dans cet exposé bibliographique, nous nous intéresserons essentiellement à la phase pré-fermentaire, à son rôle dans la modulation de la qualité des vins et au développement microbiologique qui s'y produit.

2. La phase pré-fermentaire

Avant le commencement de la fermentation alcoolique, le moût, dans lequel se trouvent les levures indigènes ou inoculées, présente une période qui peut être définie comme une phase pré-fermentaire. Pendant cette période, les levures ne dégagent pas des quantités visibles de CO_2, soit parce qu'elles sont peu nombreuses, soit parce qu'elles marquent une phase d'adaptation au milieu. C'est le cas des levures sèches actives qui passent d'un métabolisme respiratoire à un métabolisme fermentaire (Rossignol *et al.* 2006).

Cette période a été empiriquement mise à profit par les vinificateurs pour améliorer la qualité organoleptique du produit final. En effet, par différents procédés détaillés dans cette partie, il est possible d'allonger la phase pré-fermentaire et de modifier la composition chimique et microbiologique des moûts. Les techniques pré-fermentaires consistent à laisser macérer tous les éléments du raisin (pulpe, pépins, pellicules voire parfois rafles) dans le jus et sont pratiquées dès la vendange foulée et sulfitée si besoin, juste avant le démarrage de la fermentation alcoolique. Ces techniques permettent d'améliorer la couleur et la structure des vins rouges (Gómez-Míguez *et al.* 2007). Pour les vins blancs, elles permettent d'en améliorer le profil aromatique (Dubourdieu *et al.* 1986a). Ces macérations permettent également d'enrichir le jus de raisin en composées contenus dans la pellicule. Plusieurs études ont montré une augmentation de la concentration en tanins (Llaudy *et al.* 2008) ou en procyanidines (Ricardo-da-Silva *et al.* 1993) lors des macérations pré-fermentaires. Le chapitre qui suit détaille les différentes approches technologiques utilisées dans la pratique.

a. Macération pré-fermentaire (MPF) à froid des vins rouges

Cette macération en phase aqueuse sans alcool dure 5 à 15 jours et permet la diffusion de certains composés hydrosolubles du raisin : pigments, tanins via la dégradation enzymatique de la pulpe et de la pellicule de la baie éraflée et foulée (Gómez-Míguez *et al.* 2007; Gordillo *et al.* 2010). Les vins sont ainsi plus colorés (Blouin and Peynaud 2001).

Durant cette macération, en absence de développement de *Saccharomyces cerevisiae*, apparait le risque de proliferation de micro-organismes non désirables pour la fermentation. Ces micro-organimses sont à l'origine de composés qui altéreront les qualités organoleptiques de vin. Pour éviter de telles alétrations microbiologiques et retarder au maximum le développement de la flore indigène, la vendange est généralement traitée par ajout de sulfites (3 à 6g/hL) et ensemencée avec des levures commerciales. La température est maintenue aux alentours de 10°C par injection de CO_2 liquide ou de carboglace pour refroidir la vendange puis est maintenue par un groupe de froid.

b. Macération carbonique des vins rouges

Cette technique exploite le phénomène de fermentation intracellulaire qui se produit sous la seule action des enzymes contenues dans la baie de raisin. Pour cela, le fruit doit rester intact. Les vendanges doivent donc être effectuées à la main, les baies ni foulées ni éraflées sont placées dans des cuves saturées en CO_2 pendant 8 à 15 jours entre 20 et 30°C. L'apport de CO_2 est réalisé le plus souvent sous forme de glace carbonique. De plus, afin d'éviter l'écrasement des baies sous leur propre poids, ce type de macération ne peut s'effectuer qu'en petit volume.

Afin d'éviter les risques de développement microbiologique, les précautions utilisées pour la MPF sont également mises en place. (i) Le sulfitage de la vendange entre 2 et 8 g/hL. (ii) Le levurage en fond de cuve, à pratiquer 12h après le sulfitage pour éviter l'apparition d'odeurs de réduction.

La macération carbonique permet d'obtenir des moûts plus riches en composés azotés et ainsi diminuer les risques d'arrêt de fermentation (Peynaud and Guimberteau 1962). Il en résulte des vins moins acides, qui développent un arôme caractéristique de cette macération.

c. Macération sulfitique

Cette méthode de macération est appliquée aux vins rouges. Elle consiste à ajouter du SO_2 à une concentration comprise entre 10 et 20 g/hL dans le moût. Cette pratique bloque le départ de la fermentation alcoolique et permet l'extraction des composés phénoliques tels que les anthocyanes ou les tanins via l'effet solvant du SO_2 à de telles concentrations.

d. Macération pelliculaire

Cette technique est employée pour les vins blancs et consiste à laisser macérer les raisins dans le jus sur une période de 12 à 20h dans une cuve saturée en gaz carbonique. Pour éviter tout départ de fermentation, cette macération est réalisée entre 10 et 15°C. Cette macération doit être courte pour éviter que les composés phénoliques issus des pépins, des rafles ou des pellicules qui contribuent à l'amertume ou l'astringence (Nikolantonaki *et al.* 2010). De plus, elle permet une augmentation de la concentration en acide aminés conduisant à des fermentations plus rapides et une diminution de l'acidité totale (Dubourdieu *et al.* 1986).

e. Stabulation à froid

La stabulation à froid permet le débourbage des moûts. Après un premier débourbage à température ambiante, le moût placé en cuve thermorégulée est refroidi à 6°C pendant 4 à 6 jours. Cette opération est souvent précédée d'une macération pelliculaire de quelques heures (4 à 6h).

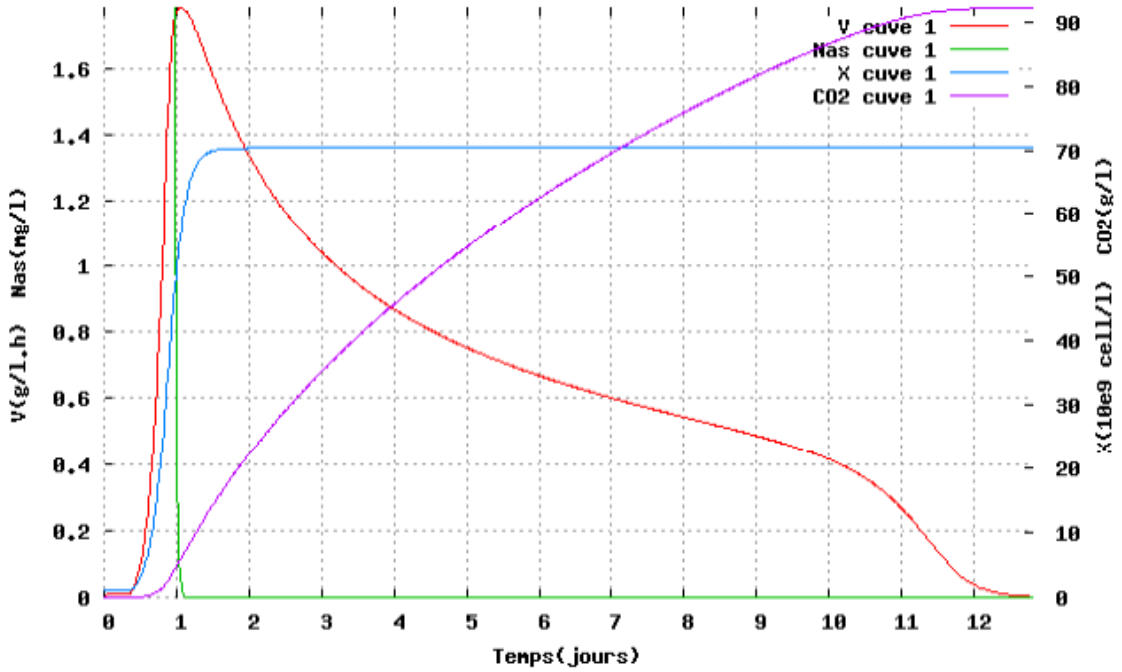


Figure 2. Cinétiques d'une fermentation alcoolique standard.
Evolution de la croissance, dégagement de CO_2, azote assimilable et de la vitesse de fermentation.
V = vitesse de fermentation, Nas = Azote assimilable, x = croissance cellulaire, CO_2= CO_2 dégagé.
(Déroulement et contrôle de la fermentation. J.M. Sablayrolles, J.M. Salmon)

3. Les différentes phases de la fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique se caractérise par la transformation du sucre en éthanol et CO_2 par les levures. Le bilan biochimique global de cette réaction est le suivant:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 + \text{Chaleur}$$

D'un point de vue métabolique, cette réaction permet au cours de la glycolyse la production de 2 molécules d'ATP par molécule de glucose. Cet ATP est la seule source d'énergie dont dispose la levure pour se développer et maintenir une activité cellulaire.

D'un point de vue cellulaire, la fermentation alcoolique s'accompagne d'un développement de la population de levures. Il est important de noter que la fermentation alcoolique n'est pas une réaction linéaire, la vitesse de celle-ci variera durant la fermenation car elle dépend à la fois de l'activité métabolique spécifique des levures et de la taille de la population de cellules vivantes. Sur le plan macroscopique, la fermentation alcoolique peut être schématisée selon la Figure 2.

Si l'on considère le développement des levures, plusieurs phases sont observables : la phase de latence, la phase de croissance et la phase stationnaire. Pour chacune de ces phases, la levure présente un état physiologique bien précis.

a. Phase de latence

La phase de la latence étudiée dans ce travail correspond à la durée observée entre le moment où un moût stérile est inoculé par les levures et le moment où un dégagement de CO_2 est mesurable. Dans la pratique cette définition a peu de sens car le moût n'est pas stérile. Cependant, bien qu'une flore indigène soit présente dans le milieu, il existe une période pendant laquelle aucun dégagement de CO_2 n'est observé. L'absence de dégagement de CO_2 peut être liée à deux phénomènes.

D'une part, les levures indigènes du moût ont une activité fermentaire mais celle-ci n'est pas visible à cause de leur trop faible population. Dans ce cas, le dégagement visible de CO_2 est précédé par une période de saturation du milieu en gaz carbonique.

D'autre part, les levures déjà présentes ou inoculées font face à une période d'acclimatation à un nouveau milieu et ne présentent pas d'activité fermentaire. Cela est particulièrement vrai pour des levures sèches actives qui passent d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme fermentaire. Dans ce cas, la levure ne se divise pas ou très peu.

D'un point de vue macroscopique, la composition du milieu ne varie presque pas à l'exception de la thiamine consommée dès les premières heures (Bataillon *et al.* 1996). Cette phase peut varier de quelques heures à plusieurs jours. Elle dépend de certains facteurs tels que la température, la présence d'inhibiteurs comme le SO_2, le taux d'inoculation ou la composition en micro-organismes sur les baies de raisin ou dans les moûts.

b. Phase de croissance

La phase de croissance succède à la phase de latence et correspond à la période durant laquelle la levure présente une croissance optimale jusqu'à l'obtention d'une population maximale comprise entre 5.10^7 et $2{,}5.10^8$ cellules/ml (Bely *et al.* 1990; Albertin *et al.* 2011) Durant cette phase, l'activité fermentaire spécifique est maximale. Cette phase correspond à une multiplication des levures entre 4 et 6 générations et est limitée par la disponibilité de l'azote assimilable (acides aminés et azote ammoniacal) (Henschke and Jiranek 1993). Lors de cette phase, l'activité métabolique intense nécessite la régulation de la température.

c. Phase stationnaire

Durant cette dernière phase, l'essentiel du sucre est fermenté. Les levures ne se multiplient plus mais leur viabilité reste généralement supérieure à 80% (Albertin *et al.* 2011). La diminution d'activité fermentaire correspond en fait à une baisse de la vitesse du transport des sucres (Salmon *et al.* 1993). Cette baisse est principalement liée à l'augmentation de la concentration en éthanol qui va altérer l'intégrité de la membrane plasmique de la levure. Durant cette phase, on observe des comportements extrêmement variables d'une souche à l'autre. Ces différences de comportements sont liées à des phénomènes de résistances divers et inter-dépendants comme la résistance à la

température (Marullo *et al.* 2009), à l'éthanol (Ansanay-Galeote *et al.* 2001; Alexandre *et al.* 2001) et à l'affinité de transport des sucres (Berthels *et al.* 2004; Guillaume *et al.* 2007).

4. Les levures d'intérêt en oenologie

La flore microbienne œnologique est un écosystème complexe caractérisé par de nombreuses espèces fongiques (champignons filamenteux et levures) et bactériennes. Au cours de la maturation de la baie de raisin, de la vinification et de l'élevage, ces différentes espèces microbiennes se succèdent et interagissent en influençant la qualité du vin. La survie et du développement éventuel de ces microorganismes intervient sur de nombreux supports comme le matériel vinaire (pompes, pressoirs, tuyaux) et les contenants œnologiques (cuves et barriques). Les substrats permettant ce développement sont le moût en fermentation et le vin.

L'inventaire microbiologique de cet écosystème a été réalisé de nombreuses fois au gré de l'évolution des techniques de biologie moléculaire (Lodder et de Ley 1970; Barnett *et al.* 2000a; Renouf 2006). Dans cette partie, nous nous attacherons à décrire très brièvement les espèces de levures intervenant au cours des phases pré-fermentaires et fermentaires en nous appuyant sur les travaux de thèse de Katharina Zott (2010) qui a réalisé un inventaire détaillé et dynamique de la flore de levure durant cette période.

a. Eléments de taxonomie

La taxonomie des champignons est basée sur deux types de classification : une première sur des tests phénotypiques (Kreger-Van Rij 1984) et une seconde sur des tests moléculaires (Barnett *et al.* 2000). Les chevauchements entre ces deux classifications sont importants et de nombreuses erreurs phylogénétiques ont été commises dans le passé. Les levures constituent une forme de vie plus qu'un phylum génétique, elles sont réparties en 81 genres comprenant 590 espèces. Seule une faible partie des levures est retrouvée dans le vin (environ une vingtaine de genres). Elles sont rattachées à l'embranchement des ascomycètes et basydiomycètes, phylum clairement établi sur des bases moléculaires (James *et al.* 2006).

Ce phylum comporte des levures sporogènes et asporogènes autrefois nommées Deutériomycètes (Ribéreau-Gayon *et al.* 2012)

b. Levures du genre *Saccharomyces*

Très peu d'espèces de levures sont capables d'effectuer la fermentation alcoolique complète du jus de raisin. Elles appartiennent toutes au genre *Saccharomyces* (P. Ribéreau-Gayon *et al.* 2012) ; l'espèce principalement rencontrée en œnologie est *Saccharomyces cerevisiae*. Cette espèce est quasiment absente sur les baies de raisin vertes, sa proportion augmente avec la maturité, la véraison marquant un changement net dans la répartition des espèces présentes (Renouf 2006). Malgré tout, *Saccharomyces cerevisiae* reste très minoritaire au moment des vendanges (Mortimer and Polsinelli 1999) et sa présence dans les chais serait liée à l'homme et non la vigne (Pretorius 2000). Entre 30% et 60% des levures *Saccharomyces cerevisiae* présentes en fin de fermentation alcoolique se trouvent déjà dans le chai avant les vendanges (Mercado *et al.* 2007).

c. Levures non-*Saccharomyces*

Les levures non-*Saccharomyces* (NS) rassemblent toutes les espèces de levures autres que les *Saccharomyces* ce qui constitue un groupe important et hétérogène de levures. Cette séparation n'a bien entendu aucun sens taxonomique mais constitue une classification couramment utilisée dans le domaine de l'œnologie. Il est important de ne pas systématiquement assimiler les levures non-*Saccharomyces* à des levures « d'altérations ». Ces levures sont majoritaires sur les baies de raisin et se retrouvent tout au long de la fermentation alcoolique (Heard and Fleet 1985; G. Fleet 2003; Zott *et al.* 2008). Lors de fermentations spontanées, c'est ce groupe qui domine durant les étapes pré-fermentaires et même au début de la fermentation alcoolique, laissant ainsi son empreinte organoleptique sur la composition finale du vin. De plus, certains travaux ont mis en évidence la présence résiduelle (10^5-10^6 UFC/ml) de levures non-*Saccharomyces* (Hierro *et al.* 2006) en fin de fermentation. Si les espèces constituant ce groupe étaient précédemment délaissées, des études récentes se sont intéressées à l'impact organoleptique de ces dernières sur le vin

Certaines d'entre elles mettent en évidence leur rôle positif dans l'élaboration des vins (Bely *et al.* 2008; Viana *et al.* 2008).

5. Eléments de bibliographie sur la phase de latence

a. La phase de latence en microbiologie

En 1949, Monod décrit la phase de latence comme un processus d'équilibre contrôlé par un mécanisme de régulation inconnu. Après soixante-dix ans de recherche cette définition est toujours d'actualité. D'un point de vue physiologique, la phase de latence est une période de transition durant laquelle les cellules s'adaptent à leur nouvel environnement avant d'entamer une croissance exponentielle. Pirt (1975) décrit 5 paramètres pouvant causer une phase de latence : (i) le changement de source de carbone, d'énergie, (ii) le changement physique d'environnement tel que la température, (iii) la présence d'inhibiteur, (iv) la germination de spores et (v) l' état physiologique de l'inoculum. Considérant les paramètres cinétiques, Buchanan et Solberg (1972) définissent la phase de latence comme le temps nécessaire pour que la taille de la population initiale augmente de deux log. Pirt (1975) considère quant à lui que la phase de latence est la période nécessaire pour que le taux de croissance atteigne sa vitesse maximale.

Les principales recherches sur la phase de latence en microbiologie ont été faites dans le cadre de l'agro-alimentaire, pour prédire par modélisation la croissance des micro-organismes non désirables (principalement les bactéries) dans cette industrie (Ross, Dalgaard, and Tienungoon 2000; McMeekin *et al.* 2002). A l'opposé, des études ont été réalisées pour optimiser la croissance des micro-organismes dans l'industrie fermentaire, comme Brejning qui a étudié l'expression génétique et protéique de *Saccharomyces cerevisiae* durant le premier stade de la fermentation alcoolique (Brejning *et al.* 2002; 2003).

Plusieurs études sur les bactéries montrent que les variations de températures (Membré *et al.* 1999) ou de pH (Cheroutre-Vialette and Lebert 2002) entre pré-culture et culture augmentent les durées des phases de latence. De plus, si ces variations sont trop importantes, la croissance peut être stoppée entraînant une nouvelle phase de latence. L'état physiologique de l'inoculum influe aussi sur la durée de la phase de latence (Augustin *et al.* 2000).

Plus récemment, des études de l'expression des gènes sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* se sont intéressées aux changements intervenant pendant la phase de latence de la fermentation alcoolique. Des approches transcriptomiques et protéomiques ont été réalisées (Brejning *et al.* 2002; 2003). Ces résultats montrent une chute considérable de l'expression génique en général durant les 20 premières minutes de la fermentation et une augmentation de l'expression des gènes liés aux fonctions de la synthèse d'ARN, des ribosomes, des translocations ou encore de la synthèse protéique. Une disparition des bourgeons sur les levures est également observée durant les 30 premières minutes qui suivent l'inoculation.

b. Facteurs influençant la phase de latence durant la fermentation alcoolique

Très peu d'études spécifiques ont été conduites sur les facteurs influençant la durée de la phase de latence chez *Saccharomyces cerevisiae* lors de la fermentation alcoolique. Lorsque les travaux ont été menés, la durée des phases de latence particulièrement courtes n'ont pas permis d'étudier en détail ce paramètre cinétique (Arroyo-López *et al.* 2009).

i. La température

La température a une influence sur l'activité fermentaire des souches de levures. D'après Ribéreau-Gayon (1975a) celle-ci double tous les dix degrés pour atteindre son maximum à 35°C avant de diminuer. Une capacité fermentaire accrue permet un départ en fermentation plus rapide et donc une diminution de la phase de latence. Il faut noter que la température optimale est variable d'une souche à l'autre (Ribéreau-Gayon *et al.* 2012). Si l'augmentation de la température permet de diminuer les phases de latence mais peut provoquer des arrêts de fermentation dus à la sensibilité des levures à des températures élevées.

ii. La concentration en sucres

La fermentation est particulièrement lente dans un milieu faiblement concentré en sucres. La vitesse de fermentation augmente jusqu'à 20g/L de sucre et se stabilise jusqu'à 200g/L de sucre. Au-delà, la vitesse de fermentation réduit. A partir de 600g/L de sucre,

celui-ci devient non fermentescible (Ribéreau-Gayon *et al.* 2012). La richesse en sucres des moûts pourrait influencer la sélection des souches qui assurent la fermentation (Fleet 1993).

iii. Les nutriments

Plusieurs vitamines sont limitantes pour la croissance des levures : l'acide nicotinique, le méso-inositol et particulièrement la biotine pour laquelle une accumulation intracellulaire est effectuée par la levure durant la phase de latence. Cette accumulation est importante car liée à la vitesse de la croissance et à la quantité de biomasse (Winter *et al.* 1989).

La Thiamine joue également un rôle particulièrement important, étant consommée dès les premières heures de la fermentation. Si *S.cerevisiae* est capable d'assimiler de la thiamine, son absence ou une concentration trop faible conduit à des fermentations lentes et pouvant s'arrêter (Bataillon *et al.* 1996).

L'azote est en général l'élement limitant des fermentations (Bely *et al.* 1990). Une concentration plus élevée en azote permettra une fermentation plus rapide.

iv. Les inhibiteurs

Le SO_2 est l'inhibiteur le plus utilisé en œnologie. Il inhibe le développement des micro-organismes, bactéries comme levures. C'est aussi un antioxydant en combinant l'oxygène dissous et un antioxydasique qui inhibe les enzymes comme la tyrosinase et même un protecteur de l'arôme des vins en se combiant à l'acétaldéhyde.

Notons également l'impact de l'ochratoxine A, une toxine produite par *Aspergillus* ou *Penicillium* et que l'on retrouve sur les baies de raisin et dans le vin (Battilani *et al.* 2006) et dont la présence allonge la durée de la phase de latence (Piotrowska *et al.*2013).

Objectif de la thèse

Durant cette thèse, un QTL précédemment détecté et associé au phénotype de la phase de la latence a été étudié au niveau moléculaire. Son impact dans différents fonds génétiques a été testé en vue d'une utilisation industrielle pour la sélection de levures. Le but est de trouver le ou les gènes responsables de ce phénotype dans ce QTL afin de comprendre les mécanismes génétiques, moléculaires et physiologiques qui régule cette phase de la fermentation alcoolique afin d'apporter une expertise aux vinificateurs pour l'élaboration de vins toujours plus qualitatifs.

Une première partie traitera de la détection et de la dissection des QTL afin d'identifier le ou les gènes responsable du phénotype étudié. Une approche par hémizygotie réciproque a été utilisée pour la validation des gènes candidats du locus. Une stratégie de fermentation en « pool » à permis de tester la pénétrance du QTL dans plusieurs fonds génétiques.

Une deuxième partie s'interessera aux mécanismes de résistance au SO_2 et aux réarrangements chromosomiques intervenant dans cette résistance suite à la mise en évidence d'une translocation via l'aide du QTL. Puis la caractérisation de cette nouvelle translocation sera faite : fréquence de celle-ci au sein de la population, impact sur l'expression génique, avantage sélectif pour la colonisation du milieu.

Finalement, une dernière partie ouvrira la voie à l'étude de l'impact de la phase de latence sur les qualités organoleptiques du vin.

CHAPITRE I

Détection et dissection d'un QTL associé à la phase de latence

Revue Bibliographique

1. Introduction aux méthodes de cartographie de QTL chez la levure

La génétique est l'étude des caractères héréditaires, de leur mode de transmission et de leur variation au sein d'une population. Elle a pour but d'établir le lien qui existe entre le génotype des individus et leur phénotype. Cette démarche adoptée pour la première fois par Johann Gregor Mendel avec l'étude du petit pois peut être appliquée à toutes les variations de caractères héritables. Si l'hérédité de certains caractères peut s'expliquer de façon simple par une relation binaire (vert/jaune, lisse/rugueux par exemple) la plupart de ses variations phénotypiques sont d'ordres quantitatifs et non qualitatifs. Ceci s'explique par le fait que plusieurs gènes ou régions d'ADN prennent part au déterminisme d'un caractère quantitatif. Plus les caractères sont complexes, plus ces gènes sont difficiles à identifier par des approches biochimiques. La génétique quantitative est une branche de la génétique qui permet de localiser grossièrement leur position dans le génome (locus) par des approches de cartographie que nous détaillerons plus loin. Historiquement on parle donc de locus et non de gènes. Les QTL (Quantitative Trait Loci) sont des régions du génome associées à un caractère quantitatif. Leur recherche constitue un des enjeux de la génétique moderne. Dans cette brève revue bibliographique, on s'attachera à décrire au lecteur les techniques généralement utilisées dans le domaine de la recherche de QTL en s'attachant particulièrement aux récentes études réalisées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Principes de bases de la cartographie de QTL

Originellement décrite par Sax (Sax 1923), la méthode de cartographie des QTL est basée sur la relation statistique qui existe entre la présence d'un marqueur génétique et la valeur d'un caractère. La cartographie de QTL nécessite donc deux prérequis indispensables : avoir à disposition une série de marqueurs génétiques, d'une part ; mesurer de manière quantitative la distribution d'un phénotype au sein d'une population d'individus, d'autre part.

a. Les marqueurs génétiques

Un marqueur génétique est une information phénotypique, biochimique ou moléculaire renseignant sur l'hérédité d'un point du génome (De Vienne *et al.* 1998). A partir des années 1990, les marqueurs moléculaires basés sur des variations de séquence d'ADN ont définitivement pris le pas sur les autres marqueurs. D'une manière générale, les techniques permettant de visualiser les polymorphismes génétiques sont en perpétuelle évolution grâce aux énormes progrès des méthodes analytiques (Falque 2011). Les approches de génotypage peuvent être divisées en deux types en fonction du nombre de locus analysés en même temps.

L'approche mono-locus permet d'étudier le génotype d'individus pour un à quelques locus en une seule réaction. L'analyse microsatellite (Hearne *et al.* 1992; Guichoux *et al.* 2011) ou la détection d'allèle par des amorces spécifiques sont les deux principales stratégies utilisées. Des techniques de multiplexage en utilisant plusieurs fluorochromes (Rudi *et al.* 2006), la réduction des volumes réactionnels et l'utilisation de la PCR quantitative permettent de réduire les coûts de génotypage d'un facteur 1 à 100. Parmi les méthodes les plus performantes citons l'utilisation de sondes TaqMan (Livak 1999) et l'approche Tm shift (Germer and Higuchi 1999) utilisées en routine pour le génotypage en parallèle de plusieurs milliers d'individus.

L'approche multi-locus grâce aux technologies les plus récentes permettent l'analyse de (très) nombreux sites simultanément. Au virage des années 2000, l'apparition des puces à ADN a permis d'envisager le génotypage d'un individu pour plusieurs milliers de marqueurs répartis sur l'ensemble de son génome. Comme souvent en génétique, la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été l'un des organismes modèles pour ce type d'étude. La technologie Affymetrix a montré son efficacité dans la détection de très nombreux SNP sur l'ensemble du génome (Winzeler 1998; Gresham 2006; Schacherer *et al.* 2009). Plus récemment, l'extraordinaire développement du séquençage par des approches de seconde génération NGS (pour *Next-Generation Sequencing*) permet de considérer les approches de génotypage multi-marqueurs d'une façon très différente. Ces techniques sont totalement étrangères aux approches de Sanger (Sanger *et al.* 1977) ou de Maxam et Gilbert (1977), apparues à la fin des années 1970. Elles ouvrent de réelles perspectives pour les applications ou un marquage ultradense du génome est utile.

La revue de Metzker (2010) présente bien ces différentes technologies. Celles ci étant en perpétuelle évolution, il est difficile de présenter ici un travail bibliographique approfondi. Citons néanmoins quelques techniques tel que le séquençage Illumina qui permet une détection des nucléotides fluorescents par fixation des échantillons sur une base solide à l'aide d'un primer, puis la formation de cluster de séquences d'ADN via une amplification par ponts (Figure 3)

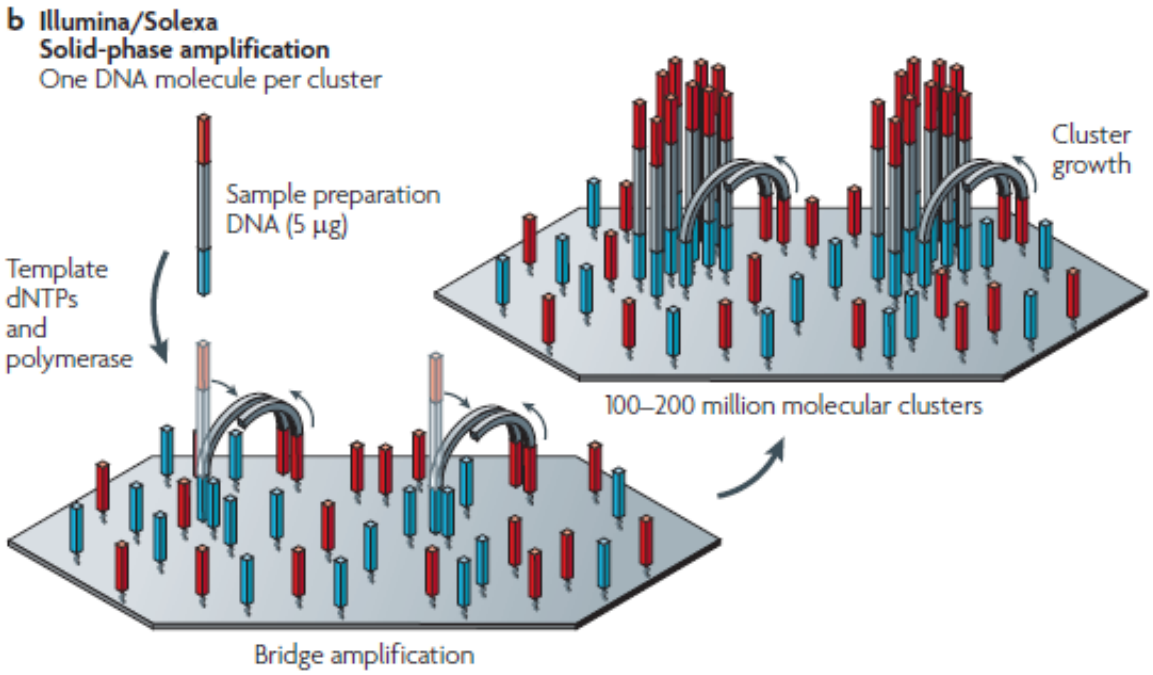


Figure 3. Séquençage illumina

Illustration de la formation des ponts de la technique de séquençage illumina (Metzker 2010)

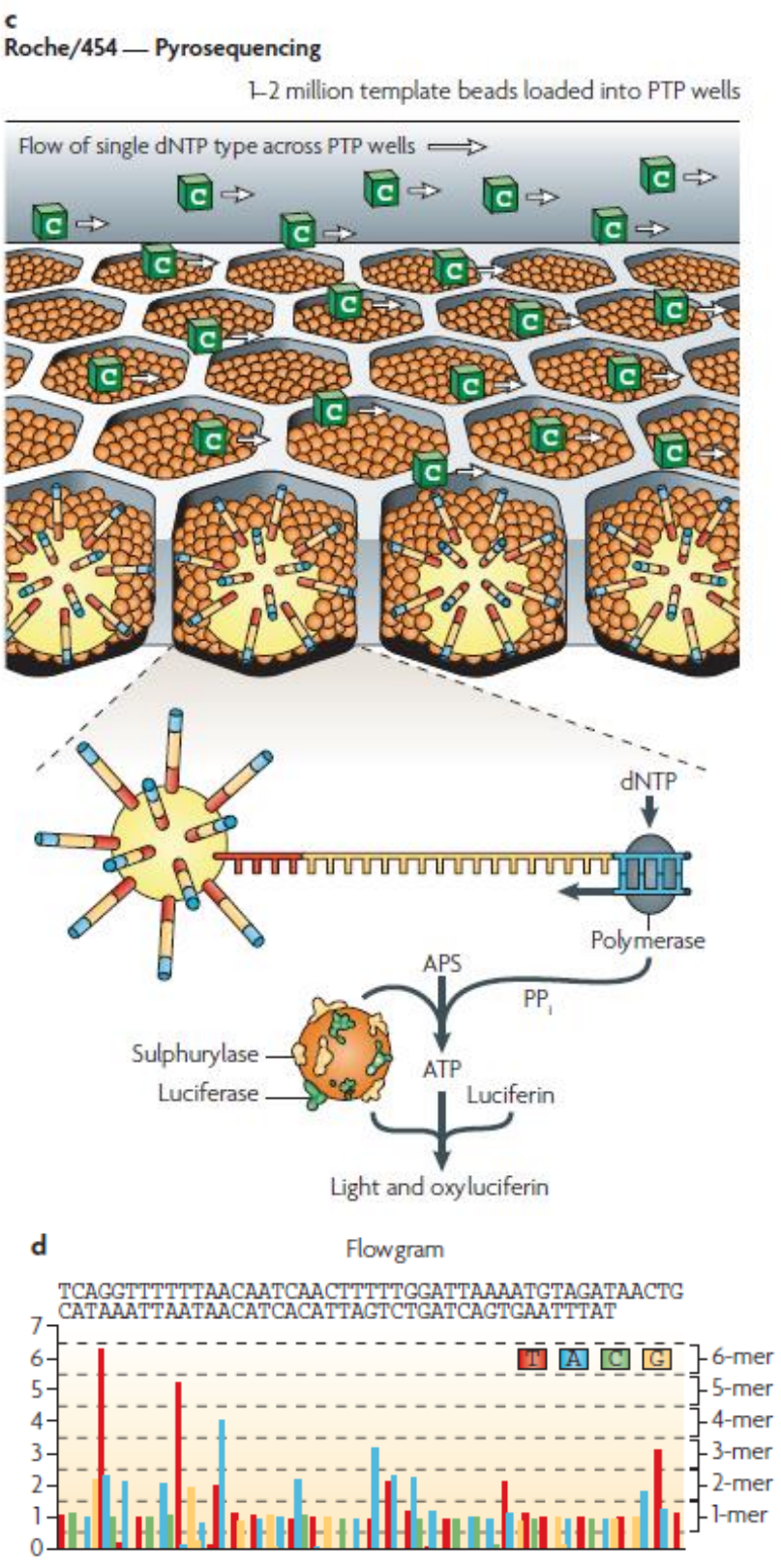


Figure 4. Le pyroséquençage et un pyrograme.
Illustration de la technique de pyrosequençage et de son pyrograme permettant la détection des dNTP (Metzker 2010)

Une autre technologie développée par la société Roche est le pyroséquençage. Cette technique utilise l'incorporation de nucléotide de manière successive contrairement aux autres techniques. A chaque cycle un seul type de nucléotide (A, C, T ou G) est introduit dans la cellule de séquençage, lorsque ce nucléotide s'hybride à la matrice d'ADN simple brin, il libère de la luciférine qui émet un signal lumineux transmis sur un pyrogramme (Figure 4). Un nouveau cycle débute avec l'ajout du dNTP suivant.

Grace à ces méthodes le coût d'un génome de levure avoisine aujourd'hui les 1000€ pour une couverture du génome de cinquante fois. Il est également possible de mélanger plusieurs génomes dans une seule réaction et de séquencer un mélange d'individus. Cette méthode de séquençage en *bulk* a été utilisée avec succès au cours des dernières années par de nombreuses équipes (Brauer *et al.* 2006; Ehrenreich *et al.* 2010 ; Cubillos *et al.* 2011; Ehrenreich *et al.* 2012 ; Liti et Louis 2012; Salinas *et al.* 2012; Yang *et al.* 2013). La recherche de QTL est alors réalisée en mélangeant les ADN d'individus extrêmes obtenus par des tests phénotypiques sélectifs. Grâce à de nouvelles techniques de multiplexage et d'indexation il est également possible d'obtenir 100 génomes à une faible couverture (5X) pour environ 10000 €. Ce type de couverture bien que trop faible pour assurer un assemblage *de novo* des génomes permet toutefois de faire du *SNP calling* avec une grande efficacité. En considérant que 30000 SNP par individus sont en moyenne détectés, le coût de génotypage par SNP avoisine dans ce cas 0,003€ ! Dans le cadre de la recherche de QTL, citons deux laboratoires de pointe qui ont pu obtenir le génotypage de plus de 1000 individus en utilisant des approches Illumina avec un haut niveau de multiplexage (Bloom *et al.* 2013; Wilkening *et al.* 2013). Ces techniques NGS représentent donc l'avenir du génotypage même si elles imposent des niveaux d'analyse bio-informatique élevés.

Dans le cadre de ce projet, j'ai bénéficié du séquençage du génome de 12 souches de levures dont les souches GN et SB. Ces souches sont les parents du croisement étudié ici nous verrons au cours des deux prochains chapitres que ce séquençage a été décisif dans la résolution de la problématique de cette thèse. Les génomes analysés ici ont été obtenus à partir d'un séquençage Illumina et assemblés de novo par l'équipe Magnome de l'INRIA.

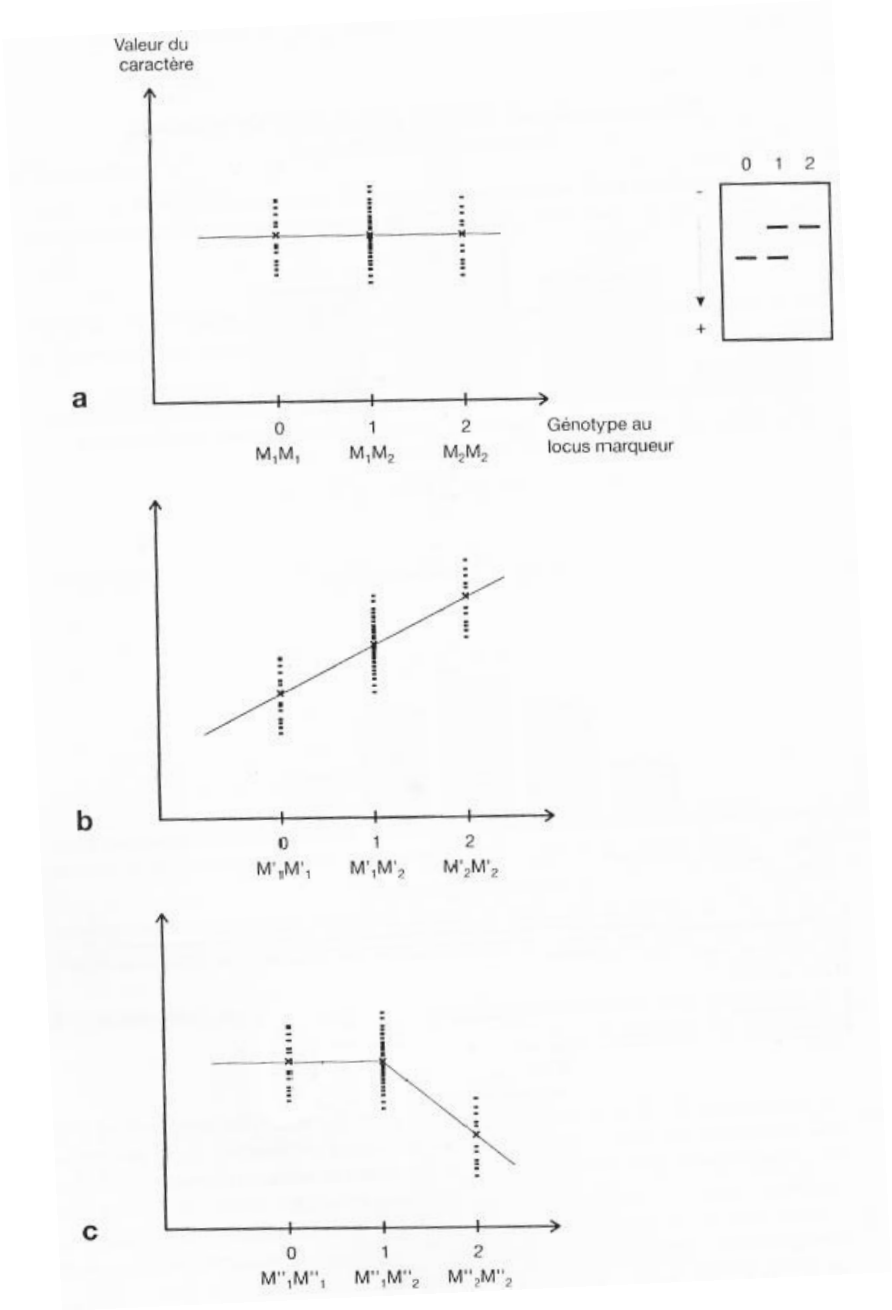


Figure 5. Mise en évidence d'un QTL.

Principe de mise en évidence d'un QTL dans une descendance F2 avec une recherche de marqueurs individuels. M, M' et M''sont 3 locus marqueurs non liés. Les indices 1 et 2 désignent les allèles. L'abscisse indique ne le nombre de doses de l'allèle M2 dans les 3 génotypes. a : pas de différence entre les moyennes. b : différence entre les moyennes avec additivité. c : différence entre les moyennes avec dominance : la moyenne des hétérozygotes est égale à la moyenne de l'homozygotes.

b. Dispositif génétique et étude phénotypique

Le second point indispensable à la cartographie de QTL s'articule autour du dispositif génétique (analyse d'un croisement ou d'une population non liée). Le plus souvent la cartographie de QTL est réalisée à partir d'individus apparentés. Cependant des études de génétique d'association (Valdar *et al.* 2006) sont également réalisées lorsque l'on étudie des organismes n'ayant pas de large descendance comme l'homme. Dans le cas le plus simple, la recherche de QTL s'effectue sur une population F2 issue d'un hybride F1 hétérozygote, cet hybride est obtenu à partir du croisement de deux parents, P1 et P2, ayant des phénotypes opposés pour le caractère étudié. Dans la plupart des cas, les distributions des phénotypes répondent à une loi normale. Il est également possible de réaliser des recherches de QTL à partir de population obtenue par backcross ce qui augmente considérablement la puissance de détection des QTL (Lander et Botstein 1989). La mesure des phénotypes dépend elle du champ d'application considéré. Des phénotypes aussi variés que la prévalence d'une maladie (Korstanje et Paigen 2002), la date de floraison (Asmono *et al.* 2000), le niveau d'expression du protéome (Foss *et al.* 2007) , ou la production d'un composé du métabolisme secondaire (Steyer *et al.* 2012) peuvent être étudiés.

c. Analyse de liaison

L'analyse de liaison consiste à établir un lien statistique entre la présence d'un marqueur à un locus donné et la variation d'un caractère. De nombreuses approches mathématiques ont été développées pour affiner la détection de QTL (De Vienne *et al.* 1998) parmi celles-ci citons la méthode d'interval mapping (Lander et Botstein 1989) ou la détection par tests non paramétriques (Kruglyak et Lander 1995).

Lorsqu'un marqueur est statistiquement lié à un paramètre quantitatif, il existe une différence de phénotypique entre les individus présentant une hérédité différente à ce locus (Figure 5). Plus la différence de valeur est importante, plus le QTL sera lié au paramètre phénotypique. Pour estimer ces différences, la moyenne ou la médiane des valeurs du paramètre d'intérêt peut être utilisée.

d. La dissection de QTL

La dissection d'un QTL a pour but d'identifier le ou les gènes responsables des variations phénotypiques. Chez les organismes eucaryotes supérieurs cette finalité est difficilement atteinte (Glazier *et al.* 2002; Maeda *et al.* 2013). Une analyse de liaison fine de nombreux marqueurs au niveau du QTL va permettre de réduire la taille du locus en cassant le déséquilibre de liaison entre le pic du locus d'intérêt et les marqueurs les plus éloignés. La taille du génome et le nombre de marqueurs utilisés influent grandement sur l'identification du ou des gènes régulant le phénotype. Une fois bornée de façon optimale, une recherche de gènes candidats est alors réalisée le plus souvent par des techniques d'interruption de gènes. En fonction de l'organisme étudié (facilité à transformer l'espèce, cycle biologique, temps de génération, niveau d'annotation du génome) ce type de validation peut prendre plusieurs années dans les cas les plus difficiles (Frary *et al.* 2000).

e. Application à la levure

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est certainement un des organismes vivants les plus adaptées à la génétique quantitative. Cette espèce présente une très forte variabilité génétique (Liti *et al.* 2009; Schacherer *et al.* 2009) au sein des souches qui la compose. Cette variabilité génétique de l'ordre d'un SNP pour 300 paires de bases constitue un réservoir allélique très important (Winzeler *et al.* 2003). De plus son génome est très compact (environ 5000 gènes pour seulement 12 Mb) et il est particulièrement bien annoté (www.yeastgenome.com). Sur le plan biologique la levure présente un cycle de vie court et permet d'obtenir un grand nombre de descendants par sporulation. Enfin la levure offre une facilité de manipulation moléculaire très importante ce qui permet de valider rapidement les QTL recherchés. Citons ici les trois techniques possibles (Ehrenreich *et al.* 2009) :

- L'analyse par hemizygotie réciproque (RHA) dans laquelle on compare des hybrides F1 issus des deux souches parentales pour lesquels un seul des deux allèles parentaux est présent. L'autre allèle ayant été éliminé par recombinaison homologue. De cette façon, il est possible d'observer l'impact des deux allèles sur

des fonds génétiques strictement isogéniques (Steinmetz *et al.* 2002). Au cours de ce travail, nous avons utilisé cette technique pour valider l'effet des gènes du QTL étudié.

