



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de STRASBOURG

Discipline : Sciences du vivant

ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par

DAMIEN STEYER

Etude génétique du métabolisme des acides gras et des terpènes aromatiques chez la levure en conditions fermentaires

Membres du Jury

Hervé Alexandre	Professeur	Université de Bourgogne	Rapporteur
Thierry Bergès	Professeur	Université de Poitiers	Rapporteur
Bruno Blondin	Professeur	ENSAM Montpellier	Examineur
Jean-Marc Jeltsch	Professeur	Université de Strasbourg	Examineur
Jean-Luc Legras	Ingénieur de recherche	INRA ENSAM	Co-Directeur de thèse
Francis Karst	Professeur	Université de Strasbourg	Directeur de thèse

Membre invitée :

Claude Erny Maître de Conférences Université de haute Alsace Co-Directeur de thèse

***Il y a plus de philosophie dans une
bouteille de vin que dans tous les livres.***

Louis Pasteur

Remerciements

Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans l'aide et le soutien de toutes les personnes qui y ont participé et je tiens à les remercier.

Pour commencer, je souhaiterais remercier le CIVA et la région Alsace, qui ont financé ma thèse et sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Ensuite, je tiens à remercier le Pr Francis Karst pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son équipe et sous sa direction. Un grand merci à lui pour m'avoir laissé mener avec la plus grande liberté, mes recherches et mes travaux. Je le remercie également d'avoir partagé avec moi ses connaissances sur et le Vin et les levures (avec un grand « L »).

Je remercie également Pr Thierry Bergès, Pr Hervé Alexandre, Pr Bruno Blondin et Pr Jean-Marc Jeltsch de me faire l'honneur de bien vouloir juger mon travail.

Merci également au Dr Claude Erny pour m'avoir co-encadré et m'avoir donné l'opportunité de pouvoir enseigner à l'IUT de génie biologique.

Merci au Dr Jean-Luc Legras pour les échanges menés tout au long de cette thèse et merci aussi pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche tel qu'il est.

Ma profonde gratitude va à toute l'équipe d'œnologie/MSV, Andrea Ilg, Raymonde Baltenweck, Geneviève Riveill, Sophie Meyer, Philippe Hugueneu et Marc Fischer pour leur soutien et leur bonne humeur. Merci également à Guillaume Arnold du CIVA pour ses conseils et son soutien. Merci à Gregory Lemarquis pour l'ensemble des essais réalisés grâce à son aide.

Merci aussi à l'équipe de virologie pour m'avoir permis de m'installer temporairement dans leur salle « pucerons » afin d'y réaliser mes fermentations, merci tout particulièrement à Louis.

Je souhaiterais remercier Marc Lollier, Eric Duchêne et Noémy Jelly pour l'ensemble des discussions constructives que nous avons pu partager dans le train Strasbourg-Sélestat-Colmar et le trajet gare-INRA.

J'exprime toute ma reconnaissance à l'ensemble du personnel ainsi que les doctorants et post-doctorants de l'INRA de Colmar qui ont toujours été là pour m'encourager et me soutenir et ce quelques soient les services ou les équipes, un grand merci donc aux équipes BDV, Agronomie GAV, mais aussi, aux services administratifs et SDAR, et à l'AUR merci à vous tous pour ces 3 ans passés en votre compagnie.

Je remercie également l'UMR SPO de Montpellier et spécialement Chloé Ambroset, Virginie Galeote et Isabelle Sanchez ainsi que les doctorants et post-doctorants que j'ai eu le plaisir de rencontrer.

J'adresse de très chaleureux remerciements à Jean Masson président de centre de l'INRA de Colmar qui m'a soutenu dans l'ensemble de mes démarches et de mes convictions sur mes différents projets.

Je remercie également SEMIA pour leur aide, Jean-Luc Dimarcq, Magali Lagrange et Gilles Grand pour ce début d'aventure avec TWISTAROMA mais aussi Laurence Lacroix-Orio pour avoir su m'encourager, merci à vous d'avoir cru en moi.

J'aimerais également remercier l'équipe du TEPRAL des Brasseries Kronenbourg, Jacques Gaucher, Carole Leclerc, Luc Didierjean, Jacques Gangloff et Johannes Rösti pour l'ensemble de leur encadrement préalable à cette thèse, aussi bien sur les conduites de fermentations que sur la biologie moléculaire, l'aspect sensoriel, les arômes et le métabolisme des levures.

J'adresse un remerciement tout particulier à Behnam Taïdi qui en plus de m'avoir encadré aux Brasseries Kronenbourg, m'a permis, pendant cette thèse, d'aller faire une présentation lors du meeting de l'EBC à Wolnzach.

J'ai eu le plaisir d'avoir été accompagné dans mon travail durant quelques mois par Marie-Mélanie Krauth qui a réalisé quelques-unes des expériences clé de cette thèse notamment la délétion du gène *PDR8* ainsi que les croisements de levure qui y sont associés, je tiens à la remercier sincèrement.

Enfin je tiens à remercier très chaleureusement Patricia Claudel pour tout son travail et son soutien aussi bien moral que technique et scientifique. La base des résultats de cette thèse a été générée grâce à elle et ce projet n'aurait pu aboutir sans sa patience, sa compréhension et son importante implication. Merci beaucoup, Patricia.

Je souhaiterais maintenant remercier l'ensemble des mes amis et ma famille qui ont donné au mot « soutien » un vrai sens pour moi. Merci à vous pour m'avoir encouragé et relancé durant les périodes de « mou », sans vous, cette thèse aurait été bien différente... Les mots vont me manquer pour vous remercier chacune et chacun.

Merci, à Jean-François avec qui j'ai pu partager un petit bout de chemin de thésard. Plus que des collègues de travail, je souhaiterais remercier, ici, les amies colmariennes que j'ai connues grâce à cette thèse, je veux parler de Sophie et Claire qui ont beaucoup compté pour moi et à qui j'adresse toute ma reconnaissance.

Enfin merci à Aurélien, (même s'il est loin), Mathieu, Valentin, (SCG entre nous) et Marie pour toutes ces soirées et sorties, squash, poker (et « after »), Valentin encore pour l'aide constante et indéfectible, merci à vous pour votre humour, cela m'a aidé à passer certains caps essentiels.

Je tiens à remercier également Colette, Manon et Philippe pour tout leur soutien au cours de cette thèse.

Pour finir un grand merci à mes parents, Anne et Jean-Marie pour m'avoir soutenu et permis de réaliser mes études, mes frères Arnaud et Clément, mes grands-parents Nicole, Marie-Thérèse et Jean et toute ma famille pour m'avoir encouragé.

Un merci tout particulier et non des moindres à Leslie qui a vécu au quotidien, dans le pire et dans le meilleur, cette « aventure » pleine de rebondissements. Merci pour son aide, son soutien, sa patience et sa compréhension, ses encouragements, ... merci...

Je souhaiterais dédier cette thèse à mon grand-père Jean-Claude Wittersheim qui aurait, j'en suis sûr, souhaité pouvoir la lire...

Abréviations

ADN	Acide desoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
BET	Bromure d'Ethidium
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CoA	CoenzymeA
DMAPP	Diméthylallyl diphosphate
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DO	densité optique
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
FA	Facteurs Anaérobies
FPP	Farnésyl diphosphate
g	gramme
GC	Gas Chromatography
GGPP	GéranylGéranyl diphosphate
GPP	Géranyl diphosphate
h	heure
hL	hectolitre
HMG-CoA	3-hydroxyméthyl-glutarylcoA
IPP	isopentényl diphosphate
INDEL	INsertion DELetions
L	litre
LOD	logarithm (base 10) of odds
M	Molaire
MEP	2-C-methyl-D-erythritol phosphate
min	minutes
MS	Mass Spectrometry
MS300	Moût synthétique
MVA	Mevalonic Acid
OAV	Odor Activity Value
PEG	Polyethylene Glycol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMDS	Polydimethylsiloxane
psi	Pound-force per square inch (6.894×10 ³ Pascal)
QTG	Quantitativ Trait Gene
QTL	Quantitativ Trait Locus
RFLP	restriction fragment length polymorphism
rpm	Revolution per minute
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.mikatae</i>	<i>Saccharomyces mikatae</i>
<i>S.paradoxus</i>	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TAE	Tris-acétate-EDTA
V	Volt
YPG	Yeast, Peptones, Glucose

Table des matières

REMERCIEMENTS	IV
ABREVIATIONS	VI
TABLE DES MATIERES	VII
INTRODUCTION	1
1. HISTOIRES ET SCIENCES DES ALIMENTS ET DES BOISSONS FERMENTES	2
1.1. FERMENTATION ET ECOLOGIE	2
1.2. LES ALIMENTS FERMENTES ET L'ALIMENTATION HUMAINE	3
1.2.1. <i>Historique</i>	3
1.2.2. <i>Avantages des aliments fermentés</i>	6
1.2.3. <i>Les aliments fermentés</i>	6
1.2.4. <i>Histoire du pain et de la levure</i>	7
1.2.5. <i>Les boissons fermentées</i>	8
1.2.6. <i>Production d'alcool par la levure</i>	9
1.2.7. <i>Utilisation des levures pour la fermentation œnologique et brassicole</i>	10
1.3. LES AROMES DU VIN	11
1.3.1. <i>La perception des arômes</i>	11
1.3.2. <i>Les arômes variétaux</i>	13
1.3.3. <i>Les arômes fermentaires</i>	20
1.4. SOUCHES DE LEVURE <i>S. CEREVISIAE</i> ET GENOMES DISPONIBLES	24
OBJECTIFS DE THESE	27
MATERIELS ET METHODES	28
1. MILIEUX	28
1.1. MILIEUX DE BASE	28
1.2. MILIEUX FERMENTAIRES	28
1.2.1. <i>MS300</i>	28
1.2.2. <i>MS300 modifiés</i>	29
2. FERMENTATION	30
2.1. PRE-CULTURE	30
2.2. DISPOSITIF DE FERMENTATION	30
2.3. SUIVI DE FERMENTATION	31
3. LEVURES	32

3.1.	SOUCHES UTILISEES	32
3.2.	MICROMANIPULATION DES LEVURES	32
4.	BIOLOGIE MOLECULAIRE	32
4.1.	TRANSFORMATION DES LEVURES	32
4.2.	EXTRACTION DE L'ADN	33
4.3.	AMPLIFICATION DE L'ADN.....	34
4.4.	ANALYSE DE L'ADN.....	34
5.	ANALYSE DES COMPOSES VOLATILS	35
CHAPITRE I : ETUDE DE LA FONCTION DU GENE <i>EEB1</i>		39
1.	CONTEXTE	40
1.1.	DESCRIPTEUR AROMATIQUE DES ACIDES GRAS A MOYENNES CHAINES (AGMC) ET DES ESTERS D'AGMC	40
1.2.	LES ACIDES GRAS A MOYENNES CHAINES.....	41
1.3.	SYNTHESE DES ACIDES GRAS A MOYENNES CHAINES	41
1.4.	SYNTHESE DES ESTERS D'ACIDES GRAS A MOYENNES CHAINES	43
1.5.	LES ESTERS SYNTHASES DE LEVURE <i>S.CEREVISIAE</i>	44
2.	RESULTATS	49
2.1.	CINETIQUE DE FERMENTATION ET DE PRODUCTION DES AGMC ET DE LEURS ESTERS PAR UNE SOUCHE DE LABORATOIRE (S288c) ET UNE SOUCHE CENOLOGIQUE (59A), EN CONDITIONS CENOLOGIQUES.....	49
2.1.1.	<i>Cinétique de fermentation</i>	49
2.1.2.	<i>Cinétique de production des AGMC et des esters</i>	50
2.1.3.	<i>Recherche de la corrélation entre AGMC et esters éthyliques</i>	52
2.2.	EFFET DE LA DELETION DES ESTERS SYNTHASES <i>EEB1</i> , <i>EHT1</i> ET <i>YMR210W</i> SUR LA PRODUCTION D'AGMC ET D'ESTERS ETHYLIQUES.....	53
2.3.	ETUDE DE L'IMPACT DE LA DELETION DU GENE <i>EEB1</i> DANS UNE SOUCHE CENOLOGIQUE (V5) ET DANS UNE SOUCHE DE LABORATOIRE (BY) SUR MILIEU YPG	56
2.4.	IMPACT DE LA DELETION DU GENE <i>EEB1</i> EN CONDITIONS CENOLOGIQUES	60
2.5.	EFFET DE L'ALLELE CENOLOGIQUE VS LABORATOIRE DANS UN FOND GENETIQUE HOMOGENE.....	66
2.5.1.	<i>Polymorphisme du gène EEB1</i>	66
3.	CONCLUSION DU CHAPITRE I.....	69
CHAPITRE II : RECHERCHE DE QTL IMPLIQUES DANS LA SYNTHESE DE COMPOSES VOLATILS		71
1.	INTRODUCTION GENERALE	72
1.1.	SOUCHES DE LEVURES	72
1.2.	L'APPROCHE QTL (QUANTITATIVE TRAIT LOCI)	73

1.3.	CALCUL DE L'HERITABILITE.....	75
1.4.	COMPOSITION DES MILIEUX ET CONDITIONS DE FERMENTATIONS	75
1.4.1.	<i>Pré-culture.....</i>	75
1.4.2.	<i>Milieux de fermentation.....</i>	76
1.4.3.	<i>Suivi et arrêt des fermentations</i>	76
1.4.4.	<i>Mesures des composés volatils</i>	77
1.4.5.	<i>Vérification de la distribution des données</i>	77
1.4.6.	<i>Analyse en Composantes Principales (ACP).....</i>	79
2.	RESULTATS.....	80
2.1.	PRODUCTION DE VOLATILES PAR LES SOUCHES PARENTALES	80
2.2.	ANALYSES PRELIMINAIRES DES RESULTATS	82
2.2.1.	<i>Analyse descriptive du dispositif A</i>	82
2.2.2.	<i>Analyse descriptive du dispositif B</i>	87
2.2.3.	<i>Analyse descriptive du dispositif C</i>	91
2.2.4.	<i>Exemple de recherche de QTL validant la démarche expérimentale : recherche d'un gène lié à la floculation.....</i>	93
2.3.	RECHERCHE DE QTL IMPLIQUES DANS LA VARIATION DE PHENOTYPES D'INTERET GENOLOGIQUE	102
2.3.1.	<i>Recherche de QTL expliquant les variations de DO maximales sur milieu YPG</i>	102
2.3.2.	<i>Recherche de mQTL impliqués dans l'arôme des vins</i>	103
3.	CONCLUSION.....	114
CHAPITRE III : VALIDATIONS DES MQTL.....		117
1.	INTRODUCTION/CONTEXTE	118
2.	RESULTATS.....	119
2.1.	VALIDATIONS PAR HEMIZYOGTIE RECIPROQUE	119
2.1.1.	<i>Le mQTL du chromosome XII : Phénotype Nérolidol.....</i>	119
2.1.2.	<i>Le mQTL du chromosome XIV : Phénotype 2-phényléthanol.....</i>	141
2.2.	VALIDATIONS DE MQTL PAR DELETION	153
2.2.1.	<i>mQTL du chromosome VIII : phénotype acides gras.....</i>	153
2.2.2.	<i>mQTL du chromosome XII : phénotype Esters éthyliques.....</i>	164
3.	CONCLUSION.....	172
CHAPITRE IV : METABOLISME DU GERANIOL EN CONDITIONS FERMENTAIRES		175
1.	INTRODUCTION.....	176
2.	RESULTATS.....	180
2.1.	EXISTENCE DES TERPENYLACETATES DANS LES FERMENTATIONS.....	180

2.2.	GENES IMPLIQUES DANS LA SYNTHÈSE DE TERPENYL ACÉTATES.....	183
2.3.	RECHERCHE DU GÈNE CODANT POUR LA GERANIOL-REDUCTASE DE LEVURE	185
2.4.	EXISTENCE D'AUTRES TERPENES DANS LE MILIEU DE FERMENTATION	188
3.	CONCLUSIONS/PERSPECTIVES.....	191
	CONCLUSION GÉNÉRALE	194
	<i>Etude du gène EEB1 et détoxification de l'acide décanoïque</i>	<i>195</i>
	<i>Recherche de mQTL responsables de la production de composés volatils</i>	<i>196</i>
	<i>Validation des mQTL et des gènes candidats</i>	<i>196</i>
	ANNEXE.....	202
	LISTE DES TABLEAUX	CCVII
	LISTE DES FIGURES	CCIX
	BIBLIOGRAPHIE	213

Introduction

1. Histoires et Sciences des aliments et des boissons fermentés

1.1. Fermentation et écologie

Depuis les travaux de Louis Pasteur (1822-1895), on sait que la bière et le vin sont issus de la fermentation du moût par la levure. Selon le père de la microbiologie, "la fermentation c'est la vie sans l'air". Plus généralement on définit la fermentation comme : « *une transformation que subissent certaines matières organiques sous l'action d'enzymes sécrétées par des micro-organismes* ». (*La fermentation des sucres sous l'influence des levures donne de l'alcool*) (Larousse 2010). Le terme «fermentation» dérive du latin *fervere* qui signifie bouillir, en effet un liquide en cours de fermentation présente un important dégagement gazeux donnant l'aspect d'un liquide en ébullition.

La fermentation n'est pas le propre de la levure même si, nous le verrons plus loin, celle-ci joue un rôle central dans les aliments et boissons fermentés que nous consommons tous les jours.

En revanche, lorsque l'on parle de fermentation alcoolique, alors on est là dans un processus naturel quasi-exclusivement réalisé par la levure au sens large du terme. Cette transformation du sucre en alcool a lieu tout particulièrement sur et dans les fruits jouant un rôle non négligeable sur l'écosystème. A titre d'exemple, des espèces aussi variées que les éléphants, les souris, les mouches et les oiseaux se nourrissent de fruits fermentés.

Dans la nature, généralement lorsqu'un fruit est mûr, il tombe sur le sol et le sucre qu'il contient est alors fermenté en alcool par des levures de différents genres et espèces qui « contaminent » le fruit. De façon concomitante à la production d'alcool, ce processus biologique conduit à la libération et/ou à la production de molécules volatiles. Ce sont ces molécules que l'on perçoit comme odeurs puis comme saveurs. Pour éviter aux fruits de se faire contaminer trop tôt par les microorganismes fermenteurs, certaines plantes produisent des alcaloïdes et des terpenoïdes qui en plus de repousser les insectes nuisibles inhibent la croissance de ces hôtes. On trouve ces molécules odorantes dans des concentrations loin d'être négligeable dans les fruits. L'ensemble de ce bouquet olfactif de molécules permet à

certaines animaux de détecter que ces fruits sont mûrs et donc très concentrés en sucre.

De nombreux animaux et insectes se nourrissent ainsi des fruits fermentés. Cette consommation peut d'ailleurs provoquer les mêmes conséquences que celles observées chez l'homme. Ainsi certains oiseaux peuvent être intoxiqués par l'alcool contenu dans les fruits [1]. En revanche, en ce qui concerne l'éléphant, qui est également un animal consommateur de fruits, il semble impossible que ce dernier puisse manger assez de fruits fermentés pour en devenir saoul. Cependant, il est intéressant de noter que si l'éléphant est en situation de dépression et que ces fruits alcoolisés sont à sa disposition, il en consommera davantage et montrera des signes d'ébriété [2].

Des chercheurs avancent même le fait que certains comportements liés à la consommation d'alcool pourraient conduire à des adaptations évolutives dans le cas des frugivores. En effet, les animaux les plus sensibles aux composés volatils mais également ceux qui sont les plus tolérants à l'alcool auront une meilleure chance de découvrir les fruits et de les manger en premiers [3,4]. Parmi les frugivores, on trouve de nombreux primates dont la majorité ont des ancêtres avec *Homo sapiens*. Les cousins les plus proches de l'homme, les chimpanzés, par exemple, ont un régime constitué essentiellement de fruits. Un des plus anciens représentant des primates actuels, le Ptilocercus de Low, (*Ptilocercus lowii*) de Malaisie, semble être particulièrement tolérant à l'alcool. Il se nourrit quasi-exclusivement de Nectar de Palmier considéré comme étant la nourriture naturelle la plus riche en alcool (0,6%). L'animal est capable d'ingurgiter (pondération faite) une quantité d'alcool dépassant les seuils toxiques pour l'homme sans montrer de symptômes d'ébriété [5].

1.2. Les aliments fermentés et l'alimentation humaine

1.2.1. Historique

Dans la plupart des civilisations passées ou existantes, les boissons et les aliments fermentés occupent une place importante qu'elle soit culturelle, religieuse, économique ou médicinale.

On estime qu'un tiers de ce que mange l'humanité est fermenté. Pains, yaourts, chocolats, fromages, vins, vinaigres et bières font partie de cette liste non exhaustive

des aliments consommés au quotidien dans notre société occidentale. L'utilisation de la fermentation est un héritage. Les recherches archéologiques et les textes qui sont nous sont parvenus permettent de montrer que de nombreuses civilisations firent usage de ce procédé : les Chinois (chou, thé) [6], Egyptiens (pain, bière) [Code d'Hammurabi],[7], les Mésopotamiens (vins) [8,9] mais également les Aztèques (cacao) [10], et même certaines civilisations inconnues dont il ne resterait que des vestiges de cette pratique (Figure 1).



Figure 1 : Jarres du site 3 de la plaine des Jarres au Laos

Champs d'imposantes jarres de pierre antiques, s'étendant sur plus de 1 000 km², vestiges d'une civilisation disparue (source photographique Wikipedia)

On estime que l'histoire des aliments et boissons fermentés a débuté en au Moyen-Orient vers le VIII^e siècle avant J-C. En effet, les archéologues ont trouvé des preuves de production de vin en Iran et en Egypte en 6 000 et 3 000 avant J-C [8,9] et plus récemment, un site archéologique arménien a révélé l'existence d'une unité de production de vin datant de 6 000 avant J-C [11].

Pourtant, selon P.E. MacGovern, des preuves archéologiques chinoises suggéreraient que la fermentation aurait été utilisée dès -9 000 [12,13]. Ses investigations permettent de montrer que du jus sucré était vraisemblablement produit après mastication du riz. Ce jus était ensuite fermenté par les levures produisant ainsi une boisson alcoolisée. Cette stratégie est clairement bénéfique puisque selon ce chercheur « consommer des sucres et de l'alcool est une fabuleuse solution pour survivre dans un environnement hostile contenant peu de

ressources naturelles »¹. Ainsi, toujours d'après ce chercheur, la découverte et la domestication de la fermentation de céréales aurait participé à la « révolution du néolithique » (l'Homme passant du stade chasseur-cueilleur et nomade à celui d'agriculteur-sédentaire) qui commença il y a 11 000 ans [13].

Bien sûr, personne ne sait réellement quel était le but recherché à l'origine de l'invention de ces techniques lorsque ces produits étaient préparés. Erreurs ou mauvais stockages ont certainement contribué à la genèse de ces habitudes. Pourtant, à force d'expériences et d'essais, on peut constater que durant les siècles, cette (bio)technologie est passée d'un stade très archaïque et empirique à celui d'une science à part entière. Celle-ci a permis des avancées considérables qui ne se limitent pas qu'à l'alimentation (biotechnologie verte) puisqu'on trouve cette science dans bien des secteurs tel que le secteur médical (biotechnologie rouge), la pétrochimie (biotechnologie blanche) et le secteur environnemental (biotechnologie jaune).

L'essor de la production d'aliments et de boissons fermentés a commencé au début du Moyen-Age. En effet à cette époque de petites communautés, généralement des monastères, ont mis en place des structures produisant, certes en faible quantité, des aliments et boissons fermentés comme le fromage ou la bière. Vers la fin du XVIIIe siècle, la révolution industrielle a conduit au développement de plus grosses unités productrices de ces aliments et boissons. Les avancées de la science, notamment grâce aux travaux de Pasteur et de son disciple Jacobsen, sur la bière et le vin, mais aussi le développement d'outils comme la réfrigération artificielle et la machine à vapeur ont permis d'énormes progrès dans l'industrie de la fermentation et tout particulièrement dans l'industrie brassicole. Les connaissances acquises sur les levures par exemple ont permis l'utilisation de souches particulières et sélectionnées dans les brasseries. Cette industrie a d'ailleurs à son tour beaucoup apporté à l'industrie des biotechnologies et notamment dans le domaine pharmaceutique qui utilise des « fermenteurs » pour réaliser la production de certains médicaments. Au sens strict du terme la fermentation est anaérobie. Pourtant, le

¹ *“Consuming high energy sugar and alcohol was a fabulous solution for surviving in a hostile environment with few natural resources”* [13]

terme « fermentation » a été plus largement utilisé jusqu'à qualifier des processus enzymatique réalisés en industrie.

1.2.2. Avantages des aliments fermentés

Les aliments et les boissons fermentés cumulent de nombreux avantages. La fermentation permet aux aliments d'être tantôt plus nutritifs, tantôt plus digestes. Elle peut favoriser leur conservation et ainsi les rendre plus sûrs pour la santé.

La fermentation couplée à la dessiccation et au salage devait surtout permettre une meilleure conservation des aliments. La baisse du pH dans le cas du yaourt et la teneur en alcool dans la majorité des boissons fermentées sont certainement les meilleurs exemples d'utilisation de la fermentation comme moyen de conservation. Cet effet est double : d'un côté les micro-organismes consomment les matières premières nécessaires au développement des éventuels contaminants et de l'autre, la production d'acides ou alcools qui s'en suit est toxique pour les contaminants survivants. Pourtant il serait faux de penser que les aliments perdent leur valeur nutritive ; en réalité la fermentation permet de l'augmenter. La fermentation peut en effet conduire à l'accumulation ou la libération de vitamines ou d'antioxydants (cas du vin, de la bière et du thé) [14].

1.2.3. Les aliments fermentés

Les aliments issus de la fermentation sont généralement produits par des bactéries. La fabrication du yaourt par exemple utilise des bactéries des genres *Lactobacillus* et *Streptococcus* alors que celle du fromage utilise des *Lactococcus lactis* et *Lactococcus cremoris* (Comté, Gruyère) ou des *Penicillium* (fromage type Roquefort ou Camembert). En revanche, la plupart des boissons fermentées sont produites par fermentation levurienne. Il est cependant important de noter que lors de la fabrication du vin, on réalise le plus souvent une seconde fermentation dite malolactique qui est effectuée par une bactérie de type *Oenococcus oeni*.

Malgré tout, l'aliment essentiel de notre alimentation, le pain, est lui produit grâce à l'utilisation de levure dite de boulangerie. En Europe et en France tout particulièrement, le pain était et reste au cœur de l'alimentation avec une consommation très forte de 50,3kg/personne/an pour les français (TNS-Sofres 2006).

1.2.4. Histoire du pain et de la levure

Les premières traces de pain retrouvées proviennent d'Égypte (4000 av. J.-C), on attribue de ce fait cette invention aux égyptiens. Le pain occupait une place centrale dans les civilisations mésopotamiennes. On en retrouve la mention dans un code de loi : Le Code d'Hammurabi (texte de loi sumérien 1750 av. J.-C, Musée du Louvre)¹. Le pain est présent dans de nombreuses cultures et religions. Il intervient dans le rituel lié à la mort dans la civilisation égyptienne. Chez les Romains, le pain est offert aux défunts. Le pain est également une offrande dans les religions juives et chrétiennes, Jésus se définit comme le pain de vie (Jean 6 :35) et Bethléem signifie maison du pain en hébreux.

Jusqu'à la fin du XVII^e siècle, l'ensemencement de la pâte à pain s'est fait à partir de levain qui est un reste de pâte non cuite, dans laquelle on a laissé se développer les microorganismes naturellement présents dans la farine. Dans ce levain se trouvent différents genres et espèces de levures ainsi que des bactéries acidifiantes [15]. L'éthymologie du nom « levure » provient d'ailleurs du terme levain.

Ce n'est qu'en 1840, à l'instigation d'un autrichien, que la levure de bière a été utilisée pour faire du pain. Cela a permis d'en améliorer le goût ainsi que la rapidité de la levée ; le pain viennois était né. Mais c'est avec l'apparition du procédé Mautner en 1867 que l'industrie de la levure s'est développée. Ce procédé empirique consistait à préparer un moût de grains, de telle sorte que le dégagement gazeux entraînait la levure à la surface où elle était recueillie.

Par la suite en 1872, le baron Max de Springer, venu de Vienne créa à Maisons-Alfort près de Paris la première fabrique française de levure de grains, selon la méthode viennoise : ce furent les débuts de la société Fould-Springer.

La Société « Lesaffre et Bonduelle », ancêtre du groupe Lesaffre, imita son confrère et commença également en 1872 à vendre, comme levure de boulangerie, la levure extraite des moûts de fermentation de grains, produits dans sa distillerie de Marcq-en-Baroeul, près de Lille. Quatre ans plus tard, Louis Pasteur révéla que l'insufflation d'air favorisait la croissance de la levure. Cette aération fut adoptée par les levuriers. Cette technique permit une augmentation des rendements et une baisse de la

¹ ce texte est par ailleurs le plus ancien texte de loi que l'on connaisse.

concentration d'alcool. Enfin, entre 1915 et 1920 en Allemagne et au Danemark un procédé d'alimentation continue (dit fed batch) fut mis au point¹. A l'heure actuelle la production de levure industrielle de boulangerie utilise toujours ce procédé. La levure de boulangerie est considérée comme un des plus anciens produits issus de la fermentation industrielle. La France, patrie du pain, produit plus de 2,5 millions de tonnes de levure par an [15].

1.2.5. Les boissons fermentées

Au même titre que le pain, on peut affirmer que les boissons fermentées tiennent une place très importante dans l'alimentation de l'humanité passée et présente. D'une façon générale leur procédé de fabrication est assez similaire quel que soit le pays d'origine. On conçoit un jus à partir de matière première (céréales, fruits, sèves, lait) que l'on recouvre pour le protéger de l'oxydation et permettre à la nature de réaliser la transformation du sucre en alcool. Une distillation du produit ainsi formé crée une autre boisson enrichie en molécules aromatiques et dont la teneur en eau est plus réduite. L'homme a ainsi pu créer à partir de cette recette simple, une diversité de boissons alcoolisées et distillées très importante qui est répertoriée de façon non-exhaustive dans le Tableau 1.

Tableau 1 : principales boissons fermentées et distillats produits dans le monde (adapté de Bamforth 2005)

Matière premières	Produit de fermentation	Distillat
Raisin	Vin	Armagnac, Cognac
Orge	Bière	Whisky
Blé	Bière (blanche)	Whisky
Sorgho	Bière	Maotai
Riz	Saké	shōchū, soju, baijiu, mei kwei lu
Maïs	Chicha	Bourbon
Seigle	Bière de Seigle	Whisky de Seigle
Pomme de terre		Vodka
Pomme	Cidre, pommeau	
Poires	Poiré	Eau de vie
Cerise	Kriek	Kirsch
Prunes		Damassine
Figues		Boukha
Sève d'Agave	Pulque	Tequila
Palmier	Vin de Palme (ou Toddy)	
Miel		Hydromel
Cannes à sucre/Melasse		Rhum

¹ L'addition de sucre est synchronisée avec la croissance de la levure

Dans la majorité des exemples donnée ci-dessus, c'est la levure du genre *Saccharomyces* et le plus souvent de l'espèce *cerevisiae*, dite levure de bière, qui réalise la fermentation alcoolique. La plupart des boissons citées ici sont produites grâce aux levures indigènes présentes dans le jus sans qu'aucun ajout ne soit nécessaire¹. Une communauté de différentes espèces ou souches de levure réalise donc la fermentation. On notera que certaines de ces boissons comme le cidre par exemple sont produites par différentes levures en co-inoculation (*Hansenula polymorpha* et *Saccharomyces cerevisiae*).

1.2.6. Production d'alcool par la levure

On peut se demander pourquoi la levure (et principalement *S.cerevisiae*) est utilisée ou est naturellement présente lors de la fermentation alcoolique des boissons citées plus haut. De façon imagé, il faut considérer le milieu de fermentation comme un territoire sur lequel vont se retrouver différentes espèces de micro-organismes en compétition. L'espèce la mieux « équipée » pour survivre ou la mieux « armée » pour éliminer ses opposants, colonisera le milieu et pourra assurer sa descendance. A ce titre, la levure *S.cerevisiae* possède un équipement enzymatique lui permettant d'assurer sa suprématie en condition fermentaire. Il semblerait que lors de la prolifération et l'expansion des arbres fruitiers sur le globe, cette espèce aurait dupliqué puis réarrangé son génome lui permettant alors de maintenir une activité métabolique intense en anaérobiose [16-20]. C'est en fait sa capacité à produire de l'éthanol et à le tolérer au-delà de 5% (concentration admise comme étant toxique pour la plupart des autres levures et bactéries) qui lui aurait permis de survivre et d'éliminer ses compétiteurs. Le prix à payer pour cette extraordinaire capacité à produire autant d'éthanol (jusqu'à 16%) est un rendement de production d'énergie très bas puisqu'il est de 2 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) produites par molécule de glucose consommée en fermentation contre 36 en présence d'oxygène [13].

¹ De nos jours la bière, le saké et l'hydromel sont quasi exclusivement produits grâce à l'utilisation de levures sélectionnées (et l'on a alors généralement une seule souche de levure présente).

1.2.7. Utilisation des levures pour la fermentation œnologique et brassicole

A l'inverse de la bière ou du saké, le moût de raisin ne subit aucune étape de chauffage (brassage du malt d'orge). Les levures naturellement présentes sur le raisin se retrouvent donc dans le moût après que le raisin ait été pressé. Ces levures réalisent la fermentation alcoolique. Dans ce cas, la fermentation, dite spontanée peut être lente voir même ne pas arriver à son terme (il reste trop de sucre). C'est ce facteur aléatoire, que l'on suppose être dû à la biomasse initiale présente dans le moût de raisin, qui peut conduire les viticulteurs à ensemercer le moût avec des souches industrielles sélectionnées (on parle alors de « levurage »). En France, l'INRA a sélectionné de nombreuses souches de levures, tout particulièrement l'INRA de Colmar avec la levure Eg8 (provenant d'Eguisheim et isolée par Mr Schaeffer à Colmar) qui fait partie des levures les plus vendues dans le monde (source INRA de Colmar). Rappelons que ces levures sont naturelles, donc non OGM, le levurier ne faisant que propager la souche à la manière des levures de pain, la sécher ou la lyophiliser puis la vendre aux viticulteurs.