- Le remplacement allélique qui consiste à remplacer un ou plusieurs allèles contenus dans une souche parentale par celui ou ceux de l'autre souche parentale. De cette manière, l'impact d'une mutation peut être clairement validé dans le fonds génétiques des deux parents (Storici *et al.* 2001). Cette approche permet par exemple de mettre en évidence des phénomènes de compensation génétique comme décrit dans (Marullo *et al.* 2007)

- Introgression : cette technique consiste à introgresser un ou plusieurs QTL issus d'une souche parentale dans une autre souche en effectuant des cycles de rétrocroisement (backcross). Ces cycles successifs permettent d'éliminer la plupart du génome de la souche donneuse et d'observer l'effet du ou des QTL dans un autre fonds génétique (Sinha *et al.* 2006 ; Marullo *et al.* 2009).

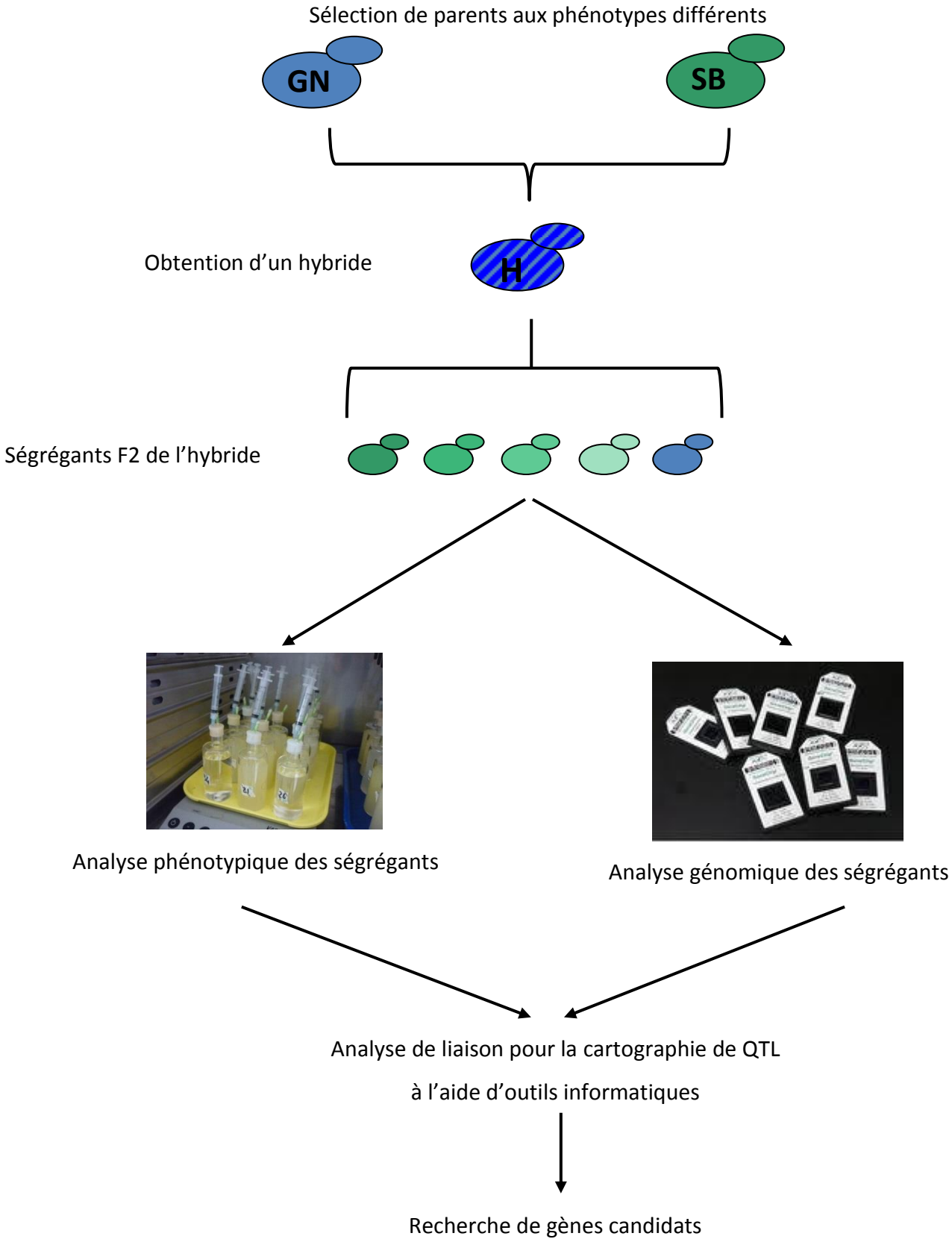


Figure 6. Détection de QTL.

Illustration de la stratégie de détection employée pour la détection du QTL lié à la phase de latence.

Résultats et discussion

Lors des précédents travaux réalisés au laboratoire, une cartographie de QTL (Marullo *et al.* 2007; Marullo *et al.* 2007) a été réalisée à partir du croisement de deux parents SB et GN présentant des caractéristiques technologiques différentes. Cette cartographie est articulée autour de 3 axes (Figure 6) :

1-Sélection de parents aux phénotypes différents

2-Utilisation de puces à ADN Affimetrix S98 (Winzeler 1998) pour obtenir différents marqueurs sur les souches parentales GN et SB et 60 ségrégants F2.

3- Analyse de liaison pour différents phénotypes œnologiques ici faite par le test de liaison statistique de Wilcoxon-Mann-Withney.

Durant ces précédents travaux, les QTL puis les gènes responsables des variations de production d'acidité volatile et de phénols volatiles ont été identifiés. En revanche, le déterminisme moléculaire d'un QTL associé à la durée de la phase de latence et à la production d'H_2S n'avait pas pu être élucidé. Le but de cette thèse était donc d'identifier le ou les gènes responsables des variations phénotypiques pour ces paramètres. Ce locus a pu être identifié sur le chromosome XV en position 166601bp (*P*-value = 4×10^{-6}).

Les objectifs à mon arrivée dans le laboratoire étaient donc de valider la pénétrance de ce locus dans différents fonds génétiques et d'identifier le ou les gènes responsables de ces variations phénotypiques par une approche de gènes candidats.

1. Description du phénotype de la phase de latence

a. Présentation du phénotype et de la méthode de travail

La mesure de la phase de latence implique de réaliser des fermentations sur du milieu synthétique ou du jus de raisin. Les levures sont préparées par un inoculum puis ensemencées à 1.10^6 cellules viables/ml après quantification de la concentration cellulaire et de la viabilité par cytométrie en flux comme indiqué dans la section Matériels et méthodes.

L'avancée de la fermentation pendant les premières heures de la FA est mesurée toutes les 2h à 6h en pesant les fermenteurs pour mesurer le dégagement de CO_2. Le suivi

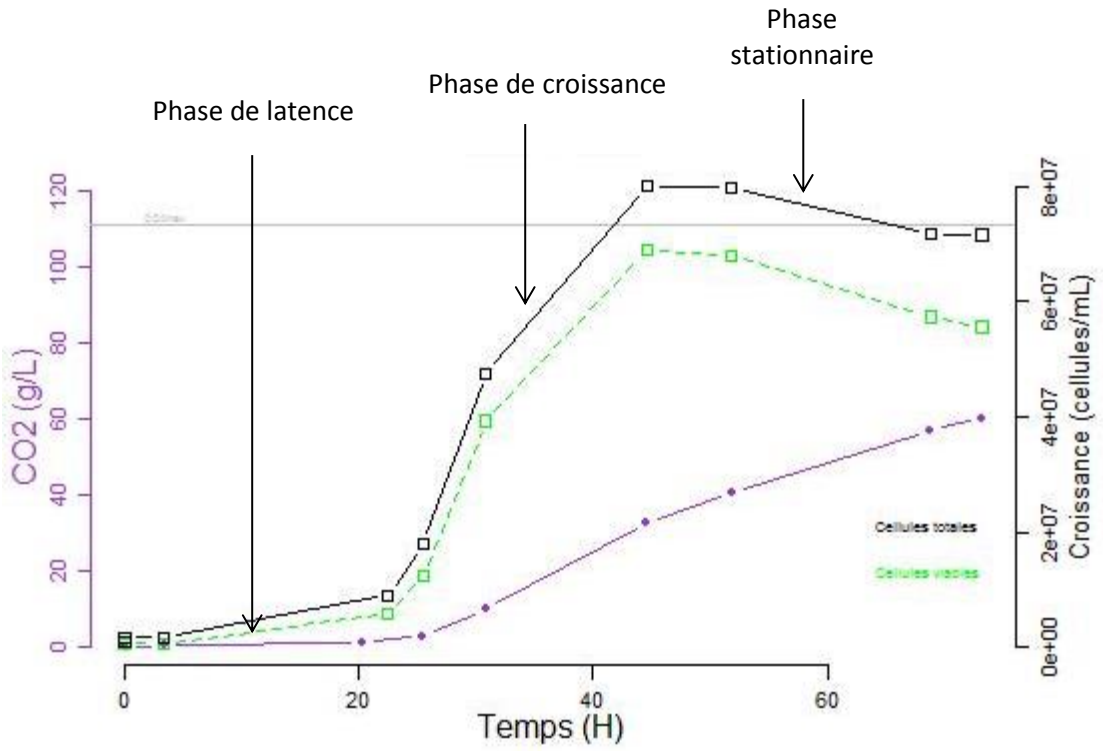


Figure 7. Croissance et CO2
Illustration des courbes obtenues pour le dégagement de CO_2 ainsi que la croissance et la viabilité au cours de la fermentation alcoolique.

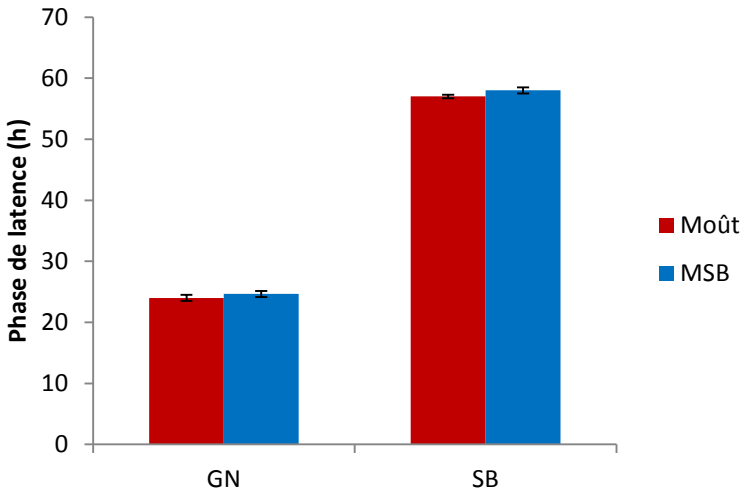


Figure 8. Validation du modèle synthétique.

Fermentation réalisées en moût naturel ou en milieu synthétique. Les données sont les moyennes et les écart-types de trois répétitions indépendantes.

de la croissance cellulaire peut être réalisé en faisant des prélèvements réguliers qui sont analysés par cytométrie en flux.

La durée de la phase de latence et le delta viabilité (Viabilité à T=0 – Viabilité la plus faible durant cette phase) pendant la phase de latence sont également mesurés. La phase de latence est le temps nécessaire pour arriver à un dégagement de 3 g/L de CO_2. Le delta de viabilité est lui obtenu en comparant la viabilité au moment de l'inoculation à la viabilité la plus faible observée durant la durée phase de latence (Figure 7).

b. Validation du modèle d'étude dans du moût

Concernant la production de sulfure d'hydrogène (H_2S), la mesure du phénotype est réalisée sur du milieu gélosé Biggy (Marullo, 2005). Bien que reproductibles dans ces conditions, les variations entre souches parentales au cours de la fermentation alcoolique n'étaient pas en adéquation avec ce test réalisé sur boîte de Petri (résultats non montrés). La faible concordance entre les résultats obtenus en condition œnologique et dans ce test nous ont conduit à ne pas étudier plus en détail ce paramètre dans un premier temps. Afin d'être sûr que le phénotype de phase de latence observée était en adéquation avec la pratique œnologique, des fermentations sur du jus de raisin ont été réalisées et comparées avec des fermentations réalisées sur milieu synthétique (Figure 8). Ces fermentations ont été réalisées en fermenteurs de 125 ml, avec 20 mg/L de SO_2 total, à 24°C. Aucune différence significative n'est observée entre les deux milieux sur la durée de la phase de latence.

c. Etude de l'impact du SO_2 sur le phénotype

En œnologie, le SO_2 est utilisé pour ses propriétés anti-microbiennes et anti-oxydantes. Au moment de la fermentation alcoolique, c'est pour préserver le moût de l'oxydation qu'il est principalement utilisé. Cependant, il peut, chez un certain nombre d'espèces microbiennes, ralentir ou inhiber leur croissance et jouer sur la durée de la phase de latence (voir bibliographie partie 2). Nous nous sommes donc intéressés à l'impact du SO_2 sur le phénotype des souches parentales.

Des fermentations en moût synthétique contenant diverses concentrations en SO_2 (0, 20 et 40 mg/L de SO_2 total) ont été réalisées dans des fermenteurs de 125 ml inoculés à 1.10^6 cellules viables/ml. Les durées de phase de latence ont été déterminées par dégagement de CO_2 (3 g/l de CO_2) mesuré par une pesée régulière des fermenteurs.

Pour le parent GN, la variation de la durée de la phase de latence est très faible malgré l'augmentation de la concentration en SO_2. La durée de la LP passe de 20h à 26h quand on passe de 0g/hl à 4g/hl de SO_2 total dans milieu. En revanche, pour le parent SB, l'impact du SO_2 sur le phénotype est important avec une phase de latence passant de 24h à 72h lorsque la concentration en SO_2 total atteint 4g/hl. Une analyse de variance confirme les différences observées montrant un effet du SO_2, un effet souche et un fort effet d'interaction (Figure 9).

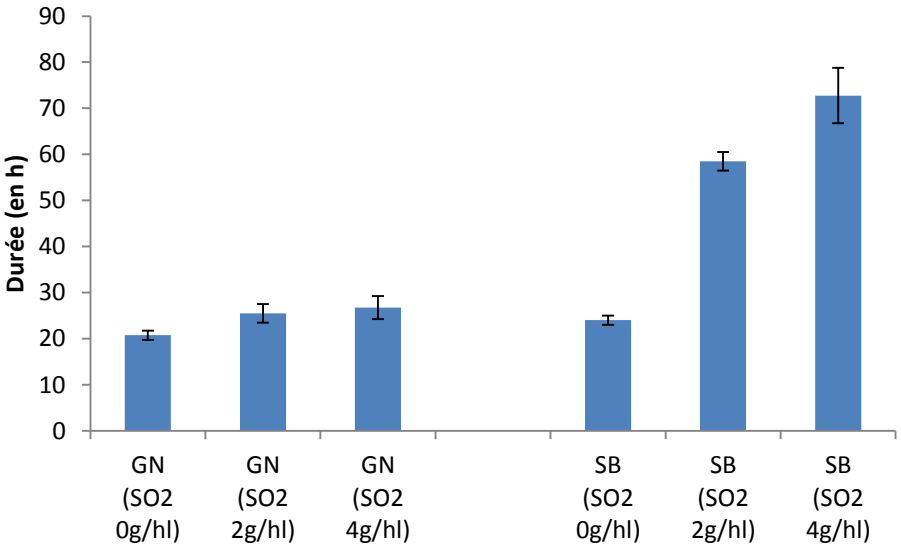


Figure 9. Phénotype des parents pour le paramètre étudié
Variation de la durée de la phase de latence en fonction de la concentration en SO_2 ajouté dans le milieu lors de la fermentation alcoolique pour les deux souches parentales utilisées dans cette étude. Les histogrammes et les écart-types sont calculés à partir de trois répétitions indépendantes.

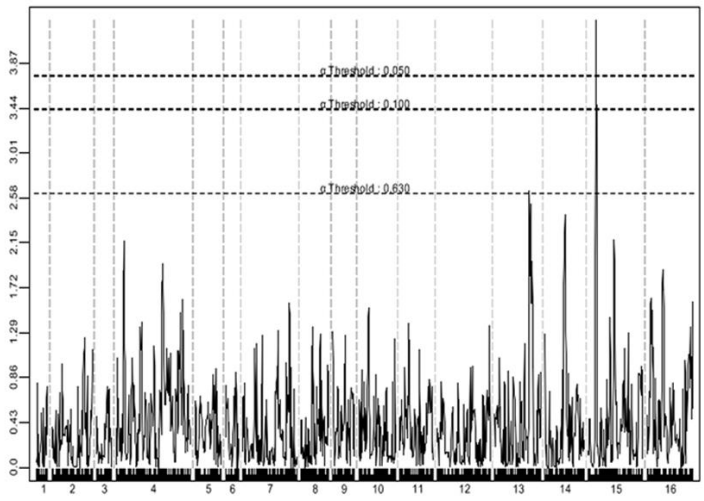


Figure 10. Analyse de liaison du QTL

Analyse de liaison pour les différents chromosomes pour le phénotype de la durée de la phase de latence montrant un pic de liaison du locus pour le gène *ATG34*.

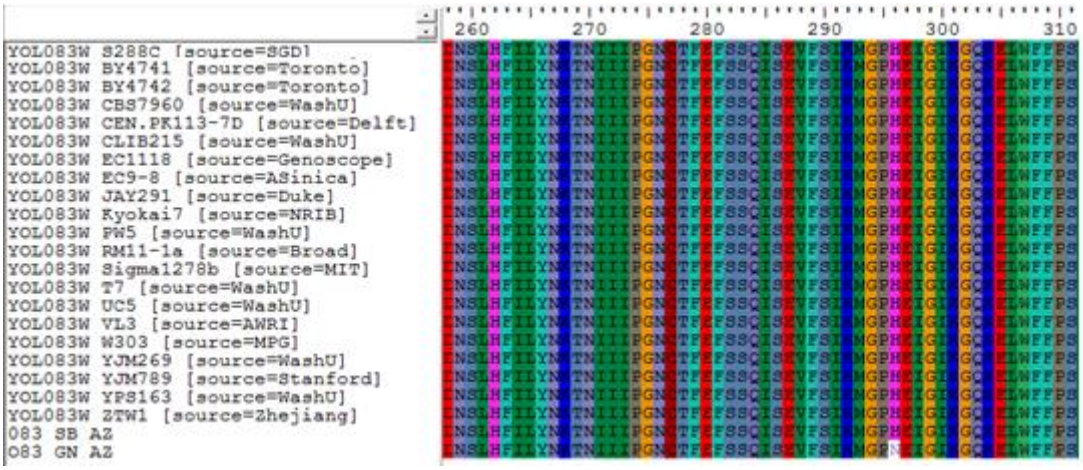


Figure 11. Mutation sur la protéine finale du gène *ATG34*

Alignement des séquences protéiques d'ATG34 de 23 souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Seule la souche GN possède une mutation.

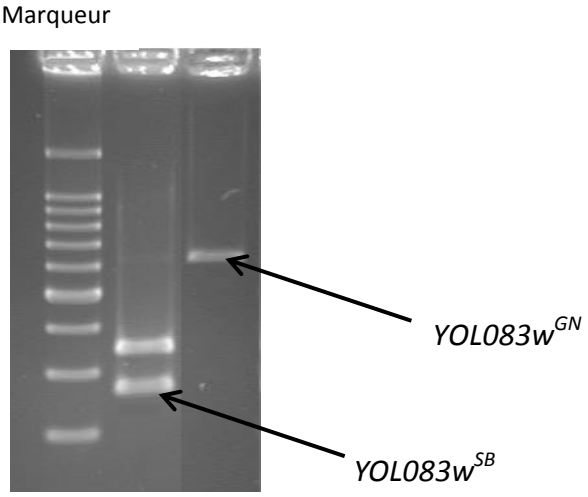


Figure 12. Profil PCR –RFLP pour *YOL083w*.

L'enzyme de restriction *Nla III*, va permettre la différenciation des deux formes alléliques du gène *YOL083w.* Celle-ci va couper l'allèle SB du gène *YOL083w* au loci. L'allèle GN, lui, restera intact.

2. Validation du QTL dans différents fonds génétiques

a. Description du marqueur *YOL083w*

L'analyse de liaison initiale réalisée au cours de la thèse de Philippe Marullo indiquait que le pic du QTL associé à la phase de latence était donné par un marqueur localisé dans le gène *ATG34* (*YOL083w*) (Figure 10). La mutation détectée par puce à ADN entraine chez la levure GN le remplacement d'une histidine par une asparagine en position 296 (H296N) de la protéine Atg34p. Lorsqu'on la recherche chez d'autres souches de levures, cette mutation présente une fréquence allélique rare 1/22 (Figure 11). Elle peut être facilement recherchée par PCR-RLFP en utilisant l'enzyme *Nla*III (Figure 12).

b. Recherche de la mutation H296N dans les souches du projet Heterosyeast

Afin de valider l'effet de ce QTL dans différents fonds génétiques, nous avons entrepris de regarder l'impact de cette mutation rare dans plusieurs souhes. Pour cela nous avons recherché par PCR RFLP chez plusieurs souches de levures utilisées au laboratoire lors d'un projet ANR sur l'hétérosis (HETEROSYEAST) (Figure 13) et comparé avec la durée de phase de latence de ces souches (Figure 14).

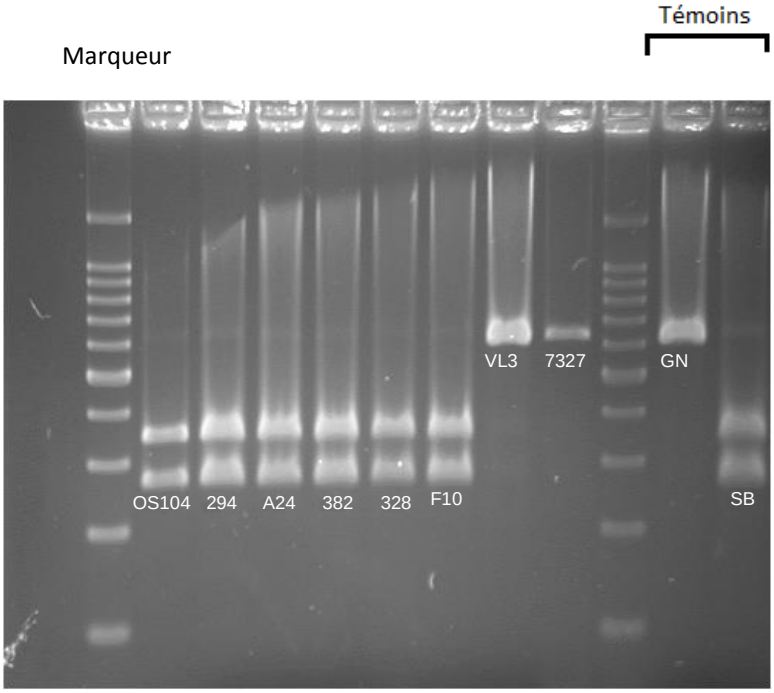


Figure 13. PCR-RFLP pour l'allèle *YOL083w*

Profil des souches parentales du projet Hétérosyeast. Les témoins GN et SB sont à droite sur marqueur de taille.

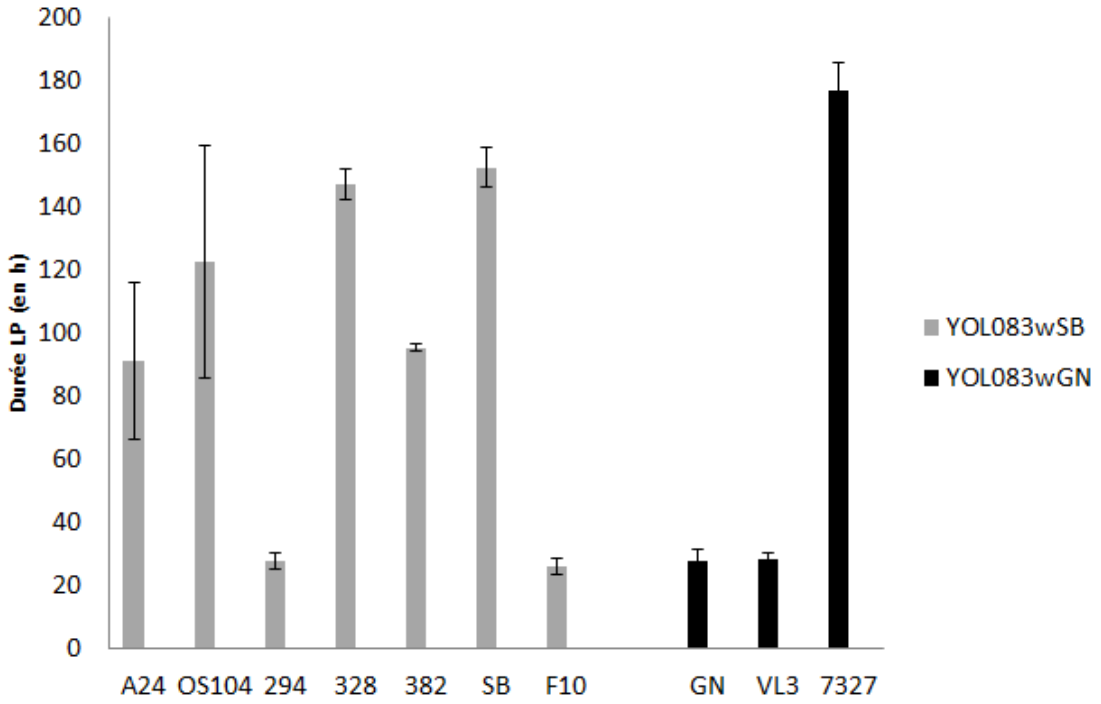


Figure 14. Variation de la phase de latence

Durée de la phase de latence pour les différentes souches du projet hétéroyeast en fonction de l'allèle *YOL083w* (GN ou SB). Données obtenues avec les moyennes de trois répétitions indépendantes effectuées en moûts de sauvignon blanc dans des fermenteurs de 125ml à une température de 18°C.

De façon intéressante 5 des 7 souches présentant l'allèle SB au locus *YOL083w* ont une phase de latence supérieure à 80 h tandis que deux des trois souches homozygotes pour l'allèle GN ont une phase de latence inférieure à 30 heures. Cependant la différence entre les deux groupes n'est pas statistiquement validée à cause des souches 7327, F10 et 294. Ces premiers résultats encourageants nous ont néanmoins poussés à vérifier si l'hérédité du marqueur *YOL083w* pouvait expliquer la ségrégation du phénotype de la phase de latence dans différents fonds génétiques.

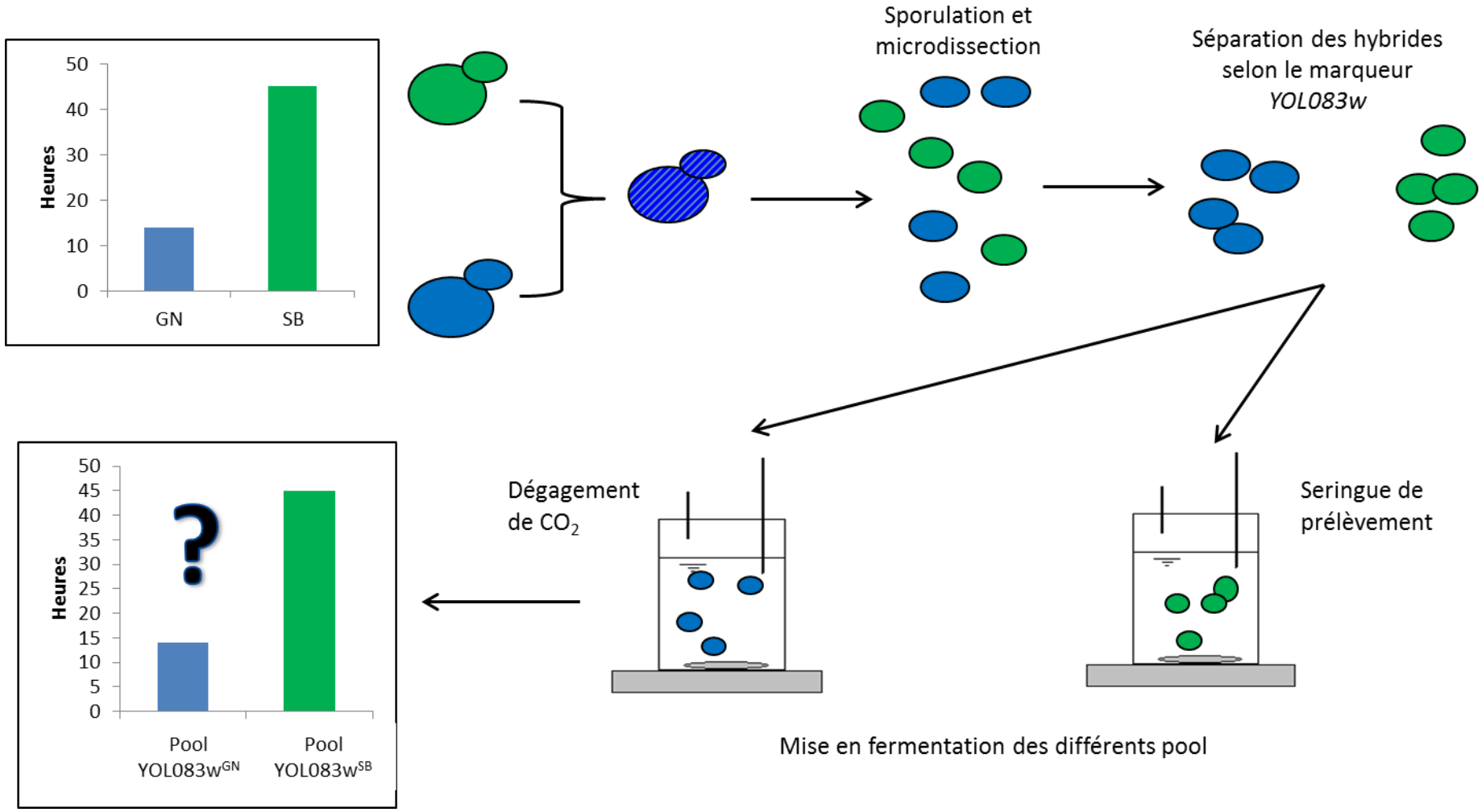


Figure 15. Stratégie d'obtention des ségrégants

Illustration de l'obtention, de la sélection puis de la séparation des mélanges de ségrégants. A partir d'un hybride de deux parents aux phénotypes différents, une sporulation puis une microdissection est effectué. Les ségrégants sont alors trié en fonction de l'allèle. Des fermentations de pools de 10 ségrégants sont faites.

c. Description de la stratégie en pool

Afin de limiter le nombre de fermentations à réaliser, une stratégie de fermentation en mélange a été mise en place pour vérifier l'impact des allèles de *YOL083w* dans plusieurs fonds génétiques. Avec cette méthode, au lieu de réaliser des fermentations avec des cultures pures nous avons utilisé des fermentations en mélange. Pour ce faire, une dizaine de ségrégants sélectionnés sur la base de leur hérédité pour le marqueur *YOL083*w ont été inoculés dans le même fermenteur. La teneur finale de l'inoculum est de 1.10^6 cellules viables/ml. Chaque modalité contient un mélange de 10 ségrégants ayant hérités de l'allèle $YOL083w^{SB}$ ou $YOL083w^{GN}$. L'hypothèse de travail est que le mélange $YOL083w^{GN}$ doit démarrer la fermentation plus rapidement que le mélange SB si l'allèle *YOL083w* a un effet sur la phase de latence. Pour chaque expérience les parents porteurs des allèles SB et GN sont utilisés comme témoins. Le milieu de culture est le milieu synthétique contenant 4 g/hl de SO_2. Nous avons précédemment montré que ces conditions affectent particulièrement la phase de latence pour la souche SB. Toutes les fermentations sont réalisées en triplicata permettant le traitement statistique des résultats (Figure 15). Cette méthode permet de vérifier rapidement l'effet du QTL tout en limitant l'impact des autres loci pouvant affecter la phase de latence. Cet impact est en effet nivelé par le nombre de ségrégants utilisés.

Dans cette expérience, les parents et les hybrides utilisés sont des souches hétérothalliques porteuses d'une mutation au locus *HO* généré par recombinaison homologue (Albertin *et al.* 2013). Ces ségrégants ont donc une phase haploïde stable et un signe sexuel. Afin d'éviter de mélanger des individus avec des signes sexuels différents, le type sexuel des ségrégants a été déterminé par PCR en suivant le protocole décrit par Huxley (1990) et seuls les individus de même signe ont été mélangés. Les ségrégants ont été obtenus soit par dissection de tétrades (Wickner 1991) soit par étalement sur boîte sur milieu sélectif. Des PCRs pour identifier l'allèle *YOL083w* et le signe sexuel ont été réalisées puis les souches haploïdes ont été mises en collection.

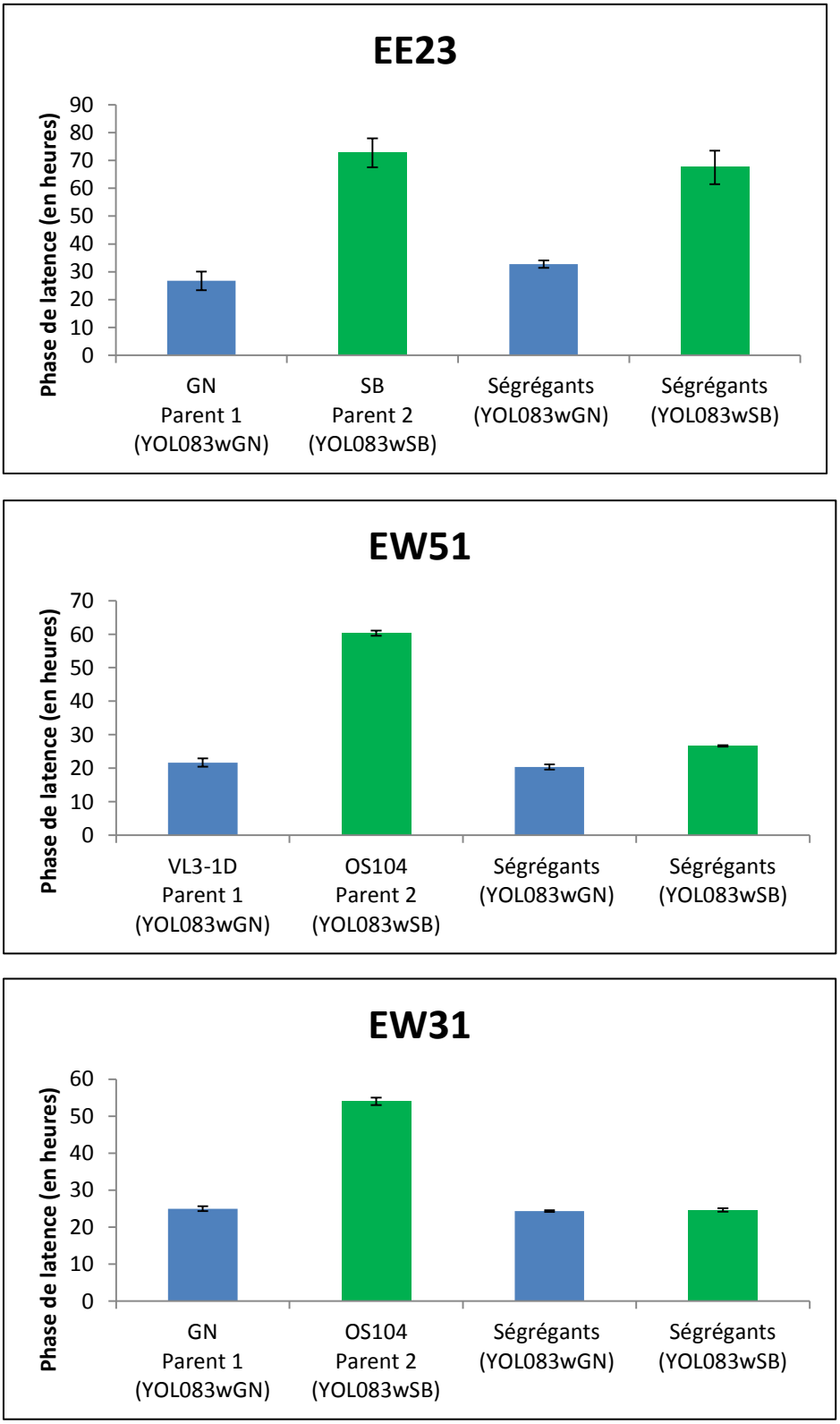


Figure 16. Variation de la phase de latence

Durée des phases de latence pour les ségrégants et les parents des 3 hybrides étudiés. Données obtenues avec trois répétions indépendantes pour chaque fermentation.

d. Fonds génétiques utilisés

Trois fonds génétiques différents ont été utilisés pour déterminer la pénétrance du QTL. Pour chacun, les parents P1 et P2 sont porteurs d'un allèle GN ou SB pour locus *YOL083w*.

- EE23 : hybride GN (*YOL083w*^{GN}) x SB (*YOL083w*^{SB})
- EW51 : hybride VL3 (*YOL083w*^{GN}) x OS104 (*YOL083w*^{SB})
- EW31 : hybride GN (*YOL083w*^{GN}) x OS104 (*YOL083w*^{SB})

e. Résultats

Dans un premier temps, nous avons validé la stratégie de fermentation en *pool* avec le fonds génétique EE23 pour lequel le QTL a été identifié (Figure 16). De manière attendue, une différence de 45h est observée pour la durée de la phase de latence entre les deux souches parentales GN et SB. De plus, une différence significative de 25h est observée entre les deux pools: 32h pour le mélange *YOL083w*^{GN} et 67h pour le mélange *YOL083w*^{SB}, P-value = 0,001 test de Student). Ce résultat valide notre dispositif expérimental et confirme que ce locus influence fortement la phase de latence quelque soit l'hérédité pour les autres locus en ségrégation. De la même manière, les mélanges GN et SB ont été comparés dans les fonds génétique EW51 et EW31.

Pour l'hybride EW51, la différence de durée de phase de latence pour les parents est de 40h. Au sein des mélanges, une différence significative de 6h est observée entre les deux pools : 20h pour le mélange *YOL083w*^{GN} et 26h pour le mélange *YOL083w*^{SB} (P-value = 0,003). Bien que moins importante que pour l'hybride EE23 ce résultat démontre que le QTL lié au marqueur *YOL083*w a un impact sur la phase de latence dans un contexte génétique différent de celui utilisé au départ. En revanche chez l'hybride EW31 aucune différence n'est observée entre les mélanges de ségrégants alors que les parents (GN et OS104) montrent une différence de phase de latence de 30h.

f. Conclusion

Cette expérience montre que le marqueur *YOL083w* associé au QTL étudié impacte dans deux cas sur trois la phase de latence chez des hybrides non apparentés. Ces résultats encourageants laissent penser que la mutation sur le gène *YOL083w* ne serait pas toujours responsable de la différence de phénotype observée. Deux hypothèses sont alors possibles. Soit il existe une autre mutation sur ce gène ou sur un gène adjacent expliquant le phénotype, soit cette mutation n'a pas d'effet dans le fonds génétique EW31 à cause de contrôles épistatiques.

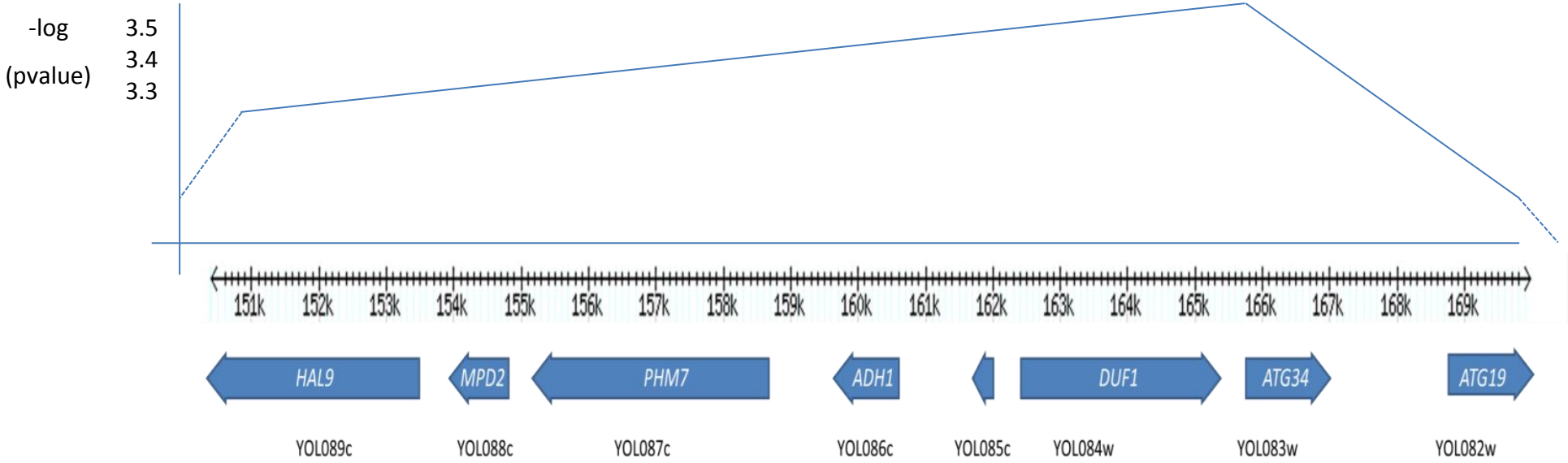


Figure 17. Présentation du QTL.

Les différents gènes composant le QTL lié à la phase de latence ainsi que son analyse de liaison montrant un pic sur *ATG34*. L'analyse de liaison a été effectuée par la statistique de Wilcoxon-Mann-Withney consistant à classer les différents marqueurs de la carte génétique en deux groupes en fonction de l'origine de l'allèle qu'ils portent. La somme des rangs des valeurs phénotypique de chaque groupe est alors comparée et une p-value pour estimer la probabilité de différence des groupe est donnée.

3. Dissection du QTL par une approche gènes candidats

La pénétrance du QTL dans d'autres fonds génétiques a été en partie validée, montrant un impact dans deux des trois fonds génétiques testés. Dès lors il était nécessaire d'identifier le ou les gènes responsables des variations de phase de latence afin de mieux comprendre les mécanismes contrôlant ce paramètre. Une approche de délétion de gènes a été retenue. Cette méthode consiste à remplacer des gènes candidats par une cassette de résistance à un antibiotique et de comparer les phénotypes obtenus une fois les gènes éliminés. Pour pouvoir comparer des souches isogéniques, l'approche par hybrides hémizygotes a été utilisée. Avant de supprimer tous les gènes présents dans le QTL, une analyse de séquence du locus XV a été entrepris à mon arrivée au laboratoire afin d'identifier les polymorphismes génétiques existants et permettre une première sélection des gènes candidats.

a. Présentation du QTL de la phase de latence

Ce QTL nommé plus loin QTL-XV s'étend sur 20kb de la position 150000bp à la position 170000bp du chromosome XV (Figure 17). Il est composé de 7 gènes dont la fonction est brièvement rappelée ci-dessous d'après les annotations du site SGD.

- ***HAL9*** **:** Ce gène code pour un facteur de transcription avec doigts de Zinc contenant un domaine de liaison à l'ADN. Les cibles de régulation directes de Hal9p ne sont pas connues. *HAL9* est impliqué dans la tolérance aux sels (Mendizabal *et al.* 1998) et la résistance aux drogues telles que la cycloheximide (Akache and Turcotte 2002).

- ***MPD2*** **:** Ce gène code pour un membre de la famille des protéines disulfides isomérase (PDI), elle catalyse le repliement correct de protéines. Sa surexpression supprime la léthalité d'une délétion pdi1 mais ne complète pas toutes les fonctions de Pdi1p (Tachikawa *et al.* 1997).

- ***PHM7*** **:** Ce gène code une protéine dont la fonction est inconnue et qui est localisée en périphérie de la cellule et dans les vacuoles (Xu *et al.* 2010).