Si l'on compare les pratiques de fermentations viticoles et brassicoles, un point important doit être ici amené. En effet, le brasseur réalise lui-même la propagation de sa propre souche de levure en fed-batch à la manière de la production de levure boulangère, puis ilensemence le brassin avec une biomasse relativement importante (de l'ordre du g/L). Une fois la fermentation réalisée, les levures de ce brassin sont récupérées et réutilisées pour ensemercer un nouveau brassin. Cette pratique est appelée le « repitching » et se réalise en moyenne 5 fois. La bière contient entre 5 et 10% d'alcool et, à cette concentration, les levures sont encore vivantes (95-99% de viabilité). Le brasseur peut alors prélever pour son brassin suivant la quantité de levure nécessaire.

En viticulture, il est presque impossible de mettre en place cette pratique. En effet, si la fermentation d'un brassin conduit à obtenir une bière entre 5 et 10% d'alcool maximum, le vin quant à lui, lorsqu'il est ensemençé, l'est avec un taux de l'ordre du

g/hL¹, et il atteint un taux d'alcool proche de 12 à 14% (15-16% pour les vendanges tardives). Ce taux d'alcool est donc significativement différent entre les fermentations brassicoles et viticoles. De plus un moût de raisin est plus pauvre en éléments nutritifs qu'un moût d'orge ou de blé. Ces deux éléments font que la viabilité d'une levure n'est que de 1 à 5% pour la fermentation œnologique, ce qui ne permet pas un « repitching ». La notion de pied de cuve dans le cas de fermentations viticoles ne consiste pas à réutiliser les levures de la cuve précédente.

La souche de levure utilisée peut permettre de produire ou libérer plus ou moins d'arômes et orienter la qualité organoleptique du vin [21-27]. Elle fait partie des variables qu'un viticulteur peut contrôler s'il souhaite ensemencher lui-même.

Les grands levuriers tels que LESAFFRE© et LALLEMAND© par exemple vendent des levures sélectionnées aux viticulteurs, leur permettant ainsi un meilleur contrôle de leur fermentation. Le choix de la levure peut être guidé par une production de molécules volatiles particulières ou une « affinité » pour le cépage que le levurier va mettre en avant. Ainsi l'on peut citer les souches de levures ZYMAFLORE© de chez LESAFFRE© ou bien la souche LALVIN© EC1118 de chez LALLEMAND© par exemple. Ces souches peuvent être achetées en sachet directement sur internet.

1.3. Les arômes du vin

1.3.1. La perception des arômes

A ce jour on dénombre près de 900 composés volatils dans le vin, mais on estime que seuls 10 % sont perceptibles par l'homme. En effet, une molécule volatile n'est pas nécessairement une molécule perceptible olfactivement parlant. A cette notion s'ajoute celle du seuil de perception. En effet, chaque composé odorant est caractérisé dans un milieu donné par un seuil de perception olfactive. On définit ce seuil comme la teneur à partir de laquelle 50 % d'un jury distingue un milieu témoin du même milieu enrichi avec ce composé. A partir de ce seuil il est possible de calculer l'activité olfactive d'un composé dont on connaît la concentration dans une

¹ Les levures œnologiques sont sous forme lyophilisées, à l'inverse des levures de brasseries qui sont utilisées en solution concentré, il y a donc plus de levure par g de lyophilisat que par g de culture de levure brassicole obtenue en fed-batch

matrice : c'est l'OAV (Odor Activity Value). Cette seuil se définit comme le ratio entre la concentration du composé présent dans la matrice et son seuil de perception. Mais il est réducteur de considérer que plus un composé a un OAV élevé et plus sa perception sera forte. En effet il faut tenir compte de la Loi de Stevens [28].

Cette loi relie une grandeur physique d'un composé (ici la concentration) et l'intensité de sa perception.

$$\text{Intensité perçue} = k * (C)^n$$

où k est une constante ; C la concentration du composé ; n : exposant de Stevens dépendant du composé

Ajoutons à cet effet complexe le fait que certaines molécules peuvent avoir des descripteurs aromatiques différents en fonction de leur concentration. Le linalol par exemple, lorsqu'il est solution hydro-alcoolique en concentration située entre son 10µg/L et 100µg/L, est perçu comme ayant une odeur florale douce, au-delà de 100µg/L, sa perception se change en odeur florale plus intense, au-delà de 10 000µg/L son descripteur aromatique devient la muscade [29]. De même certains composés peuvent se trouver en concentration inférieure à leur seuil de perception mais influencer la perception d'autres molécules ; c'est le cas par exemple de l'alcool isoamylique qui joue un rôle d'exhausteur [29] (cet alcool sera appelé isoamylalcool dans la suite de cette thèse).

On peut distinguer les arômes du vin en 3 catégories :

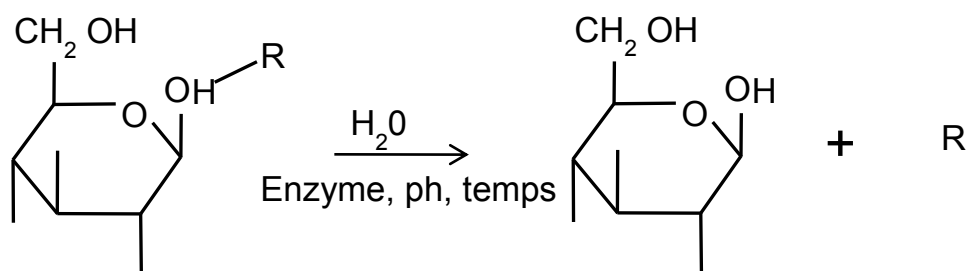
- ceux provenant de la vigne (arômes variétaux), que l'on peut aussi qualifier d'arômes pré-fermentaires
- ceux provenant de la levure (arômes fermentaires)
- ceux provenant du vieillissement du vin

Seuls les arômes variétaux et fermentaires seront traités dans la suite de cette thèse. Néanmoins un accent particulier sur la chimie de terpènes sera exposé aussi bien dans ce chapitre que dans le Chapitre IV (page 188), permettant de relier les arômes variétaux et fermentaires à ceux issus du vieillissement.

1.3.2. Les arômes variétaux

Notion de potentiel aromatique

La majorité des molécules olfactives issues de la vigne est présente sous deux formes dans le moût et le vin. La forme libre, qui est odorante, et la forme complexée (généralement glycosylée) qui n'est pas olfactive. Ces molécules complexées font partie de ce que l'on appelle les précurseurs aromatiques. Dans le vin, des équilibres fins régissent les concentrations des molécules liées/libres, celles-ci peuvent être hydrolysées lors de la fermentation alcoolique [30] et malolactique [31] et/ou lors du vieillissement du vin. L'hydrolyse conduit alors à l'élimination du glycoside et à la libération de la molécule.



β -D-glucopyranose
(ou polymère de sucre)

Les composés en C6

Les composés à six atomes de carbone (C6) forment le groupe majeur de molécules volatiles produites durant les étapes pré-fermentaires de la production du vin. Ces molécules sont produites suite à l'oxydation des lipides et de l'activité enzymatique du raisin. Les principaux composés en C6 sont l'hexanal, l'hexanol, le *cis*-3-hexenol, le *trans*-2-hexenol, et les isomères *cis*- et *trans*- du 2- et 3-hexenal. On trouve également ces composés sous forme glycosylée [32]. Les aldéhydes cités ont des seuils de perception très bas, mais sont généralement réduits en alcool durant la fermentation alcoolique. C'est pourquoi on trouve principalement l'hexanol et les *cis*- et *trans*-hexénol dans le vin. Ces composés ont des odeurs d'herbes fraîches. Leur seuil de perception serait de l'ordre de 1mg/L [33] à 8 mg/L [34]. Les concentrations de ces composés varient suivant les publications et les auteurs et atteignent souvent le seuil de perception dans les vins (Tableau 2). Pourtant, il est généralement admis

que ces composés n'apportent pas de notes positives au vin, en trop forte concentration ils peuvent même être considérés comme un défaut. On notera que l'isomérisation joue un rôle très important en effet l'odeur caractérisant le *cis*-hexanol est plus appréciée que celle du *trans*-hexanol [35].

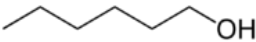
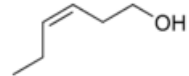

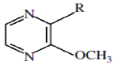
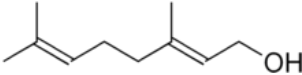
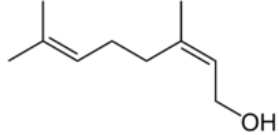
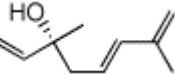
Les pyrazines

Les pyrazines sont des composés hétérocycliques simples. Le cycle est formé de quatre atomes de carbone et deux atomes d'azote. Ces composés sont parmi les plus odorants trouvés dans le vin. En effet, ils ont un seuil de perception très bas (1ng/L) [36] et des concentrations avoisinant les 50ng/L caractéristiques des notes de poivron du Cabernet Sauvignon [37]. Le seuil de perception de cet arôme est tellement bas qu'à trop forte concentration il peut être un défaut pour le vin.

Les thiols volatils

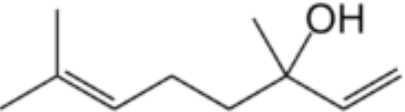
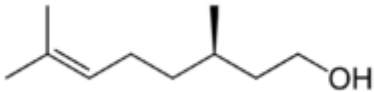

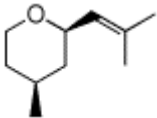
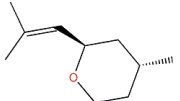
Les trois principaux thiols volatils sont le 3-mercaptohexan-1-ol (3MH), l'acétate de 3-mercaptohexyle (A3MH) et le 4-méthyl-4-mercaptopentan-2-one (4MMP). Ils sont typiques du Sauvignon blanc [38,39]. Ces molécules ont un seuil de perception très bas et des perceptions olfactives très positives dans le vin. En effet, on décrit le 3MH et le A3MH comme ayant respectivement des odeurs de « fruit de la passion » et de « zeste de pamplemousse » [40,41], tandis que le 4MMP a des arômes rappelant le buis [39]. Leurs seuils de perception sont de 50-60ng/L pour le 3MH [41], 9ng/L pour le A3MH [40] et 0,8ng/L [39] pour le 4MMP. Le 3MH et le 4MMP sont à l'origine fixés sur la cystéine dans le moût de raisin, c'est pourquoi l'on parle de précurseurs de thiols volatils [41,46]. La levure réalise la libération de ces composés au cours de la fermentation et acétyle le 3MH [47]. Leur classification est donc ambiguë car ils peuvent être également considérés comme des arômes fermentaires. La concentration des thiols volatils dans le vin dépend de la qualité du raisin, de la souche de levure réalisant la fermentation et des conditions de macération. Le 3MH est particulièrement sensible à l'oxydation. Ces composés n'ont pas été étudiés dans le cadre de cette thèse.

Tableau 2 : Exemples de molécules volatiles variétales identifiées dans le vin

Molécules	Formule chimique	Descripteur aromatique	Origines	Seuil de perception	Concentrations classiques dans un vin	Influences
Hexanol		Herbes coupées/ herbes fraiche	Variétal, lipide	1000µg/L [33] 8000 ^c µg/L [34]	Cépages espagnols: 0-900µg/L [42,43] Sémillon : 2100µg/L [44] Sauvignon blanc : 1100 à 1700 ^g µg/L 1580 ^c µg/L [34]	Clarification, traitement enzymatique
Cis-hexenol				400 ^c µg/L[34]	74 ^c µg/L [34]	
Trans-hexenol				?	?	
Méthoxypyrazine	 R: CH ₂ CH(CH ₃) ₂ 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine R: CH(CH ₃) ₂ 2-Methoxy-3-isopropylpyrazine R: CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃ 2-Methoxy-3-sec-butylpyrazine	poivrons	Variétal, métabolisme de la leucine	1-400ng/L suivant les formes [37]	0.5 to 50 ng/L [37]	Lumière, température
Géraniol		Rose, Lychee		130µg/L[37]	506 ^a ,327 ^b ,218 ^c , 58 ^d ,35 ^e ,16 ^f ,5 ^g ng/L	
Nérol		Rose	Voie du MEP, molécule de défense et/ou chimio attractant pour insectes	400 µg/L[37]	94 ^a ,135 ^b ,43 ^c ,97 ^d , 23 ^e ,4 ^f ,5 ^g ng/L	Température Stress ? Vigueur de la vigne ?
Hotriénol		Tilleuls	pollinisateurs [45]	18 µg/L[37]	ND ^a , ND ^b ,ND ^c ,127 ^e , 25 ^f ,ND ^g ,ND ^g	

a Muscat d'Alexandrie, b Muscat de Frontignan, c Gewurztraminer, d Albarino, e Riesling, f Muscadelle, g Sauvignon blanc [34]

(suite tableau 2)

Molécules	Formule chimique	Descripteur aromatique	Origines	Seuil de perception	Concentrations classiques dans un vin	Influences
Linalol		Rose	Variétale	50 µg/L [37]	455 ^a , 473 ^b , 6 ^c , 80 ^d , 40 ^e , 50 ^f , 17 ^g	
Citronellol		Citronelle	Action de la levure sur le géraniol	18 µg/L [37]	18 ^a , ND ^b , ND ^c , 12 ^d , ND ^e , 4 ^f , 3 ^g ,	Souche de levure ?
α-terpinéol		Muguet	Transformation chimique du géraniol	400 µg/L [37]	78 ^a , 87 ^b , 3 ^c , 37 ^d , 25 ^e , 12 ^f , 9 ^g	
Cis rose-oxyde		Rose	Variétal/ Souche de levure	21 [34]		Souche de levure ?
Trans rose-oxyde		Rose	Souche de levure	?		Souche de levure ?

a Muscat d'Alexandrie, b Muscat de Frontignan, c Gewurztraminer, d Albarino, e Riesling, f Muscadelle, g Sauvignon blanc

Les terpènes

Les terpènes constituent une grande famille de molécules (plus de 4 000 recensées). Ces lipides sont des polymères d'unités isoprènes à cinq atomes de carbones (une unité est notée C5). Chaque terpène est classé selon le nombre d'unités qui le compose, hémi-(C5), mono-(C10), sesqui-(C15), di-(C20), disesqui- (C25) et tri-(C30) terpènes.

Dans le vin, une trentaine de composés terpéniques a été recensée, contre une quarantaine pour le raisin [48]. Parmi ces terpènes, les plus olfactifs sont les alcools monoterpéniques ou appelés ici monoterpénols. Ainsi le linalol, le géraniol, l'hotriénol, le nérol et l' α -terpinéol mais également le cis/trans rose-oxyde (qui est une forme oxydée des monoterpénols [49,50]) sont trouvés en concentration relativement importantes dans les vins alsaciens. C'est cette particularité qui rendent ces vins si caractéristiques en leur confèrent des notes florales typiques (Tableau 2). La biosynthèse des terpènes dans le raisin et dans les plantes d'une façon générale, fait intervenir l'isopentényl pyrophosphate (IPP) qui est produit dans le cytosol et dans le chloroplaste. Cet intermédiaire joue un rôle central dans la production de nombreuses molécules chez les plantes. Il est admis que chez les plantes supérieures, la synthèse de l'IPP permettant la production de sesquiterpènes, stéroïdes et d'ubiquinone a lieu dans le cytosol par la voie dite du mévalonate (MVA) [51], tandis que l'IPP synthétisé dans le chloroplaste est produit à partir de la voie du 2-C-méthyl-D-erythritol-4 phosphate (MEP) et permet la production de monoterpènes, diterpènes, caroténoïdes et chlorophylle [52]. Le précurseur IPP(C5) commun peut d'ailleurs passer du chloroplaste au cytosol [53].

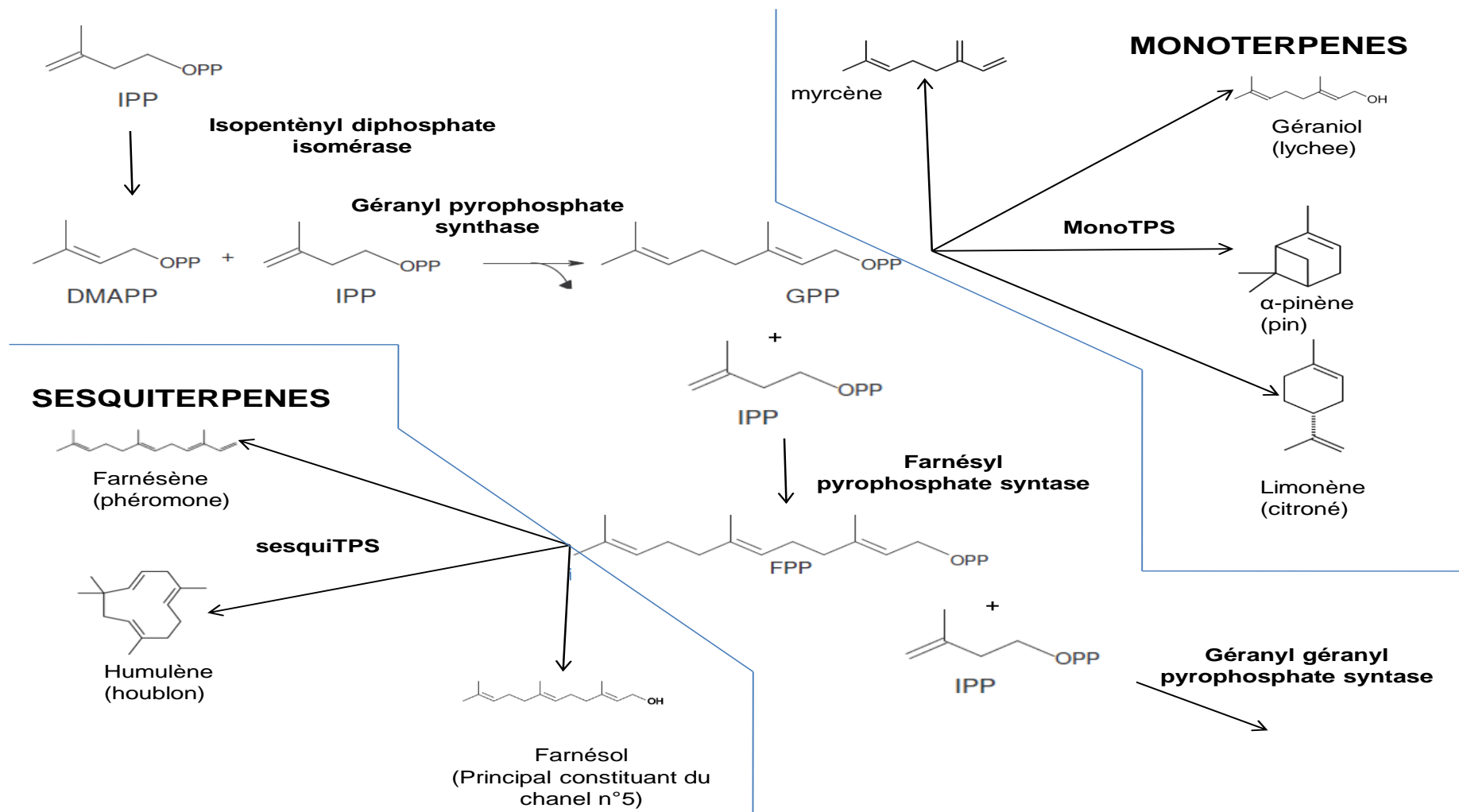


Figure 2 : Voie de synthèse simplifiée des mono- et sesqui- terpènes ; MonoTPS = monoterpène synthase ; SesquiTPS = sesquiterpènes synthase que représentent les frontières bleues. (pour plus de clarté le cytoplasme et le chloroplaste ne sont pas représentés)

L'isopentényl diphosphate isomérase produit à partir de l'IPP, un isomère, le diméthylallyl pyrophosphate DMAPP [54]. Les prényl transférases permettent, par la suite, la condensation d'une molécule d'IPP sur le DMAPP pour former le géranyl pyrophosphate (GPP) (C10) précurseurs des monoterpénols cités plus haut, ou d'une molécule d'IPP sur le GPP pour former le farnésyl pyrophosphate (FPP) (C15) précurseur des sesquiterpénols, (Figure 2). On trouve également d'autres terpènes que ceux précédemment cités dans les vins. Les plus olfactifs d'entre eux sont à nouveau les monoterpènes (C10) par exemple le limonène, l' α pinène ou le myrcène. A l'heure actuelle on ne sait si ces terpènes sont produits dans la vigne par des terpène-synthases ou s'ils sont issus d'une conversion chimique de l'un ou l'autre des terpénols présents au cours de la fermentation ou du vieillissement.

Les norisoprénoïdes

Les norisoprénoïdes sont des composés volatils issus du métabolisme de la vigne. Les voies de synthèse empruntées sont probablement celles des caroténoïdes. Parmi les nombreux norisoprénoïdes trouvés dans le vin on peut citer la β -damascénone à l'odeur de fruit de la passion, le 1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphtalène (TDN) responsable de l'odeur de kérosène des vieux Riesling et les isomères du 2,6,6-triméthyl-10-méthylidène-1-oxaspiro(4,5)dec-8-ène (vitispirane) dont les descripteurs aromatiques sont l'eucalyptus et le camphre.

Les phénols volatils

Ces composés ont deux origines : i) la décarboxylation oxydative par la levure des aides phénols *p*-coumarique et férulique conduisant à la formation de 4-vinylphénol et de 4-vinylgalaïacol, ii) l'hydrolyse des formes glycosylées de phénols volatils composés de noyaux phénol, guaiacol et syringol.

Leur descripteur aromatique n'est pas très clair, mais ils sont considérés comme apportant des notes positives au vin [55].

Les deux familles de composés ci-dessus ne sont pas présentées en détail car elles ne sont pas étudiées dans cette thèse.

1.3.3. Les arômes fermentaires

Les alcools supérieurs

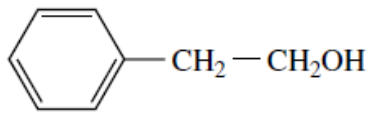
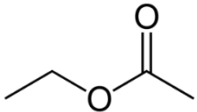
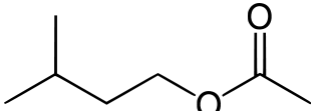
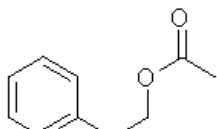
Les alcools supérieurs sont produits par la levure durant la fermentation alcoolique, et sont liés au métabolisme azoté. Leur synthèse dépend de deux voies. La première est la voie d'Ehrlich, qui correspond au catabolisme des acides aminés permettant ainsi le recyclage des fonctions amines de ces derniers [56]. La deuxième est la voie anabolique des acides aminés à partir des sucres [57]. Ces deux voies sont très finement régulées et conduisent à la production d'alcools supérieurs (Figure 3). À part le 2-phényléthanol dont le descripteur aromatique est la rose, les autres alcools supérieurs ne sont pas favorables à la qualité du vin (Tableau 3). Néanmoins ces molécules participeraient à l'arôme du vin en tant qu'exhausteurs de goût [29]. Suivant la souche de levure utilisée, la concentration en alcools supérieurs, et tout particulièrement en 2-phényléthanol, peut varier [21-27].

Esters et acides gras

On distingue généralement deux types d'esters dans le vin, les esters d'acétate et les esters d'acides gras (ou esters éthyliques). Les premiers sont issus de l'estérification d'un acétyl-CoA (jouant le rôle de l'acide) et d'un alcool supérieur (tels que ceux cités plus haut) (Figure 3). Les deuxièmes sont la conséquence de l'estérification par la levure des acyl-CoA présentant un nombre pairs d'atome de carbone (généralement C6 à C12). Comme nous le verrons plus loin, il pourrait s'agir d'un moyen de détoxification mis en place par la levure afin de réduire la toxicité des acides gras à moyennes chaînes synthétisés au cours de la fermentation (Figure 3). La synthèse des esters d'acétate et des esters éthyliques permettrait le recyclage du coenzyme-A [58,59]. La production de ces esters est influencée par divers facteurs : on citera bien sûr l'influence de la souche de levure [24,60-62], mais également celle de la température [21] et celle de la concentration en azote [25,63], en sucre [63] et en oxygène [64] bien que d'une façon générale, la plupart des auteurs s'accordent à dire que la production des esters est avant tout dépendante de la concentration en précurseurs [27,44,58,59,63,65-68]. Les esters sont particulièrement intéressants d'un point de vue organoleptique car ils apportent des arômes fruités aux vins [44,61,62]. Les esters d'acétate les plus fréquemment rencontrés dans le vin sont

l'acétate d'éthyl (appelé éthylacétate), l'acétate d'isoamyl (appelé isoamylacétate) et le 2-phényléthylacétate qui apportent aux vins respectivement des arômes de bonbon anglais, de banane et de miel. (Tableau 3). Enfin les esters éthyliques confèrent des arômes plus fruités, comme la pomme ou l'ananas. L'ensemble de ces esters sont déterminant pour l'arôme du vin et peuvent devenir des marqueurs de qualité. L'éthyl octanoate (estérification de l'acide octanoïque par de l'éthanol) par exemple serait une molécule clé de l'arôme du Gewurztraminer [34]. Le chapitre suivant expose en détail du métabolisme des esters éthyliques ainsi que de leur influence sur le vin.

Tableau 3 : Exemples de molécules volatiles fermentaires identifiées dans le vin

Molécules	Formule chimique	Descripteur aromatique	Origine	Famille chimique	Seuil de perception (mg/L)	Concentration classiques dans un vin (mg/L)
3-méthyl butanol (Isoamylalcool)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	Solvant	Leucine	Alcools supérieurs	40 [34]	80-300 [44]
2-méthyl butanol (isoamylalcool)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	Solvant	Isoleucine	Alcools supérieurs	30 [34]	30-100 [44]
2-phénylethanol		Rose	Phénylalanine	Alcools supérieurs	10 [34]	10-100 [44]
Ethyl acétate		Bonbon anglais, vernis à ongle	Ethanol et acétyl-CoA	Esters d'acétate	7,5 [69]	22.5-63.5 [69]
Isoamylacétate		Banane	Isoamylalcool et acétyl-CoA	Esters d'acétate	0.03 [69]	0.1-3.4 [69]
Phénylethyl acétate		Miel/rose	2-Phénylethanol et acétyl-CoA	Esters d'acétate	0.25 [69]	0-18.5 [69]

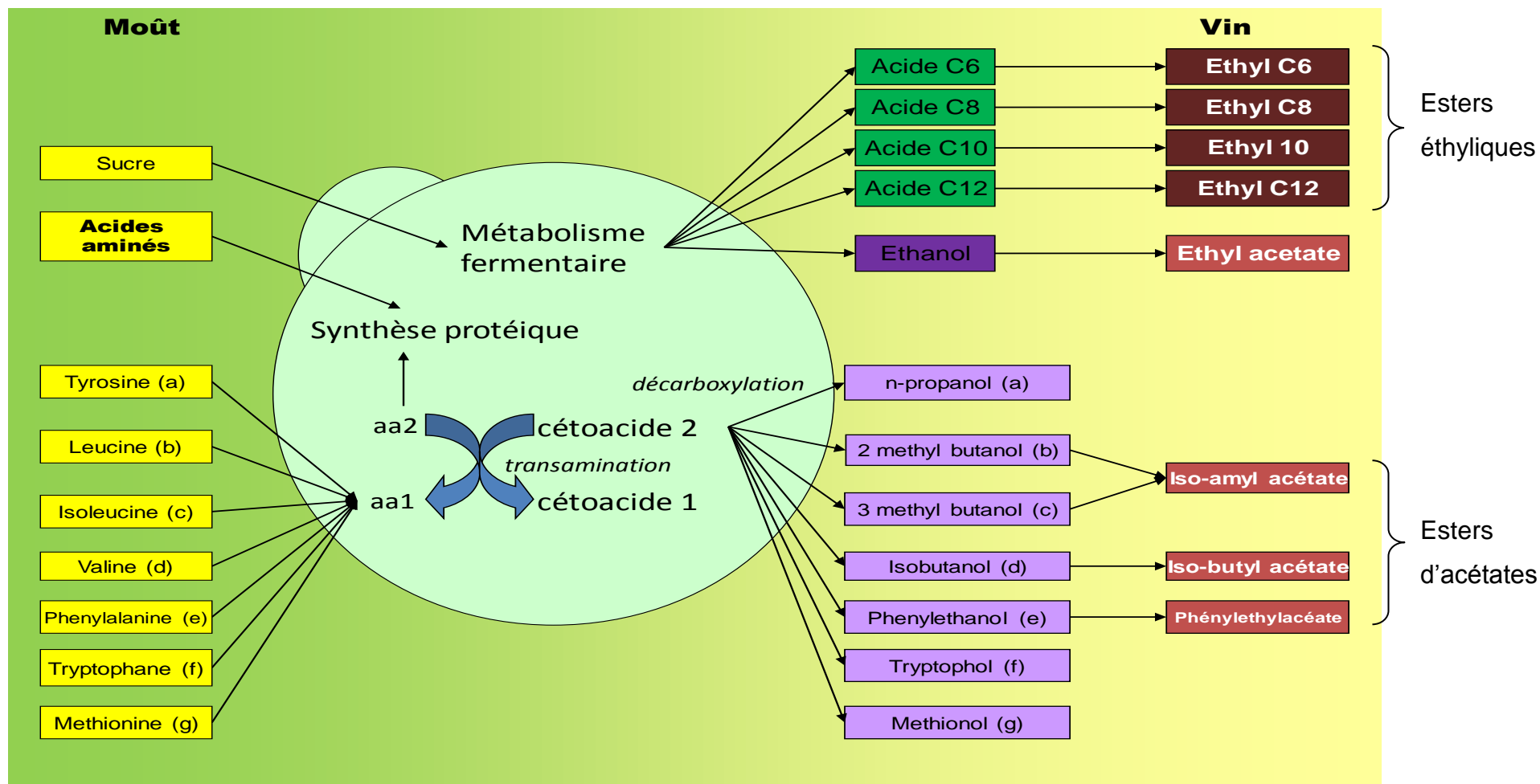


Figure 3 : Schéma de la production de quelques arômes fermentaires dans le vin

Voie de dégradation des quelques acides aminés (en jaune) empruntant la voie de Ehrlich et conduisant à la production d'alcools supérieurs (en violet) et de leurs esters respectifs (en rouge) ; production d'acides gras à moyennes chaînes (en vert) et de leur ester éthyliques respectifs (en rouge foncé) (la synthèse des esters est intracellulaire et est représentée à l'extérieur pour plus de clarté)

1.4. Souches de levure *S.cerevisiae* et génomes disponibles

En plus de ses nombreuses utilisations industrielles (cf plus haut) la levure *S.cerevisiae* est devenue un modèle biologique pour comprendre les mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques du vivant ainsi qu'un modèle d'étude de l'évolution des génomes [70]. C'est le premier eucaryote dont le génome a été entièrement séquencé [71].

La souche de référence ayant servi au séquençage (S288C) présente une phylogénie complexe, cette souche serait en effet issue d'un croisement entre plusieurs souches d'origines diverses. Le groupe de Mortimer *et al* isola la souche S288c à partir de croisements entre les souches EM93-1C et S177A. Le progéniteur principal est la souche EM93-1C (88% des gènes proviennent de cette souche). Cette dernière semble avoir été isolée sur des figes rouges en Californie. Mais son origine est inconnue, car on ne sait si cette souche provient de la flore naturelle ou d'une contamination d'origine brassicole ou boulangère [72]. Sa sélection a conduit cette souche à accumuler quelques particularités phénotypiques dont l'absence de floculation [72]. De plus, la sélection a été réalisée pour que le milieu de culture ne nécessite que la présence de biotine, d'azote, de glucose, et différents sels et oligoéléments [72].

Parmi les nombreuses souches de levures référencées, la souche S288c se distingue au niveau de ses caractères phénotypiques et génétiques. Sa sélection a en effet eu lieu pour conserver certains traits de caractères qui sont fort éloignés des caractères « technologiques » qui ont permis la sélection des levures de bières et œnologiques depuis que l'Homme « pratique » la fermentation alcoolique.

Les levures *S.cerevisiae* œnologiques, forment un groupe aux caractéristiques génétiques communes qui les séparent des levures de bières, de pain et des levures de laboratoire [73]. Elles sont pour la plupart diploïdes, mais il existe également des souches polyploïdes ou aneuploïdes présentant des disomies ou trisomies ainsi que des réarrangements chromosomiques [73,74]. L'aneuploïdie peut être considérée

clairement comme un avantage dans le cas de la fermentation œnologique. La présence de gènes en double ou triple exemplaires, s'ils sont d'intérêt, peut permettre une adaptation de la levure à des conditions œnologiques considérées comme exerçant une pression de sélection [75]. Ces caractéristiques génétiques ont évidemment des conséquences sur les capacités technologiques des levures, elles sont généralement plus tolérantes à l'alcool et fermentent très vite.

A l'heure actuelle, il existe de nombreuses souches de levures *Saccharomyces* (*cerevisiae* mais également *paradoxus*, *mikatae* et leurs hybrides interspécifiques) dont le génome a été séquencé ou reséquencé. En ce qui concerne les souches de levure *S.cerevisiae*, plusieurs projets de séquençage sont en cours ou achevés et mis à disposition sur internet. Il est alors possible d'utiliser les génomes de ces souches pour réaliser des études bioinformatiques. Néanmoins, si l'on s'en réfère au site génolevure et aux bases de données disponibles auprès du site NCBI, on ne retiendra que le génome de 7 souches de levures *S.cerevisiae* dont la qualité permet de réaliser des comparaisons bioinformatiques (Tableau 4). On citera également le projet de reséquençage du Sanger Institute. Ce projet met à disposition 37 génomes de souches de levure *S. cerevisiae* aux caractéristiques écologiques très variées [76]. Pour les besoins de cette thèse, les génomes de ces 37 souches de levures ont été utilisés en plus des 7 disponibles sur le site NCBI.

Souches	Souches apparentées citées	Qualité*	Origine
S288c	Fy, By,X2180	+++	? [71]
YJM789		++	Clinique [77]
RM11-1A		++	Vin [78]
AWRI 1631		+	Vin [79]
EC1118	V5, 59a	++	Vin [80]
M22		+	Vin [81]
YPS163		+	Chêne [81]

Tableau 4 : Souches de levure séquencées et disponibles dans les bases de données NCBI

*d'après génolevure

La première levure œnologique à avoir été séquencée est la souche RM11-1a au début des années 2000 [78]. Plus récemment, en 2009, une autre souche

œnologique, la souche EC1118¹ [80] a été séquencée. Ces deux souches révèlent des divergences de séquences nucléotidiques avec S288c de 0,5-1% (RM11-1a) et 0,6% (EC1118). Chez EC1118, on note la présence de 50 000 SNP (Single Nuclear Polymorphism) et 5 000 INDELS (INsertion DELetions) identifiés par rapport à la souche de référence (S288c). De plus 38 nouveaux gènes et trois nouvelles régions acquises par des évènements de transferts horizontaux ont pu être identifiés dans la souche EC1118.

Une spore dérivée de la souche EC1118, nommée 59a, a été isolée par Chloé Ambroset au cours de son travail de doctorat. Après séquençage, il a été montré que cette dernière a également hérité des 3 zones chromosomiques citées plus haut.

¹La souche de levure EC1118 (aussi appelé Prise De Mousse (PDM)) est une des levures la plus vendue dans le monde au même titre que EG8

Objectifs de thèse

La maîtrise de la qualité aromatique est un enjeu important pour la filière viti-vinicole. Le génotype du cépage, les conditions de culture de la vigne, les souches de levure, les conditions de vinification et de fermentation ainsi que les transformations physico-chimiques jouent un rôle déterminant dans la composition aromatique d'un vin. Les vins alsaciens se démarquent tout particulièrement par leurs fortes teneurs en terpénols. Ces molécules sont volatiles et se trouvent sous forme libre ou liée dans le vin. La levure, outre la fermentation, va contribuer à libérer les arômes liés (cas des terpénols) et produire des arômes dits fermentaires comme des acides, des esters, des alcools supérieurs qui vont venir enrichir l'arôme du vin.

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence le rôle des microorganismes dans l'arôme final des vins. Ainsi, dans le cas de la levure, la capacité à révéler ou produire des arômes est devenue un critère important de sélection de souches. Cependant, les mécanismes biochimiques impliqués sont encore mal caractérisés. Nous avons choisi deux approches complémentaires pour définir les gènes/allèles clés de la levure sur la production de composés aromatiques par la levure en conditions fermentaires.

- Une approche « QTL » utilisant deux progéniteurs différents (59a et S288c) permettant de relier le phénotype à un marqueur génétique.
- Une approche gène candidat permettant la caractérisation de gènes impliqués dans le métabolisme de l'acide décanoïque et du géraniol.

Nous avons focalisé notre attention sur le métabolisme des arômes terpéniques par la levure. En effet les arômes floraux des cépages aromatiques alsaciens sont en partie constitués par des monoterpénols.

Matériels et Méthodes

1. Milieux

1.1. Milieux de base

Tous les milieux de culture sont préparés avec de l'eau distillée puis stérilisés pendant 20 min à 120°C. Pour la préparation de milieux solides 10g/L d'agar sont ajoutés avant autoclavage.

YPG : glucose 20g/L ; peptone 20g/L ; extrait de levure 10g/L

YPG 80% : glucose 80g/L ; peptone 20g/L ; extrait de levure 10g/L

1.2. Milieux fermentaires

1.2.1. MS300

Le milieu MS300 (milieu synthétique 300mg/L d'azote assimilable) est un milieu représentatif d'un moût de raisin [82], caractérisé par sa forte teneur en glucose (200g/L), sa faible teneur en azote et son pH acide (3,3). Sa composition est donnée dans le Tableau 5. Le MS300 est flash-pasteurisé à 110°C pendant 10min.

Tableau 5 : Composition d'un litre de MS300

Glucose	200 g
Acide malique	6 g
Acide citrique	6 g
KH ₂ PO ₄	0.75 g
K ₂ SO ₄	0.5 g
MgSO ₂ , 7H ₂ O	0.25 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.155 g
NaCl	0.2 g
NH ₄ Cl	0.46 g
Solution mère de vitamines (Tableau 6)	10 mL
Solution mère d'oligo-éléments (Tableau 7)	1 mL
Solution mère d'acides aminés (Tableau 9)	13.09 mL
Solution mère de facteurs anaérobies (Tableau 8)	0,01 mL
Eau distillées Qsp	1L

Tableau 6 : Solution mère de vitamine

Myo-inositol	2 g
Pantothénate de calcium	0.15 g
Thiamine	0.025 g
Acide nicotinique	0.2 g
Pyridoxine	0.025 g
Biotine (solution mère à 100mg/L)	3 mL
Eau distillée	Qsp 1L

Tableau 7 : Solution mère d'oligoéléments

MnSO ₄ .H ₂ O	4 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1 g
KI	1 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.4 g
H ₃ BO ₃	1 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1 g
Eau distillée	Qsp1L

Tableau 8 : Solution de facteurs anaérobies

Tween 80	49,75 mL
Éthanol	49,75 mL
Acide oléique	0,5 mL
Ergostérol	1,5 g

Tableau 9 : Solution mère d'acides aminés

T rosine	1.4 g
Tryptophane	13.7 g
Isoleucine	2.5 g
Acide Aspartique	3.4
Acide Glutamique	9.4 g
Arginine	8.6 g
Leucine	3. g
Thréonine	5.8 g
Glycine	1 4
Glutamine	38.6 g
Alanine	11.1 g
Valine	3.4 g
Méthionine	2.4 g
Phénylalanine	2.9 g
Sérine	6 g
Histidine	2.5 g
Cystéine	1 g
Proline	46.8 g
Lysine	1.3 g
Eau distillée	Qsp1L

1.2.2. MS300 modifiés

Pour les besoins de cette thèse la composition du MS300 a été légèrement modifiée.

Nous avons remplacé l'ergostérol par le β -sitostérol. En effet, nous avons souhaité être plus proches de la composition d'un moût de raisin dont le principal stérol est le β -sitostérol [83], son incorporation dans les membranes de levures lors de la fermentation œnologique indique qu'il agirait comme un substitut de l'ergostérol exogène [84].

Nous avons également réduit la concentration de facteurs anaérobies dans le MS300 de sorte que celle-ci passe de 100% (1mL/L) à 1% (10 μ L/L).

Pour les besoins de l'étude du métabolisme de l'acide décanoïque et du géraniol, des milieux MS300 modifiés ont été préparés. Les solutions stocks citées sont préparées extemporanément dans de l'éthanol 99,99%. L'ajout est effectué après flash-pasteurisation comme suit :

MS300 1mg/L ou 5mg/L de géraniol : ajout de 100 μ L/L ou 500 μ L/L d'une solution de géraniol à 10mg/mL.

MS300 0,05mM ou 0,1mM d'acide décanoïque : ajout de 50 μ L/L ou 100 μ L/L d'une solution stock d'acide décanoïque à 1mmole/mL (172mg/mL).

2. Fermentation

2.1. Pré-culture

Chacune des souches est mises en pré-culture en milieu complet YPG sous agitation à 28°C. Après 24h, 1mL de pré-culture sert à ensemer 10mL de milieu complet YPG, cette deuxième pré-culture est mise sous agitation pendant 24h à 28°C.

A l'issue de cette deuxième pré-culture, l'absorbance à 600nm est mesurée et l'on détermine le volume d'inoculum nécessaire pour ensemer 200mL ou 1L de milieu à densité optique initiale de 0,1.

2.2. Dispositif de fermentation

Les fermentations sont conduites en anaérobiose. Le volume de milieu est égal à 80% du volume du fermenteur. De plus, un dispositif permet l'évacuation des gaz produits par un tuyau muni d'un clapet anti-retour et plongé dans un liquide (Figure 4), ce qui évite l'entrée d'oxygène. Lorsque le dispositif l'impose, la fermentation est mise sous agitation à l'aide d'un barreau magnétique. Les bouchons situés sur chacun des fermenteurs jouant le rôle de « soupape ».

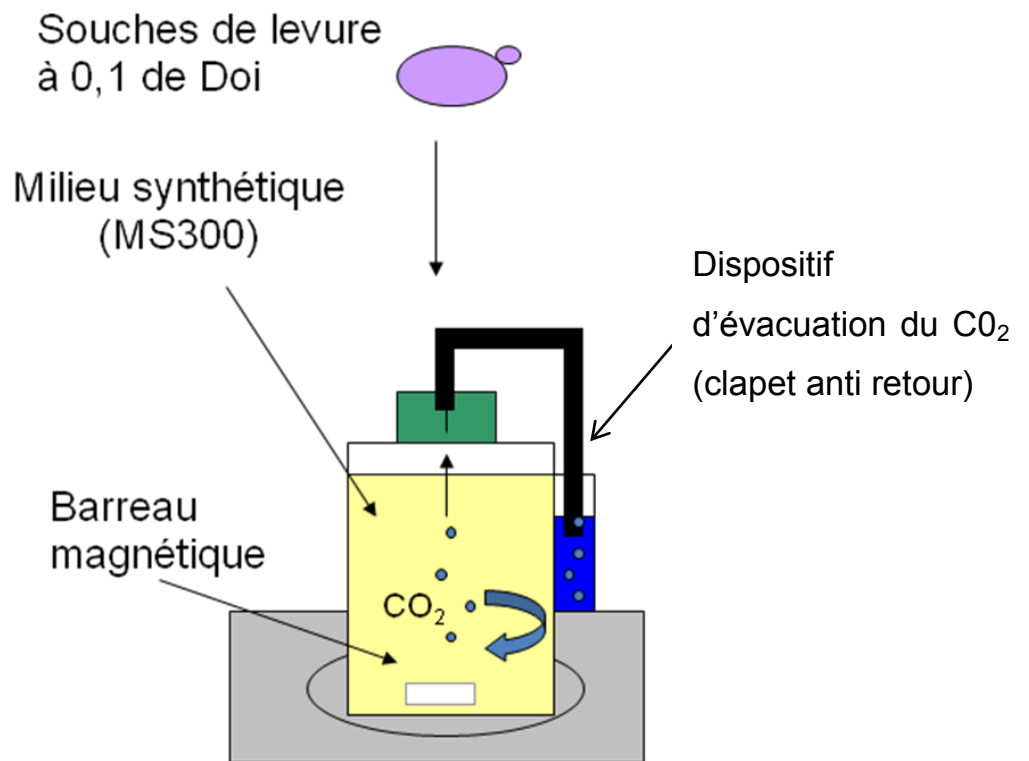


Figure 4 : Schéma du dispositif de fermentation des fermentations (Doi= densité optique initiale)

2.3. Suivi de fermentation

Pour chaque fermenteur, la masse de milieu est mesurée avant pasteurisation. Chaque fermentation est suivie par pesée une à deux fois par jour. La perte de masse est représentée en valeur absolue en g/100g de milieu. La fermentation est terminée lorsque tout le sucre présent dans le milieu a été transformé en éthanol et CO₂, ce qui correspond par exemple à une perte de 9g/100g de milieu pour les 200g/L de sucres utilisés dans nos conditions.

3. Levures

3.1. Souches utilisées

Les différentes souches de levures utilisées dans cette thèse sont présentées Tableau 10.

Souches de laboratoire		Souches œnologiques
Autres	Collection EUROSCARF	
S288c : <i>MAT α</i>	BY4741 : <i>MAT a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Spore 59a : souche haploïde, issue de la souche industrielle EC1118, <i>MAT a</i> .
FYwt =FYBL1-8B: <i>Mat a ura3-Δ851 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2Δ202</i>	BY4742 : <i>MAT α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	Zygote Z59S issu du croisement entre la souche 59a et S288C
FYΔEEB1 =FYBL3/BL023-6C: <i>Mat α YPL095c::KANMX6, ura3-Δ851, his3-Δ200, leu2-Δ1, trp1Δ63</i>	BY4743 : <i>MAT a/α, his3/his3, leu2/leu2, lys2/LYS2, MET15/met15Δ, ura3Δ0/ura3Δ0</i>	
FYΔEEB1ΔEHT1 =FYBL106-6C: <i>Mat α ura3-Δ851 his3-Δ200 leu2-Δ1, YBR177c::KANMX6, YPL095c::KANMX6</i>		Population haploïde de 30 ségrégant issus du croisement entre la souche 59a et la souche S288c.
FYΔEEB1ΔEHT1ΔYMR210w : <i>FYBL106-6C, YMR210w::HIS3</i>		

Tableau 10 : Souches de levures utilisées dans cette thèse

3.2. Micromanipulation des levures

Les diploïdes et haploïdes de levure ont été produits et isolés suivant le protocole de Morin *et al* [85], sous micromanipulateur SINGER©.

4. Biologie moléculaire

4.1. Transformation des levures

La transformation des levures est réalisée selon la procédure utilisant du lithium acétate (LiAc)/ADN simple brin/polyéthylène glycol (PEG) [86]. On utilise ici la

méthode dite “Short Flanking Homology PCR” (SFH-PCR). Elle consiste à disrupter un gène par recombinaison homologue. Elle est fondée sur l'utilisation d'un module *kanMX4* permettant à la levure ayant intégré ce module par recombinaison, d'être résistante à la généticine.

Les souches $BY\Delta EEB1$ et $\Delta PDR8$ de la collection EUROSCARF ont ainsi à la place des gènes *EEB1* et *PDR8* respectivement, le module *kanMX4*. Après purification de l'ADN génomique de ces souches, on réalise une PCR avec un couple d'amorce permettant l'amplification de cette cassette environ 250 pb avant et 250 pb après le module *kanMX4*. La souche S288c transformée avec le produit de PCR, est alors directement sélectionnée sur milieu YPG+ généticine (200µg/L), pour transformer la souche V5, celle-ci nécessite une culture d'une nuit sur milieu liquide non sélectif à 28°C avant ensemencement sur YPG+ généticine (200µg/L).

Après transformations et sélection, plusieurs clones résistants sont isolés et leur ADN est purifié et testé avec les couples d'amorces « contrôles » et « fwd » respectifs.

4.2. Extraction de l'ADN

L'ADN génomique de levure est extrait à partir de 2mL d'une culture fraîche (10mL) dans du YPG pendant 24h à 28°C. Après centrifugation 5 min à 6000 rpm le culot est lysé et dissout dans 400µL de tampon de lyse (tris 10mM, EDTA 1mM, NaCl 100mM, Triton X-100 2%, SDS 1%, pH =8), 400µL de phénol chloroforme, et 600µL de billes en verres Ø 425-600µm. Après agitation au vortex pendant 4min, on rajoute 200µL d'eau distillée. Après une centrifugation de 5 min à 6000rpm, on extrait la phase aqueuse à laquelle on ajoute 500µL de chloroforme-alcool isoamylique (98V/2V). Le mélange est centrifugé 2min à 14 000rpm. La phase aqueuse est récupérée. On lui rajoute 600µL d'isopropanol, le mélange est maintenu à -20°C pendant 20min.

Après une décongélation de 10 min à température ambiante, puis centrifugation 7 min à 14 000rpm, le culot est lavé à l'éthanol 70% et séché pendant 30 min. Le culot est repris dans 480µL d'eau distillée et la concentration de la solution d'ADN est mesurée au Nanodrop©.

4.3. Amplification de l'ADN

Les couples d'amorces utilisés pour effectuer la réaction d'amplification par PCR des gènes *EEB1* et *PDR8* sont les suivants :

EEB1 fwd : CTTCAAGAGAACCGGCACCAAAG

EEB1 rv : AAAGTGGATCGGCGGATTGGAAAG

EEB1 ctrl : ATGCGGTAAAGATTCTACGGGTGGTG

PDR8 fwd : CAACAGTGGCTTATTCGCCAGAGGG

PDR8 rv : ACGTAGGGAACTAAGCGCTCCAAGG

PDR8 ctrl : GACCCATGCACCAGATATTGATCC

L'amplification par PCR de l'ADN des souches est réalisée à l'aide d'un appareil Thermocycleur Eppendorf à couvercle chauffant. Environ 100 ng/μl de matrice est amplifiée dans 200μL (volume réactionnel = 25 μL).

Le mix comprend 10 μM de chaque amorce, 10 mM de dNTPs, 3 unités de *pfu Taq Polymérase* (Fermentas©) et le tampon associé. Le programme d'amplification PCR est le suivant :

-5 min à 95°C.

-une série de 30 cycles d'amplification comprenant :

1) une phase de dénaturation 1 min à 95°C,

2) une phase d'hybridation 30 secondes à 52°C

3) une phase d'élongation 2 min à 72°C.

A la fin des 30 cycles, une étape d'élongation supplémentaire de 5 min à 72°C est effectuée. Les produits d'amplification sont stockés à une température de 22°C avant révélation sur gel.

4.4. Analyse de l'ADN

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont séparés en fonction de leur taille par une électrophorèse en gel à 1% d'agarose (tampon TAE : 40mM Tris, 1mM EDTA , pH= 8). La migration est faite dans le même tampon TAE sous voltage fixe, 100V pendant 25 à 30 min. Le gel est ensuite placé dans une solution de bromure

d'éthidium (BET) (~1/100 000e dans de l'eau distillée) pendant 15 min. L'ADN est visualisé sous UV grâce à la fluorescence du BET et le gel est photographié par le système GELDOC 10 000 de BIORAD.

5. Analyse des composés volatils

L'analyse des composés volatils est réalisée par Stir Bar Sorptive Extraction-Liquid Desorption-Gas Chromatography-Mass Spectrometry (SBSE-LD-GC-MS).

Au début de cette thèse il n'existait pas de technique permettant de réaliser une analyse rapide, sensible des composés volatils présents dans les fermentations au sein de notre laboratoire. Afin de réaliser des analyses à haut débit il était nécessaire de mettre au point une nouvelle technique. Le choix s'est porté sur la technique dite Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) développée par Baltussen et al en 1999 [87]. Elle consiste à extraire les molécules volatiles de la matrice grâce à une étape d'adsorption sur un barreau aimanté recouvert de polydiméthylsiloxane (PDMS) puis à une étape de désorption de ces molécules dans un liquide compatible avec une analyse en chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse (ou Gas Chromatographie-Mass Spectrometry, GC-MS).

Phase d'adsorption : Un barreau aimanté (ou stir bar) recouvert de PDMS est plongé dans la matrice liquide et agité pour un temps défini sur un agitateur magnétique. Les molécules volatiles présentes dans la matrice vont alors s'adsorber sur le PDMS avec une affinité proportionnelle au coefficient de partage eau/octanol de la molécule. Ainsi les molécules les plus hydrophobes seront les mieux fixées.

Phase de désorption : La technique SBSE a été développée, à l'origine, pour être utilisée avec un désorbeur thermique dédié. Ce dernier étant couplé à une GC-MS on parle alors de SBSE-TD-GC-MS (TD= Thermal Desorption). Dans ce cas-ci, la désorption des molécules se fait par le passage sur le barreau d'un flux d'hélium à haute température (~200°C), de sorte que la quasi-totalité des molécules fixées sur le barreau soit désorbée. L'hélium ainsi enrichi est directement envoyé en GC-MS où il joue le rôle de gaz vecteur. L'INRA de Colmar n'étant pas équipé de désorbeur, la solution a consisté à réaliser une désorption chimique grâce à l'utilisation d'un

solvant. Le solvant joue le rôle de désorbeur en lavant le barreau. Une fois le solvant enrichi, il est envoyé en GC-MS par injection splitless.

Phase d'analyse GC-MS : Les extraits obtenus sont analysés sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890N, couplé à un spectromètre de masse quadripolaire Agilent 5975B inert MSD en mode impact électronique à 70 eV. La séparation de 1 µl d'extrait est réalisée sur une colonne capillaire DB-WAX 60m, Ø 0.32mm, 0.5µm épaisseur de film (J&W Scientific Inc.). Le gaz vecteur, l'hélium, est injecté à un débit constant de 1 ml/min. Les conditions de séparation sont les suivantes : température du four de 70°C à 2.7°C/min jusqu'à 235°C, maintenue 10 min, température de l'injecteur 250°C utilisé en mode pulsed splitless (25 psi pendant 0.50 min). Les températures de l'interface, de la source d'ions et du quadripôle sont respectivement 270°C, 230°C et 150°C. Le logiciel MSD ChemStation (G1701DA, Rev D.03.00) est utilisé pour l'acquisition et le traitement des données. Les spectres de masses sont interprétés à l'aide des banques de données Wiley et NIST.

Phase d'analyse GC-MS : Les composés présentés dans le Tableau 11 ont été calibrés dans un vin chimique [88]. Pour cela une gamme de concentrations a été préparée pour chacun des composés en fonction de leur concentration dans le vin déterminée par la littérature. Cette gamme comporte 5 niveaux, chaque niveau a été répété 4 fois. Le traitement des données a été réalisé sous R-GUI [89] avec le package chemquant.

Pour les besoins de cette thèse seuls 24 composés ont été calibrés, cependant cette technique permet d'identifier plus de 90 composés dans un vin et a fait l'objet d'une demande de brevet.

Tableau 11: Caractéristiques des calibrations des 23 composés dosés en SBSE-LD-GC-MS

Composés	Gamme de calibration	R ²	Seuils de		RSD%
			détection	quantification	
Isoamylacétate (mg/L)	0.264-4.655	99.86%	0.11	0.33	9.58%
Éthyl C6 (mg/L)	0.024-0.430	99.94%	0.01	0.02	15.68%
Éthyl C8 (mg/L)	0.069-1.215	99.96%	0.02	0.05	14.86%
Éthyl C10 (mg/L)	0.226-3.990	99.48%	0.11	0.33	9.94%
Éthyl C12 (mg/L)	0.024-0.415	95.91%	0.04	0.12	7.79%
Citronellyl acétate (µg/L)	31-550	99.79%	17.64	53.46	4.22%
Géranyl acétate (µg/L)	31-550	99.99%	9.61	29.11	6.56%
2-Phényléthylacétate (mg/L)	0.110-2.170	99.86%	0.13	0.43	1.96%
Acide C6 (mg/L)	0.255-4.500	97.99%	0.20	0.62	0.93%
Acide C8 (mg/L)	0.281-4.950	99.55%	0.16	0.47	7.39%
Acide C10 (mg/L)	0.320-5.650	99.81%	0.04	0.13	19.38%
Acide C12 (mg/L)	0.223-3.95	94.15%	0.09	0.26	39.90%
β-damascène (µg/L)	0.27-10.70	99.62%	0.32	0.97	0.04%
2-méthyl-butanol (mg/L)	8.869-149.000	99.85%	1.78	5.39	0.48%
1-hexanol (µg/L)	14-375	99.74%	14.18	42.98	3.15%
Isobutanol (mg/L)	0.266-4.700	99.34%	0.296	0.897	0.85%
2-Phényléthanol (mg/L)	2.5855-51.71	99.92%	0.133	0.403	0.04%
Cis-rose oxyde (µg/L)	0.230-3.640	99.88%	0.21	0.62	0.06%
Nérolidol (µg/L)	22-365	97.91%	53.84	163.15	1.50%
α-terpinéol (µg/L)	32-565	99.99%	9.28	28.11	2.08%
Linalol (µg/L)	27-485	99.88%	12.07	36.58	14.61%
Citronellol (µg/L)	22-385	99.90%	9.43	28.58	21.87%
Géranol (µg/L)	29-515	99.98%	5.74	17.41	5.59%
Nérol (µg/L)	26-455	99.99%	5.02	15.21	5.24%

Chapitre I : Etude de la fonction du gène *EEB1*

1. Contexte

L'étude de ce gène fait suite au travail de notre équipe sur la réponse des levures à la toxicité des acides gras à moyennes chaînes et tout particulièrement à celle de l'ajout d'acide décanoïque.

1.1. Descripteur aromatique des acides gras à moyennes chaînes (AGMC) et des esters d'AGMC

Malgré leur descripteur aromatique désagréable (odeur caprine, savonneuse, rance...) les acides gras à moyennes chaînes contribuent à l'arôme de certains vins, notamment les vins blancs australiens [90]. On les trouve dans des concentrations proches de celles du seuil de perception dans différents types de vin [25,34,91,92]. Résultant de l'estérification d'AGMC par l'éthanol et excrétés par la levure lors de la fermentation, les esters d'AGMC (ou esters éthyliques) confèrent au vin des notes fruitées (Tableau 12). Ils font également partie des molécules clé de certains vins blancs australiens [90], mais également du Gewurztraminer [34]. Ils sont généralement présents à des concentrations au-dessus de leur seuil de perception dans de nombreux types vins [25,34,91,92].

Tableau 12 : Pourcentage d'excrétion et impact olfactif des principaux esters éthyliques et acides gras à moyennes chaînes

Composés aromatiques	% excrété	Seuil de perception vin (mg/L)	Concentration classique dans un vin (mg/L)	Descripteur aromatique ^{a,b,c}
Éthyl C4	?	0,001[93]; 0,02[34]	0,07[93] -0,53[34]	Floral, fruité, fraise, sucré
Éthyl C6	0%[94]	0,005[93]; 0,08[34]	0,15[93] -1,64[34]	Fruité, fraise, pomme verte, anis
Éthyl C8	54-68%[94]	0,005[93] ; 0,012[34]	0,14[93] -2,61[34]	Sucré, fruit, fruit mur, brûlé, bière
Éthyl C10	8-17%[94]	0,2[93]; 0,012[34]	0,01[93] -0,70[34]	Huileux, fruité (raisin) floral
Éthyl C12	0%[94]	?	?	?
Éthyl C14	0%[94]	?	?	?
Acide C10	?	1[91]	1[34]-5[92]	Gras, savon, rance
Acide C8	?	0,5[91]	2 ; 3[25]	Gras, savon, rance

1.2. Les acides gras à moyennes chaînes

Les acides gras à moyennes chaînes (AGMC) sont des acides carboxyliques à nombre paires d'atomes de carbone (entre 4 et 12 atomes de carbones). Comme évoqué ci-dessus, ces acides sont des composés volatils fermentaires présents dans le vin à des concentrations de l'ordre du mg/L [23,25,34,37,44,95,96]. Ils sont produits spécifiquement par la levure [97] en tant que sous-produits de la synthèse des lipides [98]. Parmi les AGMC produits, les acides octanoïque (C8) et décanoïque (C10) sont toxiques pour la levure [99]. Les pKa de ces deux acides étant de 4,3 dans une solution hydroalcoolique, la forme non chargée (COOH) est prépondérante dans le vin qui est à pH 2,8-3,3 [99]. Or cette dernière forme peut diffuser librement à travers la membrane et rentrer dans le milieu intracellulaire [99]. Cela a pour conséquence d'affecter la fluidité membranaire [101] mais également d'influencer le pH intracellulaire [99]. Cette toxicité peut conduire dans le cas de concentrations trop élevées dans le vin (6mg/L pour l'acide C8 et 9mg/L pour l'acide décanoïque) à une forte mortalité de la levure [102]. Ces concentrations peuvent se retrouver au cours de la fermentation et conduire à des fermentations languissantes voire même à un arrêt prématuré du processus. Des études montrent que la toxicité de ces acides est renforcée par la concentration en alcool [99] et des températures de fermentation inférieures à 15,5°C [100].

1.3. Synthèse des acides gras à moyennes chaînes

Les acides gras que l'on trouve majoritairement dans les levures sont les acides gras à 16 ou 18 carbones. Ils sont incorporés dans les triglycérides, constituant une forme de stockage de l'énergie, ou dans les phospholipides, contribuant à la structure des membranes.

S'ils sont présents dans le milieu, la levure peut prélever les acides gras dont elle a besoin (c'est le cas de l'acide oléique présent dans les facteurs anaérobies). En présence d'oxygène, si la longueur de la chaîne est égale à ou excède 12 carbones ; ils peuvent alors être allongés par Elo1p, le plus couramment jusqu'à 16 ou 18 atomes de carbones. En absence d'apport exogène, les acides gras sont synthétisés dans le cytoplasme par le complexe FAS I (et/ou FAS II). Les acides gras à longue chaîne (C16, C18) sont ensuite désaturés par la $\Delta 9$ fatty acid desaturase (*OLE1*),

avant d'être incorporés dans les phospholipides (Figure 5A). L'incorporation d'acides gras désaturés dans la membrane est un des éléments de régulation de sa fluidité.

Lors de la fermentation, les levures sont dans des conditions d'anaérobiose, les acyl-CoA à longue chaîne ne peuvent pas être désaturés par *Ole1p*, ni même allongés par *Elo1p*. En l'absence d'oxygène, les précurseurs de ces acides gras s'accumuleraient (hexanoyl-CoA, octanoyl-CoA etc...). Cette accumulation aurait pour effet de bloquer le pool limité de Coenzyme A, entraînant une inhibition de l'acyl-CoA carboxylase de la fatty acid synthase (FAS) cytoplasmique [103]. En cours de fermentation, la levure a besoin de recycler son pool de CoA qu'elle ne peut renouveler du fait de l'absence d'oxygène. L'hydrolyse de l'acyl-CoA en acide et en Coenzyme A permettrait à la levure de remobiliser ce pool et de continuer son métabolisme fermentaire [58,59]. Lorsque l'acide gras ainsi libéré est un acide octanoïque ou décanoïque, il est expulsé par les transporteurs *PDR12* [104] et *TPO1* [105] Figure 5 B et C.

La production des acides gras à moyennes chaînes lors de la fermentation serait donc la conséquence du blocage de la voie de synthèse des acides gras à longues chaînes. Mais comme nous l'avons vu, ces molécules sont toxiques pour la levure. Or, elles ne peuvent être oxydées, ni allongées, l'élongation de l'acide étant peu efficace sur des chaînes carbonées inférieures à 12 carbones [106] et le gène *ELO1* étant de plus réprimé lors de l'anaérobiose [107]. Une des voies possible de détoxification des AGMC serait alors la production d'esters éthyliques, comme le suggère l'induction très forte du gène *EEB1*, décrit comme une éthyl-ester synthase [105]. Un acide lorsqu'il est estérifié n'est pas définition plus acide et ne possède plus de fonction chargé. L'ester éthylique formé peut alors diffuser à travers la membrane [57].

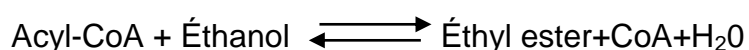
Toutefois, il est courant d'opposer aérobie et anaérobiose lorsque l'on parle de fermentation, il faut alors se souvenir que la fermentation comporte une phase semi-anaérobie caractérisée par la présence d'oxygène concomitante à la production de molécules volatiles dont les AGMC ce qui permet malgré tout d'envisager certaines voies de détoxification aérobie.

D'un point de vue évolutif, la production d'AGMC toxiques pourrait être un mécanisme de colonisation du milieu, en effet ces acides sont très toxiques pour les

bactéries [108,109] et d'autres types de levures non *cerevisiae* [110]. Dans ce cas-là, la présence de ces acides combinés à la production d'alcool permettrait une meilleure implantation de la levure *S.cerevisiae* dans le milieu.

1.4. Synthèse des esters d'acides gras à moyennes chaînes

La réaction catalysée par une éthyl ester synthase est la suivante :



Au cours de la fermentation alcoolique, le milieu s'enrichit en AGMC mais également en esters éthyliques correspondants. Cependant, la corrélation entre production d'acides gras et détoxification n'est pas parfaitement établie [58,59].

La production de ces esters d'AGMC (ici appelés esters éthyliques) serait donc un moyen mis en place par la levure durant la fermentation pour détoxifier les AGMC et recycler ainsi le CoA (Figure 5C). Les esters éthyliques produits ne sont pas excrétés par la levure mais diffusent à travers la membrane. Cette diffusion dépend de la longueur de la chaîne carbonée de l'ester, plus cette dernière est longue, moins il peut sortir facilement de la levure (Tableau 12). Cela permet de souligner un point important : en mesurant les composés volatils du milieu, on ne regarde que la partie excrétée des molécules étudiées.

Il existe plusieurs hypothèses proposant un rôle biologique à la synthèse des esters éthyliques. En plus du fait qu'ils puissent permettre un recyclage des CoA et détoxifier les AGMC, il est proposé que les esters éthyliques pourraient servir d'analogues aux lipides désaturés qui sont un facteur limitant pour la croissance de la levure en conditions anaérobies et ainsi se substituer à ces derniers dans la membrane de la levure [111]. Enfin la présence d'esters éthyliques semblent attirer les Drosophiles [112], ce qui amène S.Saerens *et al*, à proposer que la synthèse de ces composés pourrait être un mécanisme évolutif permettant aux levures d'être disséminés par la Drosophile [66] qui est connue pour être un des vecteurs de propagation de la levure notamment dans le cas des levures œnologiques [113].

1.5. Les esters synthèses de levure *S.cerevisiae*

Chez la levure *S. cerevisiae* il existe cinq ester-synthèses réparties en deux familles fonctionnelles :

i) La famille des **alcool acétyltransférases** : elle est représentée par deux enzymes codées par les gènes *ATF1* et *ATF2* [111,114,115]. Ces enzymes réalisent la réaction d'estérification entre des fonctions alcools (généralement primaires tels que les alcools supérieurs) et l'acétyl-CoA. Elles sont responsables de la synthèse des esters d'acétate (Tableau 13) comme par exemple l'isoamylacétate.

ii) La famille des **acyl-coenzymeA:éthanol-O-acyltransférase** : elle est représentée par trois enzymes codées par les gènes *EEB1*, *EHT1* et *YMR210w* [116] (Tableau 13). Ces enzymes réalisent l'estérification entre les acides gras C4 à C10 et l'éthanol.