- ***ADH1*** **:** Ce gène code pour **l'**alcool déshydrogénase 1. Protéine centrale de la fermentation alcoolique cette enzyme réduit l'acétaldéhyde en l'éthanol lors

Souche	SNP	Position	Gène	Protéine	SAP	Position
SB	A -> G	150503	*YOL089C*	*HAL9*		
SB	C -> T	150605	*YOL089C*	*HAL9*		
SB	A -> G	150635	*YOL089C*	*HAL9*		
GN	G -> A	150771	*YOL089C*	*HAL9*	S -> L	907
SB	T -> G	151024	*YOL089C*	*HAL9*	I -> L	823
SB	C -> T	151025	*YOL089C*	*HAL9*		
SB	T -> C	151073	*YOL089C*	*HAL9*		
GN	C -> T	151326	*YOL089C*	*HAL9*	G -> D	722
SB	T->G	153558	*YOL089C-YOL088C*			
GN	A -> T	155115	*YOL087C*	*DUF1*		
GN	A -> G	155438	*YOL087C*	*DUF1*	L -> P	1067
GN	G -> A	155507	*YOL087C*	*DUF1*	A -> V	1044
GN	C -> A	155539	*YOL087C*	*DUF1*	M -> I	1033
GN	C -> A	155997	*YOL087C*	*DUF1*	L -> V	881
GN	T -> C	156018	*YOL087C*	*DUF1*	E -> K	874
SB	C -> T	156099	*YOL087C*	*DUF1*	G -> S	847
SB	A -> G	156784	*YOL087C*	*DUF1*		
GN	T -> C	158329	*YOL087C*	*DUF1*		
GN	T->C	159162	*YOL087C-YOL086W-A*			
GN	A -> G	162506	*YOL084W*	*PHM7*	I --> V	50
GN	G -> C	162610	*YOL084W*	*PHM7*		
SB	G -> A	163078	*YOL084W*	*PHM7*		
GN	A -> G	164731	*YOL084W*	*PHM7*		
SB	G->C	165536	*YOL084W-YOL083W-A*			
SB	T-> A	166049	*YOL083W*	*ATG34*		
GN	G -> C	166473	*YOL083W*	*ATG34*	E -> Q	253
GN	C -> A	166602	*YOL083W*	*ATG34*	H -> N	296
SB	A -> C	166822	*YOL083W*	*ATG34*		
SB	C -> G	166851	*YOL083W*	*ATG34*		
SB	C -> A	166852	*YOL083W*	*ATG34*	C -> A	379
SB	T -> C	168815	*YOL082W*	*ATG19*	L -> P	29
SB	C -> G	169721	*YOL082W*	*ATG19*	A -> G	331
GN	T->C	170413	*YOL082W-YOL081*			

Tableau 7. Liste des différents SNP et SAP

Liste et position des SNP et SAP présents en comparaison avec la souche de référence S288c. Cette liste a été faite à l'aide du logiciel Bio-edit.

de la dernière étape de la voie fermentaire. *ADH1* a un paralogue, *ADH5*, résultant de la duplication entière de génome et deux orthologues *ADH2* et *ADH3* impliqués dans la respiration de l'éthanol.

- ***DUF1*** **:** Ce gène code pour une protéine Ubiquitin-binding de fonction inconnue localisée dans le cytoplasme. Le mutant de délétion est sensible à divers produits chimiques comprenant la phénanthroline, le sanguinarine, et l'acide nordihydroguaiaretique. Contient un domaine WD-40 (Pashkova *et al.* 2010).

- ***ATG34*** **:** Ce gène code pour un récepteur cytosolique impliquée dans l'autophagie sélective durant une carence en composé azoté, impliqué dans le transport du l'alpha-mannosidase de protéine de cargaison (Ams1p). Ce gène est paralogue de son voisin *ATG19* (Watanabe *et al.* 2010; Suzuki *et al.* 2010).

- ***ATG19*** **:** Ce gène code pour la protéine réceptrice pour la voie cytoplasme-vacuole (Cvt pathway). L'aminopeptidase I (Ape1p) et l'alpha-mannosidase (Ams1p) sont des protéines cibles. (Watanabe *et al.* 2010)

b. Analyse de séquence et proposition de gènes candidats

Nous avons entrepris de séquencer le locus étudié afin d'identifier des mutations pouvant influencer la fonction des gènes présents dans ce QTL. Pour cela plusieurs techniques ont été successivement utilisées au cours de ce travail de thèse. A mon arrivée au laboratoire nous avons entrepris de séquencer les 20kb du locus pour les souches GN et SB par la méthode de Sanger (GATC, Konstanz, Allemagne). La séquence complète des 7 gènes constituant le locus a été obtenue ainsi que les régions non codantes adjacentes. Entre les souches SB et GN, deux catégories de mutations ont été répertoriées : SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et SAP (Single Amino-acid Polymorphism) (Tableau 7). Dans la suite de ce travail la séquence complète du génome de ces deux souches a été obtenue permettant de valider ces mutations. Sur 19910 bases séquencées, 33 SNP ont été trouvés, dont 4 dans des régions non codantes. Quinze de ces mutations engendrent des SAP présents dans 5 gènes, *HAL9, DUF1, PHM7, ATG34* et *ATG19*. Après une analyse bibliographique, deux de ces gènes ont été retenus comme candidats potentiels, *ATG34 (YOL083w)* et *HAL9*.

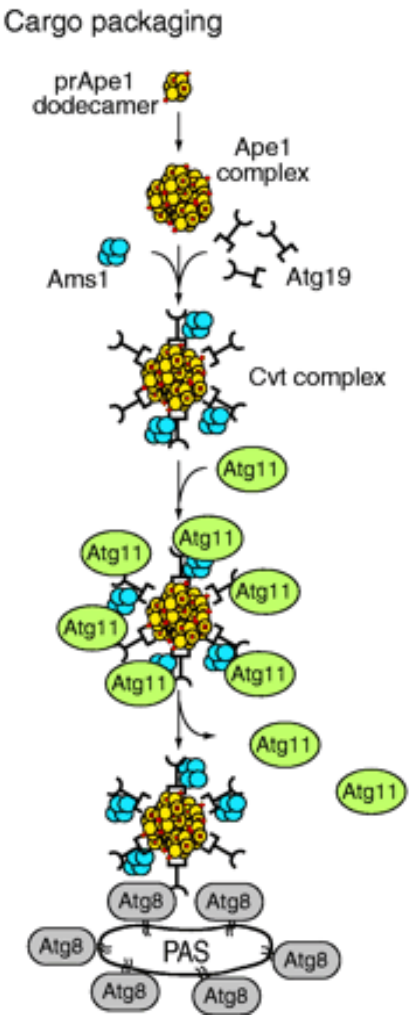


Figure 18. Complexe d'autophagocytose.

Illustration du complexe d'autophagocytose et du rôle d'Atg19p (et de son paralogue Atg34p) nécessaire au recrutement d'Atg11p puis à la fixation d'Atg8p sur la structure pré autophagosomale. (Klionsky Lab Research, Michigan, USA)

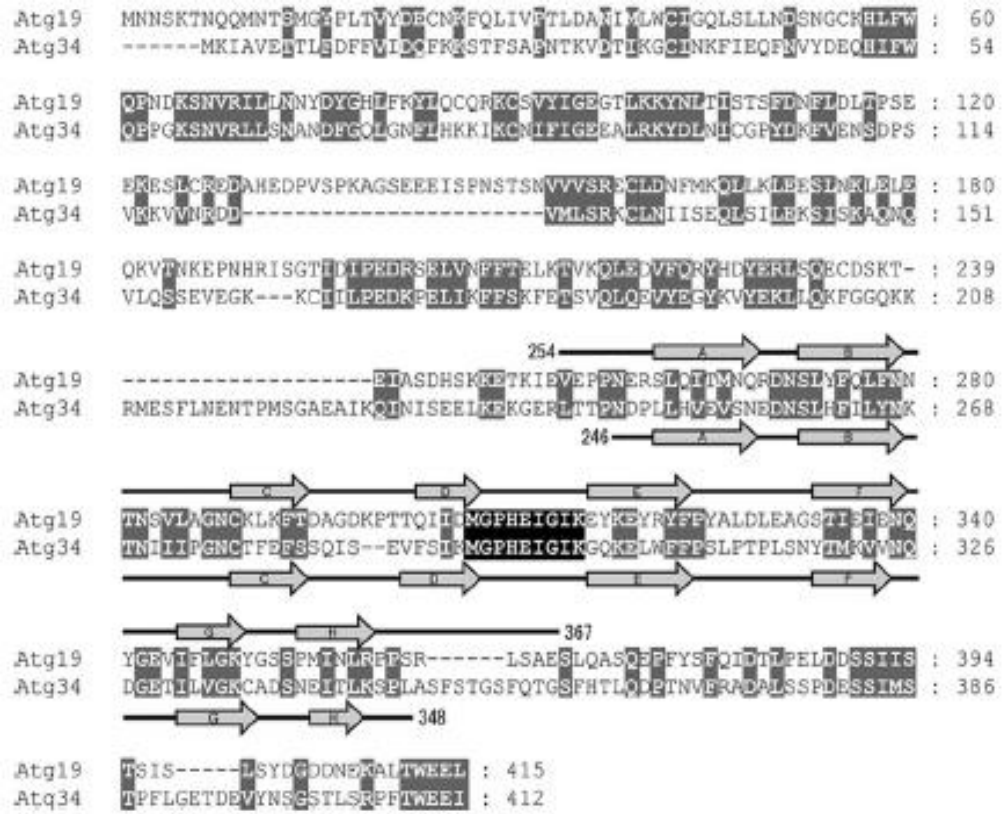


Figure 19. Séquence de la protéine Atg34p.

Dans la région hautement conservée (noir) l'Histidine en position 296 est substituée par une Asparagine pour les souches ayant la même mutation que GN. (Watanabe et al. 2010)

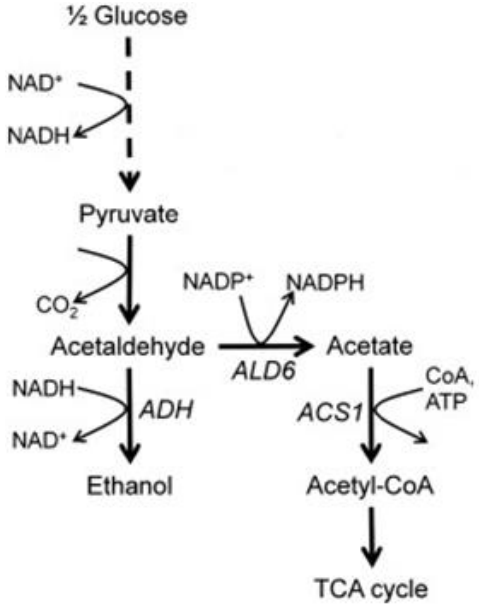


Figure 20. Rôle centrale de l'acétaldéhyde dans la glycolyse.

Dans la glycolyse l'acétaldéhyde est à un embranchement et est dégradé en éthanol ou en acétate.

La protéine cytosolique Atg34p (*YOL083w*) est impliquée dans des mécanismes d'autophagie sélective (Suzuki *et al.* 2010). Elle est le paralogue d'Atg19p. Ces protéines permettent de déplacer le complexe d'autophagocytose vers la structure pré autophogosomale (Figure 18). L'analyse de séquence différentielle de ce gène met en évidence une mutation particulièrement intéressante. Le SNP C -> A en position 166602 conduit à une mutation non silencieuse d'une histidine en asparagine en position 296 (Figure 18). Cette mutation est potentiellement délétère car elle intervient sur le site de fixation au complexe « Cytoplasm to Vacuole Targeting» (Cvt) rendant la voie d'autophagocytose non fonctionnelle dans des conditions de carence azotée (Watanabe *et al.* 2010). Les mécanismes d'autophagie peuvent participer à la régulation de changement d'état tel que le passage à un état de carence (Onodera and Ohsumi 2005) ou des mécanismes d'adaptation métabolique tel que peut l'être la phase de latence. De manière intéressante il apparait que la protéine Ald6p est une des cibles de l'autophagie sélective (Onodera 2004) lors d'une carence azotée. Cette protéine est la source principale d'acide acétique au cours de la fermentation à partir de l'acétaldéhyde (Remize *et al.* 2000) (Figure 20). Elle a également été décrite comme fortement exprimée pendant la phase de latence à la fois au niveau génétique (Brejning *et al.* 2003) et protéique (Brejning *et al.* 2002). De plus, il a été prouvé que les souches délétères pour *ALD6* ont une vitesse de croissance plus faible (Meaden *et al.* 1997). La protéine Ald6p permet d'établir une relation tenue entre d'acétaldéhyde d'une part et les mécanismes d'autophagie d'autre part. Cette mutation est également celle utilisée en PCR-RFLP pour discriminer l'allèle GN de l'allèle SB dans le QTL et se trouve sur le pic de liaison vu précédemment.

Le second gène candidat est *HAL9*. Ce gène code pour la tolérance au sel et a été considéré comme un candidat potentiel dû au fait que les voies métaboliques de tolérance au sel et à la pression osmotique partagent quelques similitudes.

Notons ici que le gène *ADH1* constituait un candidat potentiel important pouvant jouer un rôle sur le démarrage de la fermentation alcoolique. Cependant celui-ci ne présente aucun SNP entre les deux souches ni au niveau de la séquence codante ni au niveau du promoteur.

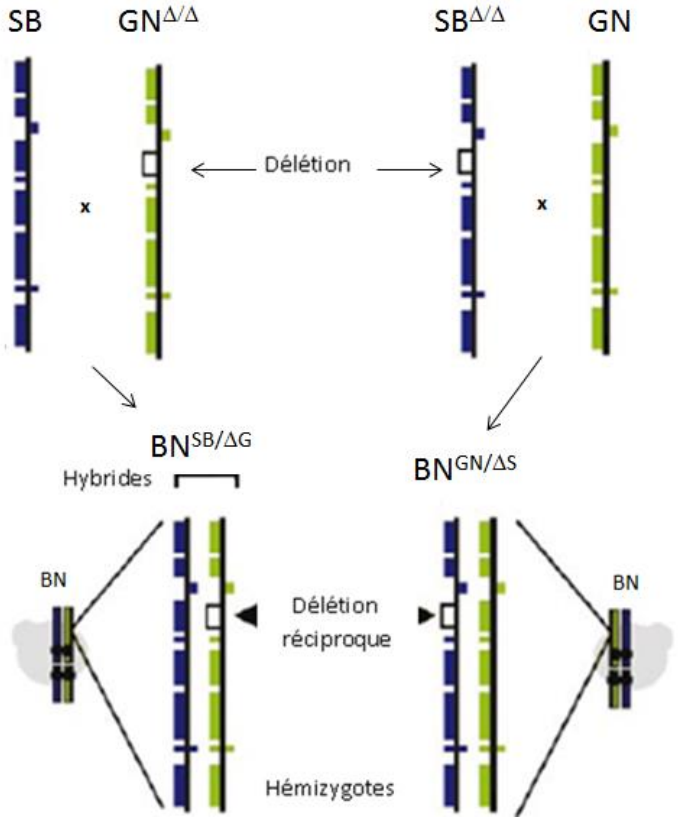


Figure 21. Illustration d'un hémizygote.
Deux hybrides (BN) issus des mêmes parents (GN et SB) subissent une délétion pour l'allèle du Parent 1 (BN$^{SB/\Delta G}$) ou l'allèle du parent 2 (BN$^{GN/\Delta S}$).

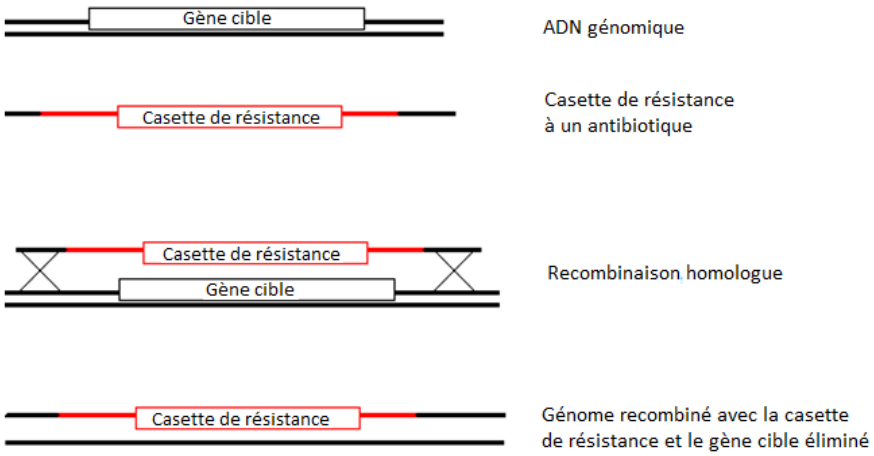


Figure 22. Principe de la recombinaison homologue

Illustration général de la transformation d'une souche de levure.

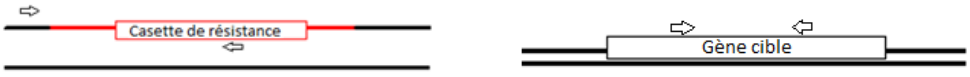


Figure 23. PCR de vérifications.

Illustration de la PCR d'insertion consistant à amplifier la cassette de résistance et une région adjacente du gène cible pour vérifier la bonne insertion de la cassette. La PCR de délétion consiste à amplifier une partie du gène cible pour vérifier sa délétion totale dans le génome.

c. Etude de l'effet de *HAL9* et *ATG34* dans le déterminisme de la phase de latence

Afin de valider expérimentalement l'effet des gènes *HAL9* et *ATG34* sur la durée de la phase de latence nous avons appliqué la stratégie de délétion de gènes chez des hybrides hémizygotes. Cette stratégie décrite pour la première fois chez la levure sous le nom de Reciprocal Hemizygosity Analysis (RHA) par Steinmetz *et al.* (2002) permet d'étudier rapidement l'impact de deux allèles d'un même gène dans un même fonds génétique (Figure 21). Le comportement de ces hybrides hémizygotes concernant la phase de latence a ensuite été comparé sur un milieu fermentaire.

d. Construction des souches

A partir des souches parentales GN et SB nous avons construit des mutants délétés pour les gènes d'intérêt *ATG34* (*YOL083w*) et *HAL9* (*YOL089c*). Le génotype des mutants obtenus est décrit dans le Tableau 1. Les mutants nécessaires à cette manipulation ont été obtenus par recombinaison homologue en introduisant dans le génome des levures une cassette génétique conférant résistance à la généticine (G418). Pour ce faire nous avons utilisé la collection de mutant Euroscarf (Frankfurt, Allemagne) chez laquelle chaque gène de la levure a été remplacé par le gène bactérien KanMx4 sous contrôle d'un promoteur et terminateur de levure. A partir des souches Euroscarf telles que Y01774 ou Y01865, nous avons pu amplifier des cassettes de délétions pour les gènes *ATG34, DUF1, PHM7,* et *HAL9*. L'amplification de la cassette pour le gène *ATG19* n'a pas été possible malgré de nombreuses tentatives (changement d'amorce, optimisation des conditions de PCR). Pour chaque gène nous avons amplifié de part et d'autre de la cassette de résistance une portion génomique d'environ 500 paires de bases. La Figure 22 présente la stratégie générale utilisée pour ces constructions.

Après transformation des souches GN et SB, des colonies résistantes à la G418 ont été testées pour vérifier l'insertion de la cassette au bon locus et la délétion effective des gènes (Figure 23). Le test d'insertion est réalisé avec l'amorce p560bis situé dans le gène KanMx4 et une amorce spécifique à chaque gène situé en amont de l'ATG du gène. Cette amorce est située en dehors de la cassette de résistance et ne peut donner lieu à une amplification que si la cassette est insérée au bon endroit.

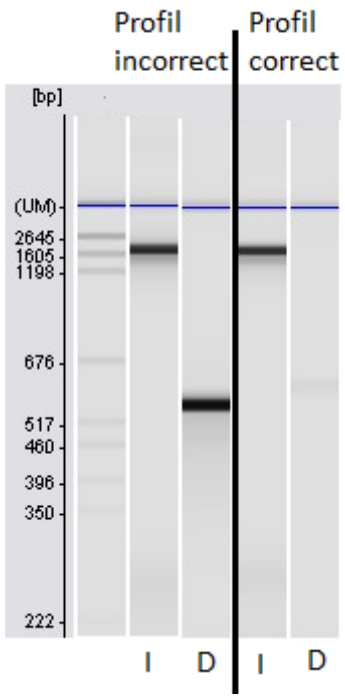


Figure 24. Profil de délétion et d'insertion.

Résultats de PCR pour la transformation du gène ATG34. A droite un profil de clône ayant une insertion correcte mais non délété. A droite, le profil d'un clône ayant une insertion et une délétion conforme à nos attentes. « I » et « D indiquent les PCRs d'Insertion et de Délétion de vérification mentionnées précedement.

Gène	Mutant GN	Mutant SB	Hybride GS	Hybride SG
YOL089c	Insertion correcte Délétion correcte	Insertion correcte Délétion correcte	Insertion correcte Délétion correcte	Insertion correcte Délétion correcte
YOL087c	Insertion correcte Une copie du gène est toujours présente	Insertion correcte Une copie du gène est toujours présente	Insertion correcte Une copie du gène est toujours présente	Insertion correcte Une copie du gène est toujours présente
YOL086c	Insertion correcte Une copie du gène est toujours présente	Insertion correcte Une copie du gène est toujours présente	Insertion correcte Une copie du gène est toujours présente	Insertion correcte Une copie du gène est toujours présente
YOL084w	Insertion correcte Délétion correcte	Insertion correcte Une copie du gène est toujours présente	Insertion correcte Une copie du gène est toujours présente	Insertion correcte Une copie du gène est toujours présente
YOL083w	Insertion correcte Délétion correcte	Insertion correcte Délétion correcte	Insertion correcte Délétion correcte	Insertion correcte Délétion correcte

Tableau 8. Profil des transformants.

Profils obtenus pour les transformants des différents gènes composant le QTL. Les insertions étaient effectuées au bon endroit, en revanche, le test de délétion montre une ou plusieurs copies supplémentaires des différents gènes.

La Figure 24 illustre ce test pour le gène *ATG34*. Pour l'ensemble de ces gènes, l'insertion d'une cassette au locus a pu être obtenue mais des problèmes de délétions ont été rencontrés (Tableau 8).

Une fois que des clones répondant correctement au test d'insertion sont obtenus, ces clones sont mis à sporuler et microdisséqués afin de vérifier une ségrégation mendélienne de la cassette par simple analyse de la résistance à la G418. Les clones monosporiques résistants sont issus de spores porteuses du gène disrupté. Ces clones donnent naissance à des souches diploïdes à cause du caractère homothallique des souches manipulées. Afin de vérifier qu'aucune autre copie du gène sauvage n'était présente dans ces souches un test de délétion a été réalisé. La PCR de délétion consiste à amplifier une partie du gène cible afin de vérifier que celui-ci a bien été éliminé du génome (Figure 23). De manière surprenante et à plusieurs reprise nous avons eu des difficultés à éliminer certains gènes comme *DUF1* et *PHM7* (Tableau 8). Après de nombreuses tentatives nous n'avons réussi à générer des mutants dans les deux fonds génétiques que pour les gènes *HAL9* et *ATG34*. Il s'agit de souches diploïdes homozygotes pures portant deux copies du gène muté. Ces mutants sont nommés selon la nomenclature suivante. « GΔ » ou « SΔ » indiquant le fonds génétique de la souche mutée et « 083 » ou « 089 » indiquant le numéro de l'ORF sur le chromosome. Ainsi la souche GN délétée pour le gène *HAL9* s'écrira GΔ089 alors que la souche SB délétée pour le gène *ATG34* s'écrira SΔ083.

L'étape suivante a consisté à construire des hybrides hémizygotes. Pour se faire des spores des souches diploïdes mutées GN ou SB ont été croisées en masse avec les souches haploides SB-*ho::NAT* ou GN-*ho::NAT.* La sélection des hybrides a été réalisée par étalement sur milieu YPD supplémenté avec les antibiotiques G418 et Nourcéothricine. Quatre hybrides ont été obtenus GΔ083S, SΔ083G et GΔ089S, SΔ089G. A titre d'exemple l'hybride GΔ083S correspond au croisement entre GN et SB. Cet hybride porte l'allèle GN délétée pour le gène *ATG34 (YOL083w)* et l'allèle SB fonctionnel.

Pour le reste de leur génome ces hybrides sont strictement isogéniques ce qui permet de comparer uniquement l'effet des allèles GN et SB dans le fonds génétique de l'hybride BN (EE23).

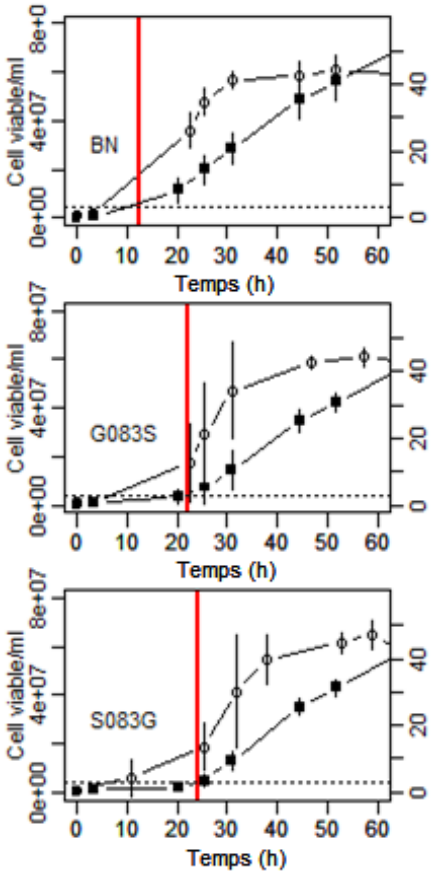


Figure 26. Croissance et dégagement de CO_2.

Evolution de concentration en cellules (○) et la production de CO_2 (■) durant les 60 premières heures après l'inoculation des fermenteurs. Ces données sont la moyenne de trois répétitions indépendantes avec les erreurs standards. La durée de la phase de latence est indiquée par la ligne rouge. L'hybride BN issu du croisement entre GN et SB ainsi que les hémizygotes GΔ083S, SΔ083G décrit précédemment sont présentés ici.

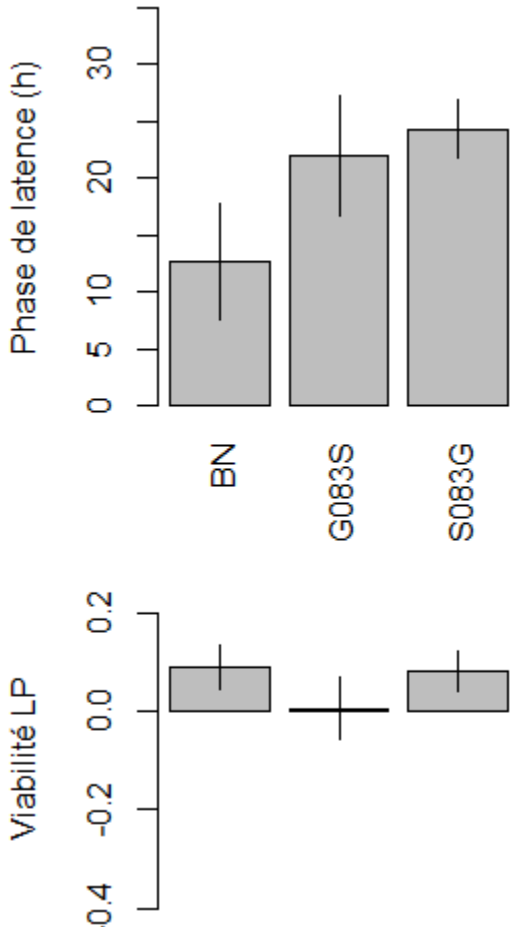


Figure 25. Phase de latence et viabilité.

La phase de latence a été mesurée pour l'hybride F1 (BN) et les souches hémizygotes (GΔ083S, SΔ083G). Les mesures sont les moyennes et les écarts-type de 3 répétitions indépendantes. Les tests statistiques ont été faits avec le test de Wilcoxon. * et ** représentent des P-values de <0,05 et 0,01.

e. Impact d'*ATG34* et d'*HAL9* sur le phénotype

Pour tester l'impact des gènes *HAL9* et *ATG34* sur la variation de durée de la phase de latence, des fermentations en milieu synthétique contenant 40 mg/L de SO_2 total ont été effectuées dans des fermenteurs de 125 ml. Le dégagement de CO_2, la croissance de la population ainsi que sa viabilité ont été suivies durant toute la durée de la phase de latence. Le suivi de ces paramètres nous a permis d'estimer la durée de la phase de latence et la chute de la viabilité durant la phase de latence.

i. Etude de l'impact du gène *ATG34*

En comparant les hybrides GΔ083S et SΔ083G aucune différence significative n'est observée ni pour la phase de latence ni pour la viabilité au cours de celle-ci (Figures 25 et 26). Ce résultat permet d'écarter le rôle de ce gène dans la différence de longueur des phases de latence entre SB et GN (Figures 27 et 28). De manière surprenante la comparaison de l'hybride BN (EE23) avec les hybrides hémizygotes montre une différence de 12 heures qui est difficile à expliquer. La délétion des deux copies du gène *ATG34* entraine également une légère augmentation de la durée de la phase de latence.

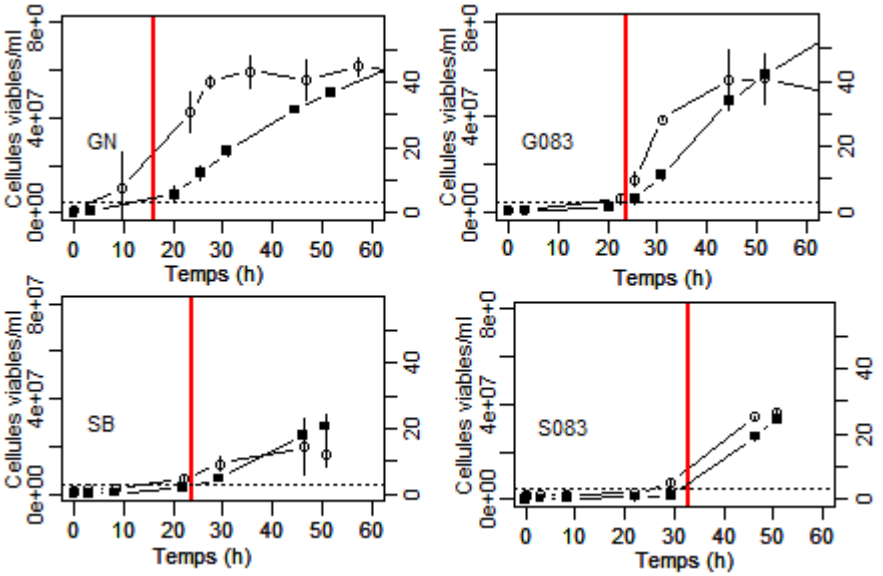


Figure 27. Croissance et dégagement de CO_2.

Evolution de concentration en cellules (○) et la production de CO_2 (■) durant les 60 premières heures après l'inoculation des fermenteurs. Ces données sont la moyenne de trois répétitions indépendantes avec les erreurs standards. La durée de la phase de latence est indiquée par la ligne rouge. L'hybride BN issu du croisement entre GN et SB ainsi que les mutants GΔ083 et SΔ083 décrit précédemment sont présentés ici.

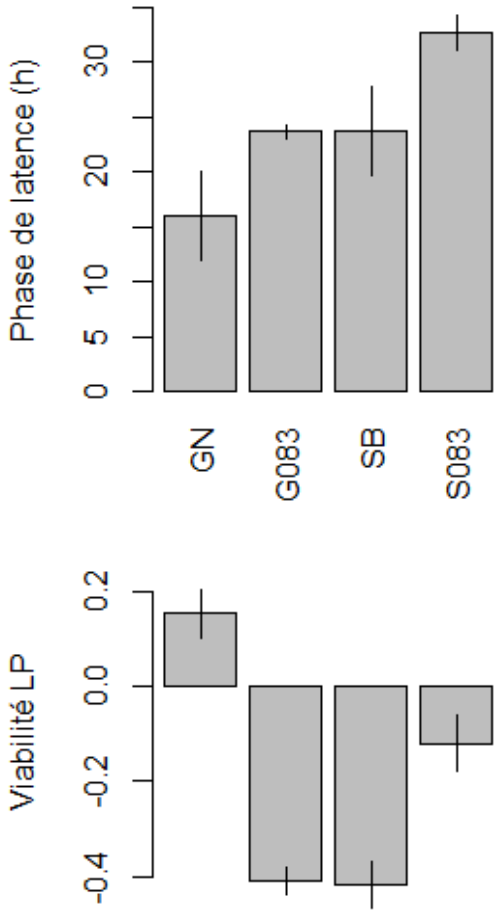


Figure 28. Phase de latence et viabilité.

La phase de latence a été mesurée pour les souches parentales (GN et SB) et les mutants mutants GΔ083 et SΔ083Les mesures sont les moyennes et les écarts-type de 3 répétitions indépendantes. Les tests statistiques ont été faits avec le test de Wilcoxon. * et ** représentent des P-values de <0,05 et 0,01.

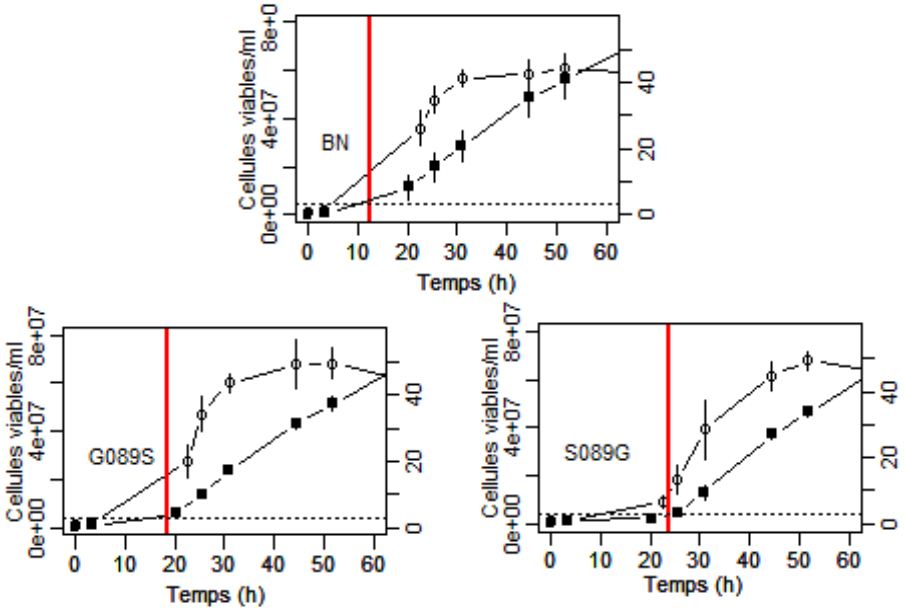


Figure 30. Croissance et dégagement de CO_2.

Evolution de concentration en cellules (○) et la production de CO_2 (■) durant les 60 premières heures après l'inoculation des fermenteurs. Ces données sont la moyenne de trois répétitions indépendantes avec les erreurs standards. La durée de la phase de latence est indiquée par la ligne rouge. L'hybride BN issu du croisement entre GN et SB ainsi que les hémizygotes GΔ089S et SΔ089G décrit précédemment sont présentés ici.

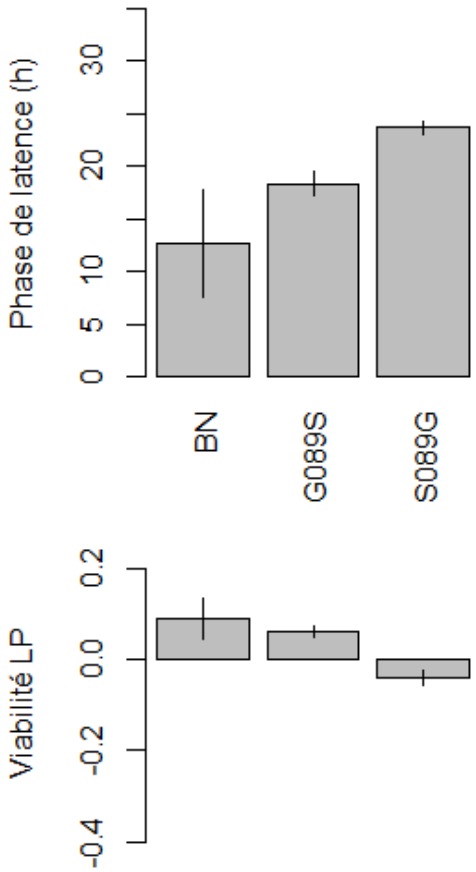


Figure 29. Phase de latence et viabilité.

La phase de latence a été mesurée pour les souches parentales (GN et SB) et les mutants mutants GΔ089S et SΔ089G. Les mesures sont les moyennes et les écarts-type de 3 répétitions indépendantes. Les tests statistiques ont été faits avec le test de Wilcoxon. * et ** représentent des P-values de <0,05 et 0,01.

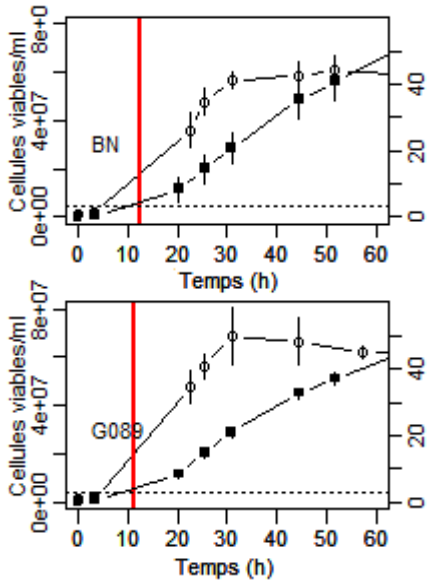


Figure 31. Croissance et dégageement de CO_2.

Evolution de concentration en cellules (○) et la production de CO_2 (■) durant les 60 premières heures après l'inoculation des fermenteurs. Ces données sont la moyenne de trois répétitions indépendantes avec les erreurs standards. La durée de la phase de latence est indiquée par la ligne rouge. La souche parentale GN ainsi que le mutant GΔ089 décrit précédemment sont présentés ici.

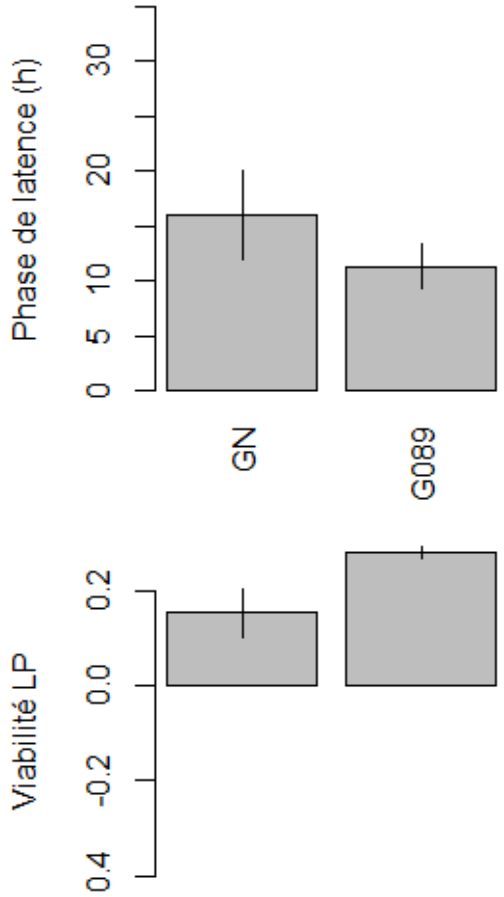


Figure 32. Phase de latence et viabilité.

La phase de latence a été mesurée pour les souches parentales (GN et SB) et les mutants mutants GΔ089S et SΔ089G. Les mesures sont les moyennes et les écarts-type de 3 répétitions indépendantes. Les tests statistiques ont été faits avec le test de Wilcoxon. * et ** représentent des P-values de <0,05 et 0,01.

ii. Etude de l'impact du gène *HAL9*

La comparaison des hybrides GΔ089S et SΔ089G donne lieu à un résultat plus intéressant (Figures 29 et 30). En effet, la délétion d'*HAL9* a un effet significatif sur la durée de la phase de latence. De manière surprenante c'est l'hybride SΔ089G ($\Delta HAL9^{SB}/HAL9^{GN}$) qui a une phase de latence plus longue que l'hybride GΔ089S ($\Delta HAL9^{GN}/HAL9^{SB}$). Dans ce cas, l'allèle SB de *HAL9* réduit donc la durée de la phase de latence, passant de 23,6h à 18,3h.

La variation du phénotype ne correspond pas au résultat attendu car dans le QTL étudié c'est l'allèle SB qui allonge la phase de latence lorsqu'il est hérité. Nous avons également comparé le comportement de la souche GΔ089 avec la souche GN (Figures 31 et 32). Dans ce cas la délétion du gène raccourcit également la phase de latence. Il n'a pas été possible de mesurer l'effet de la délétion du gène *HAL9* dans le fonds génétique SB. En effet au moment où nous avons réalisé ces résultats la souche SΔ089 n'a pas pu être ressortie de collection.

f. Conclusion

Les marqueurs liés au QTL précédemment mis en évidence montrent que celui-ci est bien lié à la phase de latence et fonctionne dans plusieurs fonds génétiques. Il permet ainsi de détecter un phénotype, phase de latence courte ou phase de latence longue, via l'aide d'un marqueur.

En revanche, ces premiers résultats et l'absence de mutations supplémentaires dans cette région suggèrent que la ou les modifications génétiques impactant le phénotype de la phase de latence n'est pas lié à une modification de séquence protéique. Des recherches supplémentaires sont nécéssaires pour mettre en évidence le mécanimse génétique régulant ce paramètre phénotypique.

4. Conclusion générale

Cette première partie a permis de valider plusieurs points :

Tout d'abord, nous avons validé le modèle expérimental, montrant que le moût synthétique utilisé permet de mimer correctement un moût blanc pour le phénotype de la phase de latence. Un prérequis indispensable pour cette étude, travailler en moût synthétique permettant à la fois d'éliminer les variations de composition d'un moût à un autre ainsi qu'une plus grande souplesse dans la mise en place des expérimentations.

L'étude du QTL via la bibliographie et les SNP/SAP permet une sélection pertinente des gènes candidats. Si les deux gènes sélectionnés n'expliquent le phénotype, ils ont tout de même un impact qui même s'il reste limité influe sur la durée de la phase de latence.

L'impact du QTL présenté ici a été validé dans 2 des 3 fonds génétiques testés, malgré le fait qu'aucun des gènes présents dans ce locus n'influe de façon pertinente la durée de la phase de latence. Si le ou les gènes responsables de cette variation de phénotype ne sont pas encore trouvés, le QTL est lui validé, permettant ainsi de détecter une phase de latence longue ou courte dans la plupart des cas à l'aide d'un simple marqueur.

Un dernier constat est celui de l'impact du SO_2 sur le phénotype. En effet, l'un des deux parents, celui avec l'allèle *YOL083w*^{SB} à phase de latence longue est particulièrement affecté par la concentration en SO_2 dans le milieu, sa phase de latence étant triplée à 40 mg/L de SO_2 dans le milieu, tandis que l'autre parent ne subit une augmentation que seulement quelques heures pour cette même concentration de SO_2.

CHAPITRE II

Mécanismes de translocations impliqués dans la résistance aux sulfites

Revue Bibliographique

Dans cette partie de ma thèse nous avons réussi à mettre en évidence la cause génétique expliquant la différence de comportement. La revue bibliographique ci-dessous vise à donner au lecteur les éléments nécessaires à la compréhension de ces mécanismes.

Durant les premières étapes du processus de vinification, les levures présentes sur les baies de raisin et dans le chai colonisent le moût et se développent. Comme nous l'avons détaillé précédemment, les populations de levures sont divisées arbitrairement en deux catégories : les levures du genre *Saccharomyces* et celle dites « non-*Saccharomyces ».* Ces dernières *sont* prédominantes sur les baies et durant les premières étapes de la vinification (Zott *et al.* 2008) mais ne participent que faiblement à la fermentation alcoolique. Les levures du genre *Saccharomyces* et principalement de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* prédominent quant à elles grâce à leur forte tolérance à l'éthanol (Alexandre 1994), leur résistance à la température (Goddard 2008; Salvadó *et al.* 2011) mais également à leur résistance au SO_2 (Henick-Kling *et al.* 1998 ; Albertin *et al.* Soumis). L'étude de la résistance des souches de *Saccharomyces cerevisiae* au SO_2 a été largement étudiée dans le passé. Nous détaillerons ici les mécanismes d'action du SO_2 ainsi que les mécanismes adoptés par les levures pour résister à cet agent anti-microbien.