Tableau 13 : Substrat et produits des principales esters synthèses de la levure en condition fermentaire

Substrats alcools	Substrats acides	Esters	Gènes
Éthanol	Acétyl-CoA	Éthylacétate	<i>ATF1/ATF2</i> [111,114,115]
Isoamylalcool	Acétyl-CoA	Isoamylacétate	<i>ATF1/ATF2</i> [111,114,115]
Hexanol	Acétyl-CoA	Hexylacétate	<i>ATF1/ATF2</i> [111,114,115]
Phényléthanol	Acetyl-CoA	Phényléthylacétate	<i>ATF1/ATF2</i> [111,114,115]
Géranol/nérol/citronellol	Acetyl-CoA	Terpénylacétate	<i>ATF1/ATF2</i> ¹
Éthanol	Malonyl-CoA (C4)	Éthyl buyrate (C4)	<i>EHT1/EEB1</i> [116]
Éthanol	Hexanoyl-CoA (C6)	Éthyl hexanoate (C6)	<i>EHT1/EEB1</i> [116]
Éthanol	Octanoyl-CoA (C8)	Éthyl octanoate (C8)	<i>EHT1/EEB1</i> [116]
Éthanol	Decanoyl-CoA (C10)	Éthyl décanoate (C10)	<i>EHT1/EEB1</i> [116]

¹Cette thèse

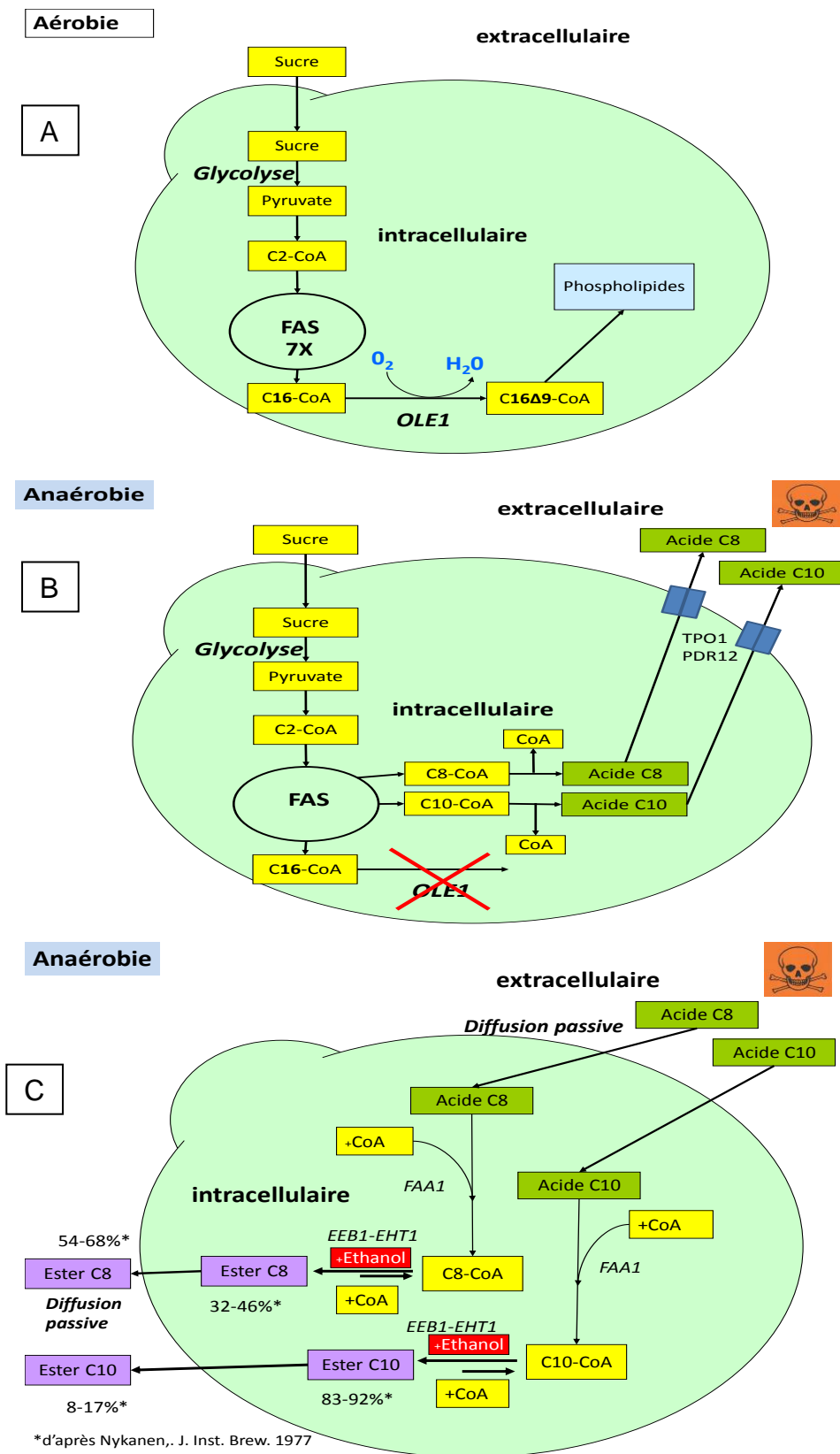


Figure 5 : Schéma de l'influence de l'oxygène sur la synthèse des acides gras et de leur détoxification supposée en fermentation chez la levure (simplifié)

Diverses études se sont attachées à identifier les fonctions de chacune de ces trois protéines. Ces études ont été menées sur des milieux variés (YPG, moût de raisin, moût de malt), en utilisant des souches délétées de ces gènes ou, au contraire, sur-exprimant ces gènes. Les résultats, parfois contradictoires, de ces études, sont présentés dans le Tableau 14.

Brièvement, les expériences menées avec des souches délétées montrent que Eeb1p et Eht1p sont les deux principales enzymes impliquées dans la synthèse des esters éthyliques tandis le gène *YMR201w* seul n'a pas d'influence sur la production d'esters éthyliques. La délétion du gène *EEB1* diminue fortement la présence d'esters éthyliques C4 à C10. La délétion du gène *EHT1* n'a qu'un impact modéré sur la production d'esters éthyliques C6 et C8, la double délétion *EEB1-EHT1* a un effet très négatif sur la concentration en éthyl C8, et la double délétion *EEB1-YMR201w* a un effet négatif sur la concentration de l'éthyl C8 et C10. Par ailleurs, les protéines Eeb1p et Eht1p ont été testées *in vitro* pour leurs activités enzymatiques. Elles sont toutes deux capables de produire des esters éthyliques à partir d'éthanol et d'acyl-CoA, avec des spécificités de substrats différentes, Eht1p étant plus active pour les acyl-CoA en C4 et C6, Eeb1p ayant une forte affinité pour les acyl-CoA en C6 et C8. Les deux protéines présentent également une activité estérase [116].

Les expériences de surexpression de ces protéines donnent des résultats plus ambigus. Dans un fond génétique BY (souche de laboratoire) étudié dans un moût de type bière ou YPG, la sur-expression de ces gènes ne modifie pas la production d'esters éthyliques alors que l'ajout d'acides gras dans le milieu de culture conduit à une augmentation des esters éthyliques correspondants [96], de plus la concentration en ester éthyliques n'est pas corrélée avec l'expression du gène *EEB1* [119] même si *EEB1* est activé par l'ajout d'acide octanoïque dans le milieu [120]. En revanche, des expériences de sur-expression du gène *EHT1* menées sur une souche œnologique en conditions œnologiques montrent une augmentation de la production en esters éthyliques [68]. Les analyses de transcriptome et d'exo-métabolome¹ menées avec des souches œnologiques en condition œnologiques, apportent des informations contradictoires avec les expériences précédentes, l'expression des gènes *EEB1* et *EHT1* étant corrélée avec la production de

¹ Ensemble des composés sécrétés par la levure au cours de la fermentation

composés volatils qui ne sont pas directement liés à leur fonction d'éthyl ester synthase [27]. Des études transcriptomiques effectuées à l'INRA de Colmar, l'UHA de Colmar et l'INRA de Montpellier ont montré que chez la souche œnologique UHA13, le gène *EEB1* était le gène le plus induit en présence d'acide décanoïque dans le milieu [105]. Ces données semblent appuyer l'hypothèse selon laquelle la production d'éthyl décanoate par *EEB1* serait une voie de détoxification de cet acide (Tableau 14).

L'ensemble de la bibliographie citée suggère que le fond génétique de la souche utilisée ainsi que le milieu de culture pourraient avoir un effet sur les mécanismes de synthèse d'esters éthyliques liés à une détoxification des AGMC. Nous avons donc orienté nos recherches afin d'identifier le rôle du gène *EEB1* dans la détoxification d'AGMC et d'esters éthyliques en lien avec le métabolisme de l'acide décanoïque.

En particulier nous avons évalué l'effet de:

- la délétion du gène *EEB1* dans une souche de laboratoire (BY) et dans une souche œnologique (V5)
- l'addition d'acide décanoïque en condition fermentaires sur la production des esters éthyliques, en présence ou en absence de *EEB1*, puisque le gène *EEB1* est induit en présence d'acide décanoïque

Tableau 14 : Principales découvertes liées à l'étude des 3 esters éthyliques synthases/hydrolases de levure

Méthode	Souche	Milieu	Conclusion	Référence
Délétion <i>EEB1</i>	BY4741	YPG8%	Baisse de synthèse des esters éthyliques	[116]
Surexpression <i>EEB1/EHT1</i> (<i>YMR210w</i>)	BY4741/CMBS	YPG8%/moût malt	Pas de variation en esters éthyliques	[63,116]
Ajout d'acide C6 et C8 levure sauvage vs surexpression <i>EEB1, EHT1</i> et <i>YMR210w</i>	BY4741	YPG8%	Augmentation de la concentration en éthyl C6 et C8, aucun effet de la surexpression	[116]
qPCR <i>EEB1, EHT1</i> + acide C6, C8, C10, C12	CMBS	Moût malt	Expression de <i>EEB1</i> augmentée par ajout d'acide C8	[63]
Surexpression <i>EHT1</i>	VIN13	Moût de raisin	Augmentation des esters éthyliques et alcools supérieurs	[68]
qPCR <i>EEB1/EHT1</i> liée avec qté esters éthyliques	Ale et lager ¹	Différents moûts de malt et T°	Pas de corrélation entre l'expression d' <i>EEB1</i> et les concentrations en esters éthyliques	[121]
Analyse transcriptomique exométabolomique	VIN13, DV10 EC1118,BM452,85 VIN13	MS300	-l'expression de <i>EEB1</i> est positivement corrélée à la concentration en acide octanoïque et phényléthylacétate mais négativement corrélée à la concentration d'alcools supérieurs -l'expression de <i>EHT1</i> est négativement corrélée à la concentration en acide octanoïque et décanoïque et phényléthylacétate -l'expression de <i>YMR210w</i> est positivement corrélée à la concentration en éthyl acétate, éthyl hexanoate et isoamyl acétate	[27]
Surexpression <i>YMR210w</i>	VIN13	MS300	Aucun effet	
Gènes activés par acide décanoïque	UHA13	YPG liquide	L'acide décanoïque active <i>EEB1</i>	[105]

¹ Levures de type brassicoles

2. Résultats

2.1. Cinétique de fermentation et de production des AGMC et de leurs esters par une souche de laboratoire (S288c) et une souche œnologique (59a), en conditions œnologiques

Dans l'optique de pouvoir comparer la production d'esters éthyliques et d'acide gras à moyennes chaînes entre une souche de laboratoire et une souche œnologique, il paraissait essentiel de réaliser une cinétique de production de ces composés au cours de la fermentation pour ces deux souches. Ce type d'expérience a déjà été réalisé par Bardi et al [58,59]. Dans notre cas, les conditions d'étude diffèrent : le milieu choisi est le MS300 1% de facteurs anaérobies, la température est de 20°C, le volume du fermenteur de 1L, le volume du milieu 800mL. Les prélèvements sont faits grâce à la présence de septum permettant l'entrée d'une seringue. Les échantillons pris sont de 20mL, ils sont congelés immédiatement après le prélèvement avant analyse par SBSE-LD-GC-MS. Les cinétiques fermentaires sont réalisées par mesure de perte de masse.

2.1.1. Cinétique de fermentation

La souche œnologique (59a) achève sa fermentation rapidement (environ 100h) alors que la souche de laboratoire (S288c) comme attendu, montre des aptitudes à la fermentation moindres et achève sa fermentation plus lentement (environ 300h) (Figure 6). L'évolution du pH a également été mesurée, elle est considérée comme négligeable pour les deux souches (Figure 6).

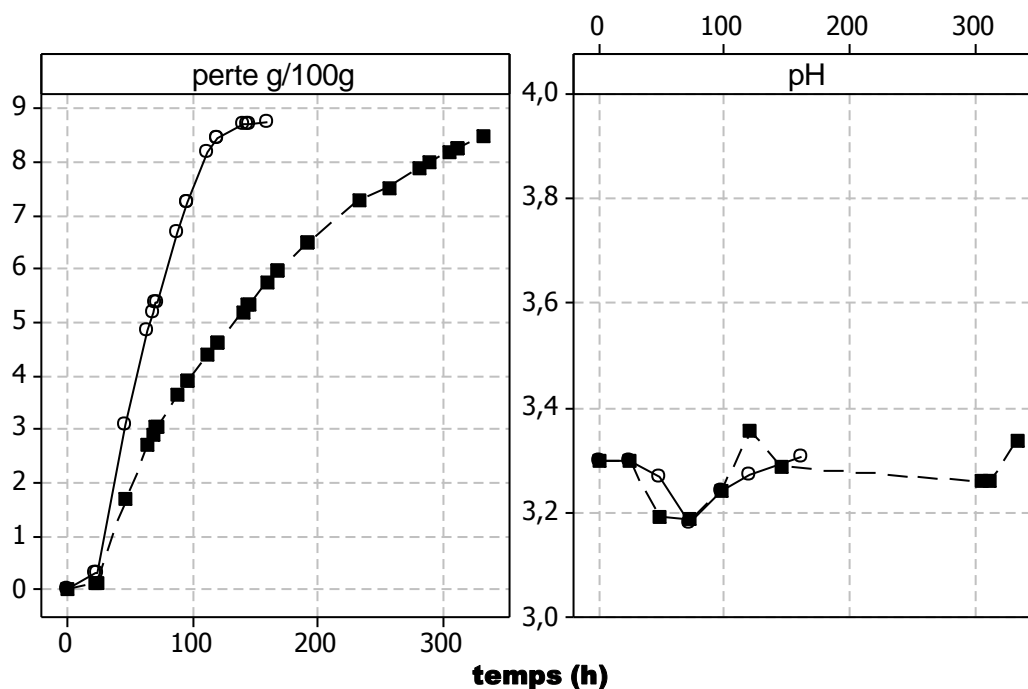


Figure 6: cinétique de fermentation (perte de masse et pH) des deux souches S288C (carrés) , 59a (ronds)

2.1.2. Cinétique de production des AGMC et des esters

Les AGMC et les esters éthyliques ont été quantifiés au cours du temps pour chaque souche (Figure 7).

Les AGMC sont produits au début de la fermentation, puis leur concentration est stable (acide C6) ou diminue (acides C8, C10, C12) en fonction du temps et ce quelle que soit la souche utilisée. La diminution de l'acide décanoïque est très rapide dans la fermentation réalisée avec la souche 59a ce qui souligne un des avantages de la souche œnologique sur la souche de laboratoire en terme organoleptique puisque l'acide décanoïque est défavorable à l'arôme du vin contrairement à son ester éthyliques. On notera que globalement, la souche S288c produit plus d'AGMC que la souche 59a, tandis que, curieusement la production des esters éthyliques semble identique pour les deux souches.

La souche S288c produit les esters éthyliques en début de fermentation, puis il semble que cette production s'arrête et que la concentration se stabilise.

La souche 59a produit l'éthyl hexanoate en début de fermentation, et en produit plus que la souche S288c. En revanche, les éthyls -octanoate et -décanoate sont produits plus tard, et augmentent jusqu'à la fin de la fermentation.

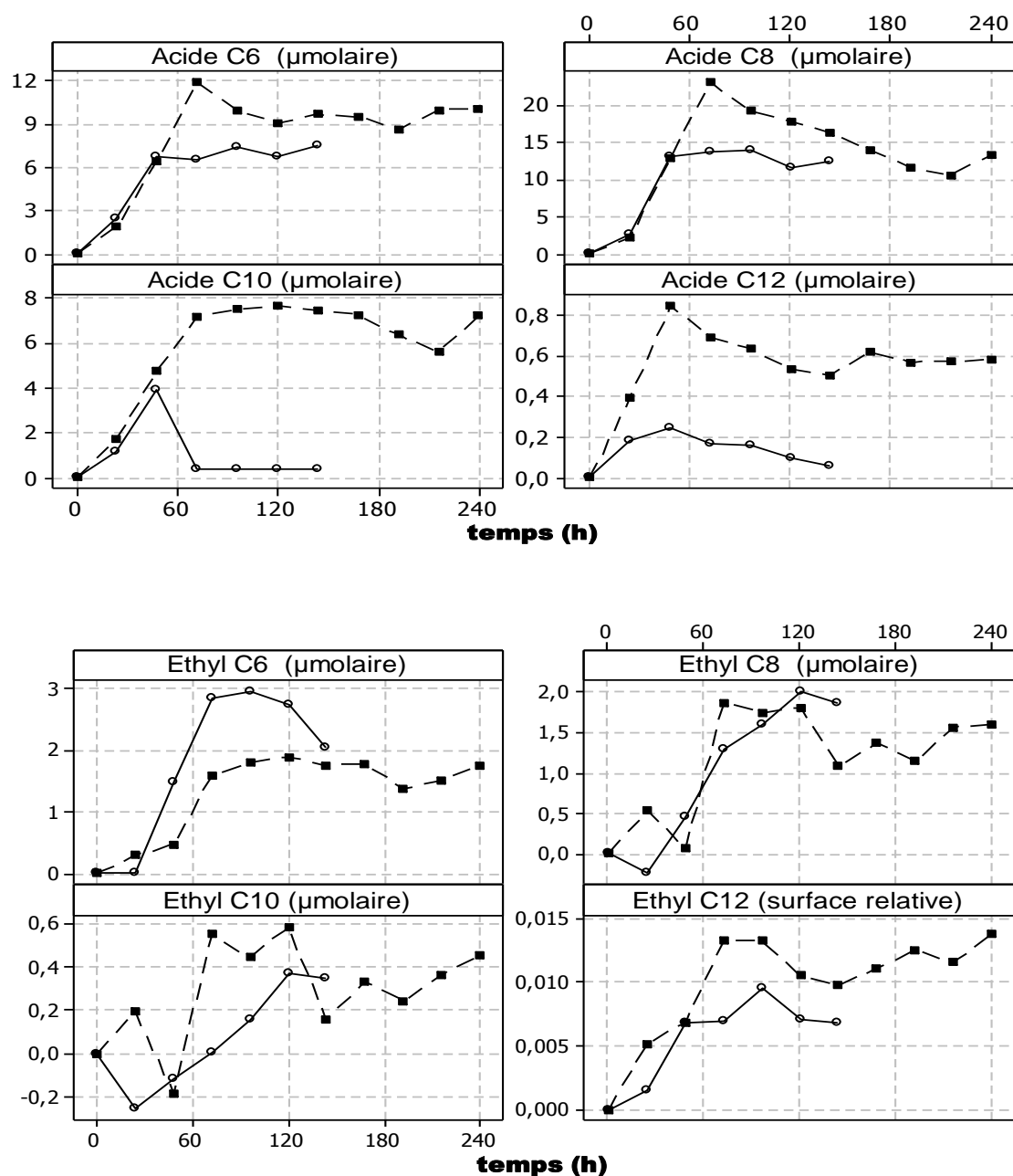


Figure 7 : Cinétique de production des esters éthyliques et des AGMC en fermentation par les souches S288C (carré) et 59a (ronds)

2.1.3. Recherche de la corrélation entre AGMC et esters éthyliques

Les expériences menées par d'autres équipes (Saerens *et al*) [65] suggèrent que le facteur limitant dans la production d'esters éthyliques est la concentration en acides gras, néanmoins les études menées par l'équipe de Bardi *et al* [58,59] ne permettent pas d'établir de corrélation entre l'acide et son ester. Pour vérifier ce point, nous avons effectué une régression linéaire pour chaque souche en évaluant le modèle [éthyl]=f[acide] avec les données issu de la cinétique de production. Le coefficient de corrélation R² et la p-value du modèle permettent d'évaluer la pertinence du modèle. A titre de comparaison les données de cinétique obtenues par Bardi *et al* ont été également traitées de cette façon (Tableau 15).

Tableau 15 : Coefficient de corrélation R² et p-value associée du modèle de régression linéaire liant la concentration de l'ester en fonction de son acide.

Souches		Acide C6	Acide C8	Acide C10	Acide C12	Degrès de liberté	Expériences
59a**	p-value	0,034	0,113	0,261	0,745	6	Cette étude
	R ²	64,6%	38,2%	12,5%	0%		
S288c*	p-value	0,001	0,057	0,120	0,660	10	
	R ²	70,6%	30,4%	18,4%	0%		
S47c**	p-value	0,091	0,127	0,088	0,708	11	[58,59]
	R ²	20,4%	15,4%	21,0%	0%		

milieux utilisé : type YNB à 200g/L de sucre ; ** souche œnologique ; * souche de laboratoire

Dans notre étude nous observons une plus forte corrélation entre la production de l'acide hexanoïque et la production d'éthyl hexanoate quelle que soit la souche étudiée (Tableau 15). Cette corrélation semble également être vérifiée pour l'acide octanoïque et l'ester correspondant. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Bardi *et al*. Ils sont vraisemblablement à mettre au crédit des progrès réalisés dans les méthodes de dosage des AGCM et des esters éthyliques. En revanche cela ne semble pas être le cas pour l'acide décanoïque et l'acide dodécanoïque et ceci pour les deux souches étudiées. Enfin, les esters éthyliques et les AGCM étant liés par les activités esters synthase/hydrolases levuriennes décrites plus haut, il nous a paru intéressant de mesurer au cours du temps les « taux de conversion » : [esters éthyliques]/ [AGCM correspondants].

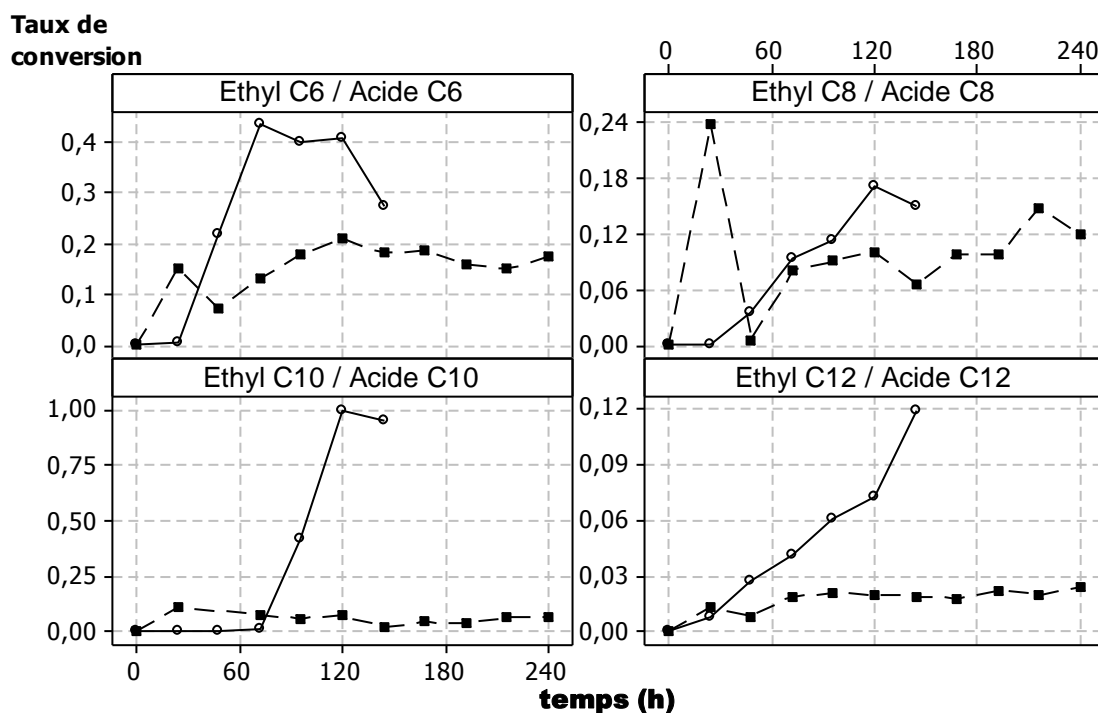


Figure 8: Cinétique du taux de conversion ester / acide par S288C (carrés) et 59a (ronds)

Pour la souche S288c, les taux de conversion des trois types de molécules (Éthyl C6, Éthyl C8 et Éthyl C10) sont similaires et s'échelonnent entre 0 et 0,2. En revanche, pour la souche 59a, les taux de conversion des acides hexanoïque et décanoïque sont supérieurs, puisqu'ils atteignent 0,4 et 1 respectivement, le taux de conversion de l'éthyl C12 semble augmenter au cours du temps dans le cas de la souche œnologique (l'éthyl C12 est mesuré en surface relative).

En résumé, les résultats de cette expérience permettent de montrer que la souche d'origine œnologique 59a présente une plus grande efficacité que la souche S288c dans la production d'éthyl C6 et C10.

2.2. Effet de la délétion des esters synthases *EEB1*, *EHT1* et *YMR210w* sur la production d'AGMC et d'esters éthyliques

Cette étude a été réalisée grâce aux souches FY (souche de laboratoire proche de BY et S288c) délétées respectivement pour les gènes *EEB1*, *EEB1* et *EHT1*, ou *EEB1-EHT1* et *YMR210w*. Ces dernières ont aimablement fournies par B. Llorente.

Le milieu utilisé est un milieu YPG 8% de glucose, le volume de fermentation est 800mL, le volume du fermenteur est de 1L, pour chaque souche, les fermentations sont réalisées en triplicat. Les calibrations de la méthode SBSE-LD-GC-MS ayant été réalisées dans un milieu mimant le vin, les concentrations ne peuvent pas être exprimées en mg/L ou en μ molaire et seront donc données, après corrections par le témoin interne, en pourcentage relatif au témoin sauvage.

La Figure 9 présente les esters éthyliques obtenus pour chaque souche (sauvage, délétée de *EEB1*, *EEB1* et *EHT1*, ou *EEB1*,*EHT1* et *YMR210w*).

Conformément aux résultats décrits par l'équipe de S.Saerens [116] pour une expérience similaire, la délétion du gène *EEB1* se traduit par une très forte baisse de la production d'esters éthyliques. Si en plus de la délétion du gène *EEB1*, le gène *EHT1* est délété cette baisse est encore plus forte, notamment pour l'éthyl C6. Nos résultats semblent donc en accord avec la bibliographie, et à ce stade sont cohérents avec un rôle de *EEB1* dans l'estérification des AGMC. Pourtant, nos résultats montrent aussi que la délétion de *EEB1* se traduit par une baisse drastique de la teneur en AGMC C6 à C10 dans le milieu, et que cette baisse est d'autant plus forte que la chaîne carbonée est longue (jusqu'à -80% de production d'acide décanoïque dans le cas de la seule délétion du gène *EEB1*).

Ces résultats, très clairs, n'avaient jamais été décrits dans la littérature et permettent de supposer une fonction plus complexe du gène *EEB1*.

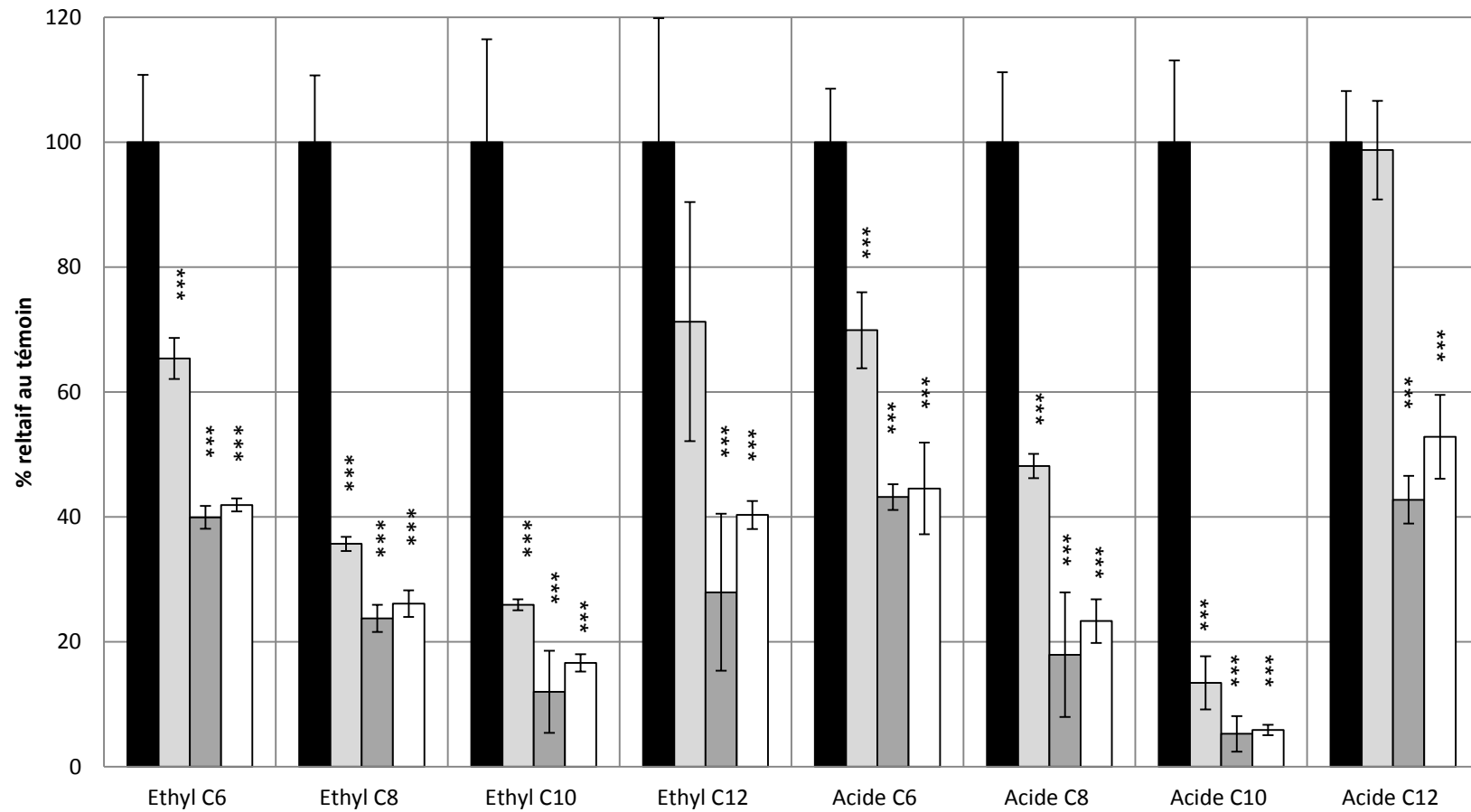


Figure 9 : Effet de la délétion des gènes *EEB1*, *EHT1* et *YMR210w* sur la concentration en ester éthyliques et en acides gras (YPG8% fond FY)

■ *FY* sauvage $n=3$ ■ *FY*Δ*EEB1* ■ *FY*Δ*EEB1*,Δ*EHT1* ■ *FY*Δ*EEB1*,Δ*EHT1*,Δ*YMR210w* *** : p -value < 0,001 test de Dunett (témoin = *FY* sauvage)

2.3. Etude de l'impact de la délétion du gène *EEB1* dans une souche œnologique (V5) et dans une souche de laboratoire (BY) sur milieu YPG

Nous avons vu précédemment que les souches S288c et 59a montraient des différences dans leurs capacités à synthétiser les acides gras à chaînes moyenne et leurs esters. De plus il apparaît que la délétion du gène *EEB1* dans un fond génétique de type FY (=BY=S288C= souche de laboratoire) conduise à des baisses de production des AGMC. Il nous a donc paru important de vérifier si la délétion de *EEB1* avait le même effet dans le fond V5 (souche œnologique). Pour cela, la cassette de délétion du gène *EEB1* a été amplifiée à partir de l'ADN génomique de la souche BY Δ *EEB1* de la collection EUROSCARF, la levure V5 a été transformée par LiAc, et les disruptants ont été sélectionnés sur milieu supplémenté en G418.

Les souches BY et V5 ont été utilisées dans cette expérience. Nous avons comparé la production d'acides gras à moyennes chaînes et de leurs esters entre les souches sauvages (wt) ou délétées (Δ) du gène *EEB1*, sur milieu YPG 8%. Une modalité supplémentaire a été rajoutée à cette expérience, une dose de 17,2mg/L (0,1mM) d'acide décanoïque a été ajoutée dans le milieu au début de la fermentation. Cette concentration a été choisie car elle est proche de celle susceptible de bloquer la fermentation œnologique [102]. Les expériences sont réalisées comme précédemment, en duplicata. Le milieu YPG 8% n'étant pas comparable à un vin, les données de calibration n'ont pas été utilisées. Les surfaces de pic de chaque composé ont été corrigées par le témoin interne et exprimées en pourcentage par rapport au témoin sauvage.