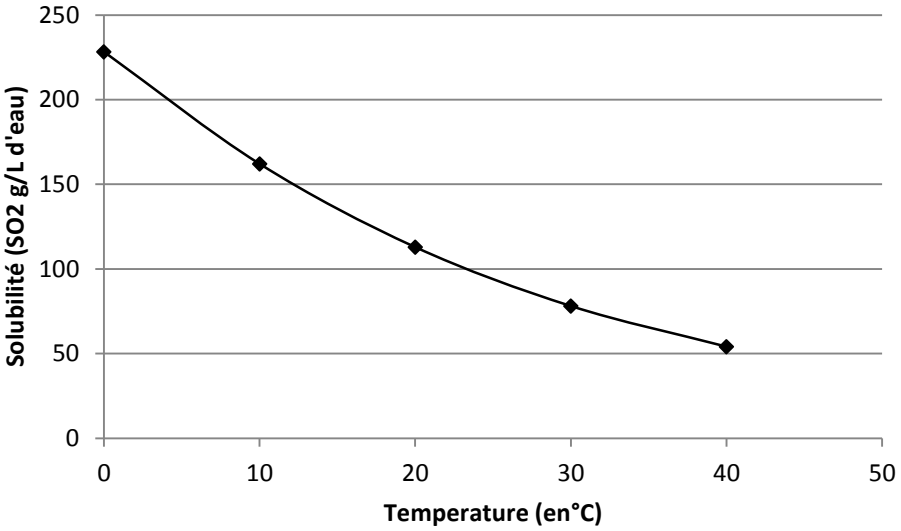


Figure 33. Solubilité du SO_2.

Evolution de la solubilité du SO_2 en solution aqueuse en fonction de la température (Barbe *et al.* 2000a)

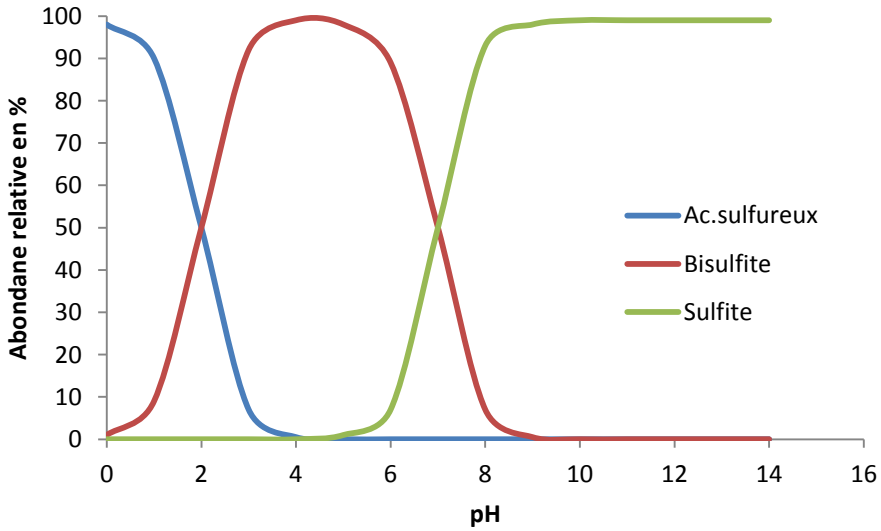


Figure 34. Formes du SO_2.

Evolution de la forme su SO_2 en fonction du pH. Le vin à un pH entre 3 et 4, la forme prédominante est celle des ions bisulfites (Barbe *et al.* 2000a)

.

1. Le dioxyde de soufre en œnologie

a. Propriétés physico-chimiques

Le dioxyde de soufre ou SO_2 est un gaz incolore résultant de la combustion du soufre en présence d'oxygène et dont l'inhalation est irritante. Dans le vin le SO_2 réagit avec l'eau pour former de l'acide sulfureux (H_2SO_3) dont la solubilité diminue avec la température (Figure 33). La dissociation de l'acide sulfureux est régie par un équilibre acido-basique dont les constantes pK1 et pk2 sont de 1,81 et 6,91 dans l'eau à 20°C.

$$H_2SO_3 \overset{K_1}{\rightleftharpoons} H^+ + HSO_3^- \overset{K_2}{\rightleftharpoons} H^+ + SO_3^{2-}$$

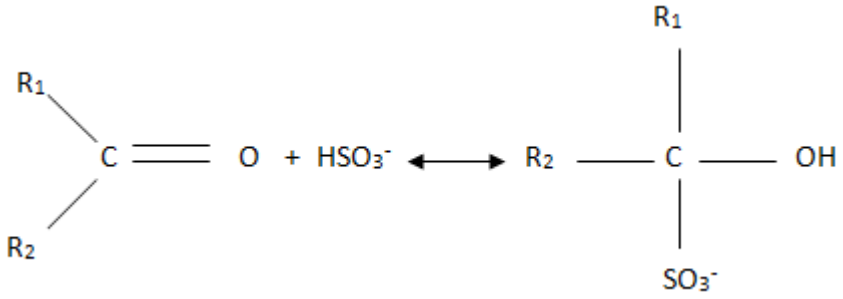
b. SO_2 libre

Au pH des vins, le SO_2 est très majoritairement (98%) sous forme d'ions bisulfites (HSO_3^-), alors que les ions sulfites (SO_3^{2-}) sont quasiment absents (Figure 34).

A quelques approximations près le SO_2 libre correspond donc à la somme des concentrations en SO_3^{2-}, H_2SO_3 et d'HSO_3^-. En plus de sa forme libre le SO_2 est présent sous formes combinées à plusieurs molécules.

c. La combinaison du SO_2

Dans les moûts et le vin, le SO_2 réagit principalement avec les composés carbonylés pour donner des combinaisons bisulfitiques, il est alors qualifié de SO_2 combiné. Les principales molécules combinant le SO_2 sont l'acétaldéhyde principalement issu de la glycolyse (Burroughs 1975), mais aussi certains sucres et dérivés de sucres , ainsi que des acides organiques. Le SO_2 non combiné est lui qualifié de SO_2 libre (Burroughs and Sparks 1973; Barbe *et al.* 2000).



d. Toxicité chez l'homme et réglementation

Le SO_2 a des effets nocifs sur la santé humaine. Il est dangereux dans les cas d'inhalation, d'ingestion ou de contact avec la peau et les muqueuses. Pour ces raisons, des réglementations visant à limiter sa présence dans le vin ont été mises en place. C'est l'Union Européenne et le règlement 606/2009 qui régissent l'utilisation du dioxyde de soufre dans le vin en France. Puisqu'il est ajouté à de nombreuses étapes de l'élaboration du vin, il est important de pouvoir contrôler son apport afin de limiter son impact sur la santé. Les teneurs en SO_2 total autorisées sont de 150 mg/L pour les vins rouges et 200 mg/L pour les vins blancs en France.

e. Propriétés anti-oxydantes et anti-oxydasique

D'une manière générale le dioxyde de soufre est utilisé en œnologie pour limiter l'oxydation du moût et des vins (Ribéreau-Gayon *et al.* 2012). Ce rôle protecteur est exercé à de nombreux niveaux tant sur les moûts que sur les vins. Dans les moûts, le SO_2 limite l'oxydation des composés hydroxylés et carbonylés. Cette action contribue à préserver leur couleur et l'arôme fruité des vins. De plus le dioxyde de soufre inhibe l'action d'enzymes fongiques telles que la tyrosinase ou la laccase ce qui permet de contrôler la qualité des récoltes botrytisées et de préserver la couleur des vins blancs. Dans les vins, le SO_2 prévient en partie l'oxydation de composés d'arômes particulièrement sensibles à l'oxydation tels que les thiols volatiles.

f. Propriétés anti-microbiennes et mécanismes d'inhibitions

L'utilisation du SO_2 pour ses qualités antimicrobiennes remonte à la fin du XIXème siècle. Dès 1866, Pasteur avait préconisé le méchage des barriques pour préserver les altérations microbiennes. L'activité antiseptique du dioxyde de soufre est associée au SO_2 libre (Ingram 1948) et est essentiellement liée au SO_2 moléculaire dont l'effet est 100 à 500 fois plus fort que celui des ions bisulfites (Rehm et Wittmann 1963). Chez les bactéries, le SO_2 combiné peut avoir une action toxique (Lafon-Lafourcade et Peynaud 1974) même si celui-ci a une activité 5 à 10 fois inférieure à celle du SO_2 libre.

D'une manière générale, le SO_2 va agir sur plusieurs cibles métaboliques avec des effets allant d'un simple ralentissement de la croissance cellulaire à la mort de la population.

Au niveau population, le SO_2 allonge la phase de latence (Warth 1985; Stratford and Rose 1986), inhibe la croissance et la viabilité cellulaire (Baldwin 1951). La résistance au SO_2 varie fortement, même au niveau intra spécifique (Agnolucci *et al.* 2013). Chez les bactéries lactiques, le SO_2 joue aussi un rôle d'inhibiteur, empêchant la croissance de ces dernières, qui montrent une grande disparité pour la résistance au SO_2 (Millet and Lonvaud-Funel 1999).

Chez la levure, une revue récente rappelle les mécanismes d'action et le métabolisme du SO_2 chez les levures œnologiques (Divol *et al.* 2012). Le SO_2 moléculaire pénètre principalement à travers la membrane cellulaire par simple diffusion (Stratford and Rose 1986). Cependant il a été montré qu'un système actif par symport de proton était présent chez la levure (Park and Bakalinsky 2004). Le transport de SO_2 dépend notamment de la température et du pH extracellulaire. Un pH acide favorise la forme moléculaire et donc l'importation de SO_2. une forte température augmente également sa toxicité (Macris and Markakis 1974). A l'intérieur de la cellule, le SO_2 est très majoritairement présent sous forme d'ions bisulfites (HSO^{3-}). Son action toxique est plus forte chez les cellules en phase stationnaire. Le SO_2 présente différents mécanismes d'inhibition : (i) Il provoque des dommages sur les membranes en se liant à certains récepteurs (Freese *et al.* 1973), (ii) il peut entrainer perte de certains métabolites (Schimz 1980) (iii) il peut induire une chute de la concentration en ATP (Schimz and Holzer 1979). Le SO_2 inhibe également certaines enzymes clé du métabolisme fermentaire. Cette inhibition peut avoir lieu au niveau transcriptionnel mais également par une fixation aspécifique au niveau des ponts disulfures. Des exemples d'inhibition ont été décrits pour de la PAPS réductase (Aranda *et al.* 2006), l'acetaldehyde déshydrogénase (Aranda *et al.* 2006) et la glycéraldehyde-3-phosphate deshydrogénase (Hinze and Holzer 1985). Enfin le SO2 se combine à différents métabolites telles que les cofacteurs (NAD^+/NADH, FAD^+), les vitamines (Petering and Shih 1975) et des molécules clés du métabolisme central (glucose, acétaldehyde, pyruvate oxaloacétate et α-cétoglutarate) (Rankine and Pocock 1969).

2. Les mécanismes de résistances au SO_2 chez les levures

a. Variabilité intra et interspécifique

La résistance des levures au SO_2 a été largement étudiée dans le passé (Thornton 1982; Beech and Thomas 1985; Xu *et al.* 1994). Au niveau inter-spécifique, des espèces telles que *Zygosaccharomyces bailii* ou *Schizosaccharomyces plombe* ont été décrites comme particulièrement résistantes au SO_2 (Pilkington et Rose 1988) (Divol *et al.* 2006). Chez les espèces œnologiques, les populations de non-*Saccharomyces* sont en général plus sensibles à ce composé que *S. cerevisiae* (Renault 2010 ; Albertin *et al.* soumis). Cependant en fonction de l'espèce considérée, l'effet du SO_2 peut être très variable. Il a récemment été démontré que le niveau de population de *Hanseniaspora uvarum* décline fortement lors du sulfitage des moûts alors que celui d'autres espèces comme *Candida zemplinina* ou *Torulaspora delbrueckii* reste relativement stables (Albertin *et al.* soumis).

Il existe également une forte variation au niveau intra-spécifique qui a été particulièrement étudiée pour l'espèce *S. cerevisiae* (Jensen *et al.* 2009). Cette variabilité existe pour d'autres espèces tel que *Brettanomyces bruxellensis* (Agnolucci *et al.* 2013). La résistance au SO_2 est un caractère héritable quantitatif qui implique de nombreux gènes (Thornton 1982). Cette résistance peut être mesurée par des approches de microbiologie classiques sur milieu de culture solide (Nardi *et al.* 2010) ou liquide (Uzuka *et al.* 1985) ce qui a permis de sélectionner des souches de levures plus résistantes à ce composé des différences de résistance sont également mesurées dans des conditions plus proches des pratiques œnologiques (Nardi *et al.* 2010).

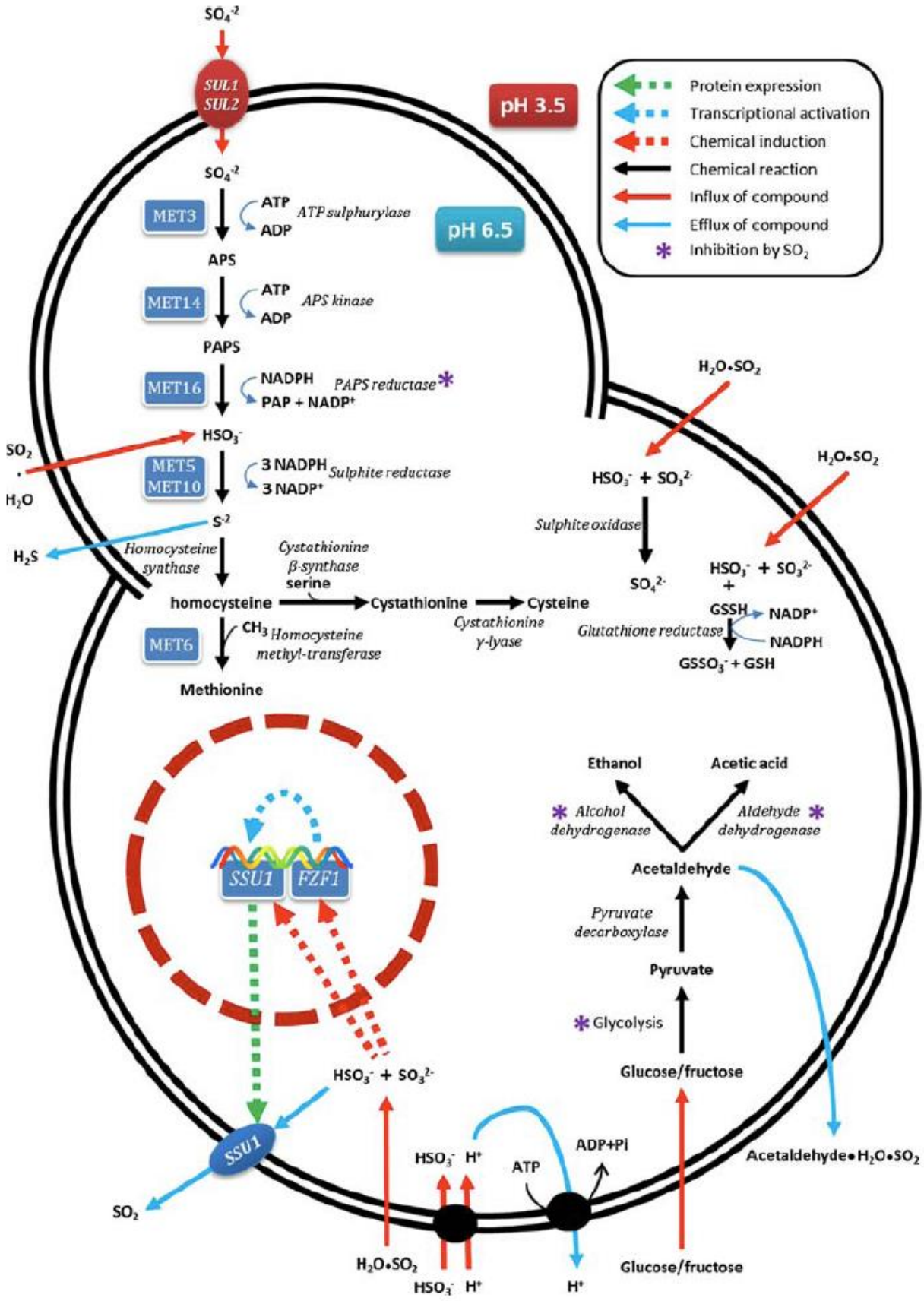


Figure 35. Mécanimses de résistance au SO_2

Illustration des différents mécanismes permettant à la levure de résister au SO_2 (Divol et al. 2012).

b. Mécanismes de résistances mis en jeu.

La toxicité du SO_2 à l'égard des levures a permis l'émergence d'un certain nombre de réponses adaptatives. On peut distinguer des réactions visant à métaboliser le SO_2 et d'autres visant à neutraliser son action par des mécanismes d'élimination. L'ensemble de ces mécanismes ont été décrits par Divol (2012) et sont résumés dans la Figure 35.

i. Mécanismes d'assimilation métabolique

Deux principales voies métaboliques permettent l'assimilation du SO_2 chez les levures. Au niveau chimique le SO_2 peut soit être réduit par la voie de la sulfite réductase, soit être oxydé en sulfates par l'intermédiaire du glutathion.

La réduction du SO_2 :

Le souffre est un élément indispensable à la vie puisqu'il intervient dans la composition de deux acides aminés la cystéine et la méthionine. Chez la levure la synthèse de ces acides aminés fait intervenir la voie de la sulfite réductase (Kobayashi et Yoshimoto 1982; Thomas et Surdin-Kerjan 1997). Cette voie métabolique permet l'assimilation des sulfates qui sont réduits en sulfites par l'enzyme PAPS reductase (Met16p) après un transport par les transporteurs Sul1p/Sul2p (Cherest *et al.* 1997). La réduction des sulfites en ions sulfides S^{2-} est alors réalisée par le complexe de la sulfite réductase (Met5p, Met10p). Le devenir des ions sulfides dépend de l'activité métabolique de la levure. D'une part, ils sont utilisés par l'homocystéine synthase pour incorporer l'atome de soufre dans le métabolisme de la levure. D'autre part, ils sont réduits en H_2S qui peut alors diffuser au travers la membrane. L'équilibre entre ces deux voies dépend de la disponibilité en composés azotés et est fortement contrôlé au niveau transcriptionnel (Spiropoulos *et al.* 2000; Marullo *et al.* 2006).

L'oxydation du SO_2 :

L'oxydation du SO_2 par une activité sulfite oxydase possible chez les mammifères supérieurs n'a jamais été décrite chez l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant ce type d'activité a été trouvé chez *Rhodoturula* (Kurek 1985) et pourrait être une réponse possible

chez d'autres espèces de levures. En revanche la levure est capable d'oxyder le SO_2 par l'intermédiaire du glutathion grâce à une réaction dite de sulfitolyse. De manière intéressante, une résistance au SO_2 a déjà été corrélée à des concentrations élevées de glutathion (Casalone *et al.* 1989). Cette réaction est catalysée par l'enzyme glutathion réductase codée par le gène *GLR1* (Outten et Culotta 2004).

ii. Mécanismes de neutralisation ou d'élimination du SO_2

Une fois présent dans la cellule, le SO_2 peut être neutralisé par deux mécanismes moléculaires. D'une part il se complexe avec des molécules telles que l'acétaldéhyde, d'autre part il peut être expulsé à l'extérieur de la cellule par des transporteurs spécifiques.

La combinaison du SO_2 avec l'acétaldéhyde :

L'acétaldéhyde est un des métabolites clés de la glycolyse et donc de la fermentation alcoolique. Celui-ci est volatile et peut se combiner avec de nombreux composés présents dans le vin dont le SO_2 dans une réaction stœchiométrique.

L'augmentation de la concentration d'acétaldéhyde en présence de SO_2 a déjà été observée (Weeks 1969; Casalone *et al.* 1992) pour les souches résistantes au SO_2 et permettrait une détoxification du milieu en se combinant au SO_2. Il a également été montré que l'augmentation de la concentration en SO_2 dans le milieu conduisait à l'augmentation de la concentration en acétaldéhyde rejetée dans le milieu (Divol *et al.* 2006).

La pompe à sulfite *SSU1* et son facteur de transcription *FZF1* :

Si les mécanismes précédemment cités jouent un rôle dans la détoxification du SO_2, l'expulsion des sulfites par un transport spécifique est certainement le plus efficace. L'étude de la résistance aux sulfites a été initiée par la découverte du gène par un crible de sensibilité au SO_2 (Casalone *et al.* 1994). Ce facteur de transcription à doigts de zinc se fixe sur des motifs promoteurs identifiés par gel retard (Avram et Bakalinsky 1999) ou chromatine co-immunoprécipitation (Badis *et al.* 2008). Il régule l'expression d'un nombre limité de gènes et répond à l'augmentation de la concentration en sulfites du milieu (Park et Hwang 2008).

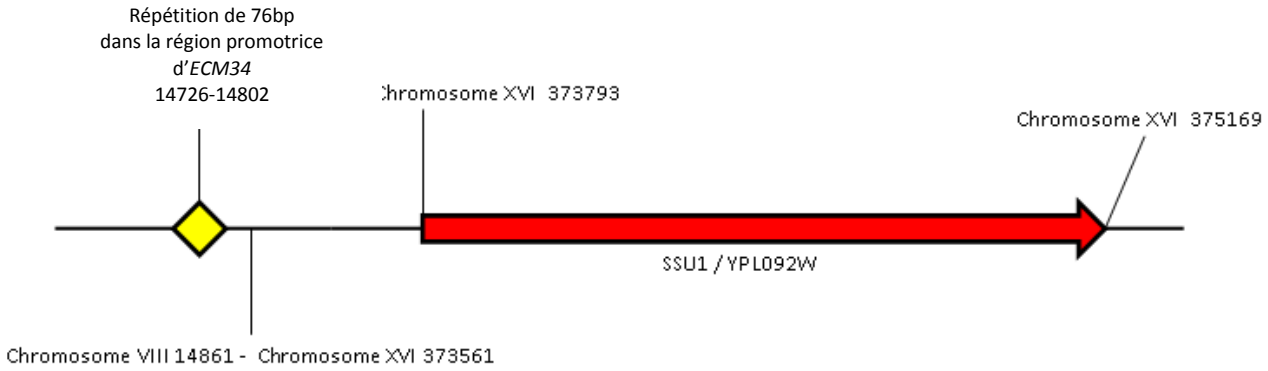


Figure 36. Translocation entre les chromosomes VIII et XVI.

Illustration de la translocation précédemment découverte qui implique le gène *SSU1* (Perez-Ortin 2002).

Table 2. Sulfite Tolerance of Yeast Strains Exhibiting Different Numbers of Repeats of a 76-bp Region in the Recombinant *SSU1* Promoter

Strain	Number of 76-bp repeats in recombinant *SSU1* promoter	Sulfite concentration (mM)				
		0	1	3	6	8
S288c	0 (nonrecombinant control)	+	+	−	−	−
T73	4	+	+	+	−	−
CECT10233	6	+	+	+	+/−	−
CECT10557	3 × 2[a]	+	+	+	+/−	−
Y-9	4 × 2[a]	+	+	+	+	−

Sulfite sensitivity was determined on YPD+TA plates containing 0–8 mM Na_2SO_3 as described in Methods. +, growth; −, no growth; +/−, poor growth scored after 24 h. Similar results were obtained in liquid medium in microtiter plates after 40 h.
[a]These strains are homozygous for the recombinant *SSU1* promoter.

Figure 37. Résistance aux sulfites.
Tolérance aux sulfites en fonction du nombre de répétitions de la séquence de 76bp (Perez-Ortin 2002).

Récemment il a été démontré que ce gène était soumis à de la sélection positive et que des modifications dans la séquence codante et promotrice pouvaient favoriser la résistance aux sulfites et la durée de la phase de latence des souches du genre *Saccharomyces* (Engle et Fay 2012). La cible principale de Fzf1p est le gène *SSU1* occupe dans ces travaux de thèse une position centrale. Identifié en 2000, Park et Bakalinsky, ce gène, lorsqu'il est surexprimé, peut contrecarrer l'effet de la délétion de *FZF1*. Il code pour une pompe à sulfite Ssu1p capable d'expulser le SO_2 hors de la cellule (Park et Bakalinsky 2013).

L'expression de *SSU1* au cours de la fermentation alcoolique a été récemment décrit pour différentes souches œnologiques (Nardi *et al.* 2010). Chez certaines souches cette expression semble être induite par la présence de SO_2 mais reste dans la plupart des cas constitutive à cause de la présence d'un mécanisme adaptatif extrêmement performant.
Une mutation a été décrite à propos de *SSU1*. Il s'agit d'une translocation en amont du gène impliquant le chromosome VIII (Goto-Yamamoto *et al.* 1998; Perez-Ortin *et al.* 2002) (Figure 36) Dans cette translocation (*SSU1-R*), le promoteur de *SSU1* est remplacé par celui d'*ECM34* sur le chromosome VIII. Ce promoteur présente une séquence répétée de 76bp, entre deux et six fois (Yuasa *et al.* 2004) et pourrait donc présenter plusieurs sites de fixations pour Fzf1p et ainsi être plus actif (Avram et Bakalinsky 1999). Si le nombre de répétitions de cette séquence augmente la résistance au SO_2 (Figure 37), aucune augmentation de l'expression de *SSU1* en présence de sulfite n'a été observé, mais l'expression des deux allèles est constitutive (Goto-Yamamoto *et al.* 1998), la présence de sulfites n'impactant pas le niveau d'expressions des gènes (Yuasa *et al.* 2005) qui augmente progressivement durant la fermentation alcoolique (Nardi *et al.* 2010). Il est intéressant de noter que toutes les souches possédants un allèle *SSU1-R* sont des souches œnologiques.

Résultats et discussion

Les gènes étudiés dans la première partie de ce travail n'affectent visiblement pas la phase de latence. Cependant il existe un lien génétique entre cette région du chromosome XV et de la durée de la phase de latence dans d'autres fonds génétiques (notamment EW51) ce qui suggère qu'il met en œuvre des mécanismes de contrôle. Dans cette partie, nous avons donc recherché les causes moléculaires pouvant expliquer l'effet de ce QTL grâce à l'analyse des séquences génomiques.

1. Mise en évidence d'une nouvelle translocation XV-XVI

Les génomes des souches parentales GN et SB ainsi que six autres souches précédemment utilisées dans le projet heteroyeast de *Saccharomyces cerevisiae* (294, 382, 328, A24, F10, F33, OS104 et VL3) ont été séquencées par une approche Illumina (Voir Matériels et Méthodes). Les séquences ont été assemblées par une méthode *de novo* délivrant environ 300 contigs par souches (Tableau 9). En interrogeant ces contigs *de novo* par l'algorithme *BLAST* avec la séquence du QTL-XV, une translocation réciproque entre les chromosomes XV et XVI a été mise en évidence pour les souches GN (contig c343 et c23) et VL3 (contig c309 et c8) (Figure 38) par rapport au génome de référence S288c et à la souche SB.

Souche	Nombre de lectures	Couverture des lectures	Nombre de contigs	Couverture des contig	Taille du génome assemblé	N50	N90
GN	2039188	12.7	398	0.94	11292297	50197	14308
SB	2790096	17.3	360	0.91	11011390	67760	17641

Tableau 9. Séquençage et contig *de novo*.
Description des paramètres des contig *de novo* obtenus lors du séquençage des souches GN et



Figure 38. BLAST des contigs *de* novo.
BLAST d'une partie du QTL-XV mettant en évidence une translocation entre les chromosomes XV (bleu) et XVI (rouge) pour les souches GN et VL3 contrairement à SB.

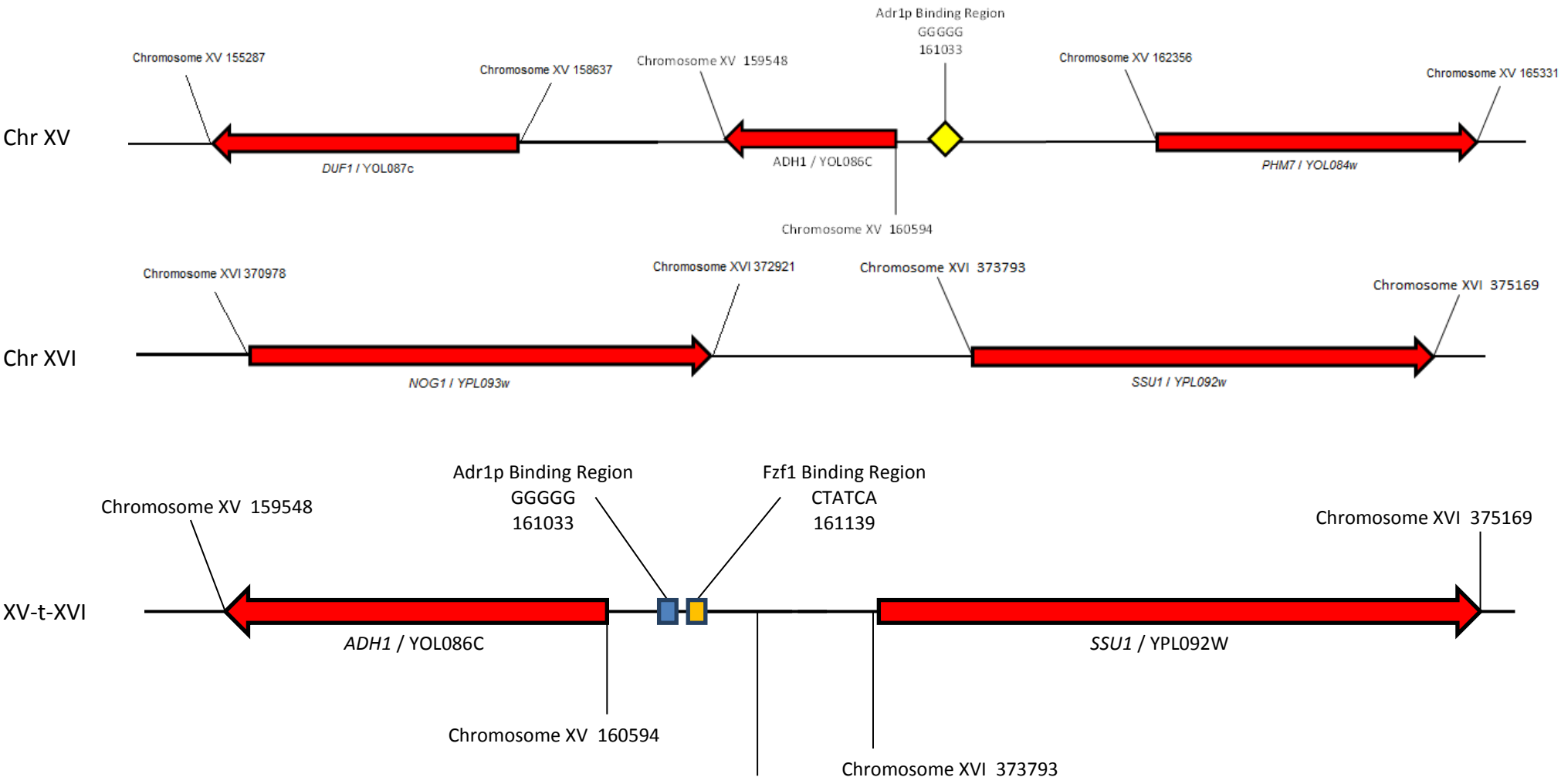


Figure 39. Translocation XV-t-XVI.

Représentation des deux régions du chromosome à proximité de la cassure ainsi que de la translocation entre les chromosomes XV et XVI. Le site de fixation original de Fzf1p sur le chromosome XVI est perdu lors de la translocation mais remplacé par une autre séquence consensus située sur le chromsome XV.

Cette translocation a lieu entre les séquences codantes d'*ADH1* et *PHM7* du chromosome XV, position 161342 et entre les séquences codantes de *SSU1* et *NOG1* du chromosome XVI, position 373561 (Figure 39). Ce réarrangement chromosomique entraine une modification de la région promotrice du gène *SSU1* qui code pour une protéine membranaire ayant le rôle de pompe à sulfites et permettant une détoxification de la cellule. Cette translocation fait apparaitre un site potentiel de fixation du facteur de transcription est Fzf1p (CTATCA) à 501 pb de la première méthionine de *SSU1*. De manière intéressante le gène *SSU1* se retrouve à 607 bp du site de site de fixation de Adr1p (GGGGG) qui est le facteur de transcription du gène *ADH1*. Ce gène code pour l'alcool déshydrogénase 1, qui réalise la transformation de l'acétaldéhyde en éthanol au cours de la fermentation alcoolique. De cette manière le gène *SSU1* pourrait alors profiter de cette position pour être surexprimé. Cette translocation décrite pour la première fois a été étudiée au cours de ce chapitre. Nous avons également vérifié si des souches de ce panel présentaient la translocation VIII-t-XVI décitre par Perez-Ortin. Pour cela nous avons réalisé un BLAST et des PCR misent en place ultérieurement. L'analyse indique également que les souches F10 et F33 présentent la translocation VIII-XVI, précédemment décrite (Perez-Ortin 2002). De manière intéressante la souche 294 ne montre ni translocation ni chromosomes sauvages par BLAST ou par PCR. Après vérification du nombre de *reads* obtenu pour cette souche au niveau de *SSU1*, il apparait que cette souche posséderait un nombre de copie important de ce gène qui aurait conduit à l'éviction de ces séquences par l'assembleur (Figure 40). Des études plus poussées dans cette direction doivent être menées.



Figure 40. Nombre de reads 294.

Illustration du nombre de reads du gène *SSU1* pour la souche 294. On peut voir un pic, montrant une très augmentation du nombre de reads indiquant la possibilité d'un nombre de copies élevés du gène.

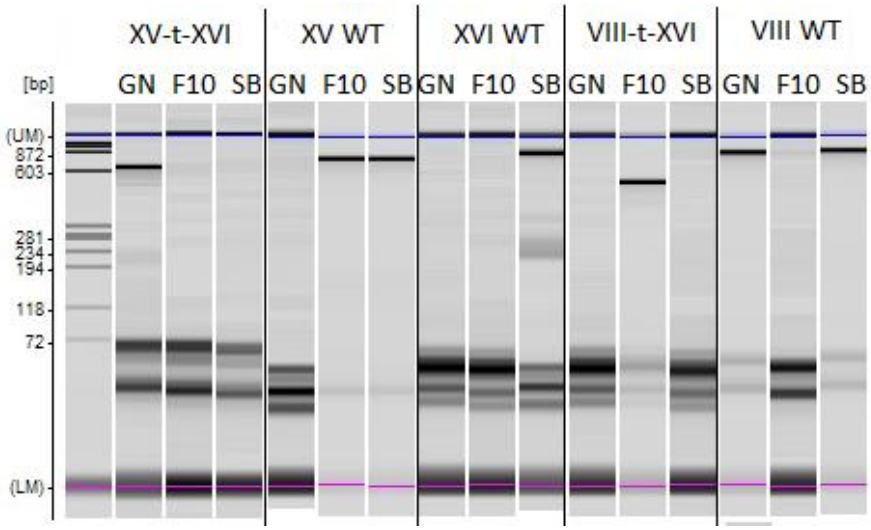


Figure 41. Profils PCRs.

Profils PCR des souches témoins pour l'état de translocation, GN (XV-t-XVI), F10 (VIII-t-XVI) et SB (WT).

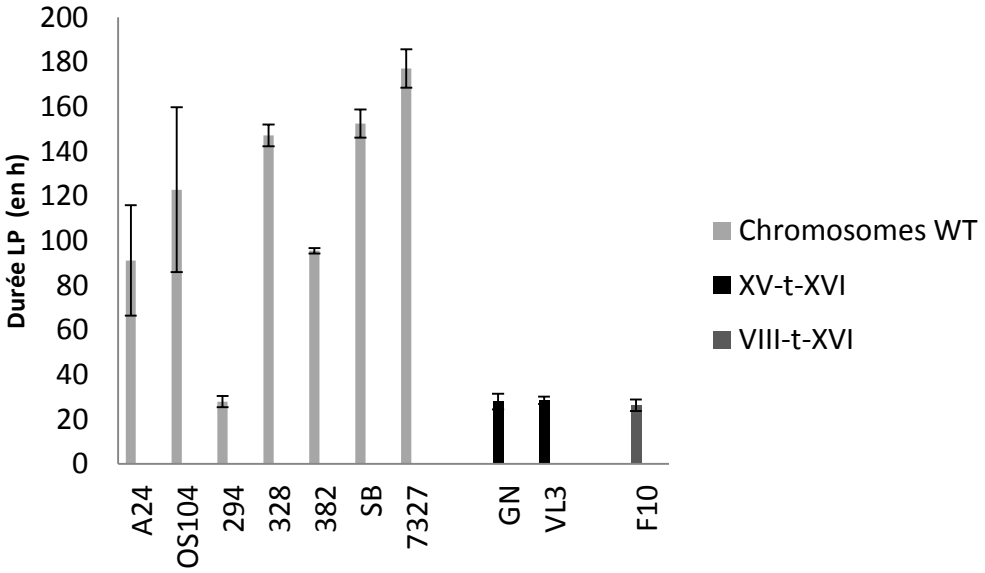


Figure 42. Souches parentales.

Durée des phases de latences en fonction de l'état de translocation de la souche. Seule 294 présente une phase de latence courte mais pas de translocation. Les résultats sont issus desmême fermentations que celles de la partie 1.

Au final l'analyse bio-informatique du QTL-XV et du gène *SSU1* sur 8 génomes de *Saccharomyces cerevisiae* assemblés *de novo* indique que deux d'entre eux (Souches GN et VL3) présentent une translocation XV-XVI, deux (F10 et F33) une translocation VIII-XVI et une (294) présente un nombre important (supérieur à 4 de copie de *SSU1*). Notons que ces cinq souches sont issues d'un environnement vinicole.

2. Etude de l'impact de la translocation XV-XVI

Avant d'entamer des manipulations lourdes telle que la construction de souches hémizygotes ou la vérification de l'expression du gène *SSU1*, une validation de sa présence par PCR ainsi que de son impact dans différents fonds génétiques a été effectuée. La translocation précédente impliquant le gène *SSU1* (Perez-Ortin 2002) a également été étudiée afin de comparer l'impact de ces deux translocations sur la phase de latence chez *Saccharomyces cerevisiae*.

a. Mise en place des PCR

Pour vérifier la présence ou l'absence de la translocation dans différentes souches, des PCRs ont été développées. Il s'agit de celles décrites dans le tableau 3 (Voir Matériels et Méthodes). Les amorces ont été dessinées à environ 500 bp de la fracture permettant ainsi d'utiliser la même amorce pour plusieurs PCRs et d'en limiter le nombre. De cette façon, nous pouvons déterminer la présence d'une translocation XV-t-XVI, VIII-t-XVI et des chromosomes non-transloqués (Wild-Type WT) : VIII, XV et XVI (Figure 41).

b. Effet des translocations sur la phase de latence chez les souches parentales du projet heterosyeast

Les souches du projet heteroyeast, précédemment utilisées pour vérifier l'impact du QTL dans différents fonds génétiques ont été à nouveau testées pour la durée de la phase de latence en fonction de l'état de translocation : XV-t-XVI, VIII-t-XVI ou les chromosomes WT (Figure 42).

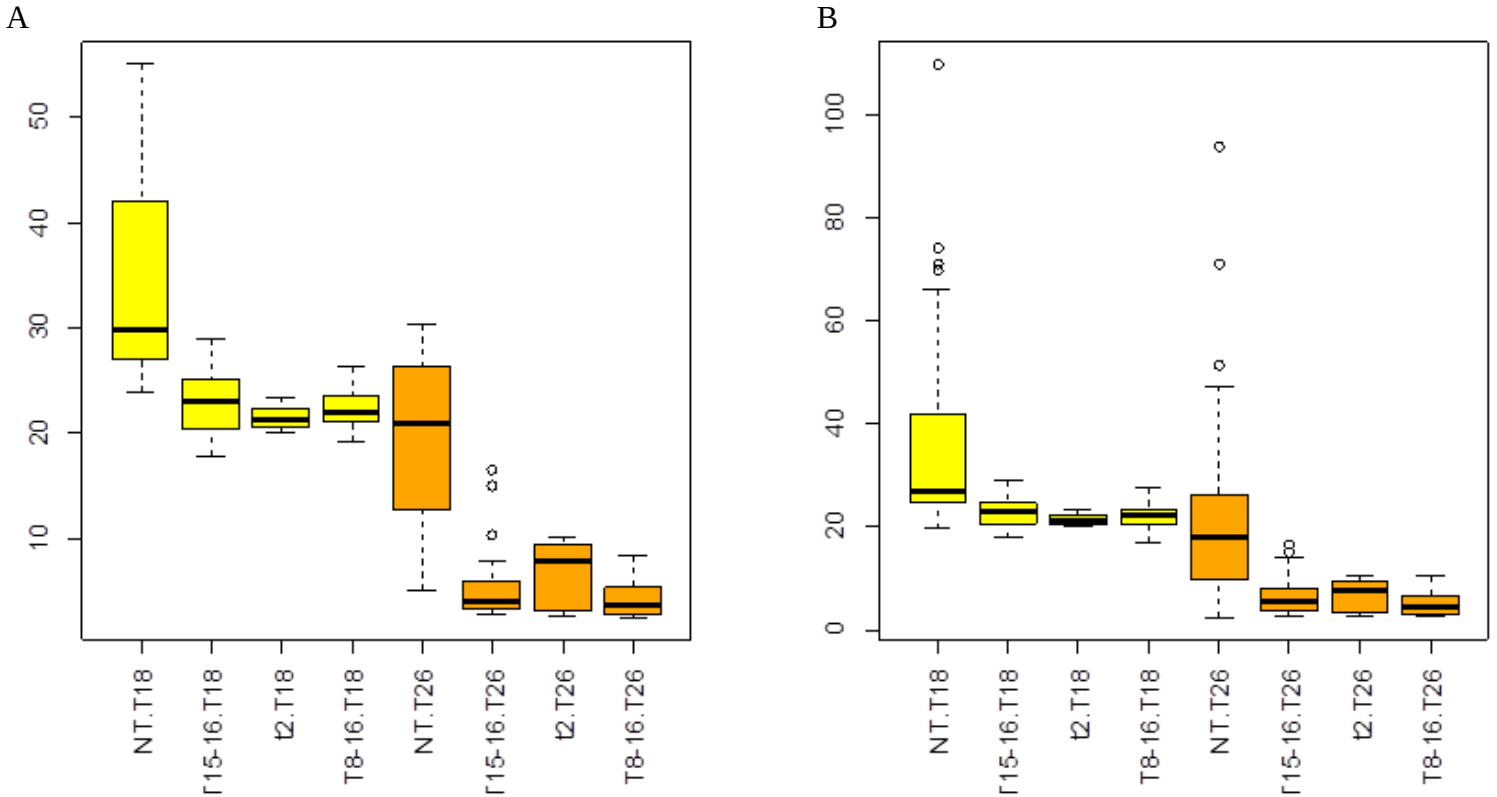


Figure 43. Durée des phases de latence.

Représentation des durées de phase de latence en fonction de l'état de translocation des souches ainsi que de la temperature. NT = Non Transloqué ; T15-16 = Translocation XV-t-XVI ; T8-16 = Translocation VIII-t-XVI ; T18 = 18°C et T26 = 26°C. Les durées des phases de latences sont en heures.

Toutes les souches à phase de latence longue ne possèdent que des chromosomes non-transloqués alors que les souches à phase de latence courte (F10, GN, VL3) sont porteuses une translocation XV-t-XVI ou VIII-t-XVI. Seule la souche 294 possède une phase de latence courte et ne semble pas avoir de translocation. Cependant cette souche présente un nombre de copie de *SSU1* supérieur aux autres souches tel que montré (Figure 40). Notons enfin que dans cette expérience la corrélation entre durée de phase de latence et présence d'une translocation est supérieure à celle observée avec le marqueur *YOL083w*.

c. Effet des translocations chez les hybrides du projet heterosyeast

Nous avons alors voulu vérifier le caractère additif (dominant) de ces translocations dans des hybrides issus des parents décrits plus haut. Pour cela nous avons utilisé les données produites par ma collègue Telma da Silva qui a réalisé des fermentations sur de nombreux hybrides issus d'un dispositif diallèle. Ce dispositif consiste à obtenir tous les hybrides possibles à partir d'une série limitée de parents en les croisant tous entre eux. Un sous ensemble de ce dispositif comprenant toutes les souches de *Saccharomyces cerevisiae* disponibles a été étudié ici. Pour les 7 souches parentales (GN, SB, VL3, F10, OS104, 294, A24), 28 hybrides ont été obtenus et leur phase de latence a été déterminée lors de la fermentation de Sauvignon Blanc sulfité à 2 g/hl. Lors de ce travail, deux séries de fermentations ont été réalisées : une à 18°C et l'autre à 26°C. La Figure 43 résume l'impact de la translocation au niveau intra et inter spécifique. Le panneau A montre clairement que les hybrides présentant une ou plusieurs translocations démarrent la fermentation plus vite que les souches non transloquées. Cet effet est très significatif à 18° (jaune) mais ne l'est pas à 26°C (orange) à cause de la réduction du temps de phase de latence. En revanche un effet température très net est décelé. L'effet des translocations a également été analysé en ajoutant les données obtenues avec les 27 hybrides interspécifiques (*Saccharomyces uvarum*-*Saccharomyces cerevisiae*) utilisés dans cette étude (panneau B). L'analyse des génomes de *Saccharomyces uvarum* montre qu'aucune translocation n'est décelable pour cette espèce. Dans le cas où les hybrides interspécifiques sont inclus l'effet des translocations n'est pas significatif mais il apparait visuellement une différence entre les

souches	*YOL083w*	XV-t-XVI
11B	GN	oui
14C	GN	oui
62B	GN	oui
74A	GN	oui
80C	GN	oui
EE23	Hybride	oui
11D	SB	non
17C	SB	non
30C	SB	non
4A	SB	non
8A1	SB	non

souches	*YOL083w*	XV-t-XVI
E1	GN	oui
F1	GN	oui
F2	GN	non
F3	GN	oui
F4	GN	oui
F5	GN	oui
F6	GN	oui
G2	GN	oui
G3	GN	oui
H1	GN	oui
EW51	Hybride	oui
E2	SB	oui
G1	SB	non
G4	SB	non
G5	SB	non
G6	SB	non
H2	SB	oui
H3	SB	oui
H4	SB	non
H5	SB	non
H6	SB	non

souches	*YOL083w*	XV-t-XVI
F1	GN	non
F2	GN	non
G1	GN	oui
G2	GN	non
G6	GN	non
H1	GN	non
H2	GN	oui
H3	GN	oui
H4	GN	oui
H5	GN	oui
EW31	Hybride	oui
F4	SB	non
F5	SB	oui
F6	SB	non
G3	SB	oui
G4	SB	oui
G5	SB	non
H2 (2)	SB	non
H3 (2)	SB	non
H4 (2)	SB	non
H6	SB	oui

Tableau 10. Tableau de ségrégants.

Les différents ségrégants utilisées pour les fermentations en pool, ainsi que l'allèle *YOL083w* et la présence ou non de la translocation XV-t-XVI.

souches transloquées et non transloquées. Cette analyse montre que des hybrides dérivés de nombreux fonds génétiques présentent une phase de latence plus longue lorsqu'ils n'ont pas de chromosomes transloqués. Si cette différence est significativement prouvée pour 28 hybrides de *Saccharomyces cerevisiae* à 18°C, elle l'est moins à 26°C ou sur un échantillon d'hybrides plus large.

d. Retour sur les ségrégants de EW31

Pour tester l'impact de cette translocation sur différents fonds génétiques, les précédentes manipulations effectuées avec des fermentations en pool basées sur une sélection faite par le marqueur *YOL083w*^{GN} avaient été utilisées (Voir résultats page 67). Cette fois-ci les ségrégants précédemment utilisés ont été regroupés en fonction de la présence ou non de la translocation XV-t-XVI (Tableau 10). Pour le fonds génétique EE23 cette séparation est identique à celle réalisée avec le marqueur YOL083. Tous les ségrégants GN possèdent une translocation XV-t-XVI et tous les ségrégants SB ont des chromosomes sauvages. Dans le fonds génétique EW51 pour lequel le QTL a également un impact, la corrélation GN/XV-t-XVI et SB/WT n'est pas parfaite, elle est relativement respectée, seul un ségrégant GN ne possède pas de translocation et 3 ségragants SB possèdent eux une translocation. Cette concordance imparfaite pourrait expliquer la plus faible différence de phénotype observé dans ce croisement que celui observé dans le fonds génétique EE23. Finalement, pour EW31, il y a une cassure du déséquilibre de liaison entre le locus YOL083 et la translocation. En effet, 5 ségrégants ayant l'allèle YOL083^{GN} ne présentent pas de translocation et 4 ségrégants ayant l'allèle YOL083^{SB} en possèdent une. Ce manque de lien génétique et l'absence de différence de phase de latence mesurée lors de l'expérience de la partie 1 suggère que la translocation plus que la présence du marqueur YOL083 puisse être à l'origine du phénotype observé.

La différence de durée de phase de latence correspond parfaitement à la répartition des ségrégants avec une translocation dans les deux pools. Lors d'une séparation parfaite des groupes, l'impact du QTL est particulièrement important (EE23), lorsque quelques ségrégants avec une translocation se retrouvent dans le pool des phases de latence longue, l'impact est moins important mais reste significatif (EW51). Finalement, lorsque les ségrégants avec ou sans translocations sont répartis de manière équitable à travers les deux groupes, alors aucune différence n'est observée.

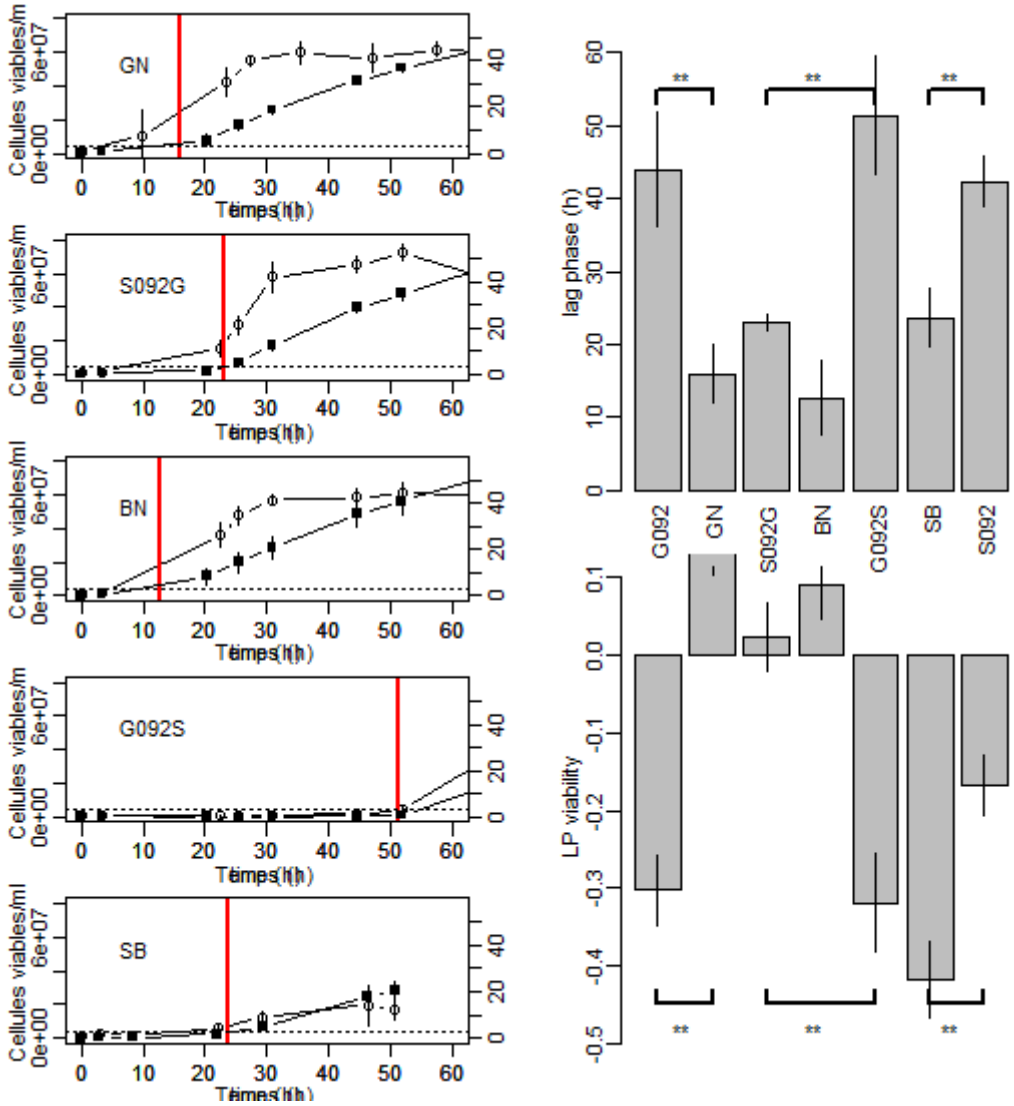


Figure 44. Impact de l'allèle SSU1 sur la phase de latence.

Les graphiques à gauche représentent l'évolution de la concentration en cellules viables (○) et la production de CO_2 (■) durant les 60h qui suivent l'inoculation. La durée de la phase de latence est indiquée par la ligne rouge. Les points tout comme les histogrammes sont les moyennes de trois répétitions indépendantes pour les différentes souches testées. Les différences statistiques ont été effectuées en utilisant le test de wilcoxon et est codé ** pour une p value <0,01.

3. Impact de l'allèle *SSU1* dans la durée de la phase de latence

Afin de confirmer l'effet du gène *SSU1* dans la phase de latence, nous avons utilisé la méthode RHA décrite et appliquée dans la partie 1. Le gène *SSU1* (*YOL092*) a donc été délété pour les souches GN, SB. Suivant la nomenclature précedément décrite les mutants GΔ092 et SΔ092 sont isogéniques de GN et SB mais sont dépourvus des deux copies de *SSU1* dans leur génome. A partir de ces mutants, les hybrides hemizygotes GΔ092S et SΔ092G ont été construits, ils sont isogéniques de l'hybride EE23.

Les fermentations ont été réalisées en milieu synthétique, dans des fermenteurs de 125 ml avec 40 mg/L de SO_2 total et à 24°C en triplicata. La durée de la phase de latence, le suivi de croissance et de viabilité ont été déterminés de la même façon que lors de la précédente expérience.

L'hémizygote GΔ092S a une durée de phase de latence bien plus importante que SΔ092G (Figure 44) montrant ainsi que l'allèle $SSU1^{GN}$ (Translocation XV-t-XVI) permet à la souche d'initier la fermentation alcoolique 28h avant la souche à l'allèle $SSU1^{SB}$ (Non-transloqué) (Test Wilcoxon $p<0,01$). Il est à noter que la présence de 2 copies de *SSU1* chez l'hybride BN permet encore de réduire la durée de la phase de latence par rapport aux hybrides avec une seule copie fonctionnelle (GΔ092S et SΔ092G) ce qui suggère que les deux allèles du gène *SSU1* (GN et SB) jouent un rôle dans la détoxification de la cellule et donc du départ en fermentation, même si l'allèle $SSU1^{GN}$ a un impact bien plus important que l'allèle $SSU1^{SB}$. Les mutants des souches parentales GΔ092 et SΔ092 répondent de la même façon, une augmentation de la phase de latence est constatée lors de la délétion de la seule copie de *SSU1*. Sur le plan physiologique, la différence de durée de phase de latence peut là aussi être expliquée par la viabilité des souches qui est significativement supérieure en présence de l'allèle $SSU1^{GN}$ (74% contre 59%). Néanmoins, cela n'est pas aussi simple. En effet, le parent SB possède une phase de latence bien plus courte (23h contre 50h) que l'hémizygote GΔ092S malgré une viabilité bien plus faible (58% contre 68%).

Ces données nous prouvent que l'allèle $SSU1^{GN}$ est la cause principale de la variabilité phénotypique observée pour la durée de la phase de latence et suggèrent que la réorganisation chromosomique chez GN via l'activation de la pompe à sulfite *SSU1* soit à l'origine de la différence de phase de latence observée entre les deux souches.

	Phase de latence (h)		*Viabilité durant la PL*		*SSU1/ACT1 (b)*	
	Variance	p value	Variance	p value	Variance	p value
Translocation	36.4	<0.001	36.2	<0.001	28.4	<0,001
SO_2	22.2	<0.001	8.0	<0.05	0.5	ns
Translocation:SO_2	34.9	<0.001	26.4	<0.01	2.3	ns
qPCR block	nd		nd		8.0	<0.05
Résiduel	6.4		29.4		60.8	

Tableau 11. Analyse de variance la phase de latence, de la Viabilité durant la phase de latence et de l'expression de *SSU1* .

ANOVA effectuée sous R permettant d'estimer la part de variance expliquée par la translocation ou la concentration en SO_2. Pour chaque condition 3 répétitions ont été analysées. nd= Non Déterminé. qPCR block = test de l'effet bloc de chaque qPCR réalisée.

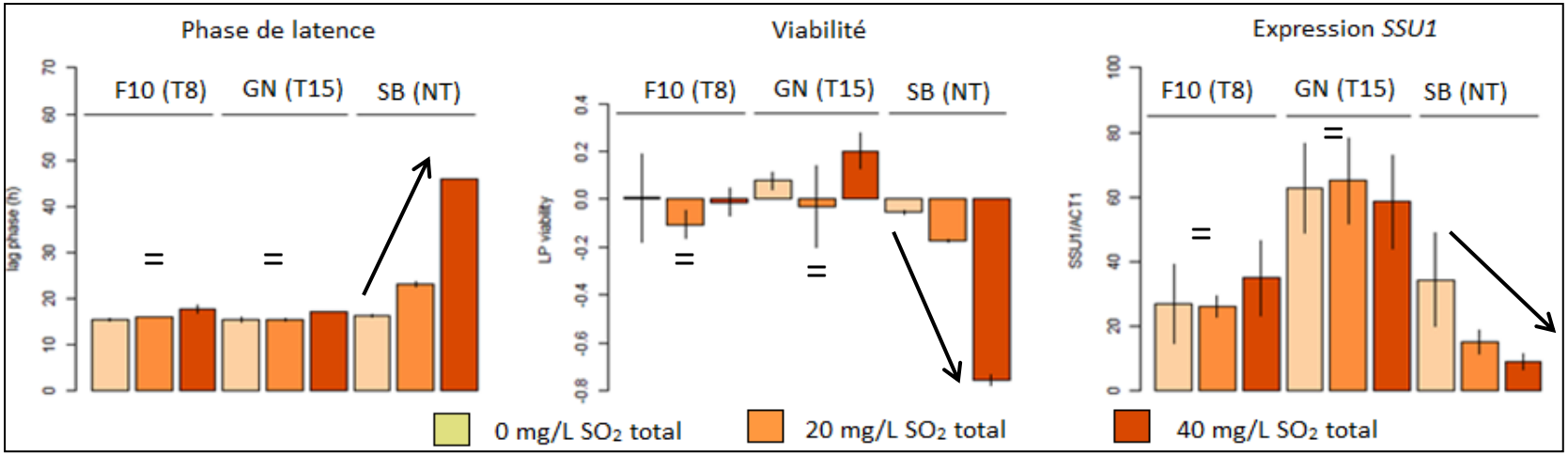


Figure 45. Effet des translocations XV-t-XVI et VIII-t-XVI sur la phase de latence, la viabilité durant la phase de latence et l'expression de *SSU1*.

La phase de latence, la viabilité et l'expression de *SSU1* sont présentés. Les concentrations en SO_2 (0, 20 et 40 mg/L) sont représentées par les niveaux d'orangé.Pour la phase de latence et la viabilité les histogrammes représentent les moyennes des 3 répétitions. Pour l'expression de *SSU1*, les histogrammes représentent les moyennes d'expression de *SSU1* normalisées par *ACT1* pour 6 à 9 échantillons.

4. Mesure de l'expression de gène *SSU1* en conditions œnologiques

a. Durant la phase de latence

Maintenant qu'il a été établi que le gène *SSU1* est le gène responsable de la différence de phénotype entre GN et SB il est nécessaire de vérifier si la translocation XV-t-XVI entraine une activation de son niveau d'expression grâce à sa position en amont du gène *ADH1*. Si l'allèle *SSU1-R* voit son expression induite chez certaines souches en présence de sulfites tout au long de la fermentation alcoolique (Nardi *et al.* 2010), rien n'a été établi pour la phase de latence, paramètre qui nous intéresse dans cette étude.

Pour ce faire, des fermentations ont été réalisées en milieu synthétique et contenant différentes concentrations en SO_2 total (0, 20 ou 40 mg/L). Les souches GN (XV-t-XVI), F10 (VIII-t-XVI) et SB (WT) ont été utilisées. La durée de la phase de latence a été déterminée par dégagement de CO_2 et des prélèvements ont été effectués durant toute la phase de latence, jusqu'au départ de la fermentation alcoolique. La croissance et la viabilité ont été suivies par cytométrie en flux et l'analyse de l'expression de *SSU1* a été faite pour la phase de latence.

Comme attendu et déjà décrit plusieurs fois, la concentration en SO_2 a un impact sur la phase de latence (Tableau 11). En particulier pour SB, la souche sans translocation où l'on triple la durée de la phase de latence (pour atteindre 45h) en passant de 0 à 40 mg/L de SO_2 total dans le milieu. Les souches GN et F10 possédant respectivement les translocations XV-t-XVI et VIII-t-XVI ne sont quasiment pas affectées et démarrent la fermentation alcoolique en moins de 20h à 40 mg/L de SO_2 total (Figure 45). Ceci peut être expliqué par la viabilité cellulaire durant la phase de latence, si les souches GN et F10 ne montrent pas de sensibilité au SO_2, SB est particulièrement affectée. En effet, à 40 mg/L de SO_2 total, SB montre une chute de 80% de sa viabilité initiale pouvant ainsi affecter la durée de la phase de latence. Ceci suggère un effet toxique du SO_2 sur la souche SB, un effet déjà observé précédemment sur les ségrégants de l'hybride BN (EE23) (Voir page 67).

Quant aux résultats d'expression du gène *SSU1*, un effet de la translocation XV-t-XVI est clairement détecté (Tableau 11et Figure 45). On remarquera cependant que l'expression de *SSU1* n'est pas induite par la concentration en SO_2 dans le milieu.

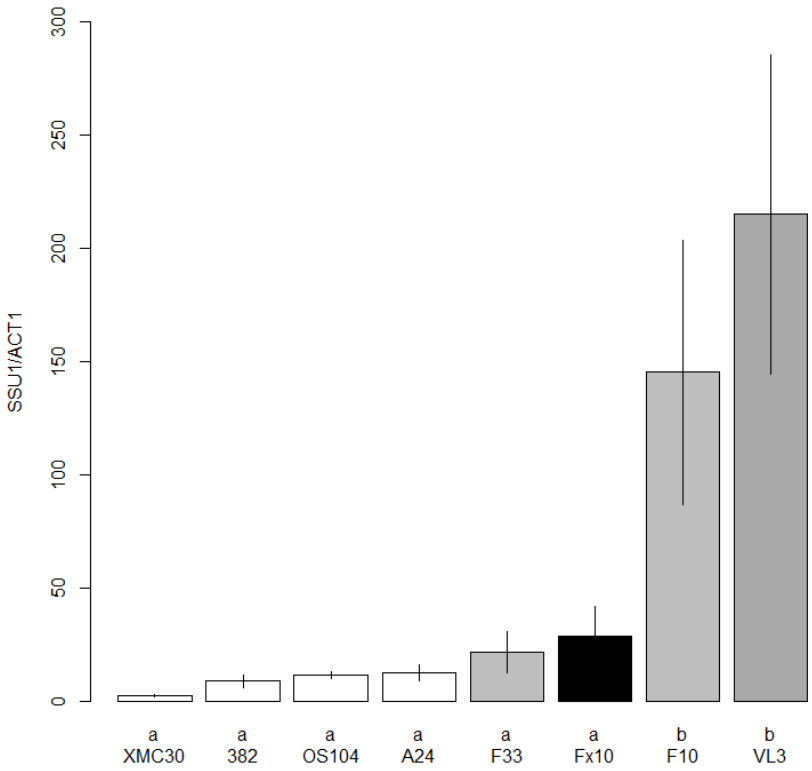


Figure 46. Expression de SSU1 à 40% de la fermentation alcoolique.

Le niveau d'expression de SSU1 a été mesuré durant la fermentation alcoolique. Les histogrammes représentent la moyenne du niveau d'expression de *SSU1* des extractions de 3 répétitions indépendantes pour chacune des huit souches utilisées (XMC30, 382, 0S104, A24, F33, Fx10, VL3). Les niveaux de gris représentent les formes du chromosome XVI, blanc (WT) , gris (VIII-t-XVI) et noirs (XV-t-XVI). Les lettres au-dessus de chaque souche représentent le groupe déterminé statistiquement par l'analyse de Duncan.

La souche GN (XV-t-XVI) présente une expression de *SSU1* trois fois plus forte que les autres souches durant la phase de latence. L'expression de *SSU1* entre F10 (VIII-t-XVI) et SB (WT) ne présente pas de différence significative (Test Duncan α=0,01).

Ces résultats montrent qu'il y a une différence importante d'expression de *SSU1* entre GN et SB durant la phase de latence probablement due à la présence de la translocation chez GN. Par ailleurs, même si aucune différence significative n'a été montrée quant à l'expression de *SSU1* entre F10 (VIII-t-XVI) et SB (WT), une augmentation significative de l'expression de *SSU1* en faveur de F10 (3,7 fois supérieur à SB) est observée lorsque la concentration en SO_2 total est de 40 mg/L (Wilcoxon $p<0,05$) indiquant que F10 pourrait détoxifier ces cellules plus efficacement que SB à de fortes concentrations en SO_2 et donc présenter une durée de phase de latence réduite.

b. Au cours de la fermentation alcoolique

Pour tester l'impact des différentes conformations du chromosome XVI sur le niveau d'expression du gène *SSU1*. Une dernière manipulation consistant à regarder l'expression du gène *SSU1* à 40% de la fermentation alcoolique a été réalisée en milieu synthétique avec 40 mg/L de SO_2 total. Huit souches ont été utilisées (XMC30, 382, 0S104, A24, F33, FX10, VL3). Quatre souches possèdent un chromosome XVI WT (382, A24, XMC30 et OS104). Deux souches possèdent une translocation VIII-t-XVI (F10 et FX10). Une possède une translocation XV-t-XVI (VL3) et la dernière possède les deux translocations (F33). Toutes les souches possédant une ou plusieurs translocations ont des niveaux d'expression supérieurs aux souches sauvages (Figure 46). Néanmoins, d'un point de vue statistique, seules les souches VL3 et F10 ont des niveaux d'expression significativement supérieurs aux souches WT. La souche F33 malgré ses deux translocations a un niveau d'expression de *SSU1* identique à celui des souches WT.

Ces résultats suggèrent que d'autres déterminismes génétiques entrent en jeu lors de l'expression de *SSU1* durant la fermentation alcoolique dans certains fonds génétiques.

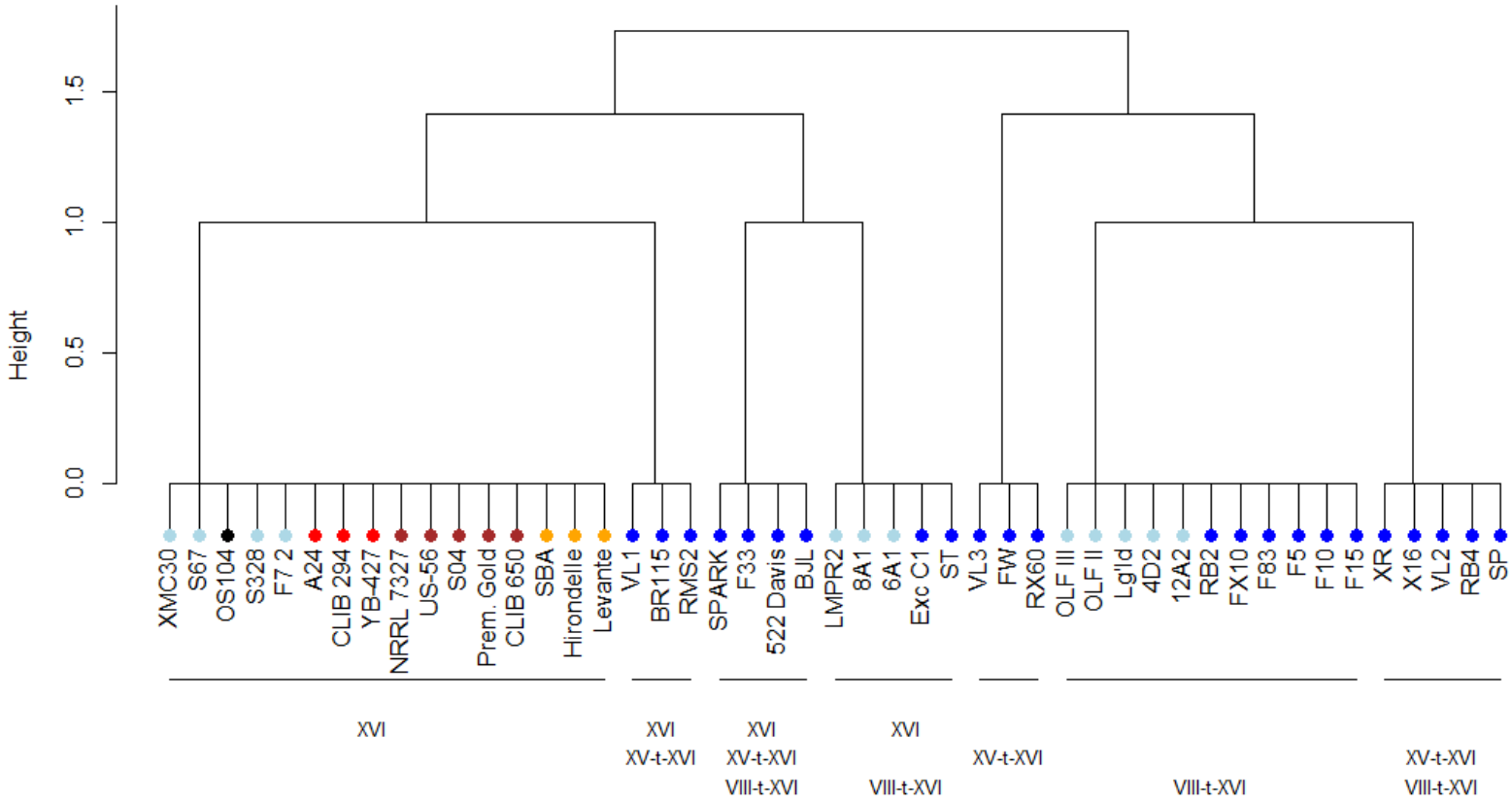


Figure 47. Distribution des différentes formes du chromosome XVI.

La distance Euclidienne entre 47 souches de levures en fonction de la présence des trois formes alléliques du chromosome XVI (WT, VIII-t-XVI, and XV-t-XVI) a été calculé à partir du logiciel R. L'origine des souches est codée par la couleur des points (Blue clair = Isolée dans le vin, Bleu foncé = Souche œnologique industrielles, Noir = Isolée du chêne, Rouge = Distillerie, Marron = Brasserie, Orange = Boulangerie)

5. Avantage sélectif

a. Fréquence de la translocation

Dans le but de vérifier si cette translocation est un évènement rare ou si une sélection naturelle a eu lieu, un panel de 47 souches de différentes origines a été criblé par PCR pour les différentes translocations. Ce groupe est constitué de 23 souches œnologiques commerciales, 12 souches naturellement isolées dans le vin, 3 souches industrielles de distillerie, 5 souches industrielles de brasserie, 3 souches industrielles de boulangerie et finalement une souche isolées naturellement sur le chêne. La Figure 47 représente la distribution des différentes formes du chromosome XVI. Parmi toutes les souches de boulangerie, brasserie, distillerie et celle isolée du chêne, aucune ne présente de translocation pour le chromosome XVI. A l'inverse, 31 des 35 souches de levures œnologiques présentent au moins une translocation pour le chromosome XVI. Pour certaines souches les trois formes possibles du chromosome XVI sont présentes (VIII-t-XVI, XV-t-XVI ou WT). De manière intéressante, seulement les souches œnologiques industrielles possèdent la translocation XV-t-XVI (15 sur 23). Ce résultat suggère que cette translocation a été sélectionnée de manière fortuite par l'homme lors de sa recherche de levures toujours plus performantes. La translocation VIII-t-XVI est présente dans 25 des 35 souches œnologiques dont 17 sont des souches industrielles œnologiques.

Souche	Translocation	Concentration SO_2 total (mM)										
		0	0,6	1,3	1,9	3,2	3,8	4,4	5,1	6,3	8,3	10,2
SB	0	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
X19	0	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ST	8 16	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-	-
Exc C1	8 16	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-	-
FX10	8 16	+	+	+	+	+	±	±	±	-	-	-
F5	8 16	+	+	+	+	±	±	±	±	±	-	-
RB2	8 16	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-	-
F83	8 16	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F10	8 16	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-	-
RB4	8 16	+	+	+	+	+	±	±	±	±	-	-
BO213	8 16	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-	-
A Rose	8 16	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
F15	8 16	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-
BJL	8 16	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-
VL1	15-16	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-	-
TXL	15-16	+	+	+	±	±	±	±	±	-	-	-
RX60	15-16	+	+	+	+	±	±	±	±	-	-	-
RMS2	15-16	+	+	±	±	±	±	±	±	-	-	-
GN	15-16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
X11	15-16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FW	15-16	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
X5	15-16	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
VL3	15-16	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-
BR115	15-16	+	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-
STR	15-16	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
F33	2T	+	+	+	+	±	±	±	±	-	-	-
522	2T	+	+	+	+	±	±	±	±	-	-	-
Spk	2T	+	+	+	+	±	±	±	±	-	-	-
VL2	2T	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
XR	2T	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-	-
SP	2T	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
X16	2T	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-

Tableau 12. Résistance au SO_2.

Résistance au SO_2 des souches et translocations. Les différents niveaux de gris représentent les différents états de translocation des souches. Les autres couleurs représentent les différents états de viabilité des souches. Vert (+) = roissance normale, Jaune (±) = bradytrophie et seuil de sensibilité des souches, Rouge (-) = abscence de croissance et seuil de viabilité des souches.

b. Impact sur la tolérance en SO_2 test sur boîte

Pour vérifier la tolérance au SO_2 des souches en fonction de l'état de translocation du chromosome XVI (chromosomes sauvages, une translocation ou une double translocation) un test en gouttes sur YPD solide a été développé. Il consiste à regarder entre 18h et 24h après dépôt sur boite la croissance des levures. 32 souches œnologiques ont été testées. Pour ces souches, deux seuils caractéristiques correspondant à des concentrations en SO_2 libre dans le milieu ont été relevés (Tableau 12) : un seuil de sensibilité, correspondant à un début de bradytrophie (jaune) et un seuil de viabilité, correspondant à l'absence de croissance (rouge).

Les souches sans translocations présentent un seuil de viabilité de 19,33 mg/L de SO_2 libre en moyenne, les souches présentant les translocations VIII-XVI, XV-XVI ou une double translocation ont un seuil de viabilité moyen de 78,33 mg/L, 71,1 mg/L, et 72,3 mg/L de SO_2 libre respectivement. Une ANOVA révèle une différence significative entre les moyennes de seuil de viabilité et les translocations (P=0,02873).

c. Compétition en LPl et LPc

Le résultat précédent montre que toutes les souches industrielles possèdent au moins une, deux voire trois formes du chromosome XVI, et plus particulièrement la translocation XV-t-XVI spécifique aux souches industrielles. Nous nous sommes demandé si cette translocation apportait un avantage sélectif quant à la colonisation du moût de raisin lors de la fermentation alcoolique en condition œnologique.

Une série de fermentations en milieu synthétique, dans des fermenteurs de 125ml et à 40 mg/L de SO_2 totale et à 24°C à été réalisée. Deux souches ont été utilisées, XAZ19 (WT) et GN-ho::NAT (XV-t-XVI) permettant ainsi, de déterminer par dépôt sur YPD d'un prélèvement en fin de fermentation puis repique velours sur YPD-NAT de colonies isolées quelle souche s'est implantée dans le milieu. Deux modalités ont été réalisées, faisant varier les concentrations de l'inoculum. Dans chaque modalité, la souche GN-ho::NAT a été inoculée à 1.10^3 cellules viables/ml et la souche SB à 1.10^6 cellules ou 5.10^6 cellules viables/ml. Grâce à ces différences d'inoculum la souche à phase de latence courte (GN) se retrouve en proportion 1000 fois ou 5000 fois moins concentrée que la souche à phase de

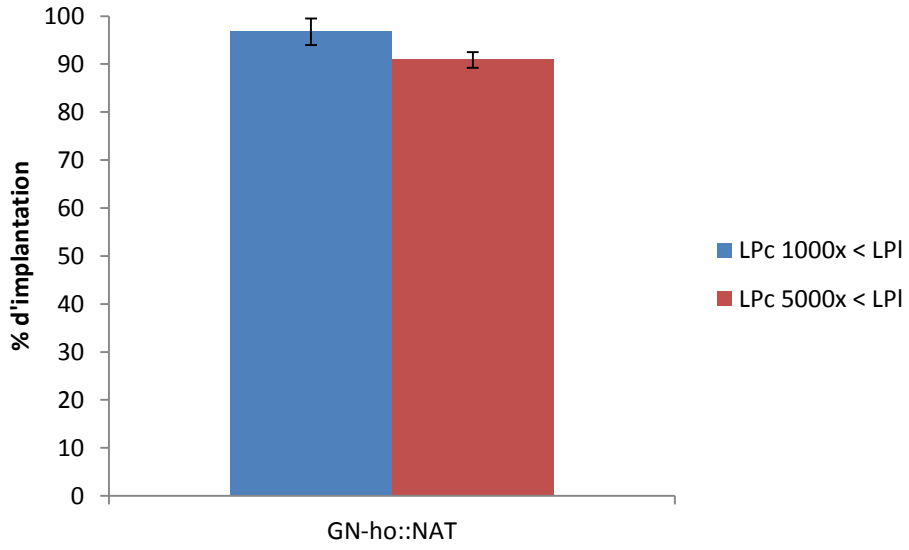


Figure 48. Implantation de la souche à phase de latence courte.

Pourcentage d'implantation de GN-ho ::NAT dans le milieu à la fin de la fermentation alcoolique. Ces données ont été obtenues par repique velours sur YPD + NAT de plus de 90 colonies isolées après dépôt d'un prélèvement du milieu en fin de FA.

latence longue (SB). Malgré ce fort déséquilibre, les résultats (Figure 48) montrent que la souche GN a un taux d'implantation compris entre 90 et 100% selon le rapport d'inoculation. Cette expérience montre que la translocation XV-t-XVI permet un avantage sélectif décisif lors de la colonisation du moût par rapport aux souches ayant un chromosome XVI sauvage. Il n'est donc pas étonnant de retrouver cette translocation dans la majorité des souches industrielles sélectionnées spécifiquement pour leur phase de latence courte et leur résistance au SO_2.

6. Conclusion

La résistance aux sulfites chez la levure intervient sous plusieurs formes comme nous l'avons vu dans cette partie. Le mécanisme de détoxification le plus efficace est celui de la pompe à sulfites Ssu1p. Plusieurs mécanimses moléculaires viennent modifier son activité et son expression : (i) des mutations ponctuelles (Xu *et al.* 1994), (ii) une expression différentielle (Goto-Yamamoto *et al.* 1998), (iii) et sans doutes des modifications post-transcriptionnelles (Nardi *et al.* 2010).

Une nouvelle translocation très répandue parmis les souches de levures œnologiques à été mise en évidence. Celle-ci modifie drastiquement la région en aval du gène *SSU1* et permet ainsi d'augmenter son expression. La présence de deux sites consensus de fixation pour les facteurs de transcription Addr1p et Fzf1p est sans doute l'explication à cette augmentation du niveau d'expression de *SSU1*. Toutes les variations expliquant l'adaptation des levures aux sulfites modifient directement ou indirectement le niveau d'expression du gène *SSU1*. De façon interessante la batérie *Oenococcus oeni* a une meilleure viabilité lorsque qu'elle possède une pompe à sulfites (tauE) similaire à *SSU1* (Favier *et al.* 2012). Cela montre que la pompe à sulfites est le mécanisme de sélection naturelle permettant aux micro-organismes de s'adapter aux sulfites.

Ces mutations peuvent être classées dans deux groupes. Les *trans*-actives qui affectent l'activité et l'expression de Fzf1p et donc l'expression de *SSU1* et les *cis*-actives comme les deux translocations VIII-t-XVI et XV-t-XVI qui snt prédominantes dans la population de levures œnologiques.

A un niveau intraspécifique, les translocations sont un moyen d'adaption particulièrement rapide permettant de créer un nouvel environement chromosomique (Liti et Louis 2005). Deplus, les translocations sont plus stables que les duplications segmenielles (Koszul *et al.* 2006). En laboratoire, plusieurs exemples démontrent l'interet des translocations dans l'adaptations à des conditions d'inhibitions ou de limitations en nutriments (Dunham *et al.* 2002). En revanche, les translocations dans des populations sauvages et confférent un avantage sélectif est rare. Jusqu'alors, la translocation VIII-t-XVI décrite par Perez-Ortin (2002) était l'unique exemple de translocation survenue dans une population naturelle. La nouvelle translocation XV-t-XVI décrite ici montre l'importance des translocations dans l'adaptation des levures à leur milieu.

L'expérimentation de compétion montre que cette translocation XV-t-XVI donne un véritable avantage aux levures en leur permettant de coloniser le milieu aux dépends des levures n'ayant aucune translocation. Ceci est confirmé par la prédominance des levures ayant une translocation VIII-t-XVI ou XV-t-XVI dans la population des levures œnologiques (naturelles ou industrielles). Ces souches ont été sélectionnées de manière directe ou indirecte pour leur rapide colonisation du moût de raisin contenant des sulfites.

CHAPITRE III

Impact sensoriel et sélection de levures

Revue Bibliographique

Levures industrielles et sélection

Les levures sont utilisées par l'homme depuis qu'il produit boissons et aliments nécessitant une fermentation (Cavalieri *et al.* 2003). C'est ainsi que *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée dans plusieurs industries comme la boulangerie, la brasserie, la distillerie et bien évidement l'œnologie. Une sélection de levures a ainsi été effectuée de façon fortuite et empirique, provoquant une différenciation génétique en fonction du processus de fermentation (Sicard and Legras 2011). Dans cette brève revue, nous allons nous intéresser aux souches de levures utilisées par l'industrie œnologique, à leur mode de sélection et aux critères technologiques à optimiser.

1. Méthode de sélection génétique des levures

Plusieurs méthodes de sélection existent et reposent sur des techniques plus au moins complexes, allant d'une simple sélection clonale en fin de fermentation aux techniques de biotechnologies moléculaires.

a. Les différentes méthodes de sélection

i. Sélection clonale

Cette technique repose sur l'isolement de levures à partir de cuves hautement qualitatives à la fois sur le plan gustatif, mais également technologique. Cela permet de constituer des collections de souches de levures œnologiques. Ces collections pourront être utilisées dans des programmes de croisement ou utilisées directement lorsque leurs caractéristiques conviennent. La qualité de telles collections repose donc sur l'expertise technique et œnologique des collecteurs. La connaissance des souches collectées passe par une caractérisation génétique afin d'identifier la souche et l'espèce, mais aussi technologique

pour connaitre leur potentiel technologique et vérifier si l'individu est satisfaisant d'un point de vue industriel.

La sélection clonale permet d'enrichir le réservoir de ressources génétiques. Cette technique permet d'obtenir des individus possédant des caractéristiques technologiques pertinentes comme des souches capables de redémarrer les fermentations (Rodríguez-Sifuentes *et al.* 2012). Elle est aussi utilisée pour la sélection de levures typiques d'un terroir (Tofalo *et al.* 2013). Cet argument est toutefois difficilement acceptable sur un plan scientifique tant qu'il n'est pas étayé par des études sérieuses comme par exemple le cas des levures utilisées dans la vinification du Sauvignon Blanc. Cette approche se heurte au nombre important de clones différents que l'on peut isoler en fermentation. La première étape consiste à isoler le ou les clones ayant un apport qualitatif remarquable. Généralement, on se concentre sur les souches dominantes en supposant que ce sont elles qui possèdent les caractéristiques gustatives et technologiques intéressantes.

ii. Mutagénèse et évolution dirigée

La levure *Saccharomyces cerevisiae* peut être améliorée par des techniques de mutagénèse aléatoire. Cette technique repose sur le criblage de mutants sur milieu sélectif permettant de sélectionner les clones d'une souche d'intérêt ayant acquis une nouvelle caractéristique technologique. Par exemple des mutants produisant peu de sulfure d'hydrogène ont pu être obtenus par cette approche (Cordente *et al.* 2009). Cette technique est surtout efficace en phase haploïde car le plus souvent les mutations sont récessives (Rous *et al.* 1983). Des techniques de mutagénèse des spores ont été développées (Romano *et al.* 1983) et permettent d'obtenir facilement des marqueurs d'auxotrophie utilisables par la suite pour croiser des souches des levures homothalliques. Cette approche a été utilisée dans l'article 1 de cette thèse (Dufour *et al.* 2013). Afin de sélectionner des souches plus performantes par mutagenèse, on peut utiliser des approches d'évolution dirigée qui cible des caractères quantitatifs. Cette méthode repose sur une culture continue de levures à laquelle une pression de sélection est effectuée. Cette pression de sélection permet

l'émergence de mutation apportant un avantage de croissance ou de résistance. Cette approche peut être réalisée en batch ou grâce à l'utilisation d'un chemostat. Il a ainsi été possible de sélectionner des souches assimilant mieux les sucres (Dunham *et al.* 2002), capable de consommer du xylose pour la production de bio-éthanol (Wisselink *et al.* 2009) ou ayant une production d'acétate diminuée (Cadière *et al.* 2011) .

iii. Organismes Génétiquement Modifiés (OGM)

Les techniques d'ADN recombinants permettent de moduler l'expression des gènes afin d'améliorer les capacités métaboliques des levures (Remize *et al.* 1999). Il est également possible d'introduire des gènes hétérologues dans le génome de la levure dans le but de lui donner de nouvelles capacités comme celle d'effectuer une fermentation malo-lactique (Volschenk *et al.* 2001) ou dans domaine tout à fait différent, de produire de l'acide lactique (Saitoh *et al.* 2005). Si ces recherches ont un fort potentiel et une bonne efficacité, elles restent sous-utilisées dans le domaine de l'œnologie. En effet, l'utilisation des souches OGM est interdit dans la plupart des pays et seulement deux souches de levures génétiquement modifiées ont été commercialisées aux USA (Husnik *et al.* 2006) avec une pénétration du marché très faible. Les souches OGM demeurent donc la plupart du temps dans les laboratoires de développement, servant de modèles pour vérifier l'intérêt de la construction avant de tenter d'obtenir la souches par des méthodes plus conventionnelles telles que celles citées précédemment (Swiegers and Pretorius 2007). En revanche ces techniques sont particulièrement utilisées dans d'autres industries comme celle de la production de bioéthanol (Xiong *et al.* 2013; Radakovits *et al.* 2010).

iv. Amélioration par croisement

C'est sans doute la technique d'amélioration des levures ayant le plus de potentiel pour l'industrie œnologique. Elle permet la manipulation de paramètres technologiques quantitatifs en associant des propriétés portées par des individus différents. La sélection de souches industrielles par croisement a été décrite pour la première fois par Winge et Laustsen (1939).

Depuis de nombreuses équipes ont utilisé ces méthodes pour optimiser des paramètres œnologiques tels que la production de glycérol (Prior *et al.* 1999), d'acide acétique (Giudici and Zambonelli 1992 ; Marullo *et al.* 2004; Marullo *et al.* 2009), de sulfure d'hydrogène (Giudici, Zambonelli, and Kunkee 1993 ; Marullo *et al.* 2006), de cinétique fermentaire (Marullo *et al.* 2006), de résistance à l'éthanol (Marullo *et al.* 2009) ou de production d'arômes (Dufour *et al.*, 2013).

Ces approches de croisement sont relativement longues à cause du caractère homothaliques des levures œnologiques (Johnston *et al.* 2000). Les croisements entre souches devant s'effectuer par appariement des spores (Romano *et al.* 1985)(Marullo *et al.* 2009). L'obtention de souches hétérotalliques par des approches de backcross (Bakalinsky et Snow 1990a; Dufour *et al.* 2013) ainsi que l'utilisation de marqueurs d'auxotrophies (Dufour *et al.* 2013 ; Timberlake *et al.* 2011) ont permis de faciliter ces approches. L'ensemble des travaux cités ci-dessus ont néanmoins été réalisées en mesurant des caractères phénotypiques afin de sélectionner les individus les plus performants. Ces approches bien que très efficaces s'avèrent longues ce qui limite le nombre d'individus analysés. Pour des caractères quantitatifs complexes impliquant plusieurs dizaines de gènes en ségrégation la probabilité d'obtenir des individus optimaux reste donc faible. L'introduction de la sélection assistée par marqueurs dans ce domaine a donc marqué un tournant décisif pour le développement des techniques de croisement. Le laboratoire de microbiologie de l'EA œnologie a été un des premiers à proposer ce type d'approches chez la levure. La sélection assistée par marqueurs permet de remplacer des tests phénotypiques par des tests moléculaires capables de trier les descendants d'un croisement par une simple analyse moléculaire. L'application de ces méthodes dans des programmes de backcross a été réalisée pour l'amélioration de nombreuses souches industrielles (Marullo *et al.* 2008 ; Marullo 2010 ; Marullo *et al.* 2007b ; Dufour *et al.* 2013). L'efficacité de cette approche tient au développement des travaux de cartographie de QTL permettant l'identification de nouveaux marqueurs génétiques.