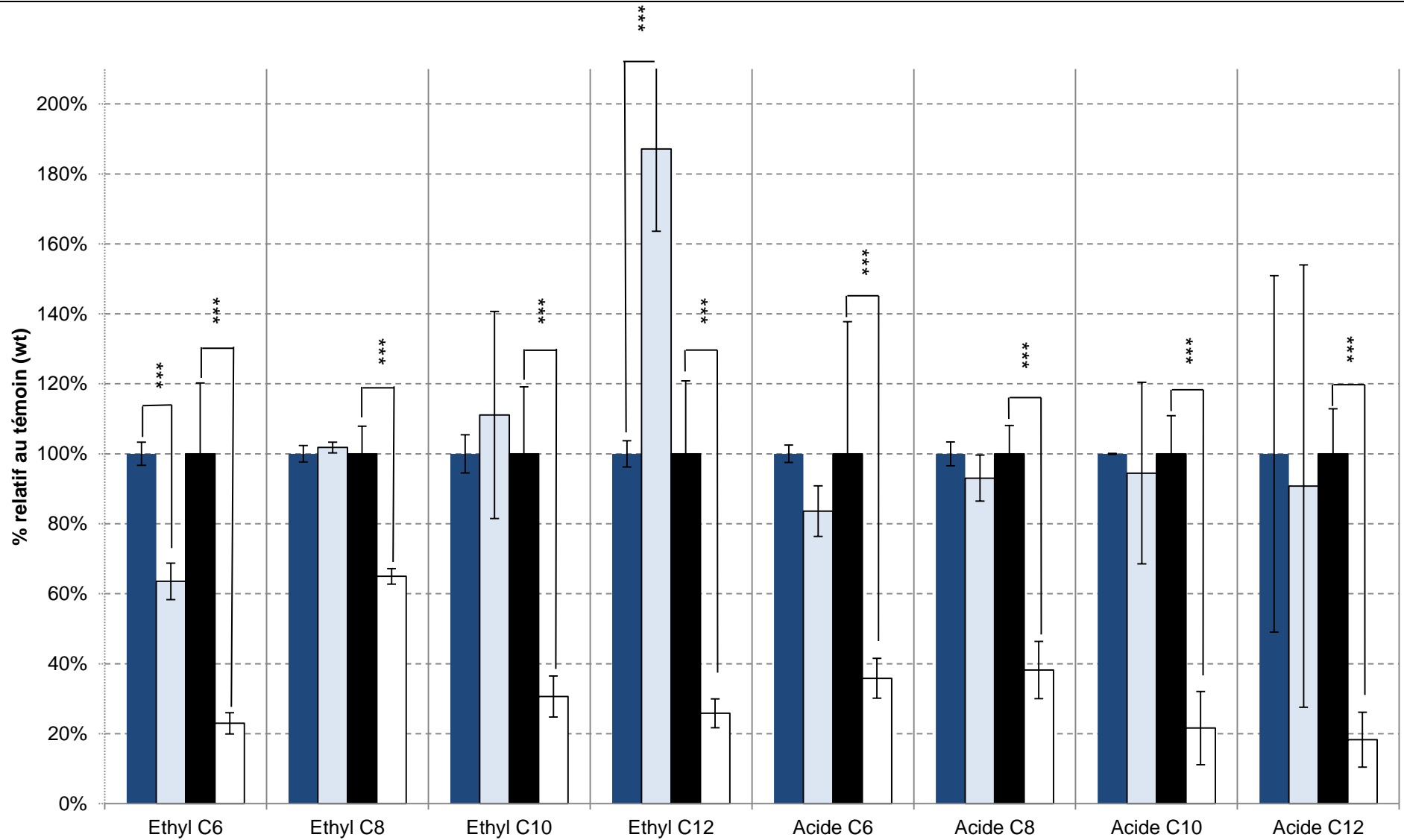


Figure 10 : Effet de la délétion du gène *EEB1* sur la concentration en esters éthyliques et en acides gras (milieu YPG 8% ; pas d'ajout d'acide décanoïque ; n=2) ; ■ *V5 sauvage*, ■ *V5 Δ EEB1*, ■ *BYsauvage*, □ *BY Δ EEB1*, *** *p-value*<0,001 *t-test* rejetant l'égalité

On constate que la délétion du gène *EEB1* conduit à une diminution de la production d'éthyl hexanoate quelle que soit la souche considérée. Dans un fond BY la délétion du gène *EEB1* réduit clairement la concentration en esters éthyliques et en acide gras à moyennes chaînes. En revanche, la délétion du même gène dans le fond génétique de la souche œnologique V5 a très peu d'effet sur la production des AGMC et leurs esters (Figure 10).

Pour vérifier ces données, l'expérience a été répétée avec un ajout de 0,1mM d'acide décanoïque.

Pour les deux fond génétiques considérés, l'ajout d'acide décanoïque à 0,1mM conduit à une augmentation de la concentration finale en éthyl décanoate et acide décanoïque (Figure 11). En revanche, on note une baisse généralisé dans la production d'AGMC et d'éthyl ester due à l'ajout d'acide décanoïque (à l'exception des composés en C10). La délétion du gène *EEB1* conduit à une baisse encore plus forte de la concentration en acide décanoïque dans le cas de la souche BY mais curieusement pas dans le cas de la souche V5. Il semble que la délétion du gène *EEB1* n'ait que peu d'effet sur la production des esters et des AGMC pour la souche V5 à l'exception de la production d'éthyl hexanoate.

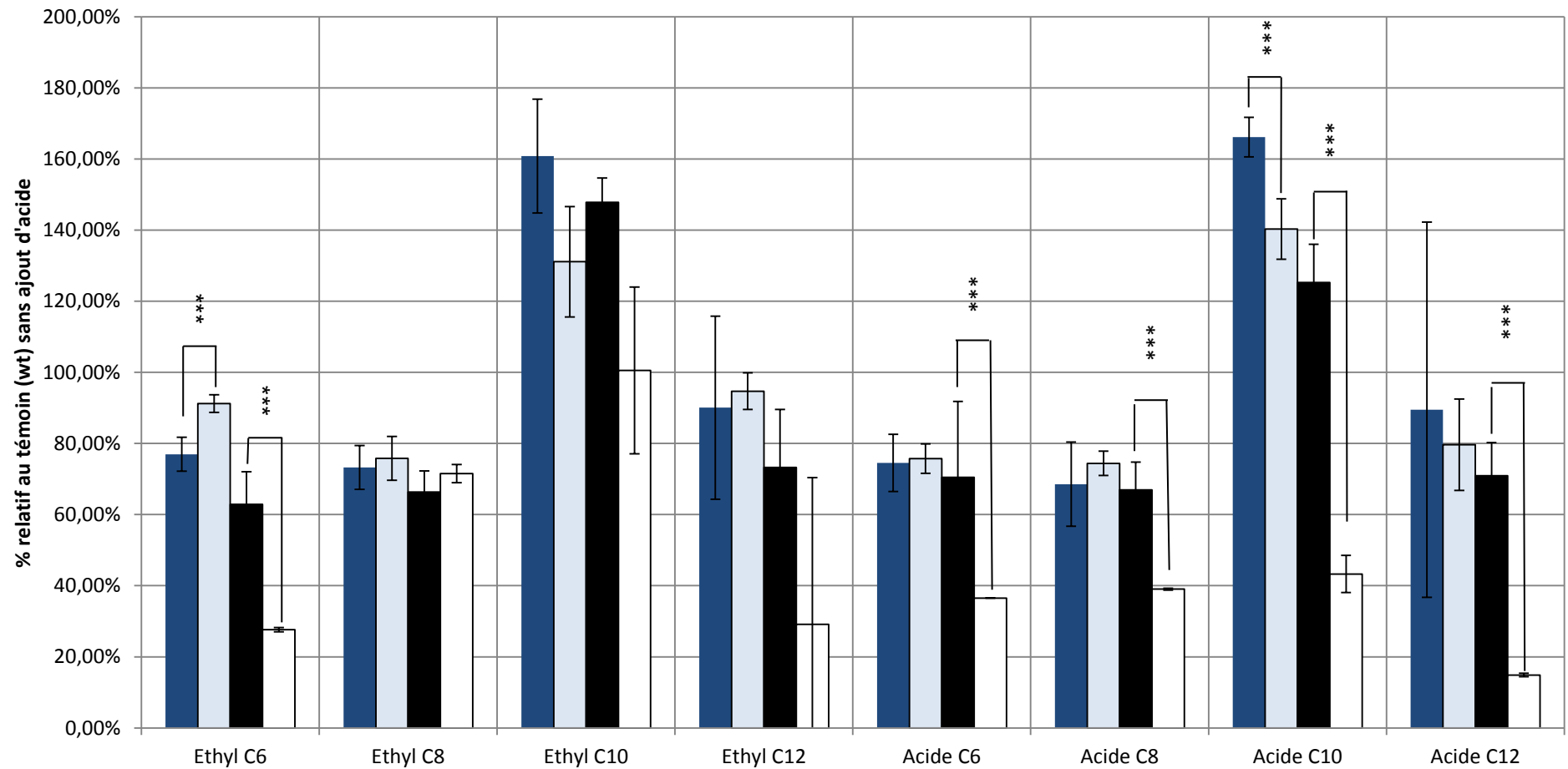


Figure 11: Effet de la délétion du gène *EEB1* sur la concentration en esters éthyliques et en acides gras (milieu YPG 8% ; ajout d'acide décanoïque = 0,1mM ; n=2), ■ V5 sauvage, ■ V5 Δ EEB1, ■ BYsauvage, □ BY Δ EEB1 *** p-value<0,001 t-test rejetant l'égalité

Si l'on considère les données brutes exprimées en surface de pic (données non montrées), on constate que la souche V5 produit en fait beaucoup moins d'acide octanoïque et décanoïques dans le milieu que la souche BY. Cela permettrait d'expliquer pourquoi l'effet du gène *EEB1* est peu visible en YPG 8%. En effet ce milieu est très riche, il peut alors cacher des mécanismes liés au stress et au temps de fermentation. Ces données nous ont amenés à changer de milieu afin de pouvoir évaluer l'impact du gène *EEB1* en condition œnologique sur la souche V5.

2.4. Impact de la délétion du gène *EEB1* en conditions œnologiques

Lors des expériences de transcriptome réalisées par l'équipe œnologique de l'INRA de Colmar et de Montpellier, il a pu être constaté que le gène *EEB1* était le gène le plus induit par l'acide décanoïque [105]. L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette activation était que la levure détoxifiait l'acide décanoïque en le transformant en décanoate d'éthyle. Les expériences présentées ci-dessus montrent que l'activité de *EEB1* n'est pas celle présumée : en effet, la délétion de *EEB1* conduit également à une baisse des acides gras produits dans un fond BY (laboratoire). L'effet de la délétion du gène *EEB1* est moins visible dans une souche œnologique, mais nous avons aussi observé que cette dernière produisait moins d'acide décanoïque que la souche de laboratoire. Nous avons donc décidé de conduire des fermentations dans un milieu de type MS300 pauvre en facteurs anaérobies (milieu synthétique mimant le goût de raisin) en ajoutant au milieu de cultures de l'acide décanoïque afin de favoriser l'induction du gène *EEB1* et de rendre ainsi plus visible son effet.

Les surnageants de ces fermentations ont été analysés par SBSE-LD-GC-MS comme précédemment, la cinétique de fermentation est représentée Figure 12, les résultats sont indiqués Figure 13 et Figure 14.

Figure 12: L'ajout d'acide décanoïque dans des cultures de souches œnologiques V5 sauvage et *V5ΔEEB1* conduit à un retard dans le début de la fermentation. Ce retard est dose-dépendant. La présence ou l'absence du gène *EEB1* ne semble pas affecter ce lag bien que la souche délétée du gène *EEB1* semble avoir un retard légèrement plus long (entre 12h à 24h, suivant les répétitions, données non montrées).

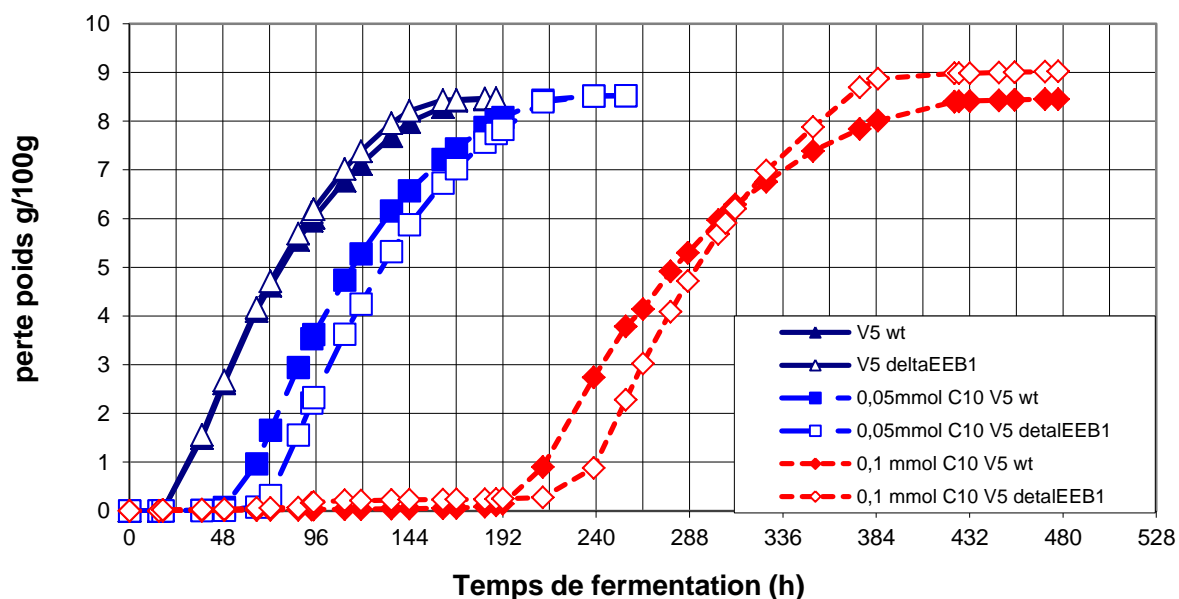


Figure 12 : cinétique de fermentation des souches V5 et V5 Δ EEB1 en fonction de l'ajout d'acide décanoïque 0 ; 0,05mM ; 0,1mM (n=1)

L'ajout de 0,1mM d'acide décanoïque entraîne une fermentation plus longue (10 jours contre 8 jours en absence d'acide décanoïque).

Figure 13: Comme nous avons déjà pu l'observer dans l'expérience précédente, l'addition d'acide décanoïque provoque une baisse de l'éthyl C6 produit mais aussi des acides gras à moyennes chaînes. Dans les conditions œnologiques, cet effet semble cependant beaucoup plus fort qu'en YPG (facteur 5 en MS300 contre un facteur 2 dans l'expérience sur YPG).

Lorsque le gène *EEB1* est délété, il y a également une baisse de la production d'éthyl C6. L'ajout d'acide décanoïque entraîne une baisse de la production de l'acide octanoïque et de l'ester éthylique correspondant. Lorsque le gène *EEB1* est délété et que l'on ajoute de l'acide décanoïque, il semble y avoir une légère augmentation de la concentration en éthyl C6, C8 et acide C8.

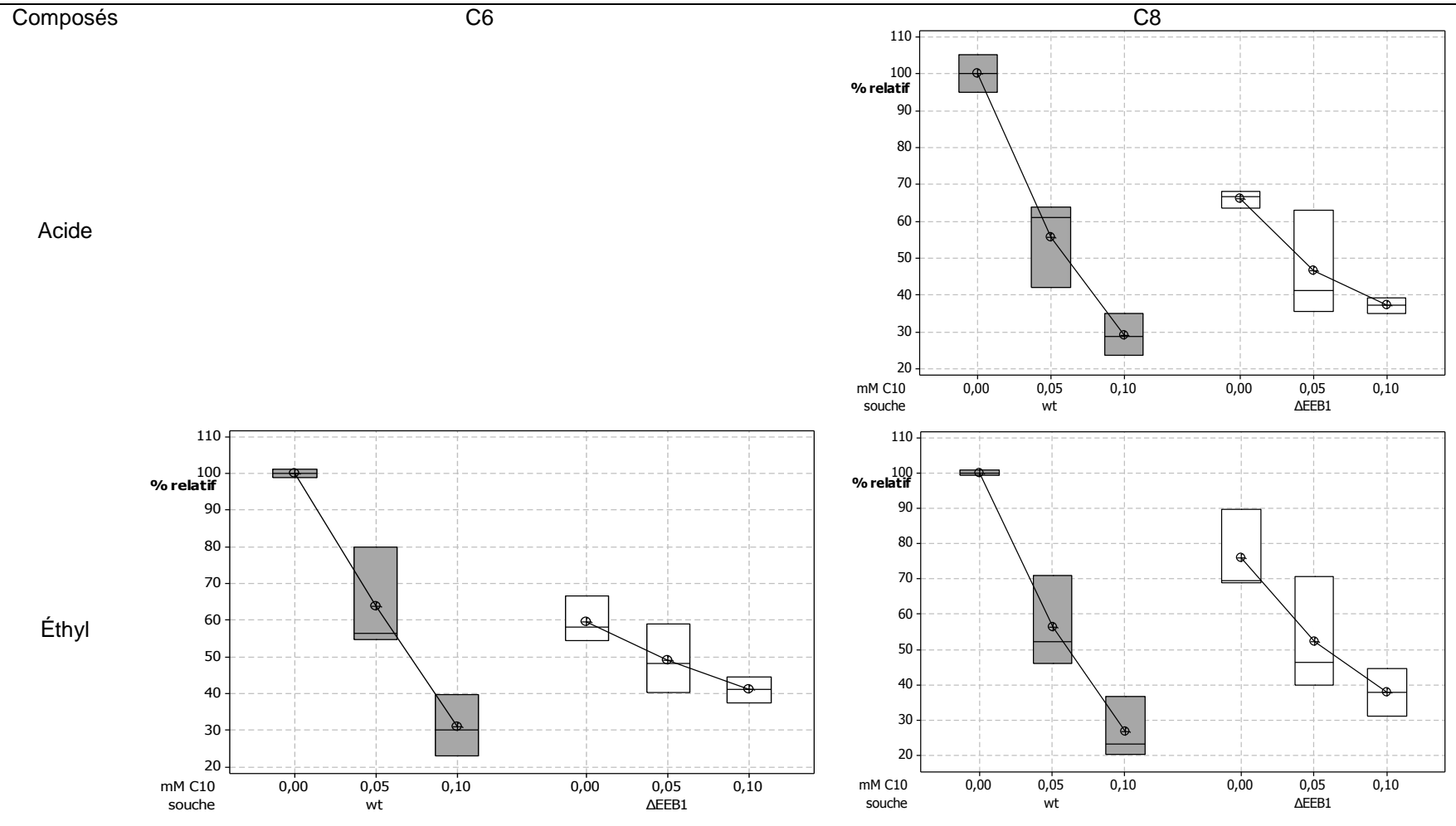


Figure 13 : Effet de l'ajout d'acide décanoïque sur la production d'AGMC et d'ester d'AGMC à 6 et 8 carbones sur les souches *V5* sauvage et *V5ΔEEB1*; surface de pic exprimé en % relatif au témoin *V5* sauvage sans ajout d'acide décanoïque (n=3)

Figure 14 : Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, l'ajout d'acide décanoïque ne conduit pas à une augmentation de la concentration en acide décanoïque dans le milieu en fin de fermentation, ni même une augmentation de l'éthyl décanoate. Il semble donc que le mécanisme de détoxification ne passe pas uniquement par la voie de l'estérification ce qui confirme les conclusions précédentes. L'évolution de la concentration en acide dodécanoïque en fonction de l'ajout d'acide décanoïque semble plus confuse et pourrait remettre en cause une éventuelle détoxification de l'acide C10 par élongation. Pourtant l'éthyl dodécanoate correspondant a un comportement similaire aux esters éthyliques.

La délétion du gène *EEB1* conduit elle aussi à une diminution de la production des AGMC et des esters correspondant. L'ajout d'acide décanoïque dans cette situation conduit à exacerber cet effet sauf pour l'acide décanoïque et l'éthyl décanoate.

Cependant on constate que l'effet de l'acide décanoïque sur la concentration en AGMC et en ester éthyliques semble moins fort que dans le cas du sauvage, en effet les baisses (représentées par la droite liant les moyennes) bien que dose-dépendantes sont plus faibles que dans le cas du sauvage. Ainsi lorsque l'ajout d'acide décanoïque est maximal, le délétant *EEB1* produit plus d'acide octanoïque et décanoïque et plus d'éthyl hexanoate et octanoate que le sauvage. Ces données laissent présager des mécanismes complexes pour lesquels un travail supplémentaire est nécessaire et est en cours.

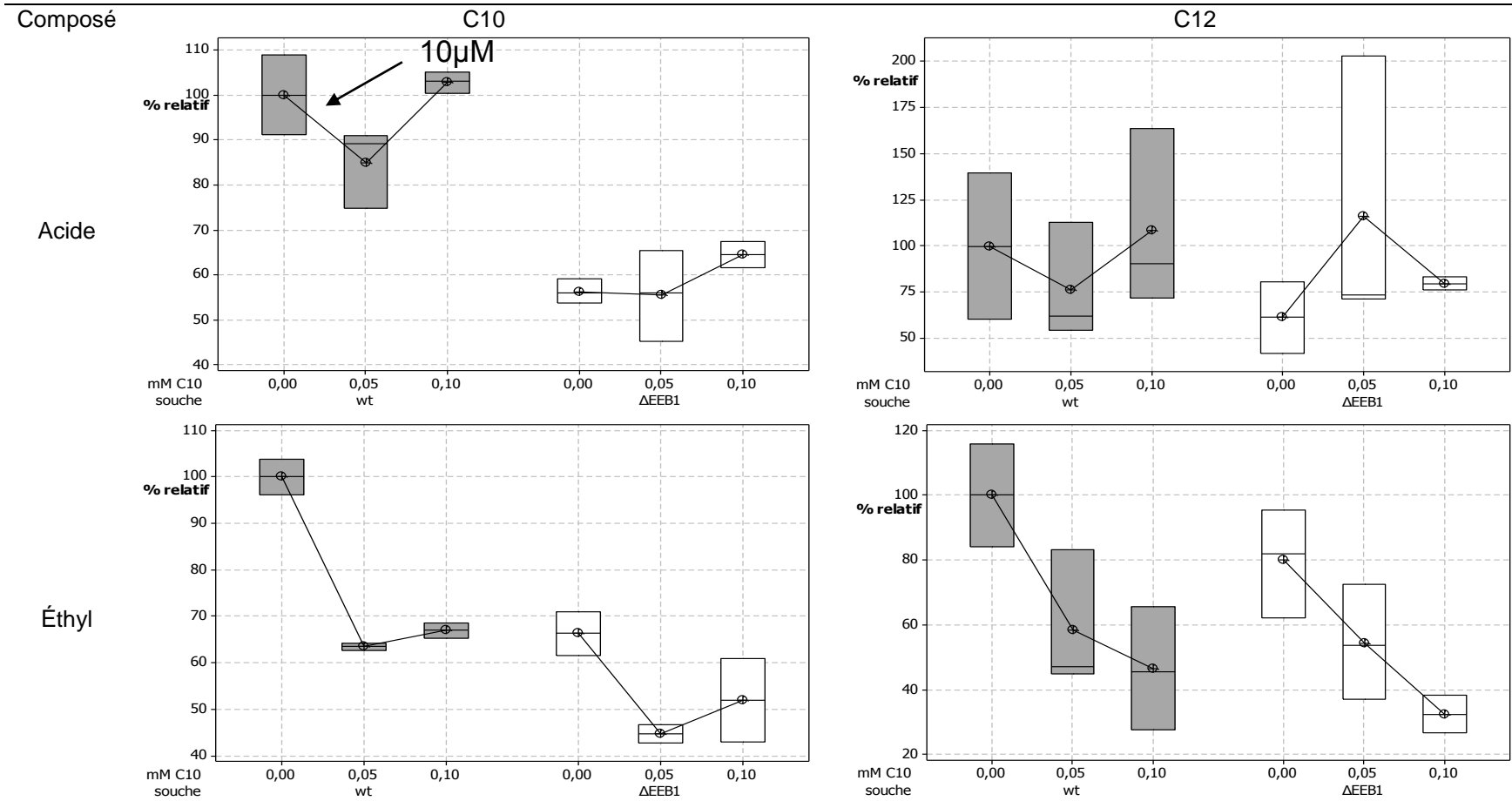


Figure 14 : Effet de l'ajout d'acide décanoïque sur la production d'AGMC et d'ester d'AGMC à 10 et 12 carbones sur les souches V5 sauvage et V5ΔEEB1 ; surface de pic exprimée en % relatif au témoin V5 sauvage sans ajout d'acide décanoïque (n=3)

Curieusement l'ajout d'acide décanoïque dans le milieu ne conduit pas à une augmentation de la concentration de ce dernier dans le milieu, on constate même l'inverse, plus la dose d'acide décanoïque est importante moins il y a d'acide décanoïque dans le milieu ce qui n'était pas le cas dans le milieu type YPG 8%.

Puisque l'élongation de cet acide semble marginale et que la détoxification de l'acide décanoïque ne passe pas, dans notre situation, par la synthèse d'éthyl décanoate, il doit exister une voie alternative de détoxification. En effet comment expliquer que l'ajout de 0,1mM d'acide décanoïque conduise à une concentration finale en acide qui soit de l'ordre de 10 μ M ?

L'utilisation de la SBSE-LD-GC-MS permet de mesurer d'autres composés que ceux présentés ci-dessus. Le décanol est l'un d'entre eux et a tout particulièrement attiré notre attention.

On note une production plus forte de 1-décanol dans le milieu lorsque le gène *EEB1* est délété, et ceci en présence et absence d'ajout d'acide décanoïque. L'ajout d'acide décanoïque en absence de gène *EEB1* conduit à une production plus forte de 1-décanol dans le milieu (Figure 15) ce qui pourrait indiquer que la réduction de l'acide décanoïque en décanol serait une autre voie de détoxification.

Dans nos conditions d'étude le 1-décanol n'a pas été calibré, mais l'on peut utiliser la courbe de calibration du géranol (alcool à 10 atomes de carbones) pour donner une concentration de ce composé.

On constate alors que la concentration en 1-décanol dans le milieu est de l'ordre du 1 μ M alors que l'ajout d'acide décanoïque est de 0,1mM (100 μ M). La conversion de l'acide décanoïque en décanol est donc très faible. On peut malgré tout évoquer le fait que le décanol mesuré à l'extérieur n'est pas forcément celui produit par la levure, les alcools primaires étant très lipophiles ils peuvent rester piégés dans la membrane de la levure. On notera également que le décanol fait partie des alcools primaires les plus toxiques pour la levure [123], ce qui semble peu compatible pour une détoxification de l'acide décanoïque.

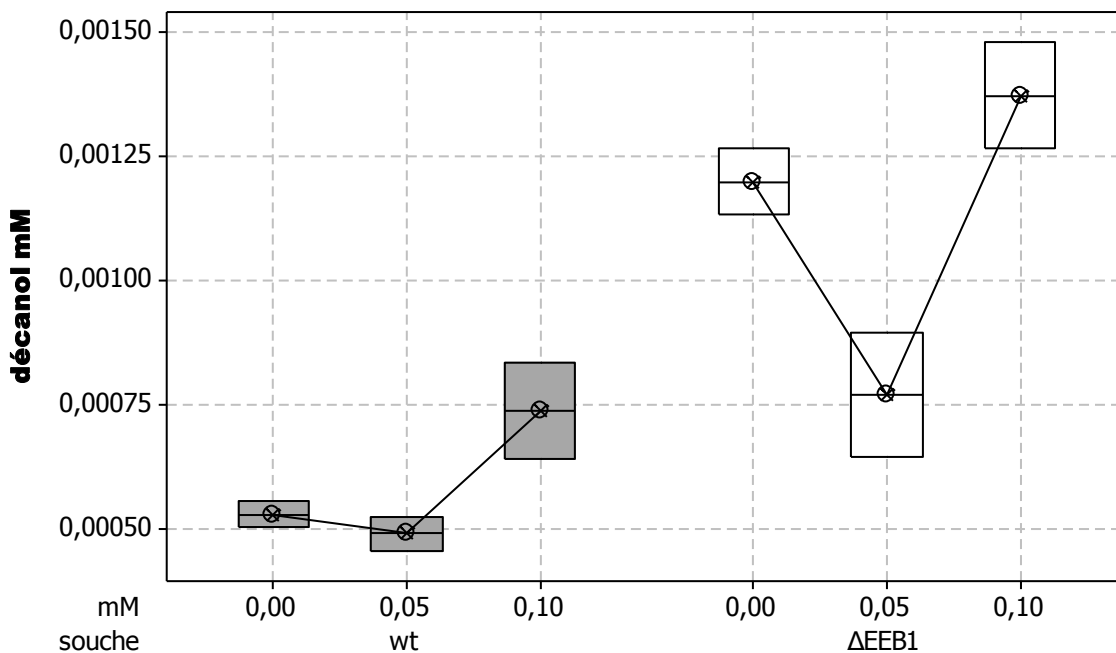


Figure 15 : Effet de l'ajout d'acide décanoïque sur la production de décanol sur les souches V5sauvage et V5 $\Delta EEB1$ (concentration obtenues à partir de la courbe de calibration du décanol) (n=3)

2.5. Effet de l'allèle œnologique vs laboratoire dans un fond génétique homogène

2.5.1. Polymorphisme du gène *EEB1*

Au vu de la différence de comportement des souches de laboratoire et de la souche œnologique V5, nous avons décidé d'étudier le polymorphisme du gène *EEB1*. Un alignement (Figure 16) des deux versions du gène *EEB1* (S288C et EC1118 (parent de la souche V5)) montre qu'il existe deux mutations non synonymes, une lysine en arginine en position 31 et une sérine en asparagine en position 436. Pour s'assurer que ce polymorphisme était conservé dans notre cas, nous avons séquencé le gène *EEB1* de la souche V5 ce qui a permis de montrer qu'il était identique à la séquence du gène *EEB1* de la souche EC1118.

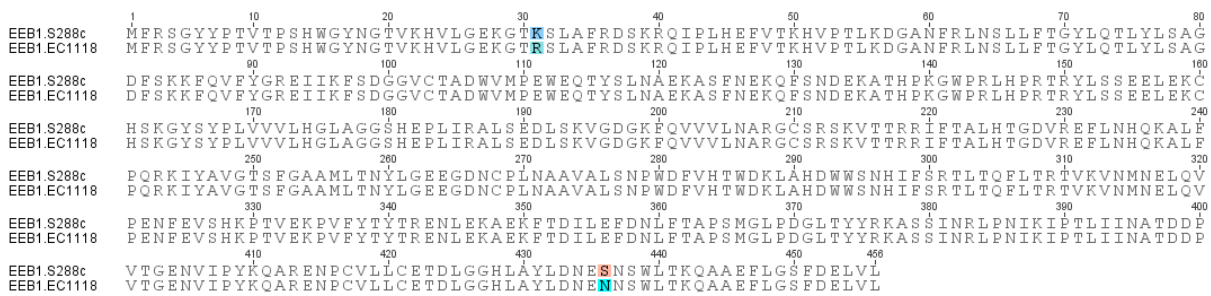


Figure 16 : Alignement de *EEB1.S288c* et *EEB1.EC1118*

La levure est un outil qui permet d'étudier l'influence du polymorphisme de deux gènes par hémizygotie réciproque. Pour cela il faut disposer des souches haploïdes délétées chacune du gène à étudier, mais également que ces dernières soient de signes sexuels opposés ce qui est le cas des souches BY (*MAT a*) et V5 (*MAT α*)

Les souches *V5ΔEEB1* et *BYΔEEB1* disponibles, il est alors possible de réaliser deux hémizygoties diploïdes en croisant les souches suivant le tableau ci-dessous :

Tableau 16 : matrice de croisement pour l'étude des allèles du gène *EEB1*

Souches (1n)		Souches hémizygoties (2n)	Allèle fonctionnel de l'hémizygotie
<i>BY4741ΔEEB1</i>	V5sauvage	<i>BY4741ΔEEB1</i> xV5	<i>EEB1.V5</i> (œnologique)
<i>BY4741sauvage</i>	<i>V5ΔEEB1</i>	<i>BY4741sauvage</i> x <i>V5ΔEEB1</i>	<i>EEB1.BY4741</i> (laboratoire)

Ces deux souches ont été mises en fermentation (n=3) dans du YPG 8% et les concentrations en composés volatils ont été mesurées en fin de fermentation.

Après analyse statistique (t-test) comparant les concentrations d'AGMC et des esters éthyliques en fonction de l'allèle du gène *EEB1*, on constate que l'allèle du gène *EEB1.V5* conduit à une production plus forte d'éthyl décanoate que l'allèle *EEB1.BY* (expliquant 66,62% de la variabilité observée, p-value=0,03) (Figure 17).

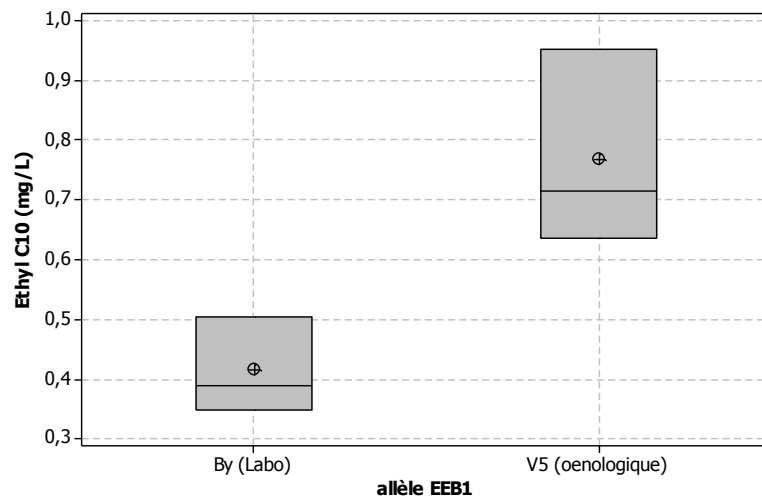


Figure 17 : Effet de l'allèle *EEB1* sur la concentration en éthyl décanoate en milieu MS300 1% de FA (n=3)

Cette observation est concordante avec les comparaisons de « taux de transformation » acide/ester réalisées plus haut qui montraient déjà que la souche œnologique avait un meilleur taux de transformation de l'acide décanoïque en éthyl décanoate que la souche de laboratoire.

3. Conclusion du chapitre I

Ce travail confirme le rôle du gène *EEB1* dans la production d'esters éthyliques en conditions fermentaires, mais montre également que ce gène est fortement impliqué dans la production d'acide décanoïque. Ces données sont difficilement interprétables car ce gène est supposé participer à la détoxification de l'acide décanoïque. Les mécanismes de cette détoxification n'ont pas pu être élucidés bien que des pistes soient évoquées (formation de décanol).

La protéine Eeb1p ne semble pas avoir de localisation précise pourtant il a été annoncé qu'elle se trouverait dans le peroxisome (communication personnelle S.Saerens ISSY août 2009). Cette donnée, si elle est confirmée, conduirait à remettre en cause la véritable fonction de ce gène. En effet, dans un contexte fermentaire, le peroxisome n'est pas un organite actif. Compte tenu de ses homologies fortes avec des lipases et du fait que sa délétion ne permette pas à la levure de pousser sur glycérol [124] Eeb1p doit avoir d'autres fonctions plus complexes que l'estérification d'un acide carboxylique par l'éthanol. Enfin, l'étude du polymorphisme du gène *EEB1* permet de montrer qu'il existe un allèle fort producteur d'éthyl décanoate (œnologique) et un allèle faible producteur (laboratoire), cette différence étant liée à seulement deux mutations dans la séquence protéique.

Chapitre II : Recherche de QTL impliqués dans la synthèse de composés volatils

1. Introduction générale

Le chapitre ci-dessous présente les résultats de la recherche de QTL impliqués dans la concentration en composés volatils dans un milieu de fermentation de type MS300, suivant 3 dispositifs expérimentaux différents. Dans ces 3 dispositifs, 30 ségrégants issus du croisement entre les souches S288C (souche de laboratoire) et 59a (souche œnologique spore de EC1118) ont été utilisés. Chaque souche est génotypée par hybridation de son génome sur une puce Comparative Genome Hybridization (CGH) ce qui permet d'obtenir une carte à haute densité de marqueurs et de compenser le faible nombre de souches. Les analyses QTL sont réalisées sous J/QTL qui est une interface graphique de R/QTL. Pour chacun des QTL identifiés une recherche de gène candidat a été entreprise et des validations par délétion et/ou échange d'allèle ont été effectuées. L'approche génétique de recherche de QTL est à opposer à l'approche « gène candidat » présentée dans le chapitre I et IV.

1.1. Souches de levures

Les souches de levures utilisées dans ce chapitre sont les ségrégants issus du croisement entre la souche S288c (souche de laboratoire) et la souche 59a (souche œnologique). Ces 30 ségrégants ont été génotypés par puces CGH permettant d'obtenir une carte génétique à très haute densité contenant 1835 marqueurs polymorphes répartis sur 13,1 millions de paires de bases du génome de la levure Figure 18. Ce travail a été réalisé par I.Sanchez et C.Ambroset (ENSAM Montpellier) pour son travail de doctorat. Le jeu de souches nous a aimablement été transmis pour les besoin de cette thèse.

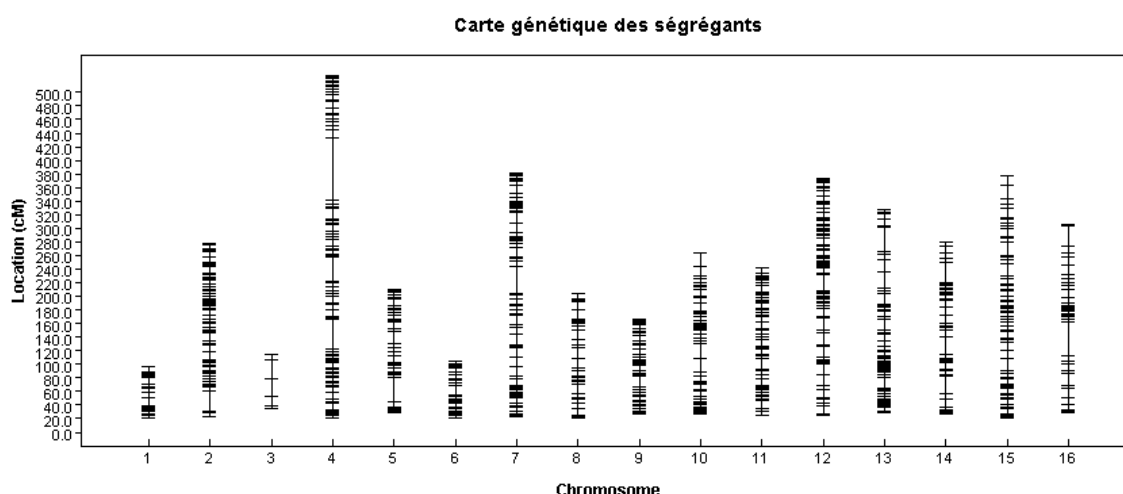


Figure 18 : Carte génétique des 30 ségrégants

1.2. L'approche QTL (quantitative trait loci)

La stratégie de recherche de QTL a été présentée par Sax dès 1923, pourtant elle ne sera vraiment utilisée et appliquée que vers la fin des années 1980 grâce aux développements des techniques de biologie moléculaire. En effet, la puissance de cette approche se révèle pleinement lorsqu'il devient possible de réaliser des cartes génétiques en positionnant des marqueurs polymorphes. Ceux-ci peuvent être de différents types, (micro satellites, RFLP, AFLP...). Le récent séquençage d'organismes modèles et le développement des puces à ADN ont permis d'augmenter la densité et la précision des marqueurs sur ces organismes, c'est tout particulièrement le cas chez la levure [125-127].

La stratégie de recherche de QTL consiste à comparer des données observées quantifiables (le phénotype) à celles d'un modèle explicatif fondé sur l'effet de chaque marqueur.

Cette stratégie permet de proposer des marqueurs génétiques impliqués dans la variation du phénotype mesuré. Par la suite, ces marqueurs permettent de localiser et d'encadrer une région du génome susceptible de jouer un rôle dans le phénotype observé. La précision de cette localisation dépend de la densité des marqueurs et du nombre d'individus inclus dans la population génotypée et phénotypée. En somme, cette recherche permet d'identifier une zone génomique plus ou moins grande permettant d'expliquer la variabilité d'un phénotype donné voire d'identifier une zone

chromosomique suffisamment petite pour localiser un gène (on parle de Quantitative Trait Gene) et ses mutations impliquées dans les phénotypes observés.

La recherche de QTL nécessite la présence de deux types de matrices, une matrice génétique (dans notre cas, chaque souche est génotypée pour un marqueur donné, on sait ainsi pour le-dit marqueur s'il est d'origine œnologique (59a) ou de laboratoire (S288c)) et une matrice phénotypique, (la concentration d'une molécule donnée (dans notre cas une molécule volatile) obtenue pour chaque souche). Il existe plusieurs logiciels permettant d'effectuer des recherches QTL [128-130], de même il existe plusieurs méthodes pour effectuer les recherches de QTL [131-133]. Dans notre situation nous avons choisi d'utiliser le logiciel R [89] avec le package R/QTL [128] et son interface graphique J/QTL, la méthode de régression retenue est celle de Haley-Knott [134]. On notera cependant que tous les QTL identifiés ont été validés avec deux autres méthodes (l'ANOVA et la régression de type « Multiple Imputation »).

Notre jeu de donnée à l'avantage de pouvoir permettre une localisation extrêmement précise du QTL identifié car la carte génétique est très dense (1835 marqueurs), en revanche, le faible nombre d'individus (30) ne permet pas de détecter facilement plusieurs QTL qui pourraient être en interaction par exemple (cf plus loin).

Cette stratégie a déjà été utilisée et a prouvé sa robustesse chez la levure pour identifier différents QTL impliqués dans divers phénotypes à partir de croisements de souches variées et dans différents contextes (Tableau 17).

Tableau 17 : Exemple d'études ayant utilisé la stratégie des QTL chez la levure

Croisement des souches	Phénotypes testés	référence
Œnologique x laboratoire	tolérance à l'éthanol, production d'acidité volatile et H ₂ S	[135-137]
Œnologiques x laboratoire	Paramètres fermentaires et QTL d'expression	[138]
Œnologique x laboratoire	e-QTL, "clump"	[139,140]
Laboratoire x saké	paramètres fermentaires, arômes	[141]
Multiplés origines	sporulation	[127,142]
Laboratoire x Laboratoire	tolérance à l'éthanol	[143]
Multiplés origines	croissance à hautes températures	[144]

1.3. Calcul de l'héritabilité

L'héritabilité d'un caractère mesure la part de la variabilité d'origine génétique par rapport à la variabilité totale ou variabilité phénotypique. Elle permet d'évaluer la part du déterminisme génétique apporté par un résultat expérimental.

La variance totale Var_{tot} que l'on observe en calculant la variance totale du paramètre évalué pour les ségrégants se décompose en la somme de deux variances, la variance environnementale (ou expérimentale) Var_{exp} estimée par les erreurs de mesures et la variance génétique $Var_{géné}$ déterminée par l'expression des différents allèles chez les individus observés.

$$Var_{tot} = Var_{géné} + Var_{exp} \text{ ce qui s'écrit également } Var_{géné} = Var_{tot} - Var_{exp}$$

L'héritabilité ne dépend que de $Var_{géné}$ et de Var_{tot} .

Une bonne estimation de Var_{exp} est de pooler les variances des deux souches parentales.

$$Var_e = \frac{(n_{S288c} - 1)Var_{S288c} + (n_{59A} - 1)Var_{59a}}{n_{S288c} + n_{59A} - 2}$$

Ainsi l'héritabilité devient

$$H^2 = \frac{Var_{tot} - Var_{exp}}{Var_{tot}}$$

1.4. Composition des milieux et conditions de fermentations

1.4.1. Pré-culture

Chacun des 30 ségrégants ainsi que les deux souches parentales est mises en pré-culture comme indiqué dans le Matériel et Méthode.

1.4.2. Milieux de fermentation

Pour réaliser la recherche de QTL de composés volatils, 3 dispositifs expérimentaux, appelés A, B et C, ont été utilisés (Tableau 18). La base du milieu est, dans tous les cas, du MS300 qui est un milieu synthétique, mimant le moût de raisin. Il contient des oligo-éléments, des vitamines, des acides aminés et 200g/L de glucose. Dans cette base la concentration en facteur anaérobies a varié (1% ou 100% selon les dispositifs) et du géraniol a été ajouté dans deux des trois dispositifs, afin de mimer le moût de raisin de type Gewurztraminer et d'avoir une information sur le métabolisme de ce dernier. Pour le dispositif B les fermentations ont été réalisées en sans clapet anti-retour et sans agitation.

Tableau 18 : Conditions utilisées dans les différents dispositifs expérimentaux

Conditions	Dispositifs		
	A	B	C
Facteurs anaérobies	1%	1%	100%
Température	20°C	20°C	28°C
Agitation	OUI	NON	OUI
Volume du fermenteur	1L	200mL	1L
Concentration en géraniol (mg/L)	1mg/L	5mg/L	0
Nombre de fermentation réalisées/souche	Minimum 2	2	1

1.4.3. Suivi et arrêt des fermentations

La mise en place et le suivi des fermentations sont réalisés suivant le protocole décrit en Matériel et Méthode. La fermentation est terminée lorsque tout le sucre présent dans le milieu a été transformé en éthanol et CO₂, ce qui correspond ici, à une perte de 9g/100g de milieu pour les 200g/L de sucres utilisés dans nos conditions.

Dans le dispositif A, chaque fermentation a été menée jusqu'à une perte de masse de 9g/100g de milieu.

Dans le dispositif B, toutes les fermentations ont été arrêtées lorsque la première souche a atteint la fin de sa fermentation.

Dans le dispositif C, chaque fermentation a été arrêtée lorsque la perte de masse sur 24h est devenue nulle, quelle que soit la quantité de sucre consommée à ce moment.

1.4.4. Mesures des composés volatils

Les mesures de composés volatils sont réalisées par SBSE-LD-GC-MS comme décrit dans le Matériel et Méthode sur 20mL de milieu de fermentation.

Il a été décidé de travailler en surfaces de pic normalisées par les standards internes dans cette expérience.

1.4.5. Vérification de la distribution des données

La recherche de QTL nécessite un traitement préalable des résultats, afin de vérifier la normalité des valeurs, et éventuellement d'exclure des dispositifs les individus aberrants. Pour réaliser une analyse de variance ou une recherche de QTL il est nécessaire de vérifier au préalable que les valeurs sont distribuées suivant une courbe de Gauss ou loi Normale. Tous les paramètres et tous les phénotypes présentés dans cette thèse ont été testés pour cette hypothèse. On peut vérifier de plusieurs façons la normalité des données, la plus simple étant le contrôle visuel qui se réalise sous Minitab. Un exemple de cette normalité est présenté (Figure 19).

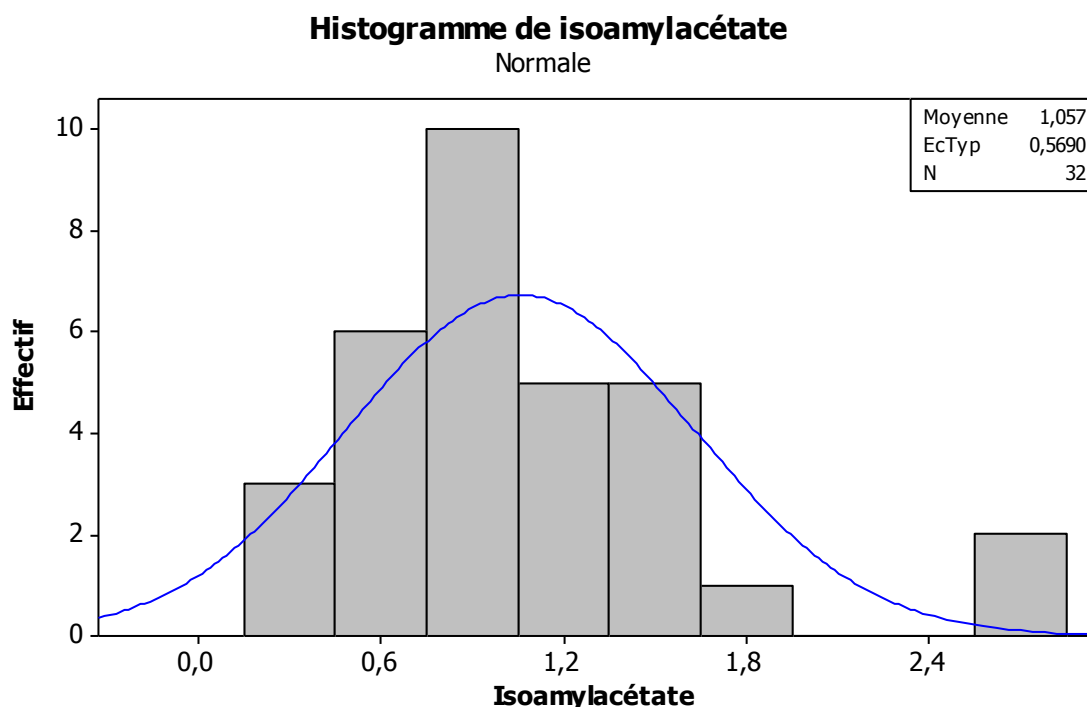


Figure 19 : exemple de distribution « normale » des concentrations relatives en isoamylacétate (dispositif A)

On conclut de ce graphique que la distribution est « normale » c'est-à-dire qu'elle suit une loi normale (ou « gaussienne »). Ce contrôle *de visu* permet de trancher rapidement quant à la normalité ou non des résidus. Nous avons également utilisé pour chaque paramètre, avant la recherche de QTL, un test de Ryan-Joiner proposé par Minitab. Similaire au test de Shapiro-Francia, ce test permet d'obtenir une probabilité correspondant au risque que l'on prend d'affirmer que la normalité est respectée alors qu'elle ne l'est pas et nous a donc permis de vérifier la normalité à un seuil de 0,05 (Figure 20).

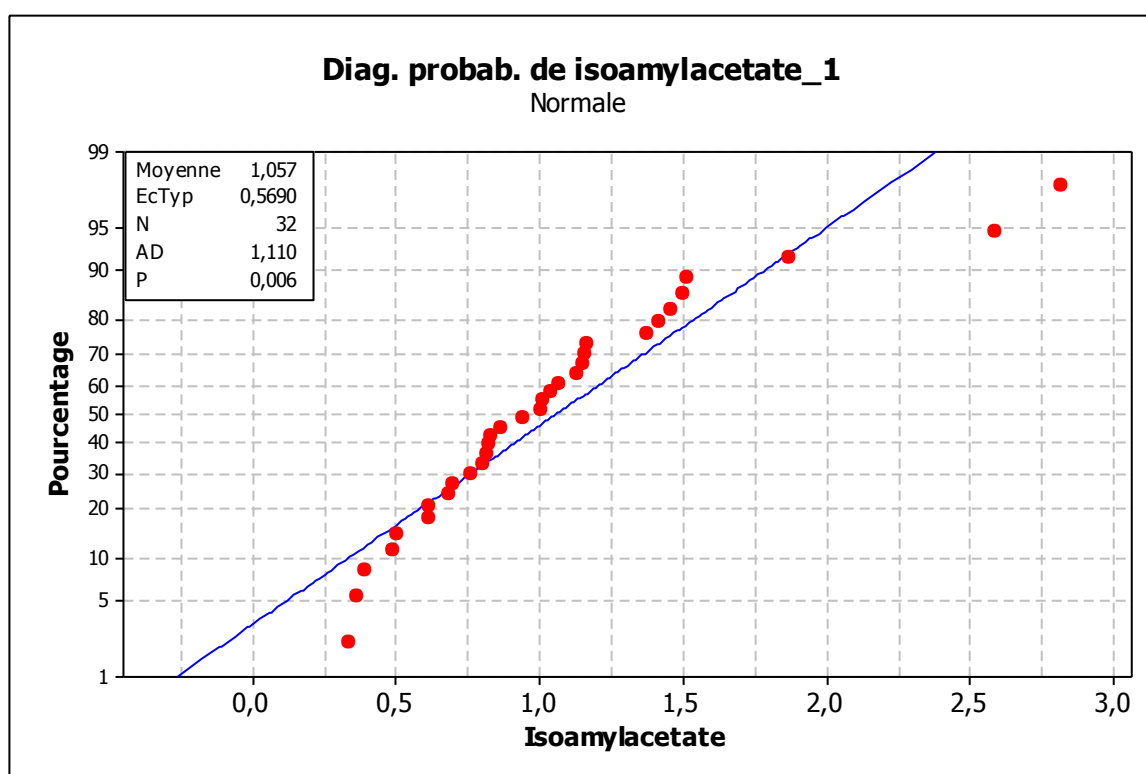


Figure 20 : exemple de test de Shapiro-Francia (ici p-value < 0,006) et exemple d'une autre représentation graphique de la dispersion des valeurs (droite de Henry)

Dans nos expériences la distribution des valeurs phénotypiques suit toujours une courbe gaussienne et respecte donc la normalité. Lorsque l'on se trouve dans une situation dans laquelle ce n'est pas le cas, il doit être envisagé de réaliser des tests « non paramétriques » (type Wilcoxon) comme cela est proposé sous MINITAB et de choisir une régression adaptée lors du paramétrage de R/QTL pour la recherche de QTL.

1.4.6. Analyse en Composantes Principales (ACP)

Des Analyses en Composantes Principales ont été réalisées sur des données des 3 dispositifs en préalable à la recherche de QTL. Cette analyse permet de réaliser une synthèse graphique et apporte certaines informations préliminaires aux traitements et à l'interprétation des données. L'ACP permet d'exprimer graphiquement des liaisons entre plusieurs variables quantitatives. Nous exposons ici, dans les grandes lignes, la construction des ACP réalisée ci-dessous.

La première étape consiste à calculer les coefficients de corrélation entre chacune des variables (=phénotype) prises deux-à-deux. On obtient ainsi une matrice dite de corrélation, cette matrice est symétrique et comporte des 1 sur la diagonale (c'est le coefficient de corrélation qu'il y a entre deux variables identiques (ex : la variation de l'acide décanoïque est corrélée à 100% avec la variation de l'acide décanoïque)). La deuxième étape consiste à représenter chaque variable graphiquement dans un espace orthonormé, choisi de manière à ce que chacun des axes permette de faire apparaître le maximum de variation, *ie*, présente la corrélation maximale avec les variables initiales. Le second axe, est choisi de façon à ce qu'il explique le maximum des variations restantes, totalement indépendantes du premier axe (c'est pour cela qu'il est orthogonal). Enfin le troisième axe est choisi de la même manière, de sorte que les variations soient indépendantes des deux premiers axes. Les variables initiales sont projetées sur les plans factoriels (axes 1 et 2, axes 1 et 3...) résumant ainsi le maximum des variations en un minimum d'axes. Dans notre cas, nous vons choisi de ne représenter les données que sur les deux principaux axes (PC1 et PC2). L'ensemble de cette approche est expliquée plus en détail dans l'ouvrage de Pagès et al [145] aux pages 185 à 202. Le logiciel MINITAB 15.0 est utilisé pour réaliser cette analyse.

2. Résultats

2.1. Production de volatiles par les souches parentales

L'analyse QTL est basée sur l'utilisation de souches présentant des phénotypes différents au niveau des paramètres étudiés. Une étude préliminaire de la production des deux souches parentales a donc été réalisée dans du milieu MS300 1% de facteurs anaérobies (FA) afin de pouvoir comparer les deux souches. La cinétique de production de 25 composés volatils par les souches parentales a été suivie. On notera que la production d'AGMC et d'esters éthyliques de ces souches a été présentée dans le chapitre précédent à la Figure 7 et que celles des esters d'acétate et de leur terpénols correspondant l'est au chapitre IV. A titre d'exemple, la Figure 21 présente ici, les cinétiques de production d'isoamylacétate, d'isoamylalcool, de phényéthyl acétate et de phényléthanol par les souches parentales.

Ces figures permettent de voir que :

- les fermentations des deux souches sont très différentes, la souche œnologique 59a arrivant en fin de fermentation après environ 6j (150h) alors que S288c n'atteint sa fin de fermentation qu'après 12j environ.
- les composés volatiles produits sont également différents, la souche 59a produisant plus d'isoamylalcool, isoamylacétate, phényléthanol et phényléthylacétate que la souche S288c

Les deux souches parentales présentent bien des profils fermentaires différents, ce qui laisse augurer de bonnes chances de détecter des différences de comportement pour les hybrides issus de leur croisement.

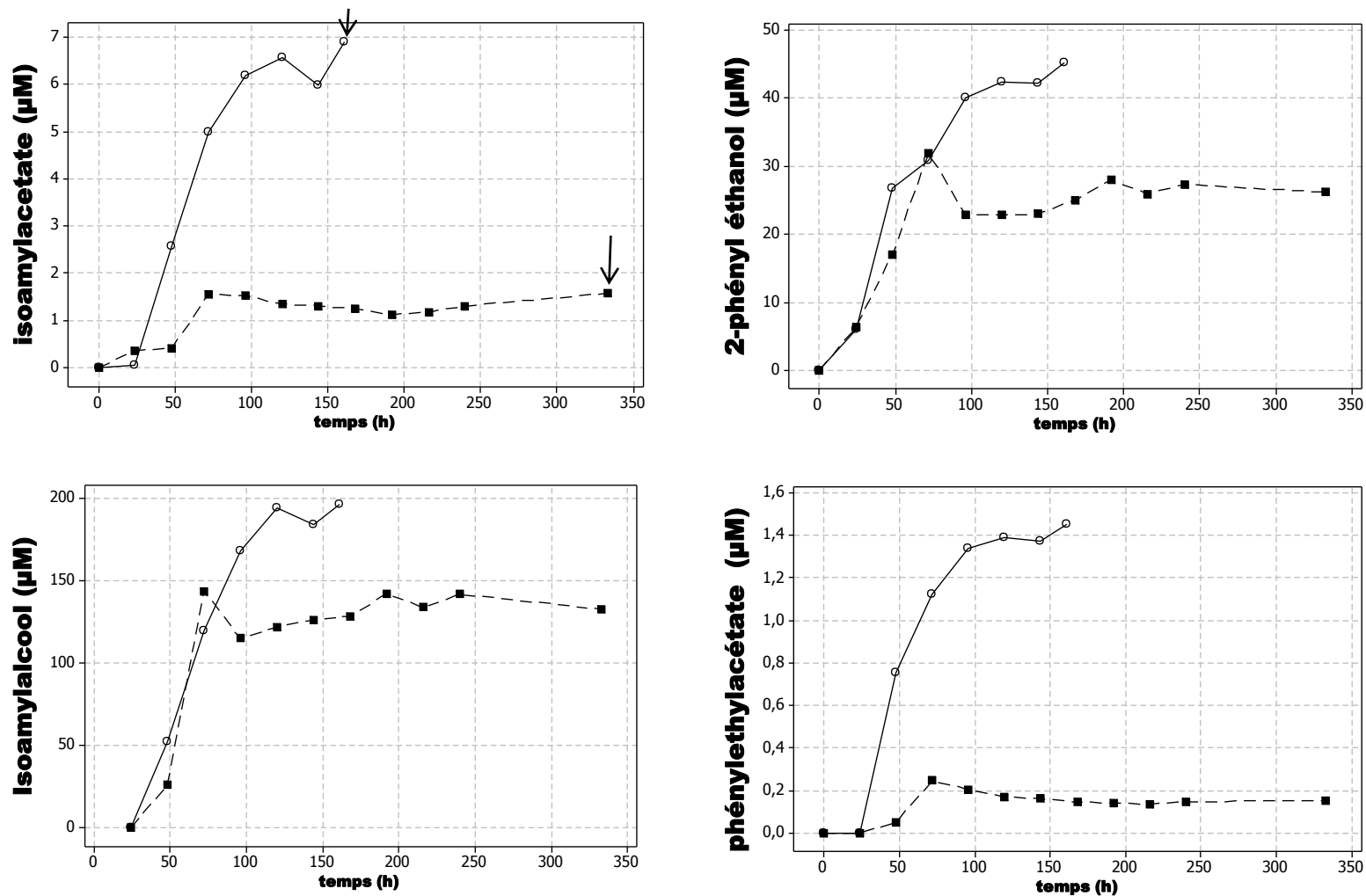


Figure 21 : cinétique de production d'isomaylacétate, d'isoamylalcool, de phényéthyl acétate et de phényléthanol (milieu synthétique MS300 1% FA ; 1mg/L de géranol) avec la souche S288C (carrés noirs) et 59a (ronds ouverts), la fin de la fermentation est indiqué par une flèche

2.2. Analyses préliminaires des résultats

L'analyse QTL nécessite de disposer de jeux de données aussi cohérents que possible, en particulier quand le nombre d'individus analysés est restreint. Par ailleurs, l'analyse des résultats par des moyens statistiques permet de dégager des tendances qui peuvent avoir une signification biologique. Ce premier paragraphe présente les informations issues des analyses préliminaires à la recherche de QTL.

2.2.1. Analyse descriptive du dispositif A

Plan d'expérience

Le **dispositif A** (MS300 1% FA, 1mg/L de géraniol) comprend [30+2 (souches parentales)]*2= 64 fermentations agitées. Les conditions matérielles ne permettaient pas de réaliser en un seul bloc 64 fermentations agitées dans des fermenteurs de 1L, ce dispositif a donc été réalisé en 5 blocs différents, comprenant chacun 10 à 16 fermentations. Les souches parentales S288c et 59a (souches parentales) ont été incluses dans chaque bloc (Tableau 19).

Dans ce dispositif, les fermentations ont été arrêtées individuellement, dès que la perte de masse de 9g/100g était atteinte.

Dans ce dispositif, les 5 blocs ont été traités séparément et il était donc important de pouvoir détecter des variations entre les différents blocs, pour pouvoir les corriger le cas échéant.

Tableau 19 : Plan d'expérience utilisé pour le dispositif A

Bloc1	Souche	Bloc2	Souche	Bloc3	Souche	Bloc4	Souche	Bloc5	Souche
QTL1	16a	QTL2	28b	QTL3	14a	QTL4	20b	QTL5	5a
QTL1	6b	QTL2	25a	QTL3	20a	QTL4	24a	QTL5	S288C
QTL1	6b	QTL2	31b	QTL3	19c	QTL4	22c	QTL5	16d
QTL1	16c	QTL2	7a	QTL3	19c	QTL4	24a	QTL5	16d
QTL1	16d	QTL2	9a	QTL3	18b	QTL4	22c	QTL5	59a
QTL1	16d	QTL2	28b	QTL3	59a	QTL4	22d	QTL5	16a
QTL1	S288C	QTL2	25a	QTL3	S288C	QTL4	20b	QTL5	16a
QTL1	S288C*	QTL2	4c	QTL3	17b	QTL4	59a	QTL5	16b
QTL1	59a*	QTL2	10b	QTL3	18b	QTL4	S288C	QTL5	16b
QTL1	59a	QTL2	7a	QTL3	14b	QTL4	22d	QTL5	16c
QTL1	3a	QTL2	S288C	QTL3	14a	QTL4	22a	QTL5	16c
QTL1	3a	QTL2	31b	QTL3	14b	QTL4	22a	QTL5	1b
QTL1	16b	QTL2	4c	QTL3	17b	QTL4	59a	QTL5	1b
QTL1	16c	QTL2	29c	QTL3	18c	QTL4	19b	QTL5	3a
QTL1	1b	QTL2	10b	QTL3	18c	QTL4	23b	QTL5	3a
QTL1	1b	QTL2	3a	QTL3	20a	QTL4	19b	QTL5	4c
QTL1	16a	QTL2	3a			QTL4	23b	QTL5	4c
QTL1	16b	QTL2	59a			QTL4	59a	QTL5	6b
		QTL2	29c					QTL5	6b
		QTL2	5a					QTL5	7a
		QTL2	9a					QTL5	7a
								QTL5	10b
								QTL5	10b

*ces deux fermentations ont été écartées du plan car la cinétique de production des arômes a été suivie sur ces dernières (prélèvement de 20mL de surnageant/jour).

Recherche d'un effet bloc

L'effet bloc se détecte en comparant les résultats des concentrations de molécules pour une même souche présente dans plusieurs blocs (cas des souches parentales S288C et 59a). S'il n'y a pas d'effet bloc, alors les concentrations de composés volatils pour une souche donnée seront statistiquement identiques dans tous les blocs, à l'inverse lorsqu'il y a un effet bloc, pour une même souche la concentration en composés volatils sera statistiquement différente d'un bloc à l'autre.

Pour évaluer l'effet « bloc » on réalise une ANOVA testant les concentrations des molécules volatiles mesurées avec comme variable explicative, les souches de levure et les blocs. Les effets « souches » et « blocs » sont alors évalués de façon statistique par un test de Fischer, qui rapporte la variation expliquée par la variable explicative à la variation résiduelle, liée aux conditions générales du test. Plus ce nombre est élevé et plus l'effet considéré est important, le R^2 correspond à l'explication de la variabilité par l'effet souche et l'effet bloc. Les résultats des analyses obtenus pour 5 composés

représentatifs de la nature chimique des composés volatils mesurés sont présentés Tableau 20.

Tableau 20 : Résultats des tests ANOVA (Fischer et R²) pour l'isoamylacétate, l'isoamylalcool, l'éthyl octanoate, l'acide décanoïque et le citronellol ; * p-value<0,001**

Composés	Famille chimique	Souches Fischer	Blocs Fischer	R²
Isoamylacétate	Esters d'acétate	19.79***	11.57***	88.31%
Isoamylalcool	Alcool supérieur	3.41***	14.20***	62.45%
Éthyl octanoate	Ester éthylique	4.01***	5.52***	73.30%
Acide décanoïque	AGMC	4.38***	10.11***	64.94%
Citronellol	Terpénol	3.89***	20.11***	69.43%

Ces résultats mettent en évidence un fort effet souche, ce qui était attendu, mais également un fort effet bloc. Cet effet, pourrait être dû à un manque de répétabilité des flash-pasteurisations qui ont été réalisées dans un autoclave à contrôle semi-automatique. En effet, nous n'avons ainsi pas pu nous assurer précisément du temps et de la température de la flash pasteurisation de chacun des blocs. Nous attribuons l'effet bloc à ce manque de répétabilité qui a conduit à une concentration variable de vitamine dans le milieu. Il a en effet été montré que les vitamines sont thermosensibles et que leur concentration dans le milieu de fermentation a un effet sur la production de composés volatils [146].

Cet effet évalué, il est possible de réaliser des corrections. Pour cela, les moyennes de chaque composé pour chaque souche sont recalculées en retranchant l'effet bloc. Ce calcul est réalisé sous MINITAB 15.0. Ce sont donc des moyennes corrigées qui sont utilisées pour réaliser l'ACP et la recherche de mQTL sur chacun des composés de ce dispositif.

Analyse en composante principale

Une analyse des composés volatils produits par toutes les souches incluses dans le dispositif a été réalisée par analyse en composantes principales (ACP) (Figure 22).

La Figure 22 fait apparaître les corrélations qui existent entre les différents composés dosés.

On peut alors diviser les composés ayant des corrélations entre eux en 5 ensembles, respectivement les alcools supérieurs (losanges verts), les terpénols (carrés verts), les

acétates (triangles jaunes), les acides gras à moyennes chaînes (ronds bleus) et les esters éthyliques (triangles jaune).

Les alcools supérieurs (losanges verts) occupent une position relativement centrale, ce qui signifie que leurs variations sont mal représentées dans ce plan factoriel : ils varient de manière indépendante des autres composés ce qui peut s'expliquer par le fait que leur métabolisme (lié aux acides aminés et au métabolisme fermentaire) soit différents des autres composés volatils présentés.

Les terpénols forment un ensemble qui inclut également les sesquiterpénols (farnésol, nérolidol). En revanche, les terpényl-acétates se situent à l'opposé de l'ensemble des terpénols. Cette opposition s'explique par le fait que le pool de terpénols est fini (apporté par le milieu) et commun à toutes les levures. Une levure acétylant peu les terpénols en « laissera » donc davantage sous forme libre dans le milieu. A l'inverse, les fermentations contenant plus de terpényl acétates sont le résultat d'une plus forte activité d'une ou des ester-synthases levuriennes ; conduisant *de facto* à une baisse de la concentration des terpénols libres.

Le cas des alcools supérieurs (isoamylalcool et 2-phényléthanol) et de leurs esters (isoamylacétate et 2-phényléthylacétate) ou encore des acides gras et de leurs esters est un peu différent. En effet, la Figure 22 montre qu'il existe une certaine corrélation entre les précurseurs (alcools, acide gras) et les produits (esters), au contraire du phénomène observé pour les terpénols / terpényl acétates. Ceci s'explique par le fait que les alcools supérieurs et les acides gras sont synthétisés par les levures. Il est donc possible que les différentes souches produisent des concentrations différentes d'alcools et d'acides gras comme on a pu l'observer pour les deux souches parentales S288c et 59a. Contrairement aux terpénols, le pool de précurseurs (ici les alcools supérieurs et les acides gras) n'est pas fixe et la concentration des esters qui en sont dérivé est donc directement liée à la concentration des précurseurs.