Enfin les techniques de croisement permettent de croiser différentes espèces du genre *Saccharomyces* afin de combiner dans des hybrides inter-spécifiques leurs caractéristiques technologiques. L'avantage technologique d'hybrides interspécifiques est en effet bien connu dans le monde de l'industrie par exemple avec le cas de l'espèce *Saccharomyces pastorianus* résultant de l'hybridation de *S. cerevisie* et *S. eubayanus* (Libkind *et al.* 2011) et qui est utilisée dans la fabrication de plus de 80% de la bière mondiale. En œnologie des croisement interspécifiques ont été réalisés permettant par exemple d'obtenir des souches adaptées à la vinification des Sauvignon Blanc (Masneuf *et al.* 2002). Un important programme de recherche visant à mesure l'avantage sélectif et technologique d'hybrides interspécifiques *S. cerevisiae* * *S. uvarum* a été récemment réalisé au laboratoire (Projet ANR heterosyeast).

2. Cibles de la sélection

Les cibles de la sélection des levures pour l'œnologie sont nombreuses. Elles vont de l'amélioration des capacités fermentaires, à la production de vins plus sains en passant par l'amélioration des qualités organoleptiques. En effet, si l'un des premiers critères de sélection de levures était basé sur des paramètres cinétiques comme la rapidité de départ en fermentation ou la capacité à finir une fermentation et que ceux-ci reste d'actualité, de nombreux autres paramètres sont venus se greffer à cette sélection comme la résistance au stress, la production de composés aromatiques, améliorant ainsi la qualité générale des vins.

a. Capacités fermentaires

Une des premières cibles de sélection est l'amélioration des capacités fermentaires des souches. Les levains industriels doivent en effet garantir une implantation de la souche sélectionnée et une fermentation complète des sucres sans arrêts de fermentation. L'amélioration de ces paramètres passe par la sélection de plusieurs cibles comme la durée

de la phase de latence (Marullo *et al.* 2006), l'assimilation des substrats azotés (Salmon and Barre 1998), la consommation rapides du fructose (Berthels *et al*. 2008), la tolérance à l'éthanol (Santos *et al.* 2008) et la résistance à la température (Marullo *et al.* 2009). Un champ de recherche récent est en train de se développer avec les changements climatiques à venir. La diminution du taux rendement éthanol/sucre afin de réduire la quantité d'éthanol dans les vins (Varela *et al*. 2012; Rossouw *et al.* 2013). Des études dans ce domaines par des approches OGM ont été initiées depuis une quinzaine d'années (Remize *et al*. 1999; Henricsson *et al*. 2005) et sont maintenant reprises par des stratégies non OGM (Bely *et al.* 2013).

b. L'élimination des défauts olfactifs

Les levures peuvent produire certains composés volatiles apportant des défauts olfactifs que les vinificateurs cherchent à éliminer. Parmi ceux-ci citons le sulfure d'hydrogène et l'acidité volatile.

La production de sulfure d'hydrogène a lieu durant la fermentation, lorsque l'azote assimilable a été entièrement consommé (Jiranek *et al*. 1995b) et à la fin de celle-ci lors de l'autolyse des levures, phénomène pouvant être évité en décalant de quelques jours le sulfitage (Lavigne 1996). De nombreuses études montrent une variation de production liée aux fonds génétiques (Giudici *et al.* 1993; Romano *et al.* 1985; Jiranek *et al.* 1995b; Marullo *et a.* 2004). Plus récemment des études génétiques se sont intéressées aux gènes responsables de la production de ce composé (Linderholm *et a.* 2008).

L'acidité volatile est due à l'accumulation d'acide acétique et autres acides organiques durant la vinification. Au-delà de 0,6 g/L il devient un défaut organoleptique. La majeure partie de l'acide acétique est formé durant la phase de croissance et dépend de l'état d'oxydoréduction de la cellule. Cette production peut donc être diminuée en stimulant la formation de biomasse (Bely *et al.* 2003). Une étude très récente désigne *YAP1* comme un des gènes responsables de la production d'acide acétique, les mutants présentant un profil

d'expression faible (Cordente *et al.* 2013). Enfin, notons que même si il ne s'agit pas de composés provoquant des défauts olfactifs, la diminution d'éthyl carbamate, un composé potentiellement cancérogène, par la manipulation des voies métaboliques des acides aminés a été réalisé (Coulon *et al*. 2006).

c. Amélioration des qualités organoleptiques

De nombreuses études portent sur l'amélioration des qualités organoleptiques du vin, pour revue voir Marullo et Dubourdieu (2010). Par des approches OGM il a été proposé d'augmenter la production de terpènes (Herrero *et al.* 2008; Baffi *et al.* 2013), d'esters et d'alcool supérieurs (Lilly *et al.* 2006; Swiegers *et al.* 2005). La diminution de l'acidité des vins (Husnik *et al.* 2006) a été également proposée. En ce qui concerne les approches non OGM la sélection clonale reste la principale stratégie utilisée. De nombreux travaux portent sur la production d'esters. Les arômes variétaux, spécifiques des cépages et responsables de la typicité tant recherchée par les vinificateurs sont aussi la cible de ces sélections (Tominaga and Dubourdieu 2000). En fonction de la souche, ces précurseurs seront plus ou moins bien libérés (Masneuf *et al*. 2002; Howell *et al.* 2004).

Résultats et discussion

Méthodes de sélection appliquées à la phase de latence et impact sensoriel

La dernière partie de cette thèse est consacrée à étudier l'impact de la phase de latence sur le plan sensoriel. Cette partie ayant été réalisée en dernier elle présente des résultats préliminaires qui devront sans doute être mieux explorés.

Les écarts de phase de latence observés entre les souches au cours des précédents chapitres varient entre plusieurs heures et quelques jours. Ces durées, importantes, avant tout activités fermentaires sont succeptibles de modifier considérablement la composition chimique des moûts par au moins trois types d'activité: (i) le métabolisme de la levure *S. cerevisiae* présente dans le milieu, (ii) l'activité des enzymes du raisin, (iii) l'activité d'autres levures du môut pouvant se développer avant le démarage de la fermentation par *S.cerevisiae*. Ces activités pourraient en retour influencer la perception du produit final.

Pour répondre le plus fidèlement possible à cette question, nous avons entrepris de construire des souches présentant des phases de latence longues afin de réaliser des tests comparatifs sur le plan biochimique et sensoriel. Pour pouvoir comparer au mieux l'impact de la phase de latence nous avons construit des souches isogéniques par des programmes de croisement assistés par marqueurs. La comparaison de ces souches a permis d'evaluer l'effet de la phase de latence et des translocations dans plusieurs conditions œnologiques.

Tout d'abord, nous avons comparé l'effet de la phase de latence lors de la vinification de Sauvignon Blanc. Ensuite lors du projet PREFERMENT nous avons étudié l'influence de la phase de latence sur le développement d'autres espèces de levures et si ce développement permettait de moduler la qualité organoleptique des vins obtenus. Enfin nous avons étudié l'impact de la phase de latence et des translocations sur l'acidité volatile et la production de sulfure d'hydrogène. Dans chacune de ces expériences, des souches isogéniques ont été comparées. Ces souches présentent une identité de génome comprise entre 93 et 97% ce qui les rend facilement comparables et permet de s'affranchir du poids d'autres gènes et de leurs effets d'interaction. Dans cette partie plus proche de la pratique œnologique toutes les fermentations ont été réalisées en moût naturel soit au laboratoire soit en chais.

1. Etude de l'impact de la phase de latence sur la production de thiols volatils en Sauvignon Blanc

a. Description des deux fonds génétiques utilisés

Avant mon arrivée au laboratoire l'étude de l'influence des gènes *URE2* et *IRC7* sur la production de thiols par *Saccharomyces cerevisiae* a été réalisée. Ce travail visait à introgresser par des backcross (rétrocroisements) un allèle non fonctionnel du gène *URE2* afin de construire des souches produisant des quantités importantes de thiols volatils. L'introgression de cette forme allélique a été réalisée dans deux fonds génétiques Vin13-22D et VL3-1D. Ces travaux ont permis de mettre en évidence des effets d'interactions entre des formes alléliques des gènes *URE2* et *IRC7.* Les principaux résultats de ce travail sont décrits dans la publication (Dufour *et al.* 2013) à laquelle j'ai participé. Ces résultats démontrent que les gènes *URE2* et *IRC7* sont capables d'expliquer une grande part de la variabilité observée pour la biotransformation de 4MMP et de 3MH. Dans le cadre de ce chapitre nous nous attachons à étudier l'impact éventuel de la phase de latence et de la translocation XV-t-XVI sur ces molécules en utilisant les données phénotypiques obtenues par Dufour *et al* (2013).

b. Fonds génétique BV et validation de l'impact de la translocation sur la durée de la phase de latence.

Un premier programme d'introgression dans le fonds génétique VIN13-22D a été réalisé. L'hybride VIN-BC4 (BV) issu de 4 rétro-croisements a été produit. Cet hybride homozygote pour plus de 93 % de son génome est hétérozygote pour les gènes *URE2*/*ure2**, *LYS2*/*lys2*, *URA3*/*ura3*, *HO*/*ho*. La fermentation d'une dizaine de descendants de cet hybride révèle que tous ont des durées de phase de latence très longues (>80h). Ces résultats ont été observés sur un moût de Sauvignon blanc sulfité à 2g/hl (résultats non montrés). Grace aux méthodes décrites dans la partie II, nous avons recherché si ces souches présentaient ou non une translocation au niveau du gène *SSU1*. Sans surprise la souche VIN-BC4 possède deux copies non transloquées du chromosome XVI.

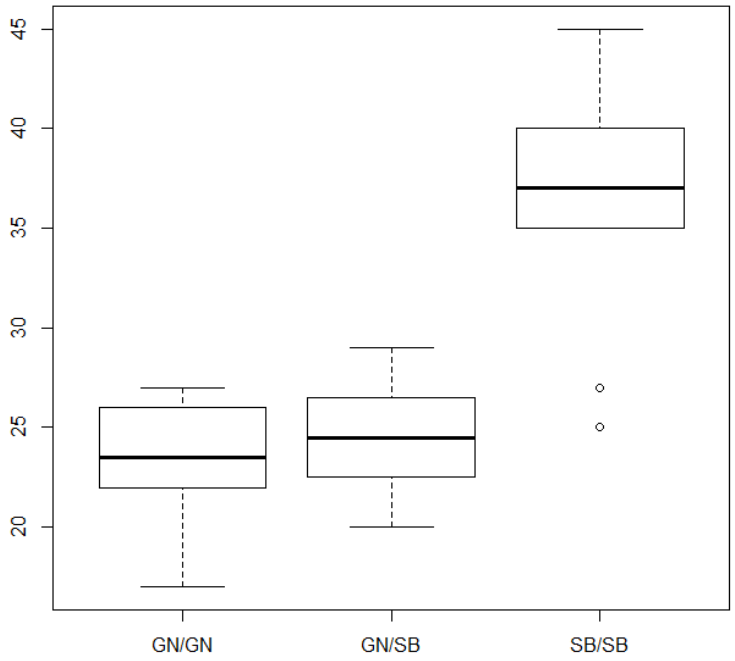


Figure 49. Impact allélique du gène *YOL083* sur BV.

Impact des allèles SB et GN du marqueur YOL083 sur la durée de la phase de latence chez des ségrégants de BV.

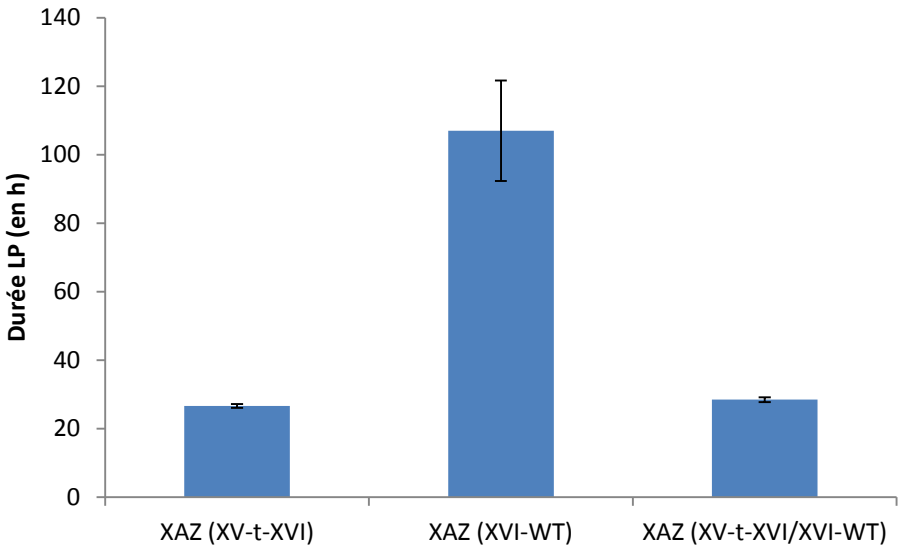


Figure 50. Phase de latence XPM43.

Variation de la durée de la phase de latence en fonction de la configuration du chromosome XVI. Les moyennes et écart-types sont faits à partir de deux répétitions indépendantes pour les 3 ou 9 utilisées par groupe.

Le croisement d'un de ses descendants (XCM13-1C) avec la souche VC6-4 porteuse de la forme XV-t-XVI permet de restaurer une phase de latence courte chez l'hybride BV. Comme attendu, les descendants F2 de l'hybride BV montrent une ségrégation pour la phase de latence en fonction de l'allèle étudié. Ici l'hérédité SB/GN pour le marqueur *YOL083w* co-ségrège avec la translocation. Voir Figure 49. La souche VC6-4 également porteuse des allèles *URE2* et $IRC7^{LT}$ a permis d'étudier dans la descendance de l'hybride BV l'impact des gènes *URE2*, *IRC7* et *YOL083w* sur la prodution de thiols volatils comme nous allons le voir plus bas.

c. Fonds génétique XPM43 et validation de l'impact de la translocation sur la durée de la phase de latence.

Un second programme d'introgression dans le fonds génétique VL3-1D a été construit de la même manière. L'hybride issu de 4 backcrosses est nommé XPM43. Il est hétérozygote pour les allèles *URE2*/*ure2**, *LYS2*/*lys2*, *URA3*/*ura3* et *HO*/*ho* ainsi que les formes XVI-WT et XV-t-XVI. Une série de 19 souches diploïdes issues du croisement de spores de XPM43 ont été construites. Ces hybrides nommés XAZ1 à XAZ19 sont des descendants F2. Leur génotypes pour les locus *URE2*/*ure2**, et XVI-WT/XV-t-XVI ont été obtenus par typage moléculaire. Des fermentations ont été réalisées en bouteilles de 75 cl avec du moût de Sauvignon blanc du domaine Ducourt millésime 2010. Ces dernières ont été effectuées à 24°C avec 40 mg/L de SO_2 total. Le suivi de la fermentation et des paramètres cinétiques a été fait par pesées régulières des bouteilles. Trois souches homozygotes chr: XV, chr: XVI, 3 souches homozygotes chr XV-t-XVI et 9 souches hétérozygotes ont été utilisées. Les résultats concernant la phase de latence sont présentés dans la Figure 50. La différence entre les souches XV-t-XVI et les souches WT est de 80h. Pour les souches hétérozygotes, la moyenne de durée de phase de latence est de 28h. Un seul allèle transloqué suffit à établir une phase de latence courte, de durée égale à celle des souches homozygotes XV-t-XVI.

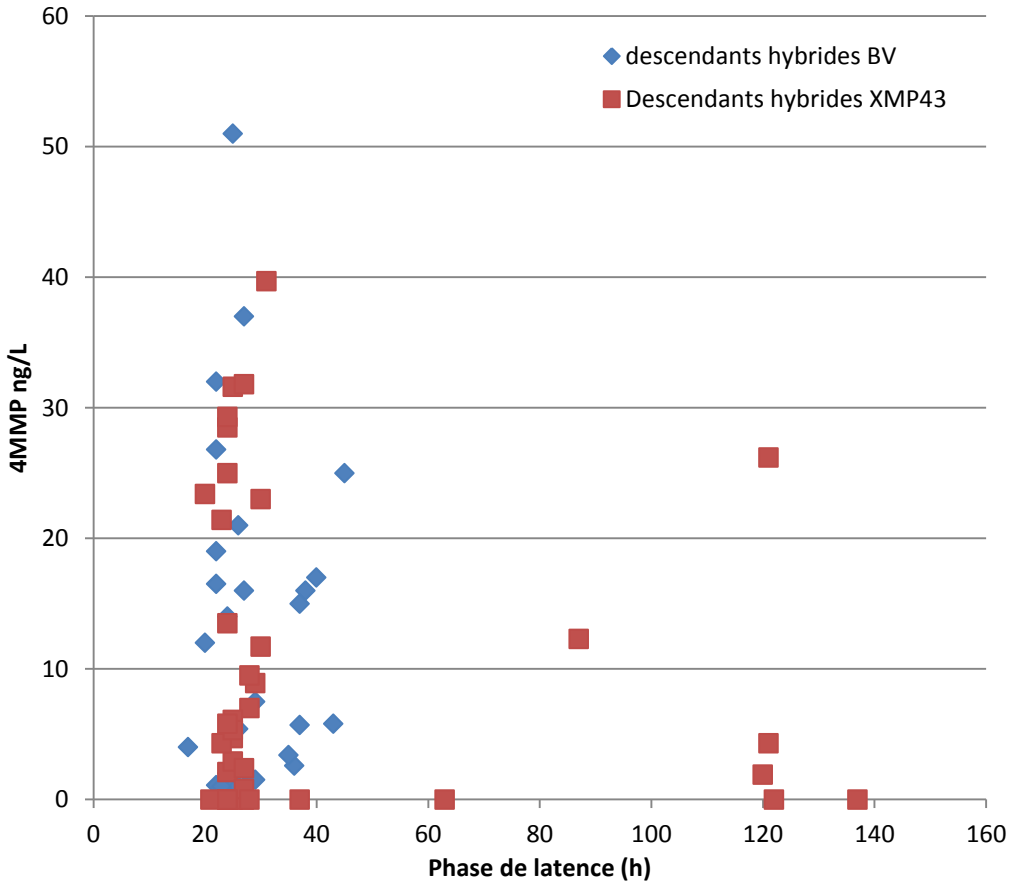


Figure 51. Phase de latence et production de thiols.

Aucune corrélation n'est observée entre phase de latence et production de thiols volatils

d. Impact de la phase de latence sur la production de thiols volatils

Initialement ces programmes de croisement visaient à étudier l'impact de la ségrégation du gène *URE2* sur la production de thiols volatils dans deux fonds génétiques VIN13-22D et VL3-1D. Ces expérimentations nous également permis de tester l'impact de la durée de la phase de latence ou de la présence de translocation XV-t-XVI sur ces mêmes composés aromatiques.

Les fermentations ont été réalisées dans des bouteilles de 37,5 cl avec du moût de Sauvignon blanc Ducourt, 2010, à 24°C avec 40 mg/L de SO_2 total. Le suivi de fermentation a été réalisé en pesant les bouteilles régulièrement. Le dosage des thiols et les analyses courantes des vins ont été réalisés par le laboratoire SARCO. L'ensemble des souches a terminé la fermentation alcoolique. Les résultats obtenus pour les descendants de BV et de XPM43 sont présentés dans la Figure 51 pour la 4MMP. Aucune corrélation n'a pu être établie entre durée de la phase de latence et production de thiols volatils pour cet arôme ni pour les autres (résultats non montrés). Par ailleurs si l'on sépare les individus selon les trois classes de translocations présentes aucune différence significative n'est retrouvée entre les groupes génétiques (Anova, P-value=0.05). Ces résultats suggèrent que la phase de latence ne modifie pas la biotransformation des précurseurs d'arômes en thiols volatiles malgré les différences importantes observées. En revanche des variations significatives sont liés à la ségrégation des gènes *URE2* et *IRC7*. Ces résultats démontrent l'impact positif des allèles *ure2** et $IRC7^{LT}$ dans le déterminisme de la production de thiols volatiles voir (Dufour *et al.* 2013).

e. Conclusion

L'impact de la translocation XV-t-XVI a pu être évalué dans deux nouveaux fonds génétiques. Ce travail a permis de démontrer notre capacité à construire des souches isogéniques et à introgresser une translocation dans le génome d'une souche cible. Nous avons également profité des dosages réalisés dans ce travail pour vérifier si la durée de la phase de latence pouvait modifier le contenu en thiols volatils des vins. Les résultats obtenus sur un moût démontrent que ce paramètre n'influence pas directement la production de thiols volatils. Il faut néanmoins noter que le moût utilisé était congelé et présentait peu de précurseurs d'arôme notamment ceux du 3MH. Effectuer cette expérimentation sur d'autre moût s'avère nécessaire avant de conclure.

2. Projet PREFERMENT et impact organoleptique

Le projet PREFERMENT dirigé par le Professeur Isabelle Masneuf-Pomarède en partenariat avec les sociétés Laffort et Pernod-Ricard a pour but d'étudier l'impact des levures non-*Saccharomyces* sur les qualités organoleptiques du vin. Au cours de ma thèse, j'ai participé à ce projet en fournissant des souches de levures nécessaires à sa réalisation. Le dispositif expérimental prévoyait la fermentation d'un mélange de levures comprenant une souche de *Saccharomyces cerevisiae* et un mélange d'espèce non-*Saccharomyces* représentatif de la flore naturelle a été reconstitué : *Hanseniaspora uvarum* et *Candida zemplinina* (1.10^6 cellules viables/ml), *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Pichia kluyveri* (1.10^4 cellules viables/ml). Pour faciliter l'implantation des souches non-*Saccharomyces*, nous avons utilisé une souche de *Saccharomyces cerevisiae* à phase de latence longue. Une souche avec phase de latence courte a également été utilisée comme témoin. Deux souches isogéniques issues d'hybrides XMP43 ont été sélectionnées. Ces souches présentaient des productions de thiols volatiles comparables et avaient le même génotype pour les gènes *URE2* et *IRC7*. Il s'agit des souches XAZ11 (XV-t-XVI) et XAZ19 (WT).

Les fermentations du projet PREFERMENT ont été réalisées par Warren Albertin. Brièvement, des fermentations de moûts de Sauvignon blanc ont été réalisées en fermenteur de 1.2L assurant un contrôle de la température. Pendant la phase pré-fermentaire, la température était contrôlée à 13°C puis au démarrage de la fermentation alcoolique la température a été ajustée à 18°C.

Cinq types d'inoculation ont été réalisés :

- XAZ11 (XV-t-XVI) seule,
- XAZ11 + non-*Saccharomyces*,
- XAZ11 inoculé à 1.10^3 cellules viables/ml + non-*Saccharomyces*,
- XAZ19 (WT)
- XAZ19 + non-*Saccharomyces*.

Trois répétions indépendantes ont été effectuées par modalité. La concentration en SO_2 des moûts a été ajustée à 2g/hl permettant l'expression d'une phase de latence longue pour la souche XAZ19. Les cinétiques de production du CO_2 en fonction du temps sont présentées sur la Figure 52 pour les cinq modalités. Les résultats (non-montré ici) indiquent que la souche XAZ19 à phase de latence longue permet le développement des souches non-*Saccharomyces*, il en est de même pour la modalité XAZ11 inoculé à 10^3 cellules viables/ml.

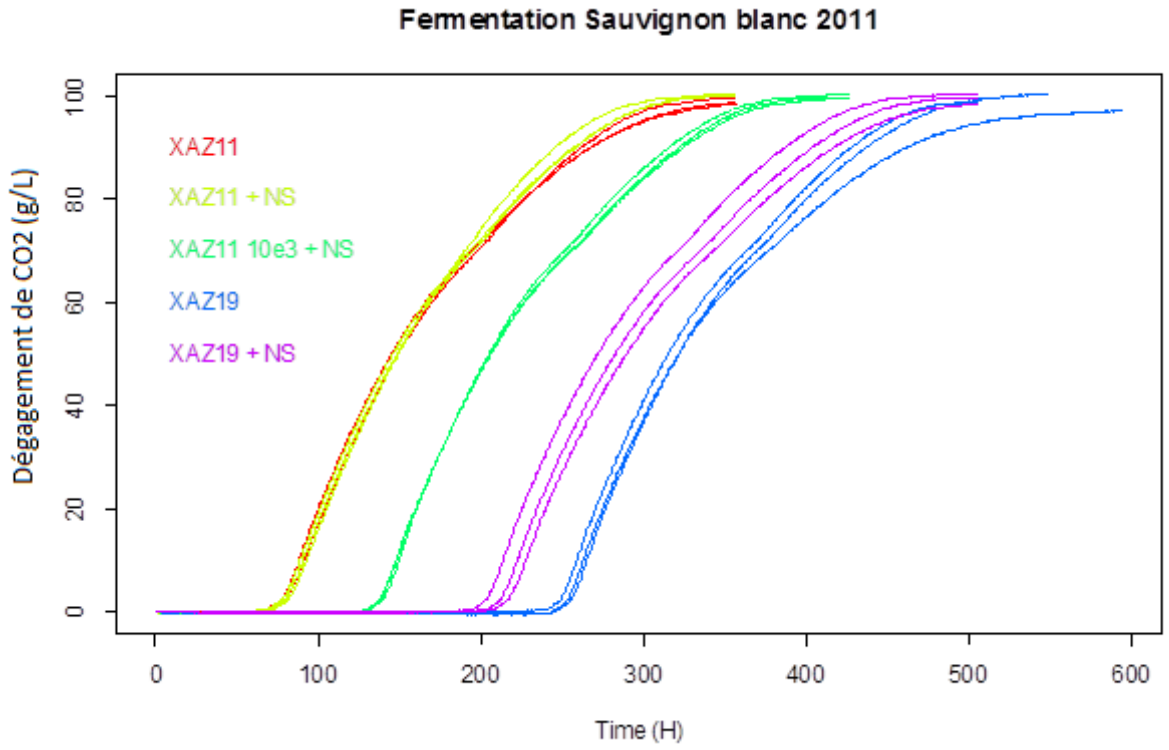


Figure 52. Fermentations PREFERMENT.

Cinétiques fermentaires du projet PREFERMENT pour les trois répétitions des cinq modalitées.

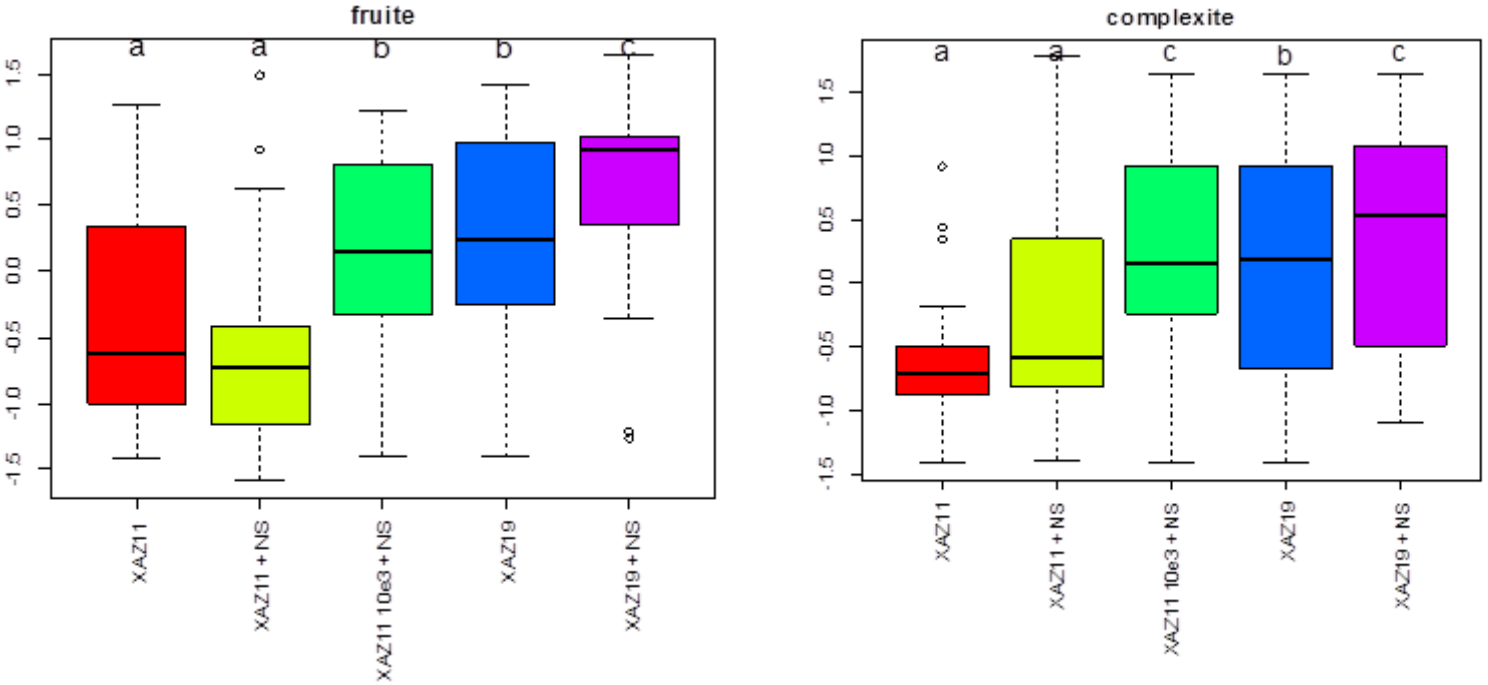


Figure 53. Analyse sensorielle.

Résultat de l'analyse sensorielle des dégustations des produits de fermentation du projet Préferment. Ces résultats sont obtenus après normalisation des notes attribuées par les dégustateurs.

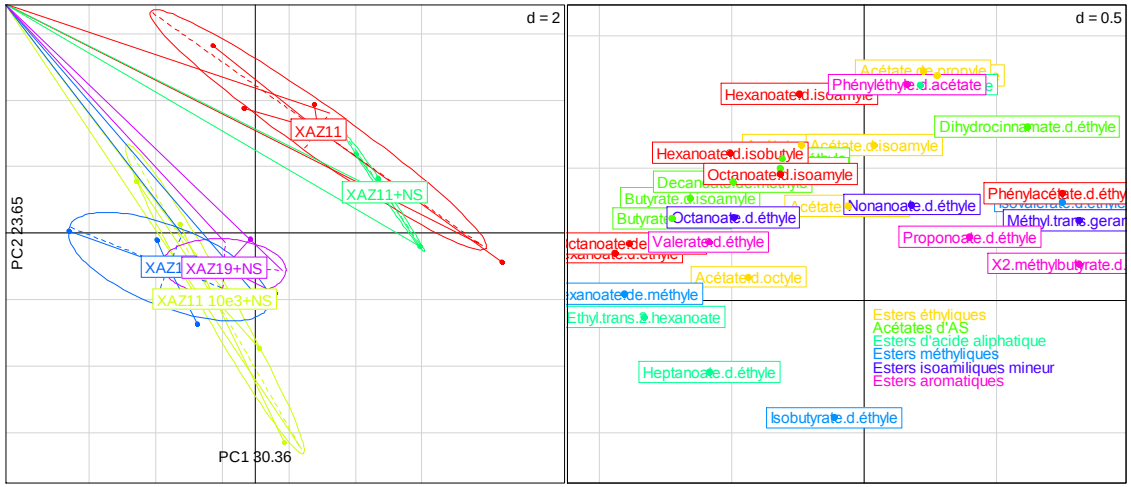


Figure 54. Analyse en Composantes Principales.

ACP des esters produits par les différentes modalités. Un effet de la durée de la phase de latence est observable.

Nous nous intéressons ici aux résultats de la dégustation réalisée pour les cinq modalités. Un test triangulaire demandant de noter la complexité aromatique et la note fruitée du vin a été effectué. Les résultats sont présentés Figure 53. Les modalités à phase de latence longues sont décrites comme significativement plus complexes et plus fruitées que celles à phase de latence courte (Fvalue = 3,8978 et 7,318). Un autre point intéressant est le fait que les modalités XAZ11 à 10^3 cellules/ml et XAZ19 sont relativement similaires, suggérant un impact de la durée de la phase de latence et non de la souche de levure. De manière intéressante la modalité avec phase de latence longue avec levures non-*Saccharomyces* est la mieux notée pour le caractère fruité en complexe.

Notons que les différences observées ne sont pas dues à la production de thiols volatiles par ailleurs très faibles dans cet essai. En revanche il semble que certains esters soient spécifiques de la durée de la phase de latence. En faisant une ACP (Figure 54), on s'aperçoit que les modalités ne sont pas liées entre-elles par la présence ou non de levures non-*Saccharomyces*, mais par la durée de la phase de latence, la modalité XAZ11 1.10^3 cellules viables étant liées aux modalités XAZ19.

a. Comparaison des souches XAZ11 et XAZ19

Les résultats obtenus lors du projet PREFERMENT suggérent un impact sensoriel possible de la durée de la phase de latence mais non lié à la production des thiols volatils. Un impact des non-*Saccharomyces* sur la perception des vins a également été observé. Pour valider l'impact de la seule phase de latence cette expérience a été répétée dans deux moûts de Sauvignon Blanc différents (Reynon 2012 et Ducourt 2012). Trois modalités ont été réalisées. XAZ11 (XV-t-XVI) inoculée à 1.10^6 cellules viables/ml, XAZ19 (WT) inoculée à 1.10^6 cellules viables/ml et XAZ11 (XV-t-XVI) inoculée à 1.10^3 cellules viables/ml. Cette dernière modalité sert de témoin : à cause de la faible concentration de l'inoculum on attend que la phase de latence soit longue mais avec une identité parfaite avec XAZ11 inoculée à 1.10^6 cellules viables/ml. Les fermentations ont été réalisées en bouteilles de 75 cl, à 18°C avec 20 mg/L de SO_2 libre. En fin de fermentation, les bouteilles ont été laissées sur lies 2 à 3 jours à 13°C puis les vins ont été sulfités avec 30 mg/L de SO_2 et laissés cinq jours supplémentaires à 13°C avant la dégustation.

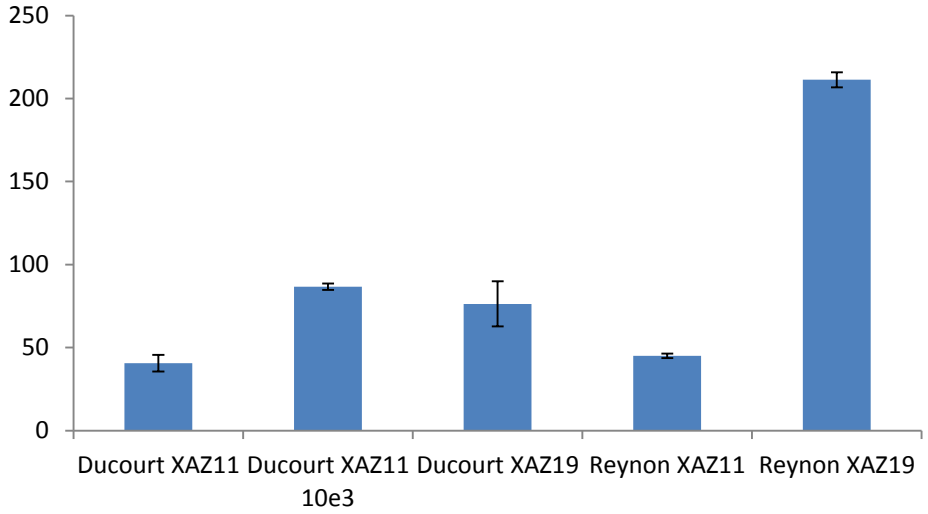


Figure 55. Phases de latences.

Durée des phases de latences en fonction de la souche et du moût. Ces données sont obtenues avec 3 répétitons indépendantes pour chaque modalité.

Test Triangulaire	Nombre de personnes	Nombre de bonnes réponses	Significatif
XAZ11(3) VS XAZ11	25	10	Non
XAZ11(3) Vs XAZ19		15	0,99
XAZ11 Vs XAZ19		13	0,95

Tableau 13. Dégustation Ducourt.

Résultat de la dégustation des fermentations réalisées avec le moût Ducourt 2012.

Test Triangulaire	Nombre de personnes	Total	Nombre de bonnes réponses	Significatif
XAZ11 Vs XAZ19	15	30	19	Oui 0,99
XAZ19 VS XAZ11	15			

Tableau 14. Dégustation Reynon.

Résultat de la dégustation des fermentations réalisées avec le moût Reynon 2012.

Dans le cas de la fermentation du moût de Reynon la modalité XAZ11 1.10^3 cellules/ml n'a pas pu finir correctement la fermentation, laissant plus de 10 g/L de sucres résiduels. Cette modalité n'a donc pas pu être insérée dans les tests. Pour l'ensemble des fermentations des tests d'implantation ont été réalisés.

La Figure 55 présente les durées de phase de latence. Des différences de phases de latence entre les souches XAZ11 et XAZ19 sont observables, ainsi qu'une différence du même ordre pour les deux taux d'inoculation de XAZ11.

Lors des dégustations des tests triangulaires ont été réalisés. Les résultats sont présentés dans les tableaux 12 et 13. Pour les deux moûts, une différence significative est observée entre les souches XAZ11 et XAZ19. Pour le moût Ducourt, une différence significative a également été trouvée entre les souches XAZ11 1.10^3 et XAZ19, mais aucune différence entre les deux modalités XAZ11. Ces résultats infirment ceux obtenus lors l'expérience du projet PREFERMENT. Ce résultat implique que l'effet souche est plus important que l'effet phase de latence dans la différence aromatique perçue.

Dans le cas du moût de Reynon 2012. L'absence de témoin XAZ11 inoculé à 1.10^3 empêche de conclure. Ces résultats en demi-teinte ne nous permettent pas d'avoir une idée claire de l'impact de la durée de la phase de latence sur le plan organoleptique. Toutefois si un impact existe il n'est pas perçu dans toutes les vinifications.

b. Construction des souches XAZ25 et XAZ26 isogéniques de X5

Les résultats décrits avec XAZ19 et XAZ11 n'ont pas confirmé l'impact de la phase de latence sur la perception finale du produit. En revanche son impact sur le développement de souche non-*Saccharomyces* a clairement été démontré (Albertin *et al.* Soumis). Nous avons décidé de construire un autre fonds génétique présentant des phases de latence courtes et longues. Afin d'étudier au mieux l'impact de la phase de latence sur les qualités organoleptiques du vin, des souches isogéniques à une souche commerciale, X5, ont été construites, possédant une phase de latence courte ou une phase de latence longue. Ces souches ont été obtenues en croisant les souches parentales utilisées pour la construction d'X5, XMC13-1C

un ségrégant XPM43, sélectionné pour la présence ou l'absence d'une translocation et ayant un allèle u*re2** donc une production de thiols plus importante. Permettant ainsi de vérifier l'impact de la phase de latence et de l'allèle *ure2** en conditions œnologiques. La souche XAZ25 possède le génotype suivant : *ure2**/ *ure2** ; *pof-*/*pof-* ; XVI-WT/XVI-WT elle présente donc une phase de latence longue un caractère *pof-* et *ure2**. La souche XAZ26 possède le génotye suivant : *ure2**/ *ure2** ; *pof-*/*pof-* ; XVI-WT/XV-t-XVI elle présente donc une phase de latence courte, un caractère *pof-* et *ure2**. La souche industrielle X5 possède le génotype suivant : *URE2*/*URE2* ; *POF*/*POF* ; XVI-WT/XV-t-XVI elle présente donc une phase de latence courte et un caractère *POF* et *URE2.* Ce dispositif de trois souches nous permet de tester l'impact organoleptique et technologique des gènes *URE2*, *POF1* et de la translocation XV-t-XVI.

c. Essais en chais

Ces souches ayant été construites dans le but de faire des essais en chais pour tester les conditions réelles de vinification, celles-ci ont été produites sous forme de LSA afin de se rapprocher au maximum de la pratique oenologique.

Des essais ont été réalisés dans deux chais : celui du Château Reynon et celui du Wine Experimental Center (WEC). Au château Reynon les essais ont été conduits en fûts inox de 50L. Au WEC des cuves inox de 25L ont été utilisées. Dans les deux cas, la concentration en SO_2 libre a été ajustée à 20 mg/L. Les inoculations ont été faites à 10g/hl de LSA soit environ $2{,}3.10^6$ cellules viables/ml. Les moûts ont été clarifiés à 150 NTU dans les deux cas. Le suivi des fermentations à été fait par relevé de densité journalier.

Les résultats de ces essais ne sont pas disponibles au moment de la rédaction de cette dernière partie de thèse. Ils seront discutés lors de la soutenance de ce travail.

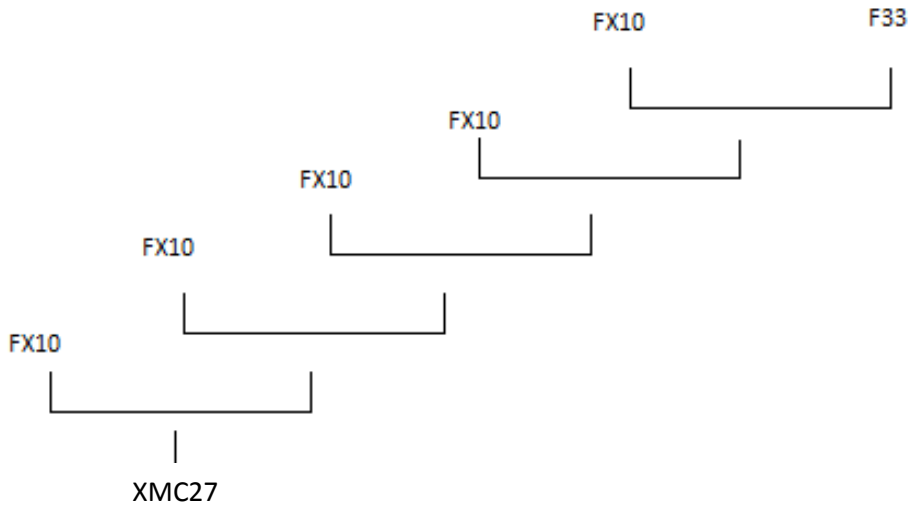


Figure 56. Backcross.

Illustration des backcross entre FX10 et F33 ayant amené à XMC27, backcross de 5ème génération.

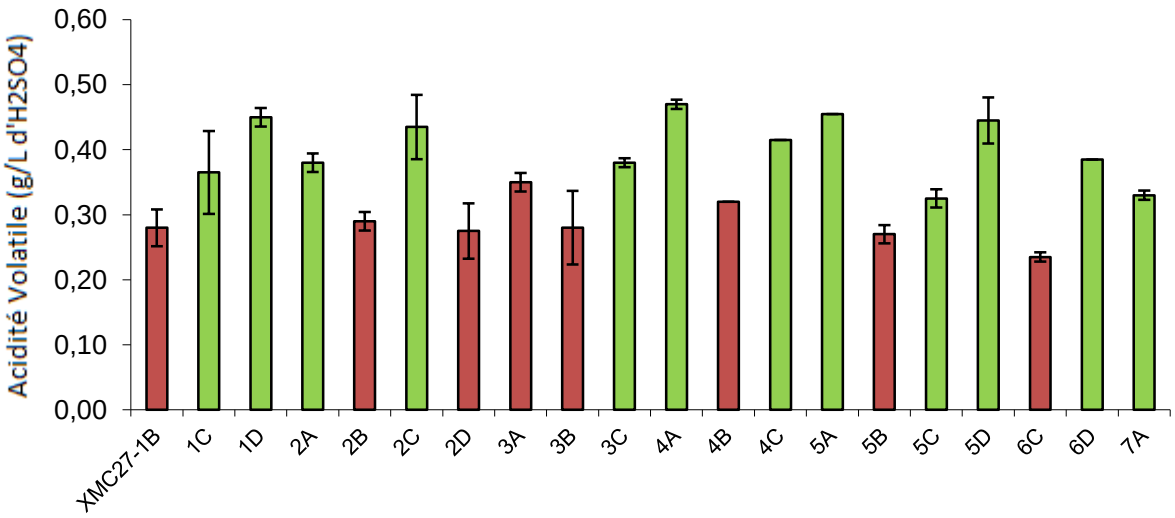


Figure 57. Production d'acidité volatile et translocations.

Production d'acidité volatile en g/L d'H_2SO_4 pour les ségragants des différentes tétrades d'XMC27. Les souches avec une translocation VIII-t-XVI sont vertes, celles avec un chromosome XVI-WT sont en rouge.

3. Etude de l'impact de la translocation VIII-t-XVI sur l'acidité volatile

a. XMC27 et la production d'acidité volatile

Dans le cadre d'un projet de selection et d'amélioration des levures en place au laboratoire avant mon arrivée, un programme de backcross entre FX10 et F33, deux souches commerciales, visant à diminuer la production d'acidité volatile a été réalisé. Au cours de ce programme, des descendants produisant des quantités faibles d'acidité volatile ont été rétrocroisés avec la souche industrielle FX10 afin de réduire le niveau de production de ce composé indésirable chez cette souche. Le 5ème backcross avec FX10 de ce programme est l'hybride XMC27 (Figure 56) qui présente un niveau d'identité de séquence avec FX10 de prêt de 97%. A chaque cycle de ce programme, les fermentations réalisées sur les descendants présentaient des phases de latence habituelle (6-15h). Cependant lors du test de certains descendants sur milieu synthétique, la moitié des ségrégants de XMC27 ont montrés des phases de latence très supérieure à l'autre moitié. Par ailleurs la moitié des descendants de XMC27 ont une production d'acidité volatile plus faible que l'autre. L'observation de ségrégation mendelienne simple chez des souches isogéniques n'est pas surprenant. Nous avons voulu vérifier si les deux phénotypes n'étaient pas liés à la présence d'une translocation impliquant le chromosome XVI. Après analyse moléculaire, il apparait que l'hybride XMC27 présente une ségrégation entre les formes XVI-wt et VIII-t-XVI. Comme le montre la Figure 57, les souches possédant une translocation VIII-t-XVI ont une production d'acidité volatile plus élèvée que celle ayant un chromosome XVI-WT (P value test de student = 7,23477E^{-06}). Un des ségrégants, XMC27-2D, sélectionné pour sa production d'acidité volatile faible a été de nouveau croisé avec FX10. Ce backcross de 6ème génération est appelé XMC28. A nouveau une ségrégation pour la phase de latence a été observée. Un caryotype de cette souche a été effectué pour deux tétrades complètes de la souche XMC28 et montre un réarrangement chromosomique, semblable à celui de la souche parentale FX10, pour les ségrégants ayant une phase de latence courte (Figure 58).

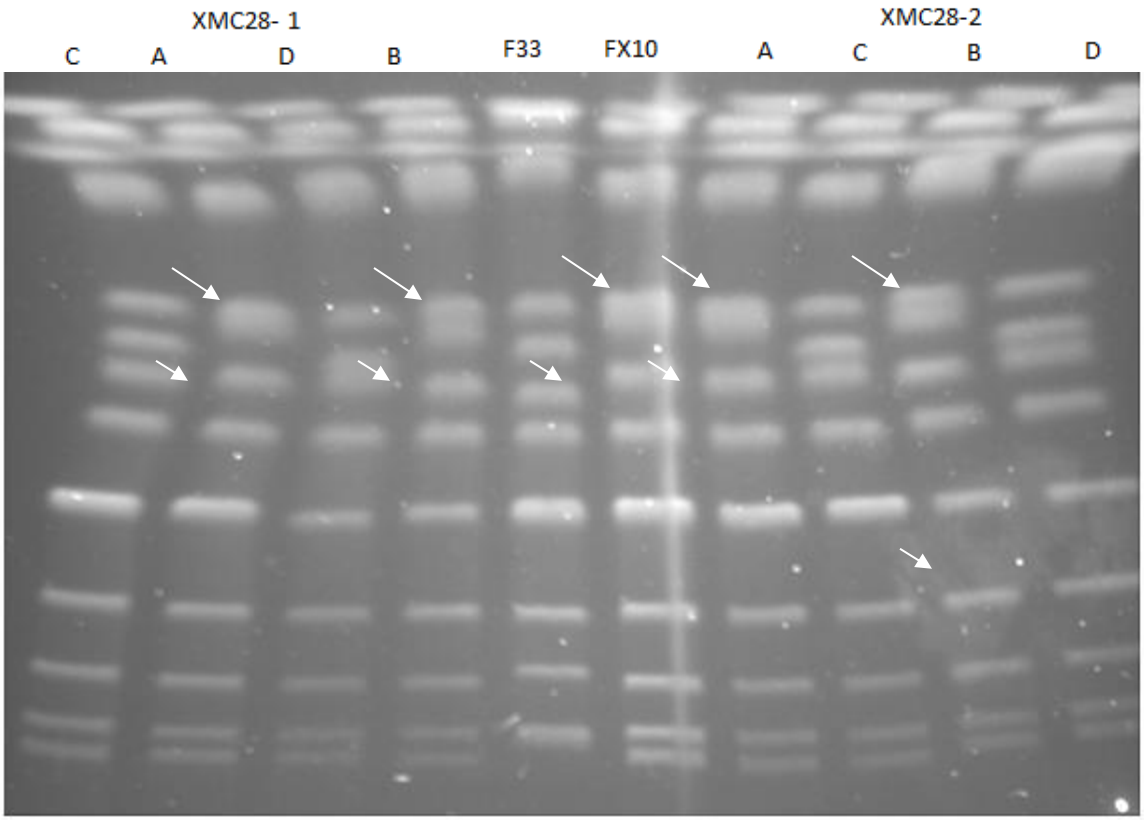
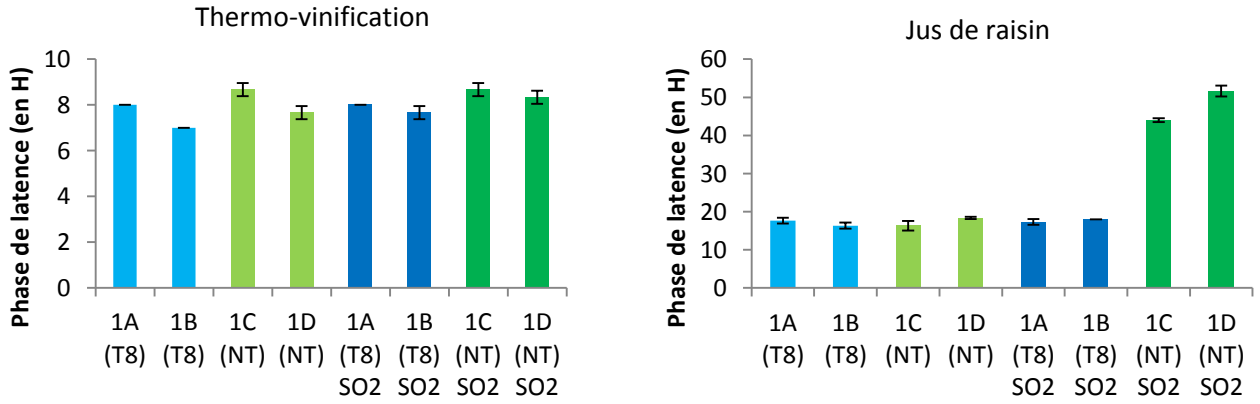


Figure 58. Caryotype XMC28.

Les deux souches parentales F33 et FX10 sont au milieu. Les tétrades sont de chaque cotés. Une translocation est visible, indiqué par une flèche blanche, pour les ségrégants A et B de chaque tétrade, identique à celle de la souche parentale FX10.



Figures 59. Phase de latence en moûts rouges

Variation de la durée de laphase de latence pour les différents ségrégants en fonction du moût et de la concentration en SO_2. Les données sont obtenues à partir de trois répétitions indépendantes. T8 = translocation VIII-t-XVI. NT = Non transloquée

b. XMC28 et production d'acidité volatile

Pour étudier le lien entre translocation VIII-t-XVI, phase de latence et production d'acidité volatile, une série de fermentations en fermenteurs de 125 ml a été effectuée pour la tétrade XMC28-1. Les souches XMC28-1A et 1B sont porteuses d'une translocation VIII-t-XVI les souches XMC28-1C et 1D présentent un chromosome XVI-WT. La comparaison de ces quatres souches permet de tester l'impact de la translocation. Deux modalités pour le SO_2 ont été réalisées: 0 et 20 mg/L de SO_2 libre. Deux moûts rouges ont été utilisés : un moût de Merlot 2012 issu de thermo-extraction (Thermo) et du jus de raisin commercial (Casino). Deux conditions de fermentations ont également été utilisées, le moût thermo a été fermenté à une température constante de 26°C alors que le jus de raisin a été innoculé à une température de 20°C puis une fois la fermentation initiée le reste de la fermentation alcoolique a été effectué à 26°C. Les fermentations ont été suivies par pesée des fermenteurs.

i. Phase de latence

La Figure 59 indique la durée des phases de latence obtenues dans le moût Thermo et dans le jus de raisin pour les différentes souches et les différentes concentrations en SO_2. Pour le moût Thermo inoculé à 26°C aucune différence de phase de latence n'est observé entre les souches XMC28 -1A et 1B (VIII-t-XVI) d'une part et les souches XMC28-1C et 1D (XVI-wt) d'autre part. Dans ce cas la concentration en SO_2 n'a pas d'impact sur la phase de latence. En revanche, le jus de raisin Casino innoculé à 20°C montre des différences importantes de phase de latence. Ces différences dépendent comme attendu de la présence de la translocation et de la présence de SO_2. Une analyse de variance met en évidence un effet très significatif de la translocation et de la concentration en SO_2 avec un fort effet d'interaction. Dans le cas du mout Casino, la présence de SO_2 influence donc la durée de la phase de latence dans des moûts rouges pour les souches ne présentant pas de translocation. L'absence de phase de latence dans le moût thermo est probablement due à la température élevée de fermentation qui réduit les écarts entre souches.

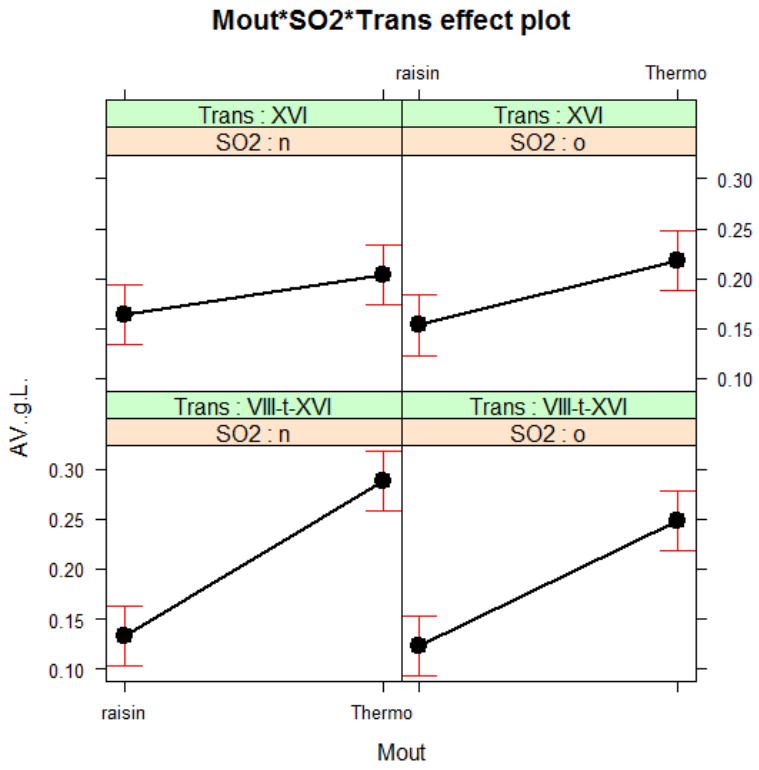


Figure 60. Facteurs impactant la production d'acidité volatile.

ANOVA des différents facteurs ayant un impact sur la production d'acidité volatile pour les différentes modalités expérimentales.

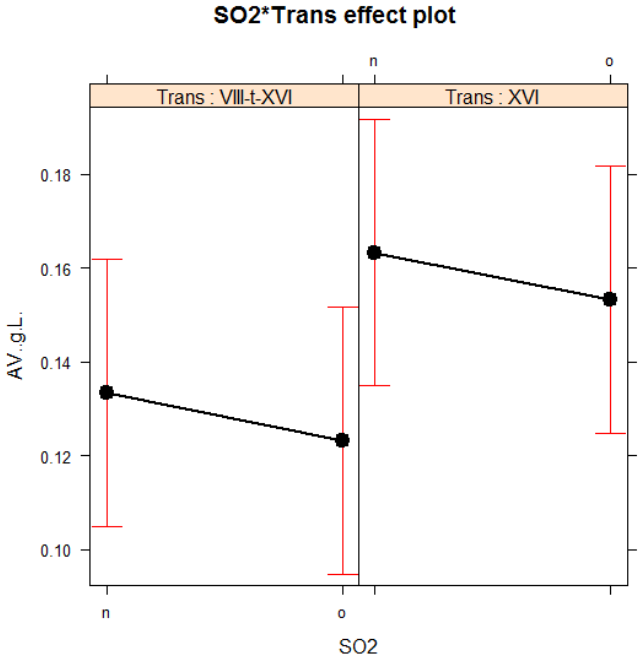


Figure 62. ANOVA jus de raisin.

Impact des différents facteurs sur la production d'AV dans le jus de raisin.

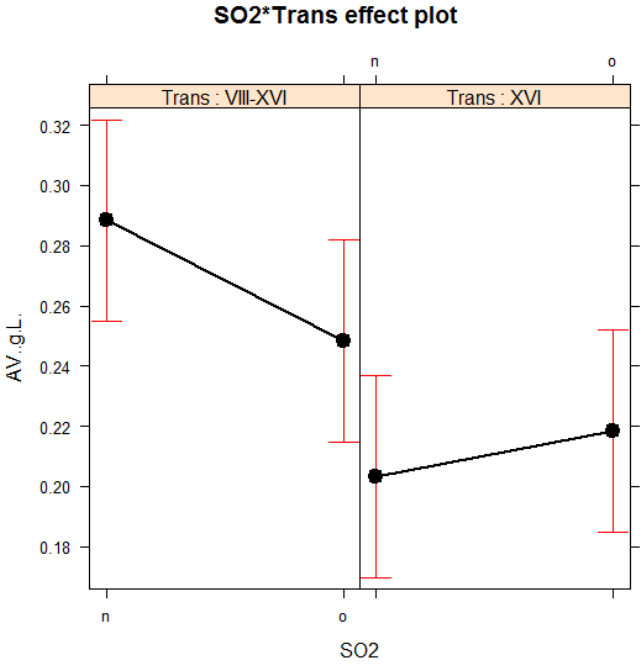


Figure 61. ANOVA moût Thermo.

Impact des différents facteurs sur la production d'AV dans le moût Thermo.

ii. Production d'acidité volatile

La production d'acidité volatile a également été mesurée en fin de fermentation alcoolique. En réalisant une analyse de variance pour ce paramètre on remarque que la translocation a un effet significatif pour les deux mouts. De manière intéressante la réponse est inversée. Pour le moût Casino (Figure 61) les souches transloquées produisent légèrement moins d'acidité volatile que les souches non transloquées (70% de la variance expliquée, p=0.03981). Pour le moût Thermo (Figure 62), la translocation augmente considérablement la production d'acidité volatile (90% de la variance expliquée p= 0.00188). La température pendant la phase de latence Ce dernier résultat correspond aux observations réalisées lors du programme de croisement de XMC27.

iii. Température et phase de latence

Dans la bibliographie générale, une description des principales techniques de macération des vins rouges a été dréssé. La macération à froid est la technique la plus utilisée. Durant cette macération, les cuves sont refroidies à 5°C durant 5 à 15 jours empêchant ainsi le départ de la fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae*. Nous venons de voir que l'utilisation de souches à phase de latence longue est possible dans des fermentations en moûts rouges. Nous nous sommes donc demandé si nous pouvions obtenir une phase de latence de plusieurs jours tout en ayant une température supérieure à 5°C. L'utilisation de telles souches permettrait en effet de réaliser des économies importantes d'énergie utilisée pour refroidir les cuves.

Ces fermentations ont été réalisées dans des fermenteurs de 1,2 L dans du moût Thermo 2012 avec 20 mg/L de SO_2 libre. Les souches XMC28-1A et 1C ont été utilisé. Trois modalités de températures ont été utilisées. La phase de latence c'est déroulée à 13°C, 17°C ou 20°C. Dès cette phase finie, le reste de la fermentation alcoolique c'est lui déroulé à 20°C

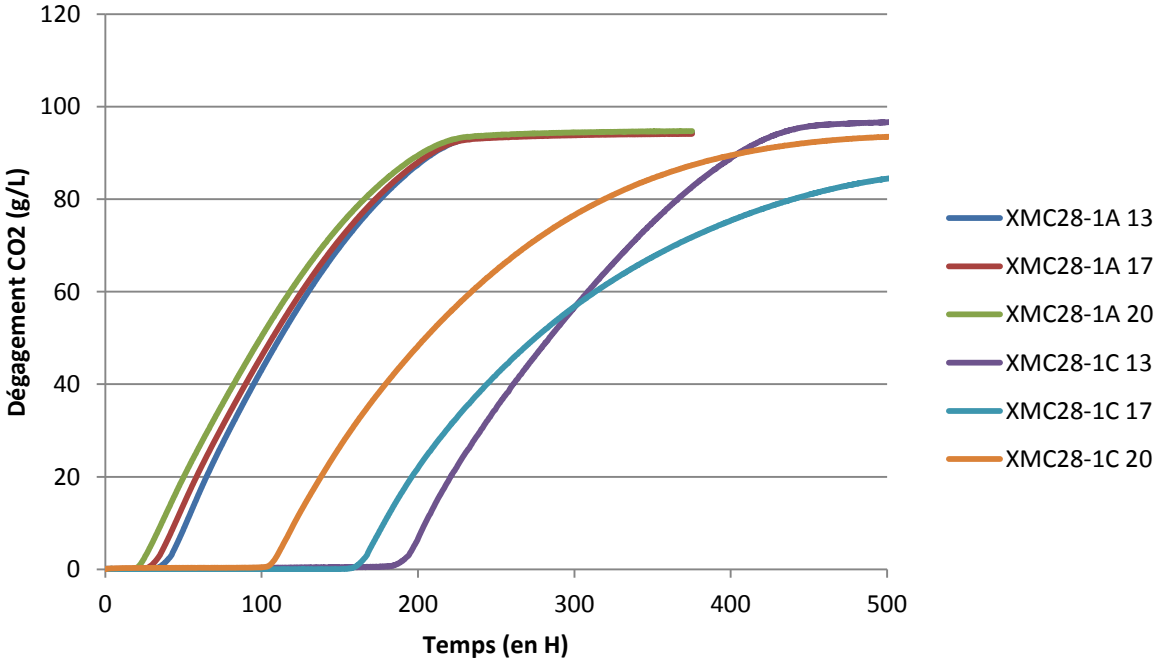


Figure 63. Cinétiques fermentaires.

Fermentation alcoolique d'un moût rouge par XMC28-1A (XV-t-XVI) et XMC28-1C (XVI-WT) en présence de 20mg/L de SO_2. La phase de latence a été réalisée à 13°C, 17°C ou 20°C. Cinétique représenté par dégagement de CO_2.

La Figure 63 montre les différentes cinétiques obtenues. XMC28-1A (XV-t-XVI) voit sa durée de phase de latence augmenter avec la diminution de la température, passant de 30h à 20°C à 45h à 13°C. La souche XMC28-1C (XVI-WT) subit un effet de la température bien plus important, voyant se phase de latence passer de 110h à 20°C à 200h à 13°C.

Cette expérience préliminaire montre qu'il est possible d'avoir des phases de latence augmentée de plus de 100 h pour une même température en utilisant des souches non transloquées.

c. Conclusion

L'impact de la phase de latence sur la dégustation reste à explorer. Si une première expérimentation montrait un effet significatif de la durée de la phase de latence sur la dégustation ainsi que sur la production d'esters, une deuxième invalide ces résultats en montrant un effet souche et non phase de latence sur la dégustation.

En revanche, la production d'acidité volatile est influencée par la présence d'une translocation avec des effets d'interaction avec le moût qui restent à explorer. Les souches ayant une translocation VIII-t-XVI montrent une surproduction d'acidité volatile par rapport à celles ayant un chromosome XVI-WT. D'autres expérimentations sont nécéssaires afin de confirmer cet effet. Il serait de plus intéressant de vérifier si cet effet est également lié à la translocation XV-t-XVI. En effet rien dans cette expérience ne permet de relier la production d'acidité volatile avec la concentration en SO_2. Par conséquent il n'est pas certain que le gène *SSU1* soit impliqué dans ce phénomène.

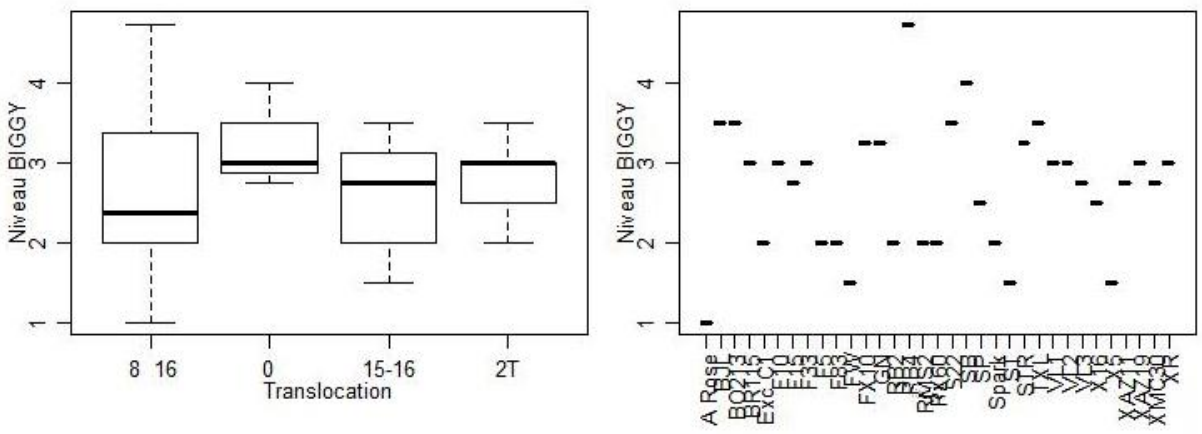


Figure 64. Production d'H_2S.

Evaluation de la production d'H_2S par evaluation du précipité brun produit sur milieu BIGGY.

4. Vérification de la production d'H_2S

Le QTL associé à la phase de latence est également associé à la production d'H_2S. Si les mécanismes génétiques sont liés à ce QTL dans le cadre de la phase de latence, rien n'a été démontré pour la production d'H_2S. Nous avons donc décidé de regarder la production d'H_2S de différentes souches (commerciales ou non) et de la comparer à l'état de translocation de la souche (Figure 62.). Cette production d'H_2S est évaluée par l'intensité de coloration du précipité brun produit sur milieu BIGGY en comparaison avec des souches témoins connues pour leur production forte ou faible d'H_2S. Il apparait de façon nette que l'état de translocation des souches, quelqu'il soit n'a aucun impact sur la production d'H_2S (pvalue = 0,57).

5. Conclusion générale

En plus d'un outil de sélection précédement mis au point durant la seconde partie, nous avons montré qu'il était possible d'introgrésser des translocations dans n'importe quel fonds génétique et donc de l'utiliser dans des programmes d'amélioration des souches.

D'un point de vue organoleptique, certains aspects comme la production d'acidité volatile sont significativement influencés par la translocation tandis que d'autres comme la production de thiols volatils ne semblent pas affecté par cette dernière même si des expériences supplémentaires restent nécéssaires pour conclure de façon plus définitive.

Si l'on s'attache non plus à certains paramètres influançant les qualités organoleptiques du produit mais à l'ensemble de la dégustation, là aussi des expériences supplémentaires sont nécéssaires. Deux dégustations ont été faites et montrent des résultats opposés, l'un montrant un effet de la phase de latence l'autre un effet de la souche. Refaire une dégustation en utilisant cette fois ci une souche possédant une translocation XV-t-XVI et son mutant pour le gène *SSU1* afin de créer une phase de latence longue dans un fonds génétique totalement isogénique permettrait d'éliminer le paramètre de variation génétique des souches.

SYNTHESE GENERALE ET PERSPECTIVES

Synthèse générale et perspectives

Cette thèse avait pour objectif principal la dissection d'un QTL associé à un paramètre phénotyique d'intérêt chez la levure œnologique : la variation de durée de la phase de latence. Il fallait déterminer les causes génétiques, moléculaires et physiologiques influant ce paramètre. En effet, ces travaux financés par la société Biolaffort avaient un objectif industriel qui était la mise au point de marqueurs génétiques permettant de controler la durée de la phase de latence dans un but de sélection industrielle de levures.

L'étude de ce QTL dans différents fonds génétiques a montré que celui-ci influençait la phase de latence dans plusieurs souches de levures, non redondants avec les souches et donc utilisable dans l'industrie.

Même si aucun des gènes présents dans sur le chromosome XV n'est au final responsable de la variation du phénotype d'intérêt, l'étude du QTL via la bibliographie et la présence de SNP/SAP était nécessaire. La dissection du QTL par RHA a permis de démontrer formellement que les gènes *ATG34* et *HAL9* ne sont pas impliqués dans le phénotype étudié. Cette valiation expérimentale était indispensable dans cette étude. L'analyse des séquences parentales et de la bibliographie n'a pas permis de dégager d'autres gènes candidats.

Lors de la délétion des gènes cibles, un problème de délétion de gènes a été rencontré à plusieurs reprises. Si l'insertion de la cassette de résistance était effective, lors des tests de délétion du gène, la présence d'au moins une copie supplémentaire des gènes étaient détectée. Si pour les gènes les plus pertinents du locus la délétion du gène a été réussie, de nombreuses tentatives et remaniement de protocole ont été nécéssaires pour obtenir ces mutants et hémizygotes. La levure présente de nombreuses aneuploïdies et réarrangements chromosomiques, (Miklos *et al.* 1997) expliquant. Ceci explique donc la difficulté à obtenir des mutants et hémizygotes ne comportant véritablement aucune copie supplémentaire du gène cible à déléter, des contrôles réguliers et rigoureux doivent être effectués à chaque étape de la transformation et des croisements.

La dissection de QTL ne doit pas être uniquement associée à l'étude des gènes du locus, mais à l'ensemble de la configuration génomique de la région. Si l'étude du QTL n'a révélé aucun des gènes du chromosome XV comme étant responsable du phénotype associé, il a permis de mettre en évidence une translocation encore jamais décrite qui explique la variation de phénotype observée ; celle-ci a eu lieu dans le locus associé à la variation la durée de la phase de latence.

Cette translocation entre les chromosomes XV et XVI montre une adaptation efficace de la levure à son milieu. Ce réarrangement chromosomique a pour effet de placer le gène *SSU1* codant pour une pompe à sulfite permettant de détoxifier la cellule du SO_2 présent dans le moût de raisin en amont du gène *ADH1* codant pour l'alcool déhydrogénase, un gène fortement exprimé durant la fermentation alcoolique dans le moût de raisin. Ce réarrangement chromosomique permet à *SSU1* de profiter d'une expression plus forte, détoxifiant ainsi la cellule du SO_2 afin d'initier plus rapidement la fermentation et de coloniser le milieu en cas de compétition avec d'autres souches de levures, *Saccharomyces* ou non-*Saccharomyces.* Cette translocation est une adaptation aux conditions particulières de la vinification lié à la tenuer des moûts en SO2. Ceci est confirmé par le fait que les deux translocations décrites avec le gène *SSU1* sont spécifiques des levures œnologiques et plus particulièrement, des levures industrielles, sélectionnées pour leurs capacités fermentaires supérieures dans le cas de la translocation XV-t-XVI.

L'usage intensif du SO_2 lors de la fermentation alcoolique a favorisé la sélection de translocations qui confèrent à la levure une meilleure croissance un moût sulfité. En effet, les réarrangements chromosomiques jouant un rôle particulièrement important dans l'évolution adaptative des levures à leur milieu (Infante *et al.* 2003). Un point intéressant est le fait d'avoir deux translocations pour le même gène *SSU1* conduisant au même phénotype. Le fait de trouver la translocation VIII-t-XVI chez les souches œnologiques industrielles ou naturellement isolées dans le vin alors que la translocation XV-t-XVI est présente uniquement chez les levures industrielles suggère que cet évènement aurait été favorisé par la sélection de levures produisant un faible taux d'acidité volatile

En effet, dans la troisième partie de ca travail, nous avons montré que la présence d'une translocation XV-XVI induit une augmentation de la production d'acidité volatile par rapport aux souches présentant un chromosome XVI-WT. Ce résulat sugèère que les souches ayant une translocation VIII-t-XVI pourraient produire plus d'acidité volatile que les autres pour des raisons qui restent à déterminer.

L'étude de cette pression de sélection serait interessante. Celle-ci semble nécéssaire afin de conserver les translocations spécifiques à certains milieux comme la translocation XV-t-XVI. En effet, durant cette étude, un des clones de la souche parentale GN a perdu cette translocation, revenant à des chromosomes XV et XVI sauvages, montrant ainsi que si cette translocation est particulièrement adaptée au milieu œnologique, elle n'est pas la configuration la plus favorable à la levure dans des conditions plus classiques. Ceci montre à nouveau l'extrême plasticité du génome de la levure et la difficulté de travailler sur les mutations, duplication et autres réarrangements chromosomiques, nécéssitant constamment des contrôles à chaque étape de sélection.

Des marqueurs moléculaires de type PCR, permettant de faciliter la sélection de souches pour la durée de leur phase de latence ont été mis en place. La troisième partie de cette thèse a montré notre capacité à contrôler ce phénotye dans différents fonds génétiques permettant d'étudier son impact sur la production de métabolites secondaires, mais aussi sur le développement de la flore de levures non-*Saccharomyces.*

En ce qui concerne l'imact aromatique de la phase de latence aucun résultat probant n'a été obtenu. En effet la production de thiols si elle ne semble pas affecter par ce caractère. L'analyse sensorielle des vins produit par des levures isogéniques ayant une différence de phase de latence a également été menée. Les dégustations donnent deux résultats contradictoires. Dans un cas la phase de latence semble influencer la complexité des vins analysés alors que dans l'autre cas les souches isogéniques utilisés sont différentiables. L'utilisation présentant une translocation XV-XVI délétées on non pour le gène *SSU1* devrait permettre de confirmer l'impact de la phase de latence sur la dégustation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

Agnolucci, Monica, Caterina Cristani, Silvia Maggini, Francesco Rea, Angela Cossu, Antonio Tirelli, and Marco Nuti. 2013. “Impact of Sulphur Dioxide on the Viability, Culturability, and Volatile Phenol Production of *Dekkera bruxellensis* in Wine.” *Annals of Microbiology*: 1–7.

Akache, Bassel, and Bernard Turcotte. 2002. “New Regulators of Drug Sensitivity in the Family of Yeast Zinc Cluster Proteins.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (24) (June 14): 21254–21260.

Albertin, Warren, Philippe Marullo, Michel Aigle, Christine Dillmann, Dominique de Vienne, Marina Bely, and Delphine Sicard. 2011. “Population Size Drives Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Alcoholic Fermentation and Is Under Genetic Control.” *Applied and Environmental Microbiology* 77 (8) (April 15): 2772–2784.

Albertin, Warren, Philippe Marullo, Marina Bely, Michel Aigle, Aurélie Bourgais, Olivier Langella, Thierry Balliau, *et al.* 2013. “Linking Post-Translational Modifications and Variation of Phenotypic Traits.” *Molecular & Cellular Proteomics* 12 (3) (March 1): 720–735.

Albertin, Warren, Cécile Miot-Sertier, Marina Bely, Philippe Marullo, Joana Coulon, Virgine Moine, Benoit Colonna-Ceccaldi, and Isabelle Masneuf-Pomarède. “Oenological Prefermentation Practices Strongly Impact Yeast Population Dynamics and Alcoholic Fermentation Kinetics in Chardonnay Grape Must.”

Alexandre, H, V Ansanay-Galeote, S Dequin, and B Blondin. 2001. “Global Gene Expression During Short-term Ethanol Stress in *Saccharomyces cerevisiae*.” *FEBS Letters* 498 (1): 98–103.

Ansanay-Galeote, Virginie, Bruno Blondin, Sylvie Dequin, and Jean-Marie Sablayrolles. 2001. “Stress Effect of Ethanol on Fermentation Kinetics by Stationary-phase Cells of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Biotechnology Letters* 23 (9) (May 1): 677–681.

Aranda, Agustín, Elena Jiménez-Martí, Helena Orozco, Emilia Matallana, and Marcellí del Olmo. 2006. “Sulfur and Adenine Metabolisms Are Linked, and Both Modulate Sulfite Resistance in Wine Yeast.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (16) (August 1): 5839–5846.

Arroyo-López, F. Noé, Sandi Orlić, Amparo Querol, and Eladio Barrio. 2009. “Effects of Temperature, pH and Sugar Concentration on the Growth Parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, S. Kudriavzevii and Their Interspecific Hybrid.” *International Journal of Food Microbiology* 131 (2-3) (May): 120–127.

Asmono, D., P. J. Freymark, J. B. Holland, and M. Lee. 2000. “Genetic analysis of quantitative trait loci associated with plant stature and flowering traits of an F2 maize population.” In Puslitbang Bioteknologi.

Augustin, Jean-Christophe, Agnès Brouillaud-Delattre, Laurent Rosso, and Vincent Carlier. 2000. “Significance of Inoculum Size in the Lag Time ofListeria Monocytogenes.” *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4) (April 1): 1706–1710.

Avram, Dorina, Mark Leid, and Alan T. Bakalinsky. 1999. “Fzf1p of *Saccharomyces cerevisiae* Is a Positive Regulator of SSU1 Transcription and Its First Zinc Finger Region Is Required for DNA Binding.” *Yeast* 15 (6): 473–480.

B

Baffi, Milla Alves, Natália Martin, Thaise Mariá Tobal, Ana Lúcia Ferrarezi, João Henrique Ghilardi Lago, Maurício Boscolo, Eleni Gomes, and Roberto Da-Silva. 2013. “Purification and Characterization of an Ethanol-Tolerant β-Glucosidase from Sporidiobolus Pararoseus and Its Potential for Hydrolysis of Wine Aroma Precursors.” *Applied Biochemistry and Biotechnology*: 1–11.

Bakalinsky, Alan T., and Richard Snow. 1990. “Conversion of Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae* to Heterothallism.” *Applied and Environmental Microbiology* 56 (4): 849–857.

Baldwin, Guy N. 1951. “Basic Effects of Sulfur Dioxide on Yeast Growth.” *American Journal of Enology and Viticulture* 2 (1) (January 1): 43–53.

Barbe, Jean-Christophe, Gilles de Revel, Annick Joyeux, Aline Lonvaud-Funel, and Alain Bertrand. 2000a. “Role of Carbonyl Compounds in SO2 Binding Phenomena in Musts and Wines from Botrytized Grapes.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (8) (August 1): 3413–3419.

Barbe, Jean-Christophe, Gilles de Revel, Annick Joyeux, Aline Lonvaud-Funel, and Alain Bertrand. 2000b. "Role of Carbonyl Compounds in SO_2 Binding Phenomena in Musts and Wines from Botrytized Grapes." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (8) (August 1): 3413–3419.

Barnett, J. A, R. W Payne, and D Yarrow. 2000a. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge, U.K.; New York, NY, USA: Cambridge University Press.

Barnett, J. A, R. W Payne, and D Yarrow. 2000b. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge, U.K.; New York, NY, USA: Cambridge University Press.

Bataillon, Michel, Alain Rico, Jean-Marie Sablayrolles, Jean-Michel Salmon, and Pierre Barre. 1996. "Early Thiamin Assimilation by Yeasts Under Enological Conditions: Impact on Alcoholic Fermentation Kinetics." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82 (2): 145–150.

Battilani, P., N. Magan, and A. Logrieco. 2006. "European Research on Ochratoxin A in Grapes and Wine." *International Journal of Food Microbiology* 111, Supplement 1 (September 1): S2–S4.

Beech, W., and S. Thomas. 1985. "Action Antimicrobienne de L'anhydride Sulfureux." *Bulletin de l'OIV* 58.

Beggs, Jean D. 1978. "Transformation of Yeast by a Replicating Hybrid Plasmid." *Nature* 275 (5676) (September 14): 104–109.

Bellis, Michel, Michel Pagès, and Gérard Roizès. 1987. "A Simple and Ranid Method for Preparing Yeast Chromosomes for Pulse Field Gel Electrophoresis." *Nucleic Acids Research* 15 (16) (August 25): 6749–6749.

Bely, M., J. M. Sablayrolles, and P. Barre. 1990. "Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance." *American Journal of Enology and Viticulture* 41 (4): 319–324.

Bely, Marina, Alessandra Rinaldi, and Denis Dubourdieu. 2003. "Influence of Assimilable Nitrogen on Volatile Acidity Production by *Saccharomyces cerevisiae* During High Sugar Fermentation." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (6): 507–512.

Bely, Marina, Philippe Stoeckle, Isabelle Masneuf-Pomarède, and Denis Dubourdieu. 2008. "Impact of Mixed *Torulaspora delbrueckii–Saccharomyces cerevisiae* Culture on High-sugar Fermentation." *International Journal of Food Microbiology* 122 (3) (March): 312–320.

Benard, P. M., and M. Buret Bourzeix. 1971. "C. Flanzy, and J. Mourgues. Methode de Vinification Par Maceration Carbonique. VI. Elaboration Des Vins Blancs Secs." *Ann. Technol. Agric* 20: 199–215.

Berthels, N, R Corderootero, F Bauer, J Thevelein, and I Pretorius. 2004. "Discrepancy in Glucose and Fructose Utilisation During Fermentation by Wine Yeast Strains." *FEMS Yeast Research* 4 (7) (May): 683–689.

Berthels, Nele J., Ricardo R. Cordero Otero, Florian F. Bauer, Isak S. Pretorius, and Johan M. Thevelein. 2008. "Correlation Between Glucose/fructose Discrepancy and Hexokinase Kinetic Properties in Different *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains." *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (5) (January 1): 1083–1091

Bloom, Joshua S., Ian M. Ehrenreich, Wesley T. Loo, Thúy-Lan Võ Lite, and Leonid Kruglyak. 2013. "Finding the Sources of Missing Heritability in a Yeast Cross." *Nature* 494 (7436): 234–237.

Blouin, Jacques, and Émile Peynaud. 2001. *Connaissance et Travail Du Vin*. Dunod.

Brejning, Jeanette, and Lene Jespersen. 2002. "Protein Expression During Lag Phase and Growth Initiation in *Saccharomyces cerevisiae*." *International Journal of Food Microbiology* 75 (1–2) (May 5): 27–38.

Brejning, Jeanette, Lene Jespersen, and Nils Arneborg. 2003. "Genome-wide Transcriptional Changes During the Lag Phase of *Saccharomyces cerevisiae*." *Archives of Microbiology* 179 (4): 278–294.

Buchanan, Robert L., and Myron Solberg. 1972. "Interaction Of Sodium Nitrate, Oxygen And pH On Growth Of *Staphyloccocus aureus*." *Journal of Food Science* 37 (1): 81–85.

Burroughs, L. F. 1975. “Determining Free Sulfur Dioxide in Red Wine.” *American Journal of Enology and Viticulture* 26 (1) (January 1): 25–29.

Burroughs, Leonard F., and Arthur H. Sparks. 1973. “Sulphite-binding Power of Wines and Ciders. I. Equilibrium Constants for the Dissociation of Carbonyl Bisulphite Compounds.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24 (2): 187–198.

C

Cadière, Axelle, Anne Ortiz-Julien, Carole Camarasa, and Sylvie Dequin. 2011. “Evolutionary Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains with Increased in Vivo Flux through the Pentose Phosphate Pathway.” *Metabolic Engineering* 13 (3) (May): 263–271.

Casalone, Enrico, Carlo M. Colella, Simona Daly, Silvia Fontana, Ilaria Torricelli, and Mario Polsinelli. 1994. “VII. Yeast Sequencing Reports. Cloning and Characterization of a Sulphite-resistance Gene of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Yeast* 10 (8): 1101–1110.

Casalone, Enrico, Carlo M. Colella, Simona Daly, Enzo Gallori, Luca Moriani, and Mario Polsinelli. 1992. “Mechanism of Resistance to Sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Current Genetics* 22 (6) (December 1): 435–440.

Cavalieri, Duccio, Patrick E. McGovern, Daniel L. Hartl, Robert Mortimer, and Mario Polsinelli. 2003. “Evidence for S. Cerevisiae Fermentation in Ancient Wine.” *Journal of Molecular Evolution* 57 (1) (August 1): S226–S232.

Cherest, Hélène, Jean-Claude Davidian, Dominique Thomas, Vladimir Benes, Wilhelm Ansorge, and Yolande Surdin-Kerjan. 1997. “Molecular Characterization of Two High Affinity Sulfate Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Genetics* 145 (3) (March 1): 627–635.

Cheroutre-Vialette, M., and A. Lebert. 2002. “Application of Recurrent Neural Network to Predict Bacterial Growth in Dynamic Conditions.” *International Journal of Food Microbiology* 73 (2): 107–118.

Ciani, Maurizio, Francesca Comitini, Ilaria Mannazzu, and Paola Domizio. 2010. “Controlled Mixed Culture Fermentation: a New Perspective on the Use of non-*Saccharomyces* Yeasts in Winemaking.” *FEMS Yeast Research* 10 (2): 123–133.

Cordente, Antonio G., Gustavo Cordero-Bueso, Isak S. Pretorius, and Christopher D. Curtin. 2013. “Novel Wine Yeast with Mutations in YAP1 That Produce Less Acetic Acid During Fermentation.” *FEMS Yeast Research* 13 (1): 62–73.

Coulon, Joana, John I. Husnik, Debra L. Inglis, George K. van der Merwe, Aline Lonvaud, Daniel J. Erasmus, and Hennie JJ van Vuuren. 2006. “Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to Minimize the Production of Ethyl Carbamate in Wine.” *American Journal of Enology and Viticulture* 57 (2): 113–124.

D

Darriet, P., T. Tominaga, E. Demole, and D. Dubourdieu. 2013. “Mise en évidence dans le raisin de Vitis vinifera var. Sauvignon d’un précurseur de la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one.” *Comptes rendus de l’Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie* 316 (11): 1332–1335.

Delfini, C., and A. Costa. 1993. “Effects of the Grape Must Lees and Insoluble Materials on the Alcoholic Fermentation Rate and the Production of Acetic Acid, Pyruvic Acid, and Acetaldehyde.” *American Journal of Enology and Viticulture* 44 (1): 86–92.

Divol, B., C. Miot-Sertier, and A. Lonvaud-Funel. 2006. “Genetic Characterization of Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Responsible for ‘Refermentation’ in Botrytis-affected Wines.” *Journal of Applied Microbiology* 100 (3) (March): 516–526.

Divol, Benoit, Maret Toit, and Edward Duckitt. 2012. “Surviving in the Presence of Sulphur Dioxide: Strategies Developed by Wine Yeasts.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 95 (3) (June 7): 601–613.

Dubourdieu, D., C. H. Ollivier, and J. N. Boidron. 1986. “Incidence Des Operations Prefermentaires Sur La Compositon Chimique et Les Qualites Organoleptiques Des Vins Blancs Secs.” *Connaissance de La Vigne et Du Vin* 20.

Dufour, Matthieu, Adrien Zimmer, Cécile Thibon, and Philippe Marullo. 2013. “Enhancement of Volatile Thiol Release of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Using Molecular Breeding.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (13) (July 1): 5893–5905.

Dunham, Maitreya J., Hassan Badrane, Tracy Ferea, Julian Adams, Patrick O. Brown, Frank Rosenzweig, and David Botstein. 2002. “Characteristic Genome Rearrangements in Experimental Evolution of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (25): 16144–16149.

E

E, Casalone, Colella Cm, Ricci F, and Polsinelli M. 1989. “Isolation and Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Resistant to Sulphite.” *Yeast (Chichester, England)* 5 Spec No (April): S287–91.

Ehrenreich, I.M., J.P. Gerke, and L. Kruglyak. 2009. “Genetic Dissection of Complex Traits in Yeast: Insights from Studies of Gene Expression and Other Phenotypes in the BYxRM Cross.” *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 74: 145–153.

Ehrenreich, Ian M., Joshua Bloom, Noorossadat Torabi, Xin Wang, Yue Jia, and Leonid Kruglyak. 2012. “Genetic Architecture of Highly Complex Chemical Resistance Traits Across Four Yeast Strains.” *PLoS Genet* 8 (3) (March 15): e1002570.

Ehrenreich, Ian M., Noorossadat Torabi, Yue Jia, Jonathan Kent, Stephen Martis, Joshua A. Shapiro, David Gresham, Amy A. Caudy, and Leonid Kruglyak. 2010. “Dissection of Genetically Complex Traits with Extremely Large Pools of Yeast Segregants.” *Nature* 464 (7291) (April 15): 1039–1042.

F

Falque, Matthieu, Laurent Décousset, Delphine Dervins, Anne-Marie Jacob, Johann Joets, Jean-Pierre Martinant, Xavier Raffoux, *et al.* 2005. “Linkage Mapping of 1454 New Maize Candidate Gene Loci.” *Genetics* 170 (4) (August 1): 1957–1966

Falque, M. “EVOLUTION DES METHODES DE GENOTYPAGE,” *Le Sélectionneur Français*, 2011.

Favier M, Bilhère E, Lonvaud-Funel A, Moine V, Lucas PM. 2012. “Identification of pOENI-1 and Related Plasmids in *Oenococcus oen*i Strains Performing the Malolactic Fermentation in Wine. ”*PLoS ONE* 7: e49082.

Fernández-González, M, R Di Stefano, and A Briones. 2003a. “Hydrolysis and Transformation of Terpene Glycosides from Muscat Must by Different Yeast Species.” *Food Microbiology* 20 (1) (February): 35–41.

Fernández-González, M, R Di Stefano, and A Briones. 2003b. “Hydrolysis and Transformation of Terpene Glycosides from Muscat Must by Different Yeast Species.” *Food Microbiology* 20 (1) (February): 35–41.