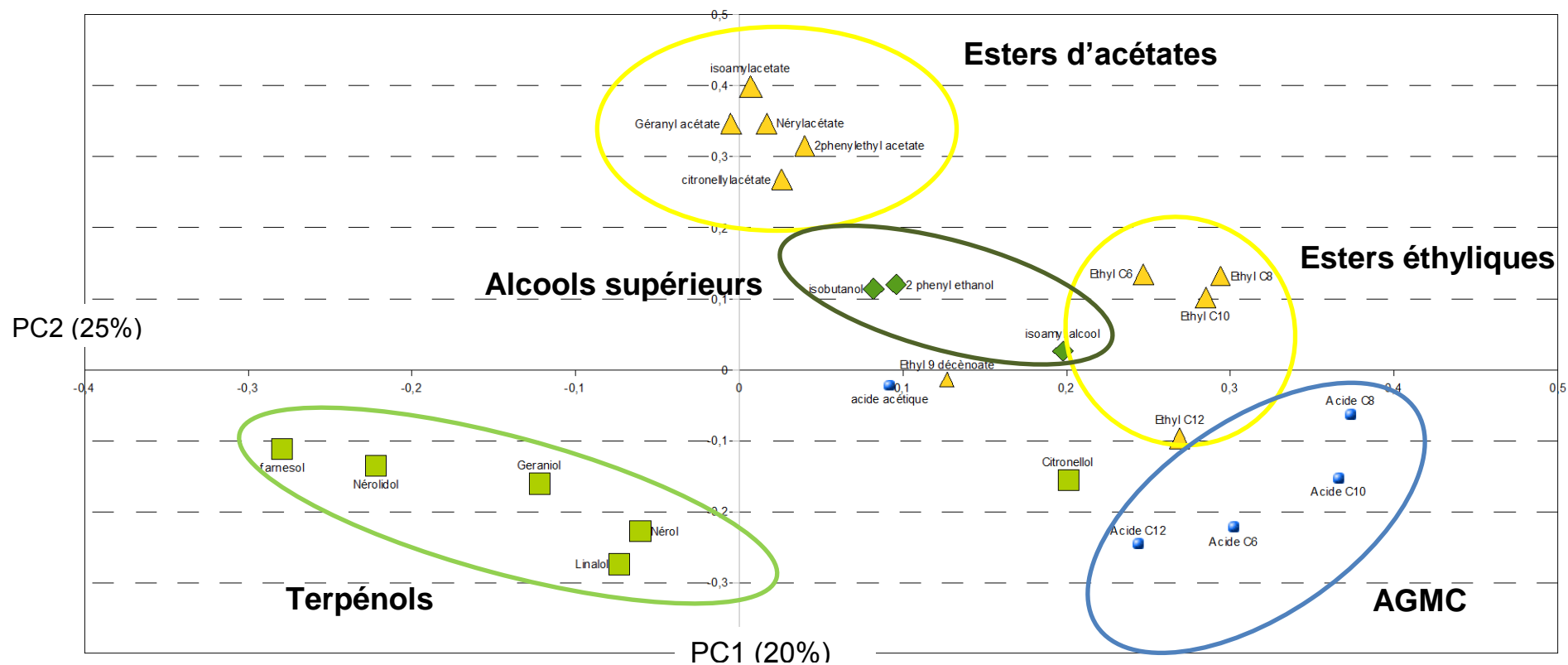


Figure 22 : Analyse en composante principale des données volatiles du dispositif A (AGMC= acides gras à moyennes chaînes)

On peut encore remarquer que les concentrations en phényléthylacétate et isoamylacétate sont corrélées aux concentrations en terpényl acétates. Ce qui permet de penser que les terpényl acétates et les acétates d'alcool supérieurs pourraient être le résultat de l'action de la même ester synthase.

L'analyse descriptive du dispositif A nous a permis :

- de détecter un effet bloc et de le corriger
- de percevoir des corrélations entre les composés volatiles produits

En revanche, la concentration de géraniol utilisée dans ce milieu (1 mg/L) ne nous a pas permis d'observer de fortes variations dans les concentrations des composés issus du géraniol. Le dispositif B a donc été conçu pour éviter l'effet bloc et amplifier l'effet du géraniol.

2.2.2. Analyse descriptive du dispositif B

Dispositif expérimental

Le dispositif B a été mis en place pour éviter d'avoir à traiter un effet bloc, il a donc été réalisé en une seule fois et comprend à lui seul 66 fermentations, réalisées dans des fermenteurs de 200 mL et en présence de 5 mg/L de géraniol. Ces fermentations n'ont pas été agitées pour des raisons matérielles et elles ont été relativement longues par rapport à celles du dispositif A (1 mois vs 1,5 semaine).

Toutes les fermentations sont arrêtées lorsque l'une d'entre elle atteint une perte de masse de 9g/100g. Cette stratégie a été utilisée dans l'étude menée par Katou *et al* [141], sur la recherche de QTL d'arôme de saké. Cependant, dans cette stratégie, certaines fermentations sont arrêtées alors que tout le sucre n'a pas été consommé. Ce choix peut induire un biais expérimental, en effet la teneur en composés volatils d'un milieu produit lors d'une fermentation incomplète peut être moindre que celle que l'on obtiendrait en fin de fermentation.

La cinétique de production des arômes par les souches 59a et S288c présentée précédemment (Figure 21) permet de répondre à cette objection. On note en effet que la production des acides et des esters d'acétate est élevée en début de fermentation, et que leur concentration atteint une relative stabilité avant le milieu de la fermentation. Il en va de même des alcools supérieurs et de leurs acétates (résultats non présentés). Cet

effet permet de supposer que les concentrations en composés volatils mesurées peu avant la fin de la fermentation reflètent les concentrations finales.

Nous disposons donc d'arguments pour supposer que l'arrêt prématuré de certaines fermentations n'induit pas de biais trop gênants. Cependant, pour ne pas induire d'erreurs lors de l'analyse QTL, il est nécessaire d'éliminer les souches et les comportements fermentaires « anormaux ».

Détection des fermentations aberrantes par analyse en composante principale

Lorsque des fermentations sont réalisées sur un temps aussi long, on peut observer des différences de comportement fermentaire pour une même souche. Les erreurs expérimentales sont donc amplifiées ce qui peut conduire à des fermentations aberrantes d'un point de vue cinétique, mais aussi aromatique. Pour détecter ces fermentations aberrantes nous avons réalisé une Analyse en Composante Principale (ACP) (Figure 23).

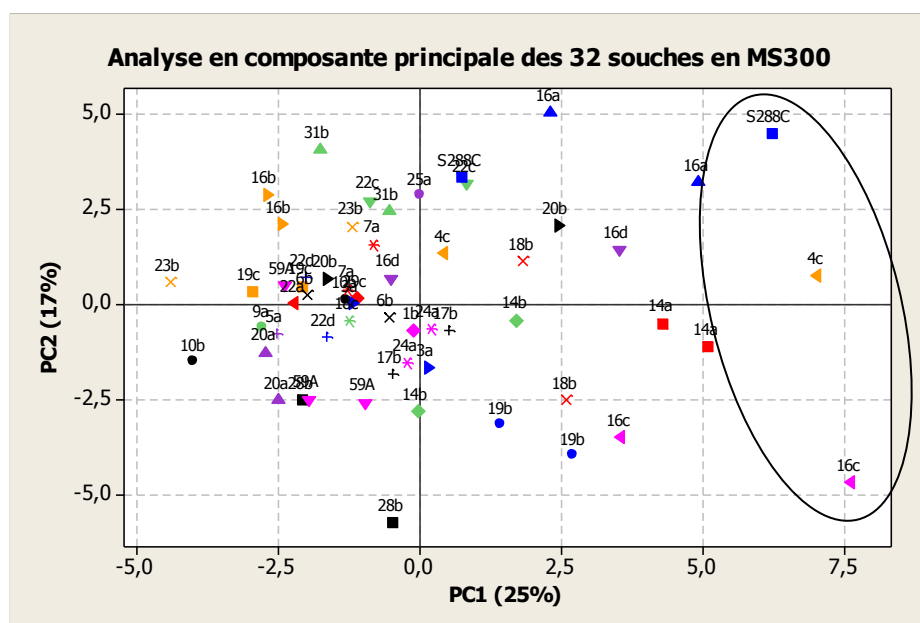


Figure 23 : Analyse en composante principales des individus du dispositif B

Chaque fermentation ayant été réalisée en double, les deux répétitions devraient raisonnablement être localisées à proximité l'une de l'autre.

Les individus S288C, 4c et 16c sont retirés du plan car ils déforment l'axe et sont éloignés de leur doublon. Par ailleurs, leurs cinétiques de fermentations (non présentées) indiquent également que ces souches ne se sont pas comportées comme l'ensemble des autres souches.

Production de composés volatiles par les souches

Après avoir appliqué cette correction, une analyse en composante principale a été réalisée sur les moyennes de l'ensemble des données volatiles obtenues (Figure 24). Tout comme précédemment (Figure 22) elle permet d'observer une bonne corrélation entre les différentes familles chimiques regroupant les molécules dosées.

On peut remarquer que cette ACP confirme ce qui a été montré lors de la précédente expérience :

- une corrélation entre terpényl acétates et isoamyl/phényl -acétate formant l'ensemble des acétates d'esters lui-même opposé à l'ensemble des terpénols
- une corrélation entre les esters éthyliques et les acides gras, confirmant qu'une souche forte productrice d'acides gras à moyennes chaînes sera forte productrice d'esters éthyliques
- une position centrale des alcools supérieurs mesurée

Les fermentations du dispositif B comprenaient 5mg/L de géraniol dans le milieu, contre seulement 1 mg/L pour les fermentations du dispositif A. Cette concentration plus importante nous a permis de doser le cis- et le trans- rose oxyde, qui sont également placés sur cette ACP. Leur position indique une corrélation avec les teneurs en terpénols. On peut expliquer cette position par le fait que ces composés sont formés à partir du géraniol et du citronellol.

On note également que sur cette ACP, et contrairement à celle présentée Figure 22, les sesquiterpénols (farnésol et nérolidol) ne semblent pas être corrélés avec les terpénols. Cependant, il n'existe aucune donnée permettant de penser que le géraniol puisse être métabolisé par la levure pour conduire à la formation de farnésol puis de nérolidol. Nous supposons donc que la corrélation entre les sesquiterpénols et les terpénols observée précédemment est un phénomène fortuit et non le signe d'un lien biochimique.

L'analyse descriptive du dispositif B nous a, là encore, permis de corriger les données expérimentales en éliminant les fermentations aberrantes de l'analyse. Elle nous a également permis de vérifier que les corrélations existant entre familles de composés détectées avec le dispositif A étaient toujours perçues et donc sont indépendantes des différences de milieu et de conditions entre les deux dispositifs.

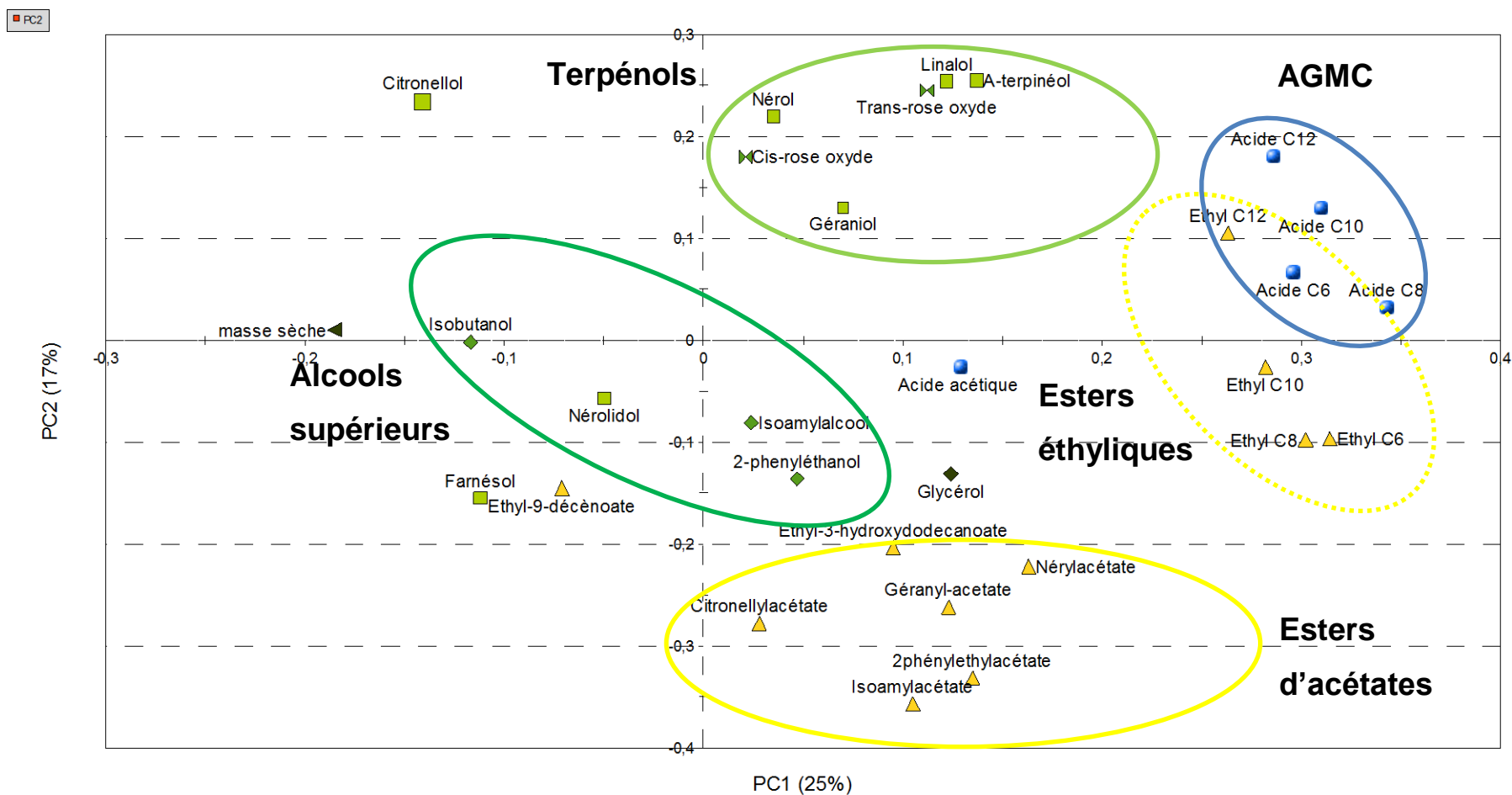


Figure 24 : Analyse en composante principale des molécules volatiles issues du métabolisme des 30 souches du dispositif B (V=200mL; T°=20°C, 5 mg/L de géranol milieu MS300 1% FA)

2.2.3. Analyse descriptive du dispositif C

Dispositif expérimental

Les fermentations du dispositif C ont été obtenues par Chloé Ambroset à Montpellier qui nous a fourni les surnageants de cultures. Elles ont été réalisées dans des fermenteurs d'un litre, avec agitation, à une température de 28°C. De plus, la concentration des facteurs anaérobies était 100x supérieure à celle utilisée dans les dispositifs A et B et il n'y a eu aucun ajout de géraniole.

Chaque fermentation a été arrêtée lorsque la perte de masse est devenue nulle.

Les analyses de composés volatils ont été effectuées à Colmar dans les mêmes conditions que pour les dispositifs A et B.

Analyse en composante principale des composés volatiles produits

Comme pour les dispositifs A et B, nous avons réalisé une analyse en composantes principales des composés volatiles produits (Figure 25). Cette analyse a permis de mettre en évidence la présence de certains composés qui n'ont pas été détectés dans les fermentations du dispositif B ni même du dispositif A pourtant comparable en terme de volumes de fermenteurs et d'agitation. La présence du méthyl oléate, certains esters éthyliques comme l'éthyl C16 et C18, mais également les isomères de farnésol et les sesquiterpènes divers présentés dans la Figure 25 montrent que ces fermentations ont conduit à un métabolisme assez différent de celui des deux autres dispositifs. On peut sans trop extrapoler, proposer que ce métabolisme s'apparente à une détoxification de la forte concentration en facteurs anaérobies (seul facteur variant entre le dispositif A et C mise à part la température). Ces composés ont d'ailleurs été retrouvés dans les fermentations ayant permis la validation d'un des gènes candidats identifiés, montrant ainsi la reproductibilité des résultats entre l'INRA de Colmar et celui de Montpellier, ainsi que dans les essais montrant l'influence des facteurs anaérobies sur la production de composés volatils.

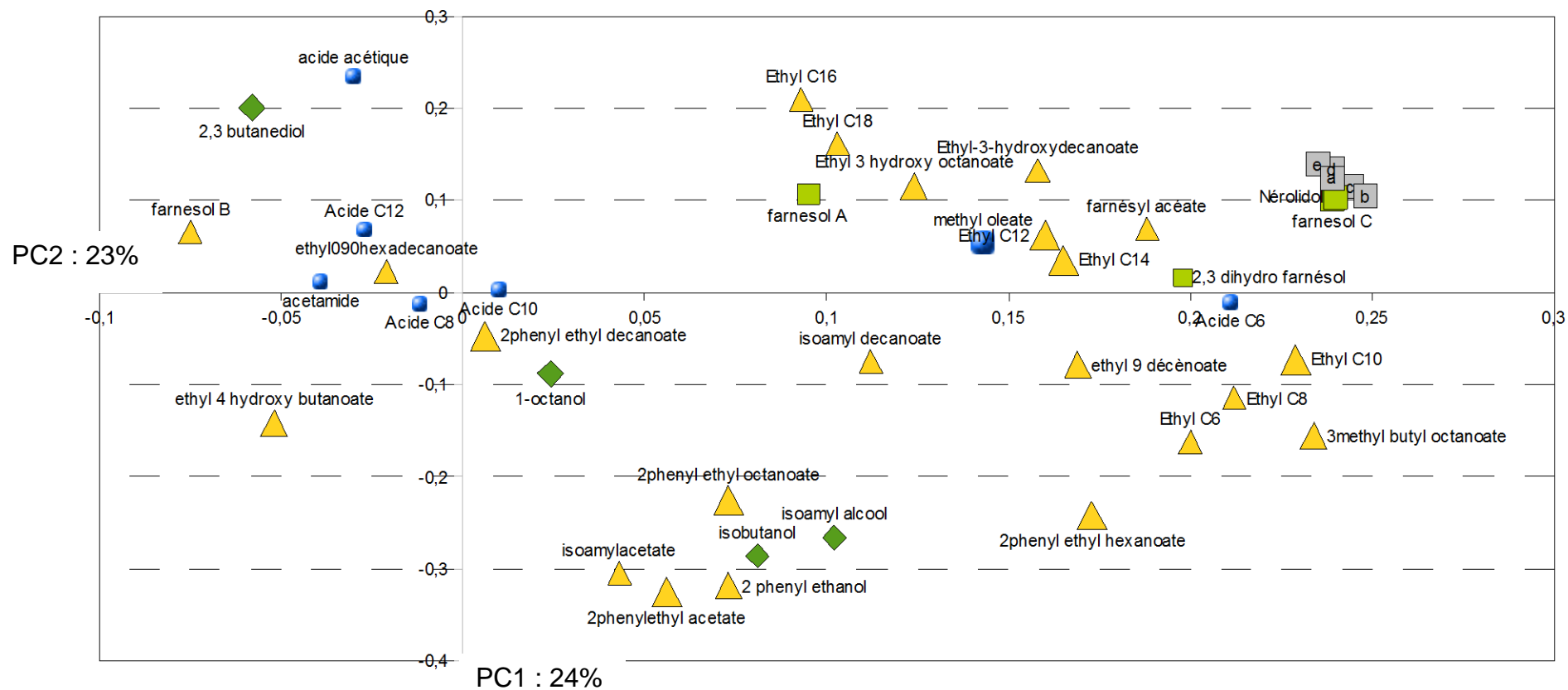


Figure 25 : Analyse en composante principale des composés volatils produits dans le dispositif C (a: trans β farnesene ; b: Z,E α farnesene, c: α bisabolene, d: β bisabolene, e: E,E α farnesene)

2.2.4. Exemple de recherche de QTL validant la démarche expérimentale : recherche d'un gène lié à la floculation

Nous avons observé, lors des pré-cultures des 30 souches ségrégantes et des souches parentales, que certaines souches floclaient, alors que d'autres restaient en suspension. Afin de tester la validité de notre approche QTL, nous avons choisi de rechercher un QTL de floculation. En effet, s'il a été montré que la souche S288C présente un allèle non fonctionnel du gène de floculation *FLO8* [147], les raisons pour lesquelles la souche EC1118 ne floclure pas ne sont pas connues. Aussi la recherche de QTL de floculation devrait nous fournir sans doute un élément de réponse.

A travers cet exemple, nous allons exposer la recherche de QTL. L'utilisation du logiciel R/QTL 1.14-2 et de l'interface graphique J/QTL ne sera pas détaillée. Cependant, afin de faciliter l'utilisation de ces outils, une annexe présentant la démarche pas à pas est ajoutée en fin de thèse (Figure 75, Figure 76, Figure 77, Figure 78 et Figure 79).

Recherche des QTL de floculation

Matrice génotypique et phénotypique

Le phénotype « floculation » est ici considéré comme une variable qualitative et non quantitative (floclure vs ne floclure pas) ce qui entraîne une recherche de QTL particulière, la distribution est binaire et non normale comme c'est le cas pour la recherche de QTL de composés volatils.

Le Tableau 21 présente un aperçu des données brutes permettant de réaliser cette recherche.

Le phénotype est ici codé 1 pour FLO+ (souche qui floclure) et 0 pour FLO- (souche qui ne floclure pas). L'origine allélique des deux premiers marqueurs du chromosome 1 (m23069 et m23070, respectivement situés en position 114cM et 115cM) est également indiquée. Les lettres A et H codent respectivement pour une origine allélique de laboratoire et œnologique, un tiret (-) signifie que l'allèle est ambigu.

Dans le cas de cette étude chaque souche a été génotypée sur les 1835 marqueurs répartis sur les 16 chromosomes, conduisant à des matrices en réalité beaucoup plus complexes.

Tableau 21 : Exemple de matrice phénotype-génotype pour la recherche d'un QTL

Souche	phénotype (floculation)	Nom du marqueur ->	m23069	m23070
		numéro chromosome ->	1	1
		Position en cM du marqueur ->	0.114	0.115
1b	0		A	A
3a	1		H	H
4c	1		A	A
5a	0		A	A
6b	0		A	A
7a	0		A	A
9a	0		A	A
10b	1		H	H
14a	1	Version allélique du marqueur ->	H	A
14b	0		H	H
16a	0		A	A
16b	1		H	H
16c	0		-	A
16d	0		-	A
17a	1		H	H
18b	0		A	A

Une fois le tableau converti en .csv (format lisible par les logiciels J/QTL et R/QTL), la recherche de QTL s'effectue sous J/QTL grâce aux différents menus de l'interface graphique. Dans le cas présent, on choisit une distribution binaire car la floculation est « binaire » (1 vs 0) tandis que pour la majorité des autres recherches celles-ci est « normale » comme confirmé par les validations préalables. Le logiciel cherche alors à établir une corrélation entre le phénotype et un ou plusieurs marqueurs génétiques et, pour chaque marqueur, calcule un LOD Score (Logarithm of odds) représentant sa probabilité d'être associé à la variation de phénotype mesurée.

Afin de vérifier si l'association entre le phénotype et le marqueur n'est pas le fait du hasard, le logiciel reconstitue un grand nombre de génomes virtuels dans lesquels les versions alléliques des marqueurs sont permutées de façon aléatoire. Puis il compte le nombre de génomes dans lesquels un marqueur est relié au phénotype dans cette nouvelle configuration sans signification biologique. La régression de Haley-Knott a été utilisée en réalisant 500 permutations différentes, pour calculer le seuil à partir duquel la valeur de LOD était significative pour un risque accepté (0,1 ou 0,05 généralement). Lorsque la recherche est terminée il est possible d'observer le résultat sous forme de graphique dit « genome scan » (Figure 26).

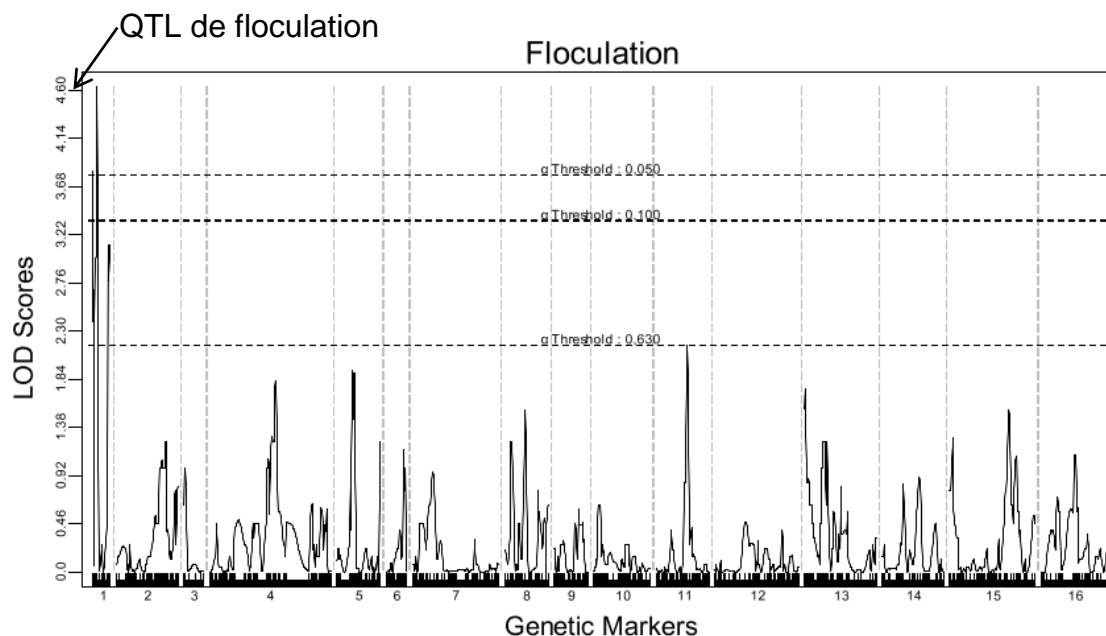


Figure 26 : Sortie "genome scan" de J/QTL pour le phénotype floculation

Cette représentation graphique permet de visualiser la position du ou des QTL sur le génome (axe des X) ainsi que leur LOD score associé (axe des Y). Les traits en pointillés représentent les seuils sous lesquels les LOD scores sont significatifs, aux risques $\alpha=0.63$, 0.1 ou 0.05.

La Figure 26 permet de visualiser que un ou plusieurs marqueurs (ce sont des QTL) situé sur le chromosome 1 semblent associé aux variations du phénotype testé (la floculation).

Le logiciel permet aussi d'obtenir les coordonnées, le seuil de probabilité calculé (p-value), et le LOD score du ou des QTL trouvés. Une validation statistique est alors possible en réalisant une ANOVA, directement avec J/QTL ou avec MINITAB. Par cette analyse on cherche à expliquer la variation observée par le ou les QTL détectés. On utilise pour cela le coefficient de corrélation linéaire (R^2). L'ensemble de ces informations est résumé dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Coordonnées, LODs, p-value, part expliquée par le QTL et effet de l'allèle œnologique du QTL de floculation

Conditions	YPG 28°C agité
mQTL	ChI 17,64 cM
LOD	5.29
p-value	<0,001
Héritabilité	X
Part expliquée par le QTL	53,33%
Effet allèle oeno vs allèle labo	Positif

Cette première partie de la démarche permet donc d'identifier des zones du génome contenant peut-être un gène impliqué dans le phénotype étudié. On notera qu'on ne peut pas réaliser de calcul d'héritabilité car il n'y a pas de variance identifiée (erreur expérimental), la souche flocule (1) ou ne flocule pas (0) et ceci même après répétition de l'expérience.

Recherche de gène(s) candidat(s)

La zone génomique comprenant le QTL de floculation doit être évaluée. Il existe pour cela plusieurs méthodes. Deux de celles-ci sont décrites par Karl W. Broman [148]. Ce sont le *LOD support interval* et l'*approximate Bayes credible interval* (appelée méthode bayésienne ci-dessous).

Brièvement, la première consiste à utiliser un intervalle arbitraire de la zone en donnant les bornes génomiques entre lesquelles le LOD est à 1,5 unité de part et d'autre de son maximum. La deuxième méthode considère que le QTL est *a priori* n'importe où sur le chromosome, la distribution *a posteriori* de la localisation du QTL est obtenue en redimensionnant la fonction 10^{LOD} comme étant une distribution. L'intervalle est alors calculé en utilisant cette équation pour qu'elle excède un seuil défini par l'utilisateur (généralement 0,95).

Il a été montré que les intervalles calculés avec la méthode bayésienne donnaient les meilleurs résultats [148].

A titre d'exemple une comparaison entre ces deux méthodes a été réalisée (Tableau 23).

Tableau 23 : Comparaison des estimations de l'intervalle permettant de positionner le QTL trouvé avec la méthode « LOD support interval » et la méthode bayésienne.

Méthode "LOD support interval"			
Marqueur	chromosome	Position (cM)	lod
m19982	1	17.10404	3.713078
m20027	1	17.61604	5.293656
m20024	1	17.64404	5.293656
c1.loc18	1	18.11400	5.293656
m20038	1	18.40304	5.293656
c1.loc24	1	24.11400	2.424913
Méthode bayésienne			
c1.loc12	1	12.11400	3.747264
m20027	1	17.61604	5.293656
c1.loc22	1	22.11400	3.834719

Ainsi, d'après la première méthode, le QTL de floculation se situe entre 17cM à 24cM sur le chromosome 1, alors que d'après la seconde méthode, il se situe entre 12 et 22 cM. (Ces coordonnées sont en fait les coordonnées physiques transformées en centiMorgan, unité exigée par le logiciel, en prenant comme approximation que le génome de *S. cerevisiae* correspond à environ 4 200 cM).

Les zones de génome contenant le QTL couvrent donc, selon le cas, 21 000 paires de bases ou 30 000 paires de bases.

Pour être candidat le gène situé dans cette zone doit répondre à deux critères essentiels avant de pouvoir être analysé plus en détail :

- il doit dans la mesure du possible présenter un lien direct ou indirect avec le phénotype que l'on observe (ici la floculation).

- il doit être polymorphe entre le génome de la levure 59a et celui de S288c.

L'utilisation de serveurs d'analyse de séquences de levures (ici le genome browser de l'INRA de Jouy) permet d'identifier les gènes présents dans la zone ciblée, et de localiser les différences de séquences protéiques entre les deux allèles (59a et S288c) (Figure 27).

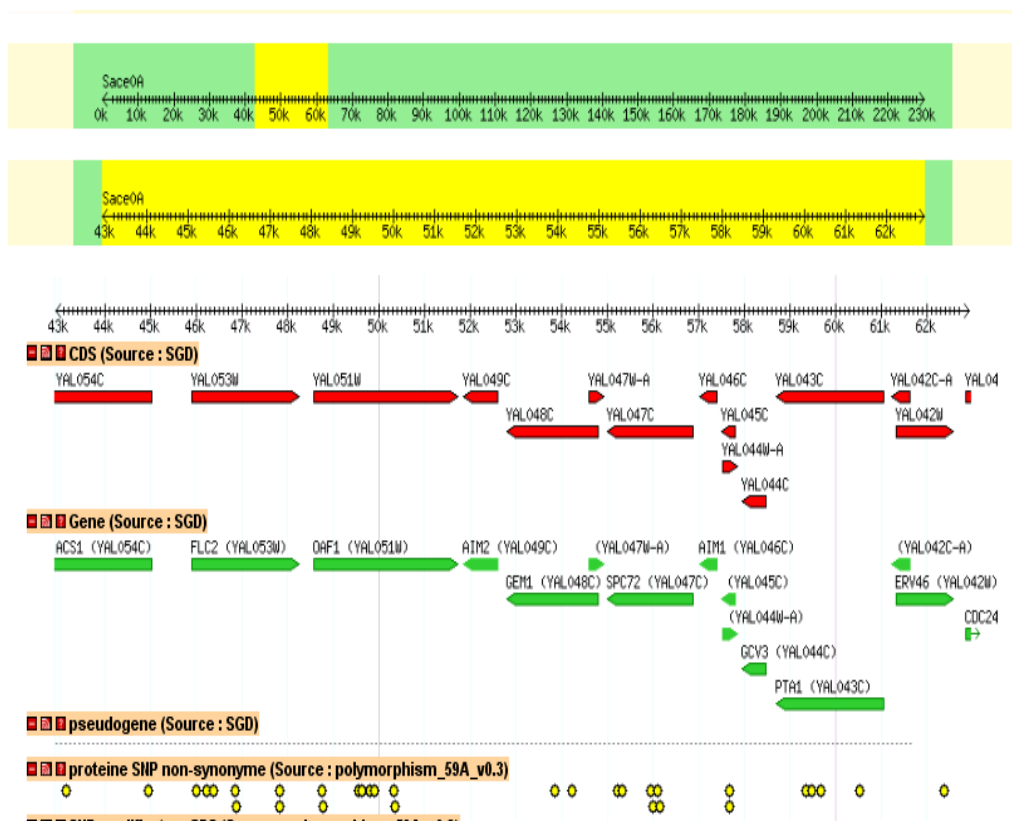


Figure 27 : Zone génomique de la levure 59a contenant le QTL1 identifié comme impliqué dans la floculation, chaque point jaune est un polymorphisme de séquence (source genome browser de l'INRA de JOUY)

Le serveur SGD (Saccharomyces genome database) (<http://www.yeastgenome.org/>) dédié au génome de la levure permet ensuite d'avoir des informations complémentaires sur les protéines codées par les gènes de la zone (Tableau 24).