Fleet, G. 2003. “Yeast Interactions and Wine Flavour.” *International Journal of Food Microbiology* 86 (1-2) (September 1): 11–22.

Foss, Eric J, Dragan Radulovic, Scott A Shaffer, Douglas M Ruderfer, Antonio Bedalov, David R Goodlett, and Leonid Kruglyak. 2007. “Genetic Basis of Proteome Variation in Yeast.” *Nature Genetics* 39 (11) (October 21):

Freese, Ernst, Chingju W. Sheu, and Enid Galliers. 1973. “Function of Lipophilic Acids as Antimicrobial Food Additives.” *Nature* 241 (5388) (February 2): 321–325.

Friis, Jørgen, Leszek Szablewski, Søren T. Christensen, Peter Schousboe, and Leif Rasmussen. 1994. “Physiological Studies on the Effect of Ca^{2+} on the Duration of the Lag Phase of *Saccharomyces cerevisiae*.” *FEMS Microbiology Letters* 123 (1): 33–36.

G

Germer, Søren, and Russell Higuchi. 1999. “Single-tube Genotyping Without Oligonucleotide Probes.” *Genome Research* 9 (1): 72–78.

Gietz, R. Daniel, and Robin A. Woods. 2006. “Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method.” In *Yeast Protocol*, 107–120.

Giudici, P., and C. Zambonelli. 1992. “Biometric and Genetic Study on Acetic Acid Production for Breeding of Wine Yeast.” *American Journal of Enology and Viticulture* 43 (4): 370–374.

Giudici, P., C. Zambonelli, and R. E. Kunkee. 1993. “Increased Production of N-propanol in Wine by Yeast Strains Having an Impaired Ability to Form Hydrogen Sulfide.” *American Journal of Enology and Viticulture* 44 (1): 17–21.

Glazier, Anne M., Joseph H. Nadeau, and Timothy J. Aitman. 2002. “Finding Genes That Underlie Complex Traits.” *Science* 298 (5602) (December 20): 2345–2349.

Goddard, Matthew R. 2008. “Quantifying The Complexities Of *Saccharomyces cerevisiae’s* Ecostystem Engineering Via Fermentation.” *Ecology* 89 (8) (August 1): 2077–2082.

Gómez-Míguez, Manuela, M. Lourdes González-Miret, and Francisco J. Heredia. 2007. “Evolution of Colour and Anthocyanin Composition of Syrah Wines Elaborated with Pre-fermentative Cold Maceration.” *Journal of Food Engineering* 79 (1) (March): 271–278.

Gordillo, Belen, M. Isabel López-Infante, Pilar Ramírez-Pérez, M. Lourdes González-Miret, and Francisco J. Heredia. 2010. “Influence of Prefermentative Cold Maceration on the Color and Anthocyanic Copigmentation of Organic Tempranillo Wines Elaborated in a Warm Climate.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (11) (June 9): 6797–6803.

Goto-Yamamoto, Nami, Kazuyoshi Kitano, Kunio Shiki, Yuichi Yoshida, Takashi Suzuki, Tomoko Iwata, Yoshiharu Yamane, and Shodo Hara. 1998. “SSU1-R, a Sulfite Resistance Gene of Wine Yeast, Is an Allele of SSU1 with a Different Upstream Sequence.” *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86 (5): 427–433.

Gresham, D. 2006. “Genome-Wide Detection of Polymorphisms at Nucleotide Resolution with a Single DNA Microarray.” *Science* 311 (5769) (March 31): 1932–1936.

Guichoux, E., L. Lagache, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Léger, O. Lepais, C. Lepoittevin, *et al.* 2011. “Current Trends in Microsatellite Genotyping.” *Molecular Ecology Resources* 11 (4): 591–611.

Guillaume, C., P. Delobel, J.-M. Sablayrolles, and B. Blondin. 2007. “Molecular Basis of Fructose Utilization by the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a Mutated HXT3 Allele Enhances Fructose Fermentation.” *Applied and Environmental Microbiology* 73 (8) (February 16): 2432–2439.

H

Heard, Gillian M., and Graham H. Fleet. 1985. “Growth of Natural Yeast Flora During the Fermentation of Inoculated Wines.” *Applied and Environmental Microbiology* 50 (3) (September 1): 727–728.

Hearne, Catherine M., Soumitra Ghosh, and John A. Todd. 1992. “Microsatellites for Linkage Analysis of Genetic Traits.” *Trends in Genetics* 8 (8) (August): 288–294.

Henick-Kling, Edinger, Daniel, and Monk. 1998. “Selective Effects of Sulfur Dioxide and Yeast Starter Culture Addition on Indigenous Yeast Populations and Sensory Characteristics of Wine.” *Journal of Applied Microbiology* 84 (5): 865–876.

Henricsson, C., M. C. de Jesus Ferreira, K. Hedfalk, K. Elbing, C. Larsson, R. M. Bill, J. Norbeck, S. Hohmann, and L. Gustafsson. 2005. “Engineering of a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Wine Strain with a Respiratory Phenotype at High External Glucose Concentrations.” *Applied and Environmental Microbiology* 71 (10) (October 1): 6185–6192.

Henschke, P. A., and V. Jiranek. 1993. “Yeasts-metabolism of Nitrogen Compounds.” *Wine Microbiology and Biotechnology*: 77–164.

Hernanz, Dolores, Ángeles F. Recamales, M. Lourdes González-Miret, M. José Gómez-Míguez, Isabel M. Vicario, and Francisco J. Heredia. 2007. “Phenolic Composition of White Wines with a Prefermentative Maceration at Experimental and Industrial Scale.” *Journal of Food Engineering* 80 (1) (May): 327–335.

Herrero, Óscar, Daniel Ramón, and Margarita Orejas. 2008. “Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* Isoprenoid Pathway for de Novo Production of Aromatic Monoterpenes in Wine.” *Metabolic Engineering* 10 (2) (March): 78–86.

Hinnen, A., J. B. Hicks, and G. R. Fink. 1978. “Transformation of Yeast.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75 (4) (April 1): 1929–1933.

Hinze, Helga, and Helmut Holzer. 1985. “Effect of Sulfite or Nitrite on the ATP Content and the Carbohydrate Metabolism in Yeast.” *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung* 181 (2) (August 1): 87–91.

Howell, K. S., M. Klein, J. H. Swiegers, Y. Hayasaka, G. M. Elsey, G. H. Fleet, P. B. Hoj, I. S. Pretorius, and M. A. de Barros Lopes. 2005. “Genetic Determinants of Volatile-Thiol Release by *Saccharomyces cerevisiae* During Wine Fermentation.” *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9) (September 8): 5420–5426.

Howell, Kate S., Jan H. Swiegers, Gordon M. Elsey, Tracey E. Siebert, Eveline J. Bartowsky, Graham H. Fleet, Isak S. Pretorius, and Miguel A. Barros Lopes. 2004. “Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one Release by *Saccharomyces cerevisiae* Commercial Wine Strains.” *FEMS Microbiology Letters* 240 (2) (November): 125–129.

Husnik, John I., Heinrich Volschenk, Jurgen Bauer, Didier Colavizza, Zongli Luo, and Hennie J.J. van Vuuren. 2006. “Metabolic Engineering of Malolactic Wine Yeast.” *Metabolic Engineering* 8 (4) (July): 315–323.

Huxley, C, E D Green, and I Dunham. 1990. “Rapid Assessment of *S.cerevisiae* Mating Type by PCR.” *Trends in Genetics: TIG* 6 (8) (August): 236.

I

Infante, Juan J., Kenneth M. Dombek, Laureana Rebordinos, Jesús M. Cantoral, and Elton T. Young. 2003. “Genome-Wide Amplifications Caused by Chromosomal Rearrangements Play a Major Role in the Adaptive Evolution of Natural Yeast.” *Genetics* 165 (4) (December 1): 1745–1759.

Ingram, M. 1948. “The Germicidal Effects of Free and Combined Sulphur Dioxide.” *Journal of the Society of Chemical Industry* 67 (1): 18–21.

J

James, Timothy Y., Frank Kauff, Conrad L. Schoch, P. Brandon Matheny, Valérie Hofstetter, Cymon J. Cox, Gail Celio, *et al.* 2006. “Reconstructing the Early Evolution of Fungi Using a Six-gene Phylogeny.” *Nature* 443 (7113) (October 19): 818–822.

Jensen, Susanne L., Nicole L. Umiker, Nils Arneborg, and Charles G. Edwards. 2009. “Identification and Characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa*, and *Pichia guilliermondii* Isolated from Commercial Red Wines.” *Food Microbiology* 26 (8) (December): 915–921.

Jiranek, Vladimir, Peter Langridge, and P. A. Henschke. 1995a. “Validation of Bismuth-containing Indicator Media for Predicting H2S-producing Potential of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts Under Enological Conditions.” *American Journal of Enology and Viticulture* 46 (2): 269–273.

Jiranek, Vladimir, Peter Langridge, and P. A. Henschke. 1995b. “Regulation of Hydrogen Sulfide Liberation in Wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* Strains by Assimilable Nitrogen.” *Applied and Environmental Microbiology* 61 (2): 461–467.

Johnston, John R., Clelia Baccari, and Robert K. Mortimer. 2000. “Genotypic Characterization of Strains of Commercial Wine Yeastsby Tetrad Analysis.” *Research in Microbiology* 151 (7): 583–590.

K

Kobayashi, Kazumi, and Akio Yoshimoto. 1982. “Studies on Yeast Sulfite Reductase: IV. Structure and Steady-state Kinetics.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 705 (3) (August 10): 348–356.

Korstanje, Ron, and Beverly Paigen. 2002. “From QTL to Gene: The Harvest Begins.” *Nature Genetics* 31 (3) (July): 235–236.

Koszul R, Dujon B, Fischer G. 2006. “Stability of Large Segmental Duplications in the Yeast Genome.” *Genetics* 172: 2211-2222.

Kruglyak, Leonid, and Eric S. Lander. 1995. “A Nonparametric Approach for Mapping Quantitative Trait Loci.” *Genetics* 139 (3): 1421–1428.

Kurek, Ewa J. 1985. “Properties of an Enzymatic Complex Active in Sulfite and Thiosulfate Oxidation by *Rhodotorula Sp*.” *Archives of Microbiology* 143 (3) (December 1): 277–282.

L

Lafon-Lafourcade, S., and E. Peynaud. 1974. “Sur L’action Antibacterienne de L’anhydride Sulfureux Sous Forme Libre et Sous Forme Combinée.” *Conn. Vigne Vin* 8: 187–203.

Lander, E. S., and D. Botstein. 1989. “Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using RFLP Linkage Maps.” *Genetics* 121 (1) (January 1): 185–199.

Lavigne, V. 1996. “Recherches Sur Les Composés Soufrés Volatils Formés Par La Levure Au Cours de La Vinification et L’élevage Des Vins Blancs Sec”. Thèse de doctorat, University of Bordeaux II, Bordeaux, France.

Lavigne, V., R. Henry, and D. Dubourdieu. 1998. “Identification et dosage de composés soufrés intervenant dans l’arôme grillé des vins.” *Sciences des aliments* 18 (2): 175–191.

Legras, Jean-Luc, and Francis Karst. 2003. “Optimisation of Interdelta Analysis for *Saccharomyces cerevisiae* Strain Characterisation.” *FEMS Microbiology Letters* 221 (2) (April): 249–255.

Libkind, Diego, Chris Todd Hittinger, Elisabete Valério, Carla Gonçalves, Jim Dover, Mark Johnston, Paula Gonçalves, and José Paulo Sampaio. 2011. “Microbe Domestication and the Identification of the Wild Genetic Stock of Lager-brewing Yeast.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (35) (August 30): 14539–14544.

Lilly, Mariska, Florian F. Bauer, Marius G. Lambrechts, Jan H. Swiegers, Daniel Cozzolino, and Isak S. Pretorius. 2006. “The Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase and Esterase Activity on the Flavour Profiles of Wine and Distillates.” *Yeast* 23 (9) (July 15): 641–659.

Linderholm, A. L., C. L. Findleton, G. Kumar, Y. Hong, and L. F. Bisson. 2008. “Identification of Genes Affecting Hydrogen Sulfide Formation in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Applied and Environmental Microbiology* 74 (5) (January 11): 1418–1427.

Liti G, Louis EJ. 2005. “Yeast Evolution And Comparative Genomics. ” *Annu Rev Microbiol* 59: 135-153.

Livak, Kenneth J. 1999. “Allelic Discrimination Using Fluorogenic Probes and the 5’ Nuclease Assay.” *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 14 (5–6) (February): 143–149.

Llaudy, María Carmen del, Roser Canals, Joan Miquel Canals, and Fernando Zamora. 2008. “Influence of Ripening Stage and Maceration Length on the Contribution of Grape Skins, Seeds and Stems to Phenolic Composition and Astringency in Wine-simulated Macerations.” *European Food Research and Technology* 226 (3) (January 1): 337–344.

Lodder, J., and L. DE LEY. 1970. “The Yeast.” *A Taxonomic Study,” Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam*.

M

Macris, Basil J., and Pericles Markakis. 1974. “Transport and Toxicity of Sulphur Dioxide in *Saccharomyces cerevisiae Var.ellipsoideus*.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 25 (1): 21–29.

Maeda, Hideo, Takeshi Sugisawa, Hiroshi Nemoto, and Yoshihiro Sunohara. 2013. “QTL Analysis for Rice Stripe Resistance in the Japanese Upland Rice Kanto72.” *Breeding Science* 54 (1): 19–26.

Marullo, P, M Bely, I Masneufpomarede, M Aigle, and D Dubourdieu. 2004. “Inheritable Nature of Enological Quantitative Traits Is Demonstrated by Meiotic Segregation of Industrial Wine Yeast Strains.” *FEMS Yeast Research* 4 (7) (May): 711–719.

Marullo, Philippe, Michel Aigle, Marina Bely, Isabelle Masneuf-Pomarède, Pascal Durrens, Denis Dubourdieu, and Gaël Yvert. 2007. “Single QTL Mapping and Nucleotide-level Resolution of a Physiologic Trait in Wine *Saccharomyces cerevisiae* Strains.” *FEMS Yeast Research* 7 (6) (September): 941–952.

Marullo, Philippe, Marina Bely, Isabelle Masneuf-Pomarède, Monique Pons, Michel Aigle, and Denis Dubourdieu. 2006. “Breeding Strategies for Combining Fermentative Qualities and Reducing Off-flavor Production in a Wine Yeast Model.” *FEMS Yeast Research* 6 (2) (January 18): 268–279.

Marullo, Philippe, Chantal Mansour, Matthieu Dufour, Warren Albertin, Delphine Sicard, Marina Bely, and Denis Dubourdieu. 2009. “Genetic Improvement Of Thermo-tolerance in Wine *Saccharomyces cerevisiae* In Strains by a Backcross Approach.” *FEMS Yeast Research* 9 (8) (December): 1148–1160.

Marullo, Philippe, Cecile Thibon, Denis Dubourdieu, and Takatoshi Tominaga. 2010. “Use Of *Ure2* Mutant Yeast For Increasing The Release of Aromatic Volatile Thiols By Yeast During Fermentation.”

Marullo, Philippe, Gael Yvert, Marina Bely, Michel Aigle, and Denis Dubourdieu. 2007. “Efficient Use of DNA Molecular Markers to Construct Industrial Yeast Strains.” *FEMS Yeast Research* 7 (8) (December): 1295–1306.

Masneuf, I., M. L. Murat, G. I. Naumov, T. Tominaga, and D. Dubourdieu. 2002. “Hybrids *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces bayanus Var.uvarum* Having a High Liberating Ability of Some Sulfur Varietal Aromas of Vitis Vinifera Sauvignon Blanc Wines. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin* v. 36(4) p. 205-212 (November).

Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1977. “A New Method for Sequencing DNA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (2) (February 1): 560–564.

McMeekin, T.A., J. Olley, D.A. Ratkowsky, and T. Ross. 2002. “Predictive Microbiology: Towards the Interface and Beyond.” *International Journal of Food Microbiology* 73 (2–3) (March 11): 395–407.

Meaden, Philip G., Francis M. Dickinson, Amparo Mifsud, Wayne Tessier, John Westwater, Howard Bussey, and Melvin Midgley. 1997. “The *ALD6* Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a Cytosolic, Mg2+-activated Acetaldehyde Dehydrogenase.” *Yeast* 13 (14): 1319–1327.

Membré, J.-M., T. Ross, and T. McMeekin. 1999. “Behaviour of Listeria Monocytogenes Under Combined Chilling Processes.” *Letters in Applied Microbiology* 28 (3): 216–220.

Mendizabal, Iratxe, Gabino Rios, Jose M. Mulet, Ramón Serrano, and Iñigo F. de Larrinoa. 1998. “Yeast Putative Transcription Factors Involved in Salt Tolerance.” *FEBS Letters* 425 (2): 323–328.

Mercado, L., A. Dalcero, R. Masuelli, and M. Combina. 2007. “Diversity of *Saccharomyces* Strains on Grapes and Winery Surfaces: Analysis of Their Contribution to Fermentative Flora of Malbec Wine from Mendoza (Argentina) During Two Consecutive Years.” *Food Microbiology* 24 (4) (June): 403–412.

Metzker, Michael L. 2010. “Sequencing Technologies — the Next Generation.” *Nature Reviews Genetics* 11 (1) (January): 31–46.

Michnick, Sumio, Jean-Louis Roustan, Fabienne Remize, Pierre Barre, and Sylvie Dequin. 1997. “Modulation of Glycerol and Ethanol Yields During Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressed or Disrupted for GPD1 Encoding Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase.” *Yeast* 13 (9): 783–793.

Miklos, Ida, Tamás Varga, Ágnes Nagy, and Matthias Sipiczki. 1997. “Genome Instability and Chromosomal Rearrangements in a Heterothallic Wine Yeast.” *Journal of Basic Microbiology* 37 (5): 345–354.

Millet, V., and A. Lonvaud-Funel. 1999. “Incidence du dioxyde de soufre sur les micro-organismes pendant l’élevage des vins rouges.” *Journal des sciences et techniques de la tonnellerie* 5: 27–45.

Mortimer, Robert, and Mario Polsinelli. 1999. “On the Origins of Wine Yeast.” *Research in Microbiology* 150 (3) (April): 199–204.

Murat, Marie-Laure, Isabelle Masneuf, Philippe Darriet, Vallerie Lavigne, Takatoshi Tominaga, and Denis Dubourdieu. 2001. “Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains on the Liberation of Volatile Thiols in Sauvignon Blanc Wine.” *American Journal of Enology and Viticulture* 52 (2) (January 1): 136–139.

N

Nardi, Tiziana, Viviana Corich, Alessio Giacomini, and Bruno Blondin. 2010. “A Sulphite-inducible Form of the Sulphite Efflux Gene *SSU1* in a *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast.” *Microbiology* 156 (6) (June 1): 1686–1696.

Naumov, G. I., V. I. Kondratieva, and E. S. Naumova. 1986. “Methods for Hybridization of Homothallic Yeast Diplonts and Haplonts.” *Soviet Biotechnol* 6: 29–32.

Nickersok, Walter J. 1953. “Reduction of Inorganic Substances by Yeasts I. Extracellular Reduction of Sulfite by Species of *Candida*.” *Journal of Infectious Diseases* 93 (1) (July 1): 43–56.

Nikolantonaki, Maria, Igor Chichuc, Pierre-Louis Teissedre, and Philippe Darriet. 2010. "Reactivity of Volatile Thiols with Polyphenols in a Wine-model Medium: Impact of Oxygen, Iron, and Sulfur Dioxide." *Analytica Chimica Acta* 660 (1): 102–109.

O

Onodera, J. 2004. "Ald6p Is a Preferred Target for Autophagy in Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* 279 (16) (February 13): 16071–16076.

Onodera, Jun, and Yoshinori Ohsumi. 2005. "Autophagy Is Required for Maintenance of Amino Acid Levels and Protein Synthesis Under Nitrogen Starvation." *Journal of Biological Chemistry* 280 (36) (September 9): 31582–31586.

P

Park, Hoon, and Alan T. Bakalinsky. 2004. "Evidence for Sulfite Proton Symport in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 (5) (October 3): 967–971.

Park, Hoon, and Yoon-Sun Hwang. 2008. "Genome-wide Transcriptional Responses to Sulfite in *Saccharomyces cerevisiae*." *The Journal of Microbiology* 46 (5) (October 1): 542–548.

Park, Hoon, Nathan I. Lopez, and Alan T. Bakalinsky. 1999. "Use of Sulfite Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* as a Dominant Selectable Marker." *Current Genetics* 36 (6): 339–344.

Pashkova, Natasha, Lokesh Gakhar, Stanley C. Winistorfer, Liping Yu, S. Ramaswamy, and Robert C. Piper. 2010. "WD40 Repeat Propellers Define a Ubiquitin-Binding Domain That Regulates Turnover of F Box Proteins." *Molecular Cell* 40 (3) (November 12): 433–443.

Perez-Ortin, J. E. 2002. "Molecular Characterization of a Chromosomal Rearrangement Involved in the Adaptive Evolution of Yeast Strains." *Genome Research* 12 (10) (October 1): 1533–1539.

Petering, David H., and Nancy Ting Shih. 1975. "Biochemistry of Bisulfite-sulfur Dioxide." *Environmental Research* 9 (1) (February): 55–65.

Peynaud, E., and G. Guimberteau. 1962. "Sur La Formation Des Alcools Supérieurs Par Les Levures de Vinification." *Ann. Technol. Agr* 11: 85–105.

Pilkington, Bridget J., and Anthony H. Rose. 1988. “Reactions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* to Sulphite.” *Journal of General Microbiology* 134 (10) (October 1): 2823–2830.

Piotrowska, M., A. Nowak, and A. Czyzowska. 2013. “Removal of Ochratoxin A by Wine *Saccharomyces cerevisiae* Strains.” *European Food Research and Technology* 236 (3) (March 1): 441–447.

Pirt, S. J. 1975. “Principles of Microbe and Cell Cultivation.” 274 pp. CABDirect2.

Pretorius, I. S. 2000. “Tailoring Wine Yeast for the New Millennium: Novel Approaches to the Ancient Art of Winemaking.” *Yeast* 16 (8): 675–729.

R

Radakovits Randor, Robert E. Jinkerson, Al Darzins, and Matthew C. Posewitz. 2010. “Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production.” *Eukaryotic Cell* 9 (4) (April 1): 486–501.

Rankine, B. C., and K. F. Pocock. 1969. “Influence of Yeast Strain on Binding of Sulphur Dioxide in Wines, and on Its Formation During Fermentation.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 20 (2): 104–109.

Rehm, H.-J., and Helga Wittmann. 1963. “Beitrag zur Kenntnis der antimikrobiellen Wirkung der schwefligen Säure.” *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 120 (6) (October 1): 465–478.

Remize, F., J. L. Roustan, J. M. Sablayrolles, P. Barre, and S. Dequin. 1999. “Glycerol Overproduction by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains Leads to Substantial Changes in By-product Formation and to a Stimulation of Fermentation Rate in Stationary Phase.” *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1): 143–149.

Remize Fabienne, Emilie Andrieu, and Sylvie Dequin. 2000. “Engineering of the Pyruvate Dehydrogenase Bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the Cytosolic Mg^{2+} and Mitochondrial K+ Acetaldehyde Dehydrogenases Ald6p and Ald4p in Acetate

Renault, Philippe-Emmanuel. 2010. *Caractérisation Phénotypique de L'espèce Torulaspora Delbrueckii En Conditions Œnologiques. Application à La Co-inoculation Avec L'espèce Saccharomyces cerevisiae*. Bordeaux 2.

Renouf, Vincent. 2006. "Description et Caractérisation de La Diversité Microbienne Durant L'élaboration Du Vin."

Ribéreau-Gayon, Pascal, Denis Dubourdieu, Bernard Donèche, and Aline Lonvaud. 2012. *Traité d'oenologie-Tome 1-6e éd.-Microbiologie Du Vin. Vinifications*.

Ricardo-da-Silva, J. M., V. Cheynier, A. Samsom, and M. Bourzeix. 1993. "Effect of Pomace Contact, Carbonic Maceration, and Hyperoxidation on the Procyanidin Composition of Grenache Blanc Wines." *American Journal of Enology and Viticulture* 44 (2) (January 1): 168–172.

Rodríguez-Sifuentes, L., J.B. Páez-Lerma, O.M. Rutiaga-Quiñones, J.A. Rojas-Contreras, E. Ruiz-Baca, G. Gutiérrez-Sánchez, E. Barrio, and N.O. Soto-Cruz. 0. "Identification of a Yeast Strain as a Potential Stuck Wine Fermentation Restarter: a Kinetic Characterization." *CyTA - Journal of Food* 0 (0): 1–8.

Romano, P., C. Fiore, M. Paraggio, M. Caruso, and A. Capece. 2003. "Function of Yeast Species and Strains in Wine Flavour." *International Journal of Food Microbiology* 86 (1–2) (September 1): 169–180.

Romano Patrizia, M. Grazia Soli, Giovanna Suzzi, Luigi Grazia, and Carlo Zambonelli. 1985. "Improvement of a Wine *Saccharomyces cerevisiae* Strain by a Breeding Program." *Applied and Environmental Microbiology* 50 (4): 1064–1067.

Romano Patrizia, M. Grazia Soli, and Giovanna Suzzi. 1983. "Procedure for Mutagenizing Spores of *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Bacteriology* 156 (2): 907–908.

Ross Tom, Paw Dalgaard, and Suwunna Tienungoon. 2000. “Predictive Modelling of the Growth and Survival of Listeria in Fishery Products.” *International Journal of Food Microbiology* 62 (3): 231–245.

Rossignol Tristan, Olivier Postaire, Julien Storaï, and Bruno Blondin. 2006. “Analysis of the Genomic Response of a Wine Yeast to Rehydration and Inoculation.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 71 (5) (April 11): 699–712.

Rossouw, D., E. H. Heyns, M. E. Setati, S. Bosch, and F. F. Bauer. 2013. “Adjusting Trehalose Metabolism to Modify Ethanol Yields in Wine Yeast Strains.” *Applied and Environmental Microbiology* (June 21): AEM.00964–13.

Rous, C. V., R. Snow, and R. E. Kunkee. 1983. “Reduction of Higher Alcohols by Fermentation with a Leucine-Auxotrophic Mutant of Wine Yeast.” *Journal of the Institute of Brewing* 89 (4): 274–278.

Rudi, Knut, Monika Zimonja, Sigrun Hannevik, and Signe Drømtorp. 2006. “Multiplex Real-time Single Nucleotide Polymorphism Detection and Quantification by Quencher Extension.” *BioTechniques* 40 (3) (March): 323–329.

S

Saitoh, Satoshi, Nobuhiro Ishida, Toru Onishi, Kenro Tokuhiro, Eiji Nagamori, Katsuhiko Kitamoto, and Haruo Takahashi. 2005. “Genetically Engineered Wine Yeast Produces a High Concentration of l-Lactic Acid of Extremely High Optical Purity.” *Applied and Environmental Microbiology* 71 (5) (May 1): 2789–2792.

Salmon, J. M., O. Vincent, J. C. Mauricio, M. Bely, and P. Barre. 1993. “Sugar Transport Inhibition and Apparent Loss of Activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a Major Limiting Factor of Enological Fermentations.” *American Journal of Enology and Viticulture* 44 (1): 56–64.

Salmon, J. M., and Barre, P. 1998. “Improvement of Nitrogen Assimilation and Fermentation Kinetics Under Enological Conditions by Derepression of Alternative Nitrogen-assimilatory Pathways in an Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Strain.” *Applied and Environmental Microbiology* 64 (10): 3831–3837.

Salvadó, Z., F.N. Arroyo-López, E. Barrio, A. Querol, and J.M. Guillamón. 2011. “Quantifying the Individual Effects of Ethanol and Temperature on the Fitness Advantage of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Food Microbiology* 28 (6) (September): 1155–1161.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. “DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12) (December 1): 5463–5467.

Santos, J., M. J. Sousa, H. Cardoso, J. Inacio, S. Silva, I. Spencer-Martins, and C. Leao. 2008. “Ethanol Tolerance of Sugar Transport, and the Rectification of Stuck Wine Fermentations.” *Microbiology* 154 (2) (February 1): 422–430.

Sax, Karl. 1923. “The Association of Size Differences with Seed-Coat Pattern and Pigmentation in PHASEOLUS VULGARIS.” *Genetics* 8 (6) (November): 552–560.

Schacherer, Joseph, Joshua A. Shapiro, Douglas M. Ruderfer, and Leonid Kruglyak. 2009. “Comprehensive Polymorphism Survey Elucidates Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Nature* 458 (7236) (March 19): 342–345.

Schimz, Karl-Ludwig. 1980. “The Effect of Sulfite on the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.” *Archives of Microbiology* 125 (1-2) (March 1): 89–95.

Schimz, Karl-Ludwig, and Helmut Holzer. 1979. “Rapid Decrease of ATP Content in Intact Cells of *Saccharomyces cerevisiae* after Incubation with Low Concentrations of Sulfite.” *Archives of Microbiology* 121 (3) (June 1): 225–229.

Schwartz, David C., and Charles R. Cantor. 1984. “Separation of Yeast Chromosome-sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis.” *Cell* 37 (1) (May): 67–75.

Sicard, Delphine, and Jean-Luc Legras. 2011. “Bread, Beer and Wine: Yeast Domestication in the *Saccharomyce*s Sensu Stricto Complex.” *Comptes Rendus Biologies* 334 (3) (March): 229–236.

Sinha, Himanshu, Bradly P. Nicholson, Lars M. Steinmetz, and John H. McCusker. 2006. “Complex Genetic Interactions in a Quantitative Trait Locus.” *PLoS Genetics* 2 (2): e13.

Spiropoulos, Apostolos, Jota Tanaka, Ioannis Flerianos, and Linda F. Bisson. 2000. "Characterization of Hydrogen Sulfide Formation in Commercial and Natural Wine Isolates of *Saccharomyces*." *American Journal of Enology and Viticulture* 51 (3): 233–248.

Steinmetz, Lars M., Himanshu Sinha, Dan R. Richards, Jamie I. Spiegelman, Peter J. Oefner, John H. McCusker, and Ronald W. Davis. 2002. "Dissecting the Architecture of a Quantitative Trait Locus in Yeast." *Nature* 416 (6878) (March 21): 326–330.

Steyer, Damien, Chloe Ambroset, Christian Brion, Patricia Claudel, Pierre Delobel, Isabelle Sanchez, Claude Erny, Bruno Blondin, Francis Karst, and Jean-Luc Legras. 2012. "QTL Mapping of the Production of Wine Aroma Compounds by Yeast." *BMC Genomics* 13 (1) (October 30): 573.

Stratford, Malcolm, and Anthony H. Rose. 1986. "Transport of Sulphur Dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of General Microbiology* 132 (1) (January 1): 1–6.

Suzuki, K., C. Kondo, M. Morimoto, and Y. Ohsumi. 2010. "Selective Transport of -Mannosidase by Autophagic Pathways: Identification Of A Novel Receptor, Atg34p." *Journal of Biological Chemistry* 285 (39) (July 16): 30019–30025.

Swiegers, J. H., and I. S. Pretorius. 2007. "Modulation of Volatile Sulfur Compounds by Wine Yeast." *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (5) (January 30): 954–960.

Swiegers, J.h., E.j. Bartowsky, P.a. Henschke, and I.s. Pretorius. 2005. "Yeast and Bacterial Modulation of Wine Aroma and Flavour." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11 (2): 139–173.

Swiegers, Jan H., Robyn Willmott, Alana Hill-Ling, Dimitra L. Capone, Kevin H. Pardon, Gordon M. Elsey, Kate S. Howell, *et al.* 2006. "Modulation of Volatile Thiol and Ester Aromas by Modified Wine Yeast." In *Developments in Food Science*, edited by Wender L.P. Bredie and Mikael Agerlin Petersen, Volume 43:113–116.

T

Tachikawa, Hiroyuki, Wataru Funahashi, Yutaka Takeuchi, Hideki Nakanishi, Rikuka Nishihara, Shizue Katoh, Xiao-Dong Gao, Takemitsu Mizunaga, and Daisaburo Fujimoto. 1997. "Overproduction of Mpd2p Suppresses the Lethality of Protein Disulfide Isomerase Depletion in a CXXC Sequence Dependent Manner." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 239 (3) (October 29): 710–714.

Teste, Marie-Ange, Manon Duquenne, Jean M François, and Jean-Luc Parrou. 2009. "Validation of Reference Genes for Quantitative Expression Analysis by Real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*." *BMC Molecular Biology* 10 (1): 99.

Thibon, Cécile, Philippe Marullo, Olivier Claisse, Christophe Cullin, Denis Dubourdieu, and Takatoshi Tominaga. 2008. "Nitrogen Catabolic Repression Controls the Release of Volatile Thiols by *Saccharomyces cerevisiae* During Wine Fermentation." *FEMS Yeast Research* 8 (7) (November): 1076–1086.

Thomas, Dominique, and Yolande Surdin-Kerjan. 1997. "Metabolism of Sulfur Amino Acids in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (4): 503–532.

Thornton, Roy James. 1982. "Selective Hybridisation of Pure Culture Wine Yeasts." *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 14 (3) (September 1): 159–164.

Timberlake, William E., Margaret A. Frizzell, Keith D. Richards, and Richard C. Gardner. 2011. "A New Yeast Genetic Resource for Analysis and Breeding." *Yeast* 28 (1): 63–80.

Tofalo, Rosanna, Giorgia Perpetuini, Giuseppe Fasoli, Maria Schirone, Aldo Corsetti, and Giovanna Suzzi. 2013. "Biodiversity Study of Wine Yeasts Belonging to the 'Terroir' of Montepulciano d'Abruzzo 'Colline Teramane' Revealed *Saccharomyces cerevisiae* Strains Exhibiting Atypical and Unique 5.8S-ITS Restriction Patterns." *Food Microbiology*.

Tominaga, Takatoshi, and Denis Dubourdieu. 2000. "Identification of Cysteinylated Aroma Precursors of Certain Volatile Thiols in Passion Fruit Juice." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (7) (July): 2874–2876.

Tominaga, Takatoshi, Marie-Laure Murat, and Denis Dubourdieu. 1998. “Development of a Method for Analyzing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wines Made from Vitis Vinifera L. Cv. Sauvignon Blanc.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (3): 1044–1048.

U

Uzuka, Yasuyuki, Rumi Tanaka, Takahiro Nomura, and Kentaro Tanaka. 1985. “Method for the Determination of Sulfite Resistance in Wine Yeasts.” *Journal of Fermentation Technology* 63 (2) (April): 107–114.

V

Valdar, William, Leah C. Solberg, Dominique Gauguier, Stephanie Burnett, Paul Klenerman, William O. Cookson, Martin S. Taylor, J. Nicholas P. Rawlins, Richard Mott, and Jonathan Flint. 2006. “Genome-wide Genetic Association of Complex Traits in Heterogeneous Stock Mice.” *Nature Genetics* 38 (8) (August): 879–887.

Varela, C., D. R. Kutyna, M. R. Solomon, C. A. Black, A. Borneman, P. A. Henschke, I. S. Pretorius, and P. J. Chambers. 2012. “Evaluation of Gene Modification Strategies for the Development of Low-Alcohol-Wine Yeasts.” *Applied and Environmental Microbiology* 78 (17) (September 1): 6068–6077.

Viana, Fernando, José V. Gil, Salvador Genovés, Salvador Vallés, and Paloma Manzanares. 2008. “Rational Selection of non-Saccharomyces Wine Yeasts for Mixed Starters Based on Ester Formation and Enological Traits.” *Food Microbiology* 25 (6) (September): 778–785.

Vienne, Dominique de. 1998. *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. Editions Quae.

Volschenk, H., M. Viljoen-Bloom, R. E. Subden, and H. J. J. van Vuuren. 2001. “Malo-ethanolic Fermentation in Grape Must by Recombinant Strains of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Yeast* 18 (10): 963–970.

W

Warth, A. D. 1985. “Resistance of Yeast Species of Benzoic and Sorbic Acids and to Sulphur Dioxide.” *J Food Prot* 48 (7): 564–9.

Watanabe, Y., N. N. Noda, H. Kumeta, K. Suzuki, Y. Ohsumi, and F. Inagaki. 2010. “Selective Transport of -Mannosidase by Autophagic Pathways: Structural Basis For Cargo Recognition By Atg19 And Atg34.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (39) (July 21): 30026–30033.

Weeks, C. 1969. “Production of Sulfur Dioxide-Binding Compounds and of Sulfur Dioxide by Two Saccharomyces Yeasts.” *American Journal of Enology and Viticulture* 20 (1) (January 1): 32–39.

Wickner, R. B. 1991. “Methods in Classical Genetics.” In *Saccharomyces*, edited by Michael F. Tuite and Stephen G. Oliver, 101–147. Biotechnology Handbooks 4. Springer US.

Wilkening, Stefan, Manu M. Tekkedil, Gen Lin, Emilie S. Fritsch, Wu Wei, Julien Gagneur, David W. Lazinski, Andrew Camilli, and Lars M. Steinmetz. 2013. “Genotyping 1000 Yeast Strains by Next-generation Sequencing.” *BMC Genomics* 14 (1) (February 9): 90.

Winge, Oejvind, and Otto Laustsen. 1939. *On 14 New Yeast Types, Produced by Hybridization*.

Winter, Jacques F., Marie-Odile Loret, and Jean-Louis Uribelarrea. 1989. “Inhibition and Growth Factor Deficiencies in Alcoholic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*.” *Current Microbiology* 18 (4) (April 1): 247–252.

Winzeler, E. A. 1998. “Direct Allelic Variation Scanning of the Yeast Genome.” *Science* 281 (5380) (August 21): 1194–1197.

Winzeler, E. A., Cristian I. Castillo-Davis, Guy Oshiro, David Liang, Daniel R. Richards, Yingyao Zhou, and Daniel L. Hartl. 2003. “Genetic Diversity in Yeast Assessed With Whole-Genome Oligonucleotide Arrays.” *Genetics* 163 (1) (January 1): 79–89.

Wisselink, H. Wouter, Maurice J. Toirkens, Qixiang Wu, Jack T. Pronk, and Antonius J. A. van Maris. 2009. “Novel Evolutionary Engineering Approach for Accelerated Utilization of Glucose, Xylose, and Arabinose Mixtures by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Strains.” *Applied and Environmental Microbiology* 75 (4) (February 15): 907–914.

X

Xiong, Mingyong, Guohua Chen, and John Barford. 2013. “Genetic Engineering of Yeasts to Improve Ethanol Production from Xylose.” *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*.

Xu, Tao, Christian A. Shively, Rui Jin, Matthew J. Eckwahl, Craig J. Dobry, Qingxuan Song, and Anuj Kumar. 2010. “A Profile of Differentially Abundant Proteins at the Yeast Cell Periphery During Pseudohyphal Growth.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (20) (May 14): 15476–15488.

Xu, Xiao, JoLynne D. Wightman, Bruce L. Geller, Dorina Avram, and Alan T. Bakalinsky. 1994. “Isolation and Characterization of Sulfite Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Current Genetics* 25 (6) (June 1): 488–496.

Y

Yuasa, Noriyuki, Youji Nakagawa, Masayuki Hayakawa, and Yuzuru Iimura. 2004. “Distribution of the Sulfite Resistance Gene SSU1-R and the Variation in Its Promoter Region in Wine Yeasts.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98 (5): 394–397.

Yuasa, Noriyuki, Youji Nakagawa, Masayuki Hayakawa, and Yuzuru Iimura 2005. “Two Alleles of the Sulfite Resistance Genes Are Differentially Regulated in *Saccharomyces cerevisiae.” Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69 (8): 1584–1588.

Z

Zhang, Jianzhi. 2003. “Evolution by Gene Duplication: An Update.” *Trends in Ecology & Evolution* 18 (6): 292–298.

Zoecklein, B.W., J.E. Marcy, J.M. Williams, and Y. Jasinski. 1997. “Effect of Native Yeasts and Selected Strains of *Saccharomyces cerevisiae*on Glycosyl Glucose, Potential Volatile Terpenes, and Selected Aglycones of White Riesling (Vitis viniferaL.) Wines.” *Journal of Food Composition and Analysis* 10 (1) (March): 55–65.

Zott, Katharina, Cecile Miot-Sertier, Olivier Claisse, Aline Lonvaud-Funel, and Isabelle Masneuf-Pomarede. 2008. “Dynamics and Diversity of non-*Saccharomyces* Yeasts During the Early Stages in Winemaking.” *International Journal of Food Microbiology* 125 (2) (July): 197-203

Publications et communications :

Publications internationales :

Zimmer Adrien, Cécile Durand, Nicolas Loira, Pascal Durrens, David. J Sherman, and Philippe Marullo. "QTL Dissection of Lag Phase in Wine Fermentation Reveals a New Translocation Responsible for *Saccharomyces cerevisiae* Adaptation to Sulfite." Soumis Plos One

Dufour Matthieu, Adrien Zimmer, Cécile Thibon, and Philippe Marullo. 2013. "Enhancement of Volatile Thiol Release of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Using Molecular Breeding." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (13) (July 1): 5893–5905.

Communications par affiches en congrés national avec acte :

Dissection of a QTL associated to the lag phase in *Saccharomyces cerevisiae* for the oenological industry : genetic, molecular and physiological approach
Adrien ZIMMER[1,2], Bénédicte LAGOFUN[2], Nicolas LOIRA[3], David SHERMAN[3], Philippe MARULLO[1,2] [1] SARCO/LAFFORT Group [2] Unité de recherche Œnologie, EA 4577, Université Bordeaux Ségalen Institut des Sciences de la Vigne et du Vin [3] INRIA Bordeaux Sud-Ouest
Levures, Modèles & Outils 2012

Communications par affiches en congrés internationaux avec acte :

A new translocation involving the sulphite pump Ssu1p controls the lag phase duration of grape must fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*.
Adrien ZIMMER[1,2], Aurélie Goulielmakis[3], David SHERMAN[3], Philippe MARULLO[1,2] .[1] BIO-LAFFORT, Bordeaux [2] EA 4577 Œnologie, Université Bordeaux Ségalen, INRA-IPB, ISVV, Villenave d'Ornon [3] INRIA Bordeaux Sud-Ouest.
5th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi (PYFF5)

Enhancement of Volatile Thiol Release of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Using Molecular Breeding
Mathieu DUFOUR [1,], Adrien ZIMMER[1,2], Cécile THIBON[2], Philippe MARULLO[1,2] .[1] BIO-LAFFORT, Bordeaux [2] EA 4577 Œnologie, Université Bordeaux Ségalen, INRA-IPB, ISVV, Villenave d'Ornon
5th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi (PYFF5)

RESUME

Etude du déterminisme génétique de la phase de latence chez *Saccharomyces cerevisiae* en conditions œnologiques. Impact des mécanismes de résistance au SO_2

Les QTL (Quantitative Trait Loci) sont des régions chromosomiques comportant un ou plusieurs gènes contrôlant l'expression d'un paramètre péhnotypique. La détection de ces QTL dans l'industrie des levures œnologiques permet la sélection de souches performantes. Dans cette étude, la dissection d'un QTL associé à la phase de latence durant la fermentation alcoolique en conditions œnologiques a permis de mettre en évidence une nouvelle translocation. Celle-ci, impliquant le gène *SSU1* permet aux souches qui la possèdent d'avoir une phase de latence raccourcie. L'usage intensif du SO_2 en œnologie a conduit à la sélection de cette translocation chez les souhes industrielles. Des marqueurs PCR ont été developpés pour contrôler ce caractère dans les processus de sélection des souches, permettant d'intoduire cette translocation dans différents fonds génétiques. Une première étape dans l'étude de l'impact organoleptique de ces translocations sur le vin a été faite, montrant une corrélation avec la production d'acidité volatile. Cette voie reste néanmoins à approfondir, tant au laboratoire qu'en conditions réelles dans un chai.

Mots Clés : *Saccharomyces cerevisiae*, QTL, translocation, *SSU1*, SO_2, croisements de levure, vin

ABSTRACT

Study of the genetic determinism of the lag phase in *Saccharomyces cerevisiae* in oenological conditions. Impact of mechanisms resistance to SO_2

QTL (Quantitative Trait Loci) are chromosomics regions including one or more genes controlling the expression of a phenotypic parameter. The detection of these QTL in the wine industry allows the selection of more efficient yeast strains. In this study, the dissection of a QTL linked to lag phase variation during wine alcoholic fermentation was carried out. Our findings put in light a new translocation involving the *SSU1* gene conferring a shorter lag phase. The intensive use of SO_2 in oenology allows the selection of this translocation in industrials strains. Genetic markers were developed for introducing this translocation in various genetic backgrounds during selection programs. The study of translocations impact on the wine organoleptic properties was initiated, showing an unexplained role of VIII-XVI translocation on the volatile acidity production. These preliminary results need to be continued, in laboratory and cellar conditions.

Key Words : *Saccharomyces cerevisiae*, QTL, translocation, *SSU1*, SO_2, yeast breeding, wine