Tableau 24 : Ensemble des gènes trouvés dans la zone génomique de la levure 59a contenant le QTL1

Gene Name	Systematic Name	Description
<i>OAF1</i>	<i>YAL048C</i>	Oleate-activated transcription factor, acts alone and as a heterodimer with Pip2p; activates genes involved in β -oxidation of fatty acids and peroxisome organization and biogenesis
<i>AIM2</i>	<i>YAL049C</i>	Cytoplasmic protein involved in mitochondrial function or organization; null mutant displays reduced frequency of mitochondrial genome loss; potential Hsp82p interactor
<i>GEM1</i>	<i>YAL048C</i>	Evolutionarily-conserved tail-anchored outer mitochondrial membrane GTPase which regulates mitochondrial morphology; cells lacking Gem1p contain collapsed, globular, or grape-like mitochondria; not required for pheromone-induced cell death
	<i>YAL047W-A</i>	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data
<i>SPC72</i>	<i>YAL047C</i>	Component of the cytoplasmic Tub4p (gamma-tubulin) complex, binds spindle pole bodies and links them to microtubules; has roles in astral microtubule formation and stabilization
<i>AIM1</i>	<i>YAL046C</i>	Protein involved in mitochondrial function or organization; null mutant displays elevated frequency of mitochondrial genome loss
	<i>YAL045C</i>	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; almost completely overlaps <i>YAL044W-A</i>
	<i>YAL044W-A</i>	Putative protein of unknown function; similar to <i>S. pombe</i> uvi31 which is a putative DNA repair protein
<i>GCV3</i>	<i>YAL044C</i>	H subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex, required for the catabolism of glycine to 5,10-méthylene-THF; also required for all protein lipoylation; expression is regulated by levels of 5,10-méthylene-THF
<i>PTA1</i>	<i>YAL043C</i>	Subunit of holo-CPF, a multiprotein complex and functional homolog of mammalian CPSF, required for the cleavage and polyadenylation of mRNA and snoRNA 3' ends; involved in pre-tRNA processing; binds to the phosphorylated CTD of RNAPII
	<i>YAL042C-A</i>	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps verified ORF <i>ERV46/YAL042W</i> ; <i>YAL042C-A</i> is a non-essential gene
<i>ERV46</i>	<i>YAL042W</i>	Protein localized to COPII-coated vesicles, forms a complex with Erv41p; involved in the membrane fusion stage of transport
<i>CDC24</i>	<i>YAL041W</i>	Guanine nucleotide exchange factor (GEF or GDP-release factor) for Cdc42p; required for polarity establishment and maintenance, and mutants have morphological defects in bud formation and shmooing
<i>CLN3</i>	<i>YAL040C</i>	G1 cyclin involved in cell cycle progression; activates Cdc28p kinase to promote the G1 to S phase transition; plays a role in regulating transcription of the other G1 cyclins, CLN1 and CLN2; regulated by phosphorylation and proteolysis
<i>CYC3</i>	<i>YAL039C</i>	Cytochrome c heme lyase (holocytochrome c synthase), attaches heme to apo-cytochrome c (Cyc1p or Cyc7p) in the mitochondrial intermembrane space; human ortholog may have a role in microphthalmia with linear skin defects (MLS)
	<i>ARS106</i>	Autonomously Replicating Sequence
<i>CDC19</i>	<i>YAL038W</i>	

Il ne semble pas y avoir de gènes candidats dans cette zone, en effet aucun d'entre eux ne semble lié de près ou de loin à la floculation. On peut néanmoins supposer que la fonction de l'un de ces gènes est mal décrite et qu'il intervient dans le phénotype observé. S'il y avait un ou plusieurs gènes liés à la floculation, la présence de polymorphisme serait un indice supplémentaire à prendre en compte.

Cette recherche QTL semble donc ne mener à aucun gène candidat.

Un élément complémentaire est à prendre en compte : aucune des deux souches parentales ne flocule. Ceci indique qu'il y a au minimum deux gènes impliqués dans ce phénotype. Les souches hybrides floculant seraient celles qui auraient hérité des deux allèles de floculation, l'un de S288C, l'autre de 59a. Nos résultats montrent que sur 30 souches, 20 ne floculent pas et 10 floculent. On peut donc supposer que les souches parentales portent chacune un gène récessif pour la floculation donnant donc comme ségrégation 2/3 de phénotype parentale et 1/3 de phénotype recombinant.

La recherche de QTL est donc relancée, en partant de l'hypothèse que le phénotype est commandé par la combinaison de deux allèles.

Cette nouvelle recherche conduit à la détection d'un nouveau QTL, toujours situé sur le chromosome 1, mais au niveau du marqueur situé aux coordonnées 66.1 cM (Tableau 25).

La recherche d'un gène candidat présent sur ce QTL a permis d'identifier le gène *FLO1*. La recherche de QTL déterminant le phénotype de floculation nous a conduit à identifier deux QTL. Nous n'avons pas réussi à identifier de gène candidat associé au premier QTL alors que, au niveau du second QTL, nous avons identifié *FLO1* comme gène candidat. De plus, les allèles S228c et 59a de ce gène sont très différents puisqu'il y a 15 mutations non synonymes sur ce gène (Figure 28). Le gène *FLO1* semble donc être un bon candidat pour le phénotype que l'on observe.

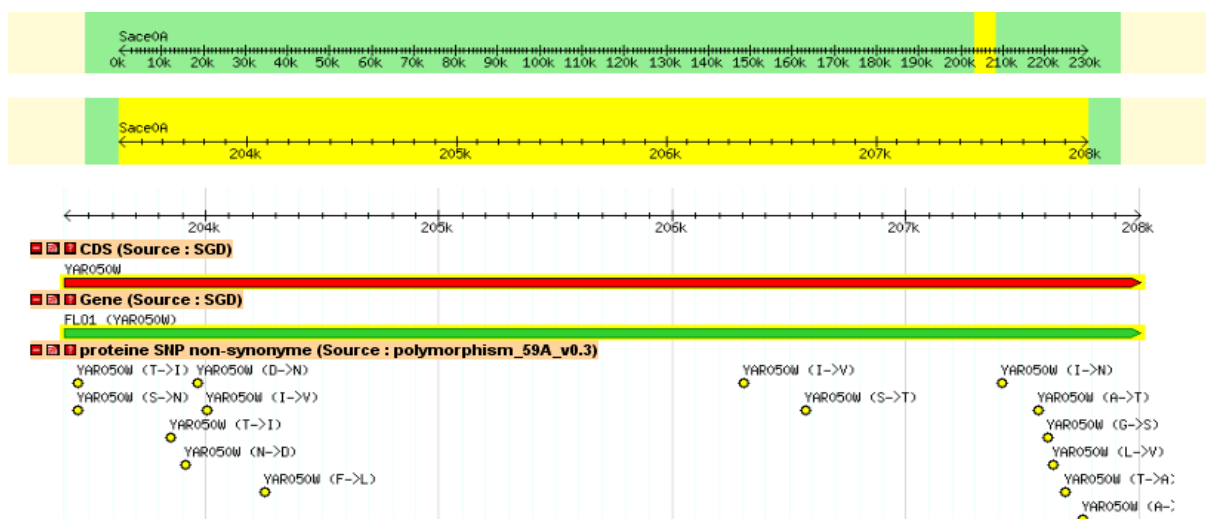


Figure 28 : Zone génomique de la levure 59a contenant le QTL2 identifié comme impliqué dans la floculation, (source genome browser de l'INRA de JOUY)

Tableau 25 : Caractéristiques du QTL 2 lié à la floculation

Conditions	YPG 28°C agité
mQTL	ChI 66,10 cM
LOD	3,638
p-value	0,002
Héritabilité	X
Part expliquée par le QTL	43,75%
Effet allèle oeno vs allèle labo	Négatif

Cependant aucune validation n'a été entreprise pour ces gènes.

Cet exemple permet de montrer comment la démarche nous a permis de pointer sur un gène de floculation, mais pas celui attendu, et fait apparaître les limites de la méthode.

2.3. Recherche de QTL impliqués dans la variation de phénotypes d'intérêt œnologique

La recherche de QTL est une méthode générique pouvant être appliquée à toute variation phénotypique. Nous l'avons appliquée aux phénotypes de composés volatils ayant un impact sur l'arôme des vins. Ces composés sont excrétés par la levure et on peut les considérer comme des déchets du point de vue métabolique donc de l'exoMétabolome. Les QTL présentés ici correspondent à des « mQTL » (QTL du métabolome). Cependant, nous avons aussi appliqué cette méthode à des traits phénotypiques observés, et qui nous ont paru important par leur impact sur la fermentation.

2.3.1. Recherche de QTL expliquant les variations de DO maximales sur milieu YPG

La normalisation de l'inoculum de chaque fermentation est très importante. A cette fin, nous avons procédé, pour chaque souche, à deux pré-cultures successives dans 10 mL de milieu YPG et mesuré la Densité optique à 600 nm de chaque pré-culture au bout de 24h.

Pour chacune des souches une moyenne de densité optique a été calculée et une recherche de QTL impliqués dans les différences de DO maximale a été menée. Les DO_{max} mesurée pour la souche S288c et 59a sont de ~40 et ~20 respectivement. Nous avons décidé d'utiliser ces données pour faire une recherche de QTL que nous avons identifié (Tableau 26).

Tableau 26 : Caractéristiques du QTL de densité optique

	YPG 28°C agitation Doi=1
mQTL	Do600nm ChII@189,101cM
LOD	5.890
p-value	<0,001
héritabilité	89,35%
part expliquée par le QTL	56.91%
Intervalle bayésien	498kb-570kb
Gène candidat	<i>AMN1</i>
SNPs (S288c/59a)	A119T ; K151N ; R226Q ; H233R ; L252V ; V368D
Effet allèle oeno vs labo	Négatif

Le QTL ainsi trouvé explique plus de 56% de la variabilité. Dans l'intervalle donné, on identifie le gène *AMN1* déjà identifié par Gael Yvert [139] pour son implication dans la division cellulaire et la formation d'amas. Lors de cette étude, G. Yvert a montré que, en comparaison avec la souche de laboratoire S288C, l'allèle « œnologique » du gène *AMN1*, issu de la souche RM11-1 (souche œnologique), conférait à la levure la capacité de former des amas cellulaires (Annexe Figure 74). Compte tenu de l'effet connu de l'agrégation cellulaire sur la densité optique, il est très vraisemblable que ce gène soit le bon candidat.

Cet exemple constitue également une validation de la méthode appliquée sur notre population de ségrégants.

2.3.2. Recherche de mQTL impliqués dans l'arôme des vins

Nous avons mesuré les variations de 45 composés volatils pour les 3 dispositifs présentés plus haut. La recherche des mQTL a été réalisée d'une part directement, puis en incluant des co-variables comme la floculation, la DO et le gène *ABZ1*.

Les résultats des mQTL de composés identifiés sont présentés dans les Tableau 27, Tableau 28 et Tableau 29 respectivement pour les dispositifs A, B et C. Leur position sur la carte génétique de *S.cerevisiae* est représentée aux Figure 29, Figure 30 et Figure 31. On notera que les 3 zones chromosomiques spécifiques à la souche EC1118 (non présentes dans la souche S288c) sont présentes dans la souche 59a. Ces zones bien que séquencées n'étaient pas clairement positionnées sur le génome de la souche EC1118. Virginie Galeote de l'UMR SPO de l'INRA de Montpellier a pu déterminer pour chacun des ségrégants la présence ou l'absence de ces zones. Grâce à cette matrice, nous avons entrepris la même recherche que celle menée pour la floculation et ainsi pu identifier la localisation précise de ces zones en utilisant l'approche QTL (résultats non montrés). De plus leur présence/ absence a également été évaluée (par ANOVA) pour expliquer les variations des composés volatils mesurés. Les résultats de cette analyse montrent que la présence/absence de ces régions dans les ségrégants n'explique aucun des phénotypes observés.

Tableau 27 : Principaux mQTL du dispositif A (1mg/L géranol)

Composés	Positions des mQTL et intervalles bayesiens	LOD	p-value	Part expliquée par le QTL	héritabilité
isoamylacétate					97,98%
isoamyl alcool					90,70%
Éthyl C6					97,65%
Éthyl C8					97,37%
Éthyl C10					90,13%
Éthyl C12					98,84%
2phényléthyl acétate					99,79%
2 phenyl éthanol	Ch IV 810kb-954kb	2,77	0,044	31,90%	97,38%
Acide C6					10,49%
Acide C8					72,43%
Acide C10					90,87%
Acide C12					84,27%
éthyl 9 décénoate					82,89%
Nérolidol	Ch XII 678kb-714kb	6,481	0,000	63,02%	86,81%
Farnesol					30,21%
Linalol					91,37%
Citronellol					88,39%
Geraniol					91,91%
Nérol					93,61%
géranyl acétate					93,48%
citronellyl acétate					91,33%
néryl acétate					89,99%
isobutanol					84,47%

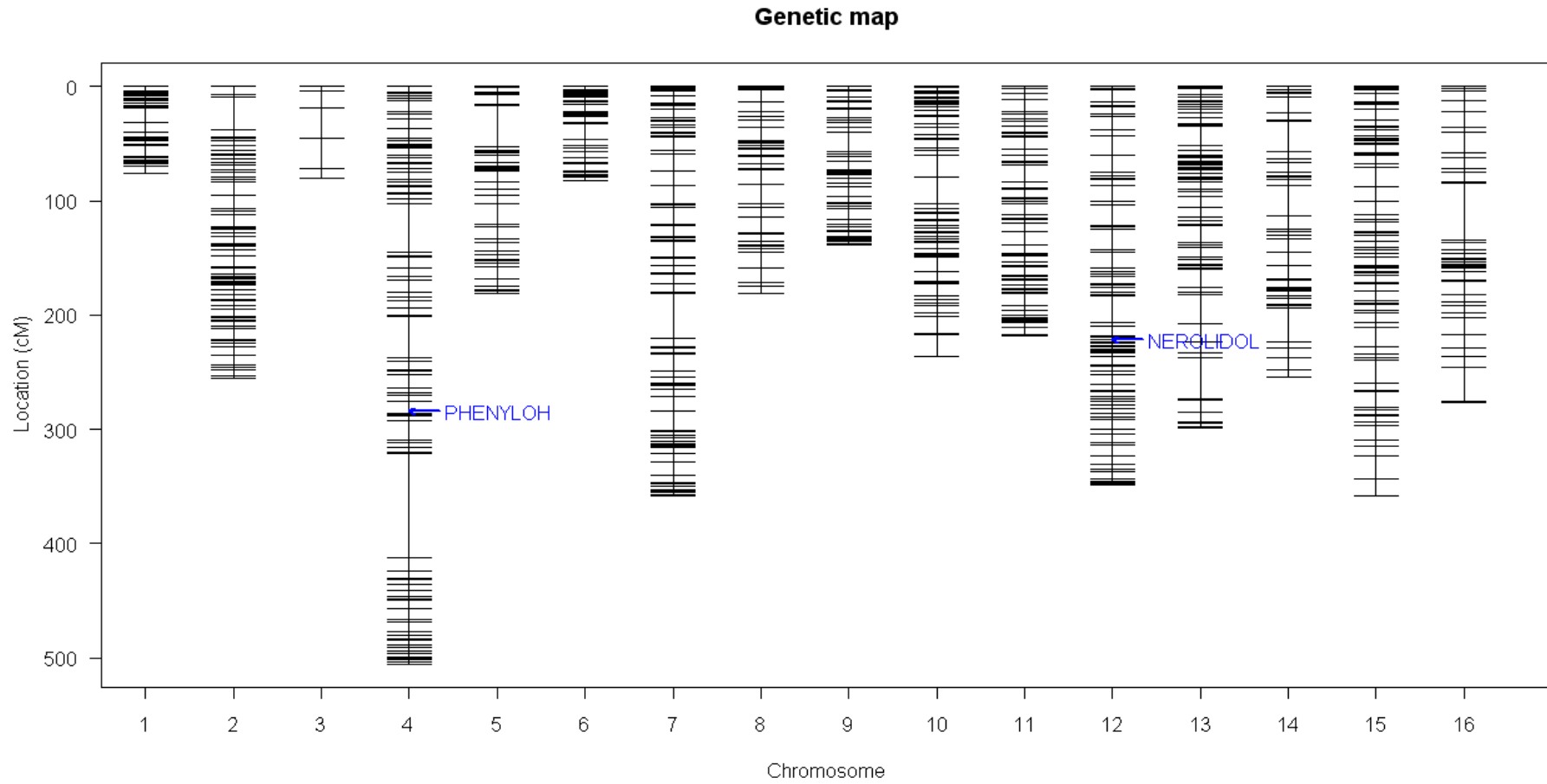


Figure 29 : Localisation des mQTL impliqués dans la production de composés volatils par *S.cerevisiae* sur la carte génétique

(*PHENYLOH*= phényléthanol) dispositif A

Tableau 28 : Principaux mQTL identifiés pour le dispositif B (5mg/L géraniole)

Composés	Positions des mQTL et intervalles bayesiens	LOD	p-value	Part expliquée par le QTL	héritabilité
isoamylacétate					34,63%
isoamyl alcool					81,08%
Éthyl C6					39,84%
Éthyl C8					11,19%
Éthyl C10					76,50%
Éthyl C12					76,37%
2phényléthyl acétate					81,49%
2 phenyl éthanol	Ch VIII 387kb-483kb	3,206	0,056	38,86%	99,05%
Acide C6					29,69%
Acide C8	Ch VII 214kb-267kb	3,452	0,083	42,46%	91,08%
Acide C10	Ch V 258kb-300kb	3,601	0,048	40,44%	98,73%
Acide C12					98,78%
éthyl 9 décénoate					43,84%
Nérolidol	Ch XII 678kb-714kb	8,422	0,001	72,55%	93,92%
Farnesol					87,66%
Éthyl-3-hydroxydodécanoate					79,76%
α -terpéneol					65,22%
Linalol					82,60%
Citronellol	Ch XIII 27kb-813kb	3,394	0,054	39,40%	79,68%
Geraniol					98,06%
Nérol					22,62%
citronellyl acétate					82,87%
geranyl acétate					86,54%
nérylacétate					68,62%
isobutanol					70,36%
cisroseoxyde:transroseoxyde	Ch XIV 540kb-606kb	4,01	0,046	43,90%	68,98%
limonène					96,41%
Myrcène					82,69%
cis-B-ocimène					85,85%
α -terpinolène	Ch XIV 321kb-453kb	4,006	0,04	42,50%	93,34%
α -terpinène					94,31%

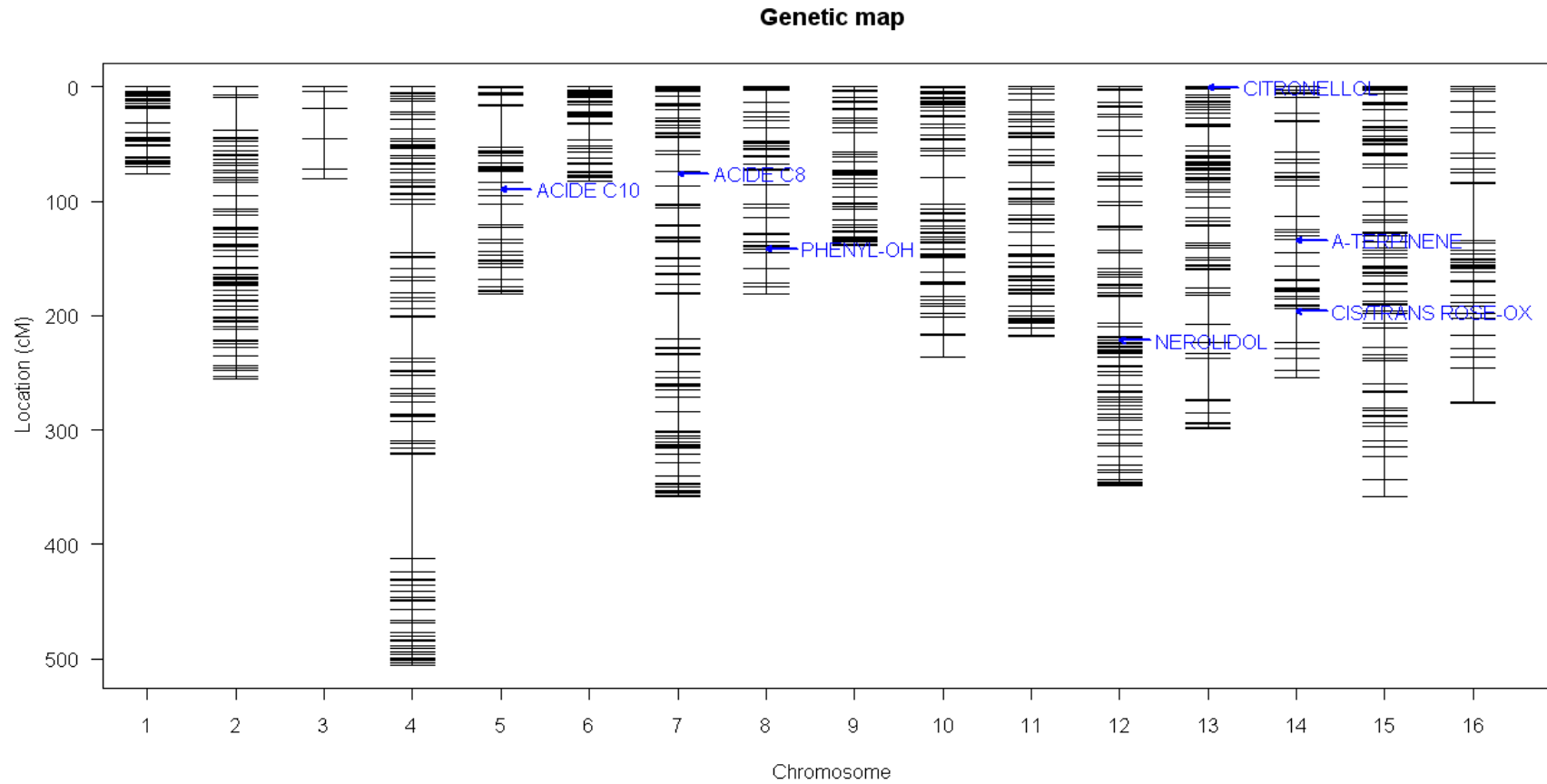


Figure 30 : Localisation des mQTL impliqués dans la production de composés volatils par *S.cerevisiae* sur la carte génétique

PHENYL-OH= 2-phényléthanol, *CIS/TRANS ROSE OX*= rapport *cis* rose oxyde/*trans* rose oxyde) dispositif B

Tableau 29 : Principaux mQTL identifiés pour le dispositif C (100% de FA)

Composés	Positions des mQTL et intervalles bayesiens	LOD	p-value	Part expliquée par le QTL
isoamylacétate				
isoamyl alcool				
Éthyl C6				
Éthyl C8	Ch XIII 234kb-297kb	3,746	0,04	44,64%
Éthyl C10	Ch XIII 234kb-297kb	3,674	0,046	43,61%
Éthyl C12				
Éthyl C14	Ch XIII 234kb-297kb	3,972	0,008	47,96%
Éthyl C16				
Éthyl C18				
2phényléthyl acétate	Ch XIV 654kb-702kb	3,108	0,094	38,55%
2 phenyl éthanol	Ch XIV 666kb-699kb	3,859	0,022	46,35%
Acide C6				
Acide C8				
Acide C10				
Acide C12				
éthyl 9 décénoate				
Nérolidol	Ch XII 678kb-747kb	3,885	0,014	46,59%
Farnesol				
2,3 dihydro farnésol				
2,3 butanediol				
2phenyl éthyl hexanoate				
2phenyl éthyl octanoate				
2phenyl éthyl décanoate				
Isoamyl octanoate 1	Ch VIII 423kb-480kb	3,438	0,032	13,44%
Isoamyl octanoate 2	Ch IV 300kb-1500kb	2,959	0,092	23,04%
éthyl 4 hydroxy butanoate				
Éthyl-3-hydroxydécanoate				
Éthyl-3-hydroxyoctanoate				
Éthyl-9-hexadécanoate				
E,E farnésol (A)				
E,Z ou Z,E farnesol (B)				
E,Z ou Z,E farnesol (C)	Ch II 576kb-642kb	4,127	0,008	46,27%
farnésyl acétate				
isoamyl décanoate				
isoamyl dodécanoate				
méthyl oleate	Ch XIII 234kb-285kb	3,847	0,038	46,88%
trans beta farnesene	Ch XII 672kb-750kb	3,468	0,040	31,11%
Z,E α farnesene	Ch XII 672kb-750kb	3,673	0,020	45,26%
α bisabolene	Ch XII 672kb-750kb	3,491	0,034	42,85%
beta bisabolene	Ch XII 672kb-750kb	3,799	0,018	42,81%
E,E α farnesene	Ch XII 672kb-750kb	3,693	0,032	41,97%

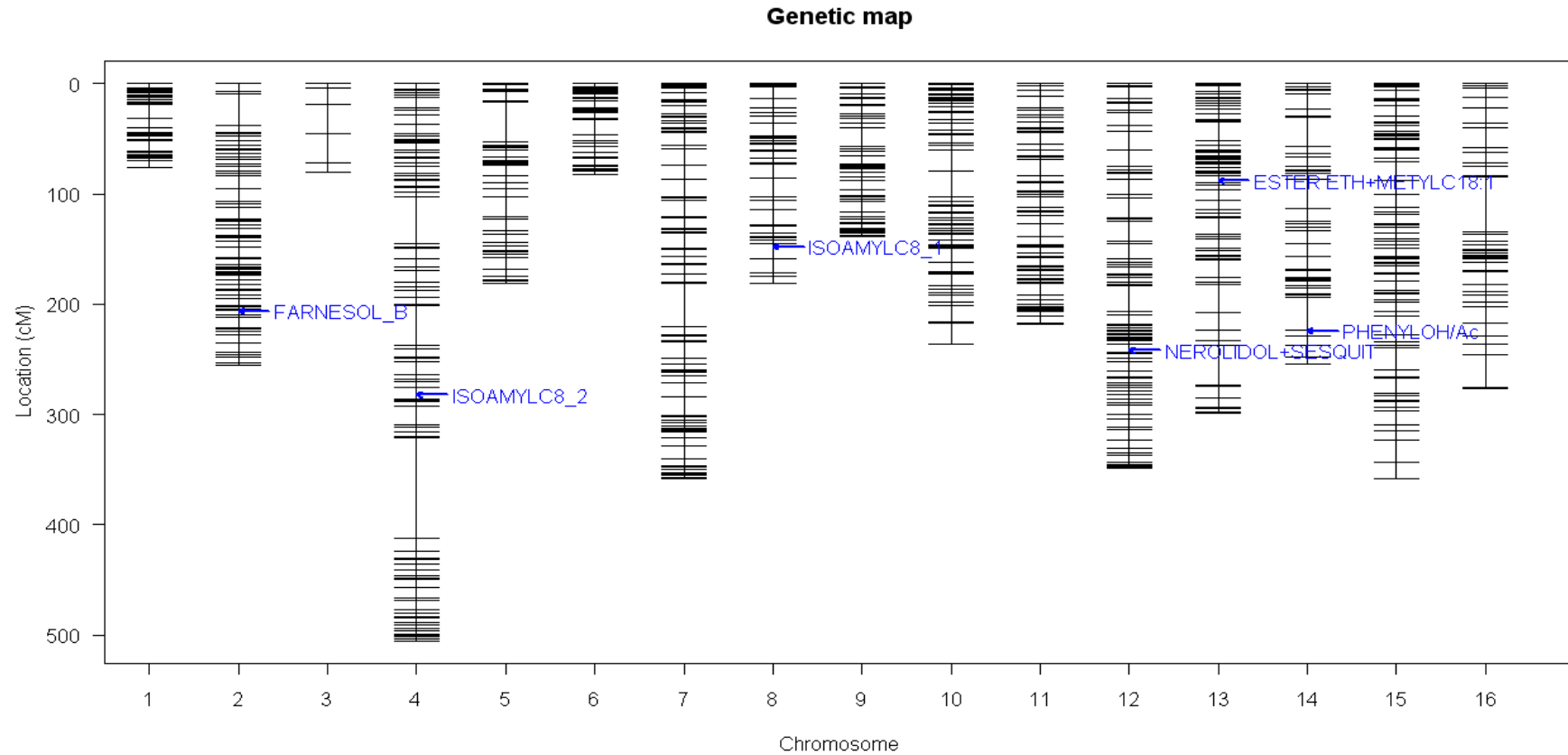


Figure 31 : Localisation des mQTL impliqués dans la production de composés volatils par *S.cerevisiae* sur la carte génétique

(IOAMYL8_1 ou _2 =isoamylaoctanoate QTL1 ou 2, PHENYLOH/Ac= 2-phényléthanol et 2-phényléthylacétate, Sesquit=Sesquiterpènes, ESTERS ETH= Esers éthyliques, METHC18 :1 = Méthyl oléate) dispositif C

Recherche de QTL double (interaction et addition)

Lorsqu'un QTL est détecté une nouvelle recherche est lancée en incluant dans le modèle ce QTL en covariable (additive ou interactive), cette recherche a été menée pour tous les mQTL décrits plus haut et n'a pas permis de détecter de nouveaux QTL à l'exception du 2-phényléthanol.

Recherche de nouveaux QTL incluant la floculation dans le modèle

Il a été montré que la floculation pouvait influencer fortement la synthèse des esters chez les levures de bières [149]. C'est pourquoi, une seconde recherche de mQTL sur l'ensemble des volatils mesurés pour les 3 dispositifs expérimentaux testés a été menée en mettant en co-variable le phénotype floculation.

Cette nouvelle recherche a permis d'aboutir à la découverte de nouveaux QTL présentés Tableau 30, Tableau 31 et Tableau 32.

Tableau 30 : Caractéristiques du QTL lié à la concentration en Nérol, Phényléthanol, Éthyl C6, Éthyl C8, Éthyl C10 avec en co-variable la floculation (co-variable interactive) dispositif A

	Nérol	Phényléthanol	Éthyl C6	Éthyl C8	Éthyl C10
mQTL	ChrXV@ 22.354cM	ChXV@ 46,539cM	ChXIV@ 242.625	ChII@ 256.374cM	ChX@ 33,891cM
LOD	10,725	3.6	4.551	3.9	4.9
p-value	0.000	0.048	0.044	0.030	0.005
Part expliquée par le QTL	83.27%	38.21%	53.42%	46.47%	53.796%

Tableau 31 : Caractéristiques du QTL lié à la concentration en éthyl C6 avec en co-variable la floculation dispositif B

	Éthyl C6
mQTL	ChXIV@216.625
LOD	4.806
p-value	0.016
Part expliquée par le QTL	53.42%

Tableau 32 : Caractéristiques du QTL lié à la concentration en isoamylalcool, éthyl-9-décénoate, éthyl-4-hydroxy butanoate et 2-phényléthylhexanoate avec en co-variable la floculation (co-variable interactive) dispositif C

	Isoamylalcool	Éthyl-9-décénoate	Éthyl-4 hydroxy butanoate	2-phényéthyl hexanoate
mQTL	ChXV@	ChVIII@	ChX@	ChXIV@
	273,354cM	139,938cM	199,774cM	230,625cM
LOD	4,844	3,84	4,502	5,011
p-value	0,036	0,044	0,026	0,04
Part expliquée par le QTL	52,50%	48,44%	52,28%	54,17%

Recherche de nouveaux QTL incluant la Do dans le modèle

La densité optique de chaque souche de levure mesurée lors de leur mise en pré-culture permet de proposer ce paramètre comme un estimateur de la biomasse maximum (elle reflète la capacité d'une souche donnée à atteindre une biomasse en fonction des nutriments du milieu). Il a pu être montré que certains terpénols comme le géraniol [150,151] mais également le farnésol (sans que l'isomérisation de ce dernier soit donnée) [152,153] avaient une affinité pour les membranes biologiques, notamment celles de *S. cerevisiae*. Une recherche de mQTL a donc été entreprise en utilisant la densité optique maximale comme co-variable interactive. Malheureusement aucun QTL n'a pu être détecté, que ce soit pour les terpénols ou les terpènes.

Recherche de nouveaux QTL incluant le gène ABZ1

La thèse de Chloé Ambroset (Ambroset 2009) a permis de mettre en évidence le rôle du gène *ABZ1* dans la cinétique de fermentation grâce à l'utilisation de l'ensemble des ségréants utilisés également dans cette thèse. La vitesse de fermentation traduisant une conversion plus rapide du glucose en éthanol et CO₂, les souches les plus véloces possèdent donc un métabolisme que l'on pourrait qualifier de plus actif. Le mQTL sur lequel se trouve le gène *ABZ1* pourrait donc de façon directe ou indirecte influencer la synthèse de composés aromatiques. Afin de s'affranchir de l'influence du gène *ABZ1* une recherche de mQTL a été réalisée en incluant dans le modèle la covariable du marqueur portant le gène *ABZ1*, permettant ainsi de « gommer » l'effet des mutations portées par ce gène sur les phénotypes recherchés et de dévoiler ainsi de nouveaux

mQTL. Cette nouvelle analyse a permis découvrir un nouveau mQTL pour le 2 phényléthanol (Figure 32) et de conforter les mQTL trouvés pour les esters éthyliques C8 (Figure 32, Figure 33 et Tableau 33) en effet les LODscore sont plus élevés et les p-value associées plus basses que celles trouvés sans covariable. Les autres recherches n'ont pas permis de détecter de nouveaux mQTL.

Tableau 33 : comparaison des caractéristiques des mQTL trouvés pour les esters éthyliques sans ou avec l'addition de la co-variable « ABZ1 » dans le modèle (dispositif C)

Composés	Modèle	Position mQTL		LOD	p-value
2-Phényléthanol	Sans covariable	Ch XIV	230,625cM	3,859	0,022
	Avec covariable	Ch XIII	132,00cM	3,68	0,048
Éthyl C8	Sans covariable	Ch XIII	97,210cM	3,746	0,034
	Avec covariable	Ch XIII	94,210cM	4,86	0,004
Éthyl C10	Sans covariable	Ch XIII	95,210cM	3,674	0,052
	Avec covariable	Ch XIII	95,210cM	4,63	0,028
Éthyl C14	Sans covariable	Ch XIII	85,158cM	3,972	0,008
	Avec covariable	Ch XIII	84,200cM	3,983	0,016

Dans la suite de cette thèse nous ne nous sommes intéressés qu'aux mQTLs identifiés en l'absence de co-variable car ils étaient les plus robustes et les plus simples à étudier.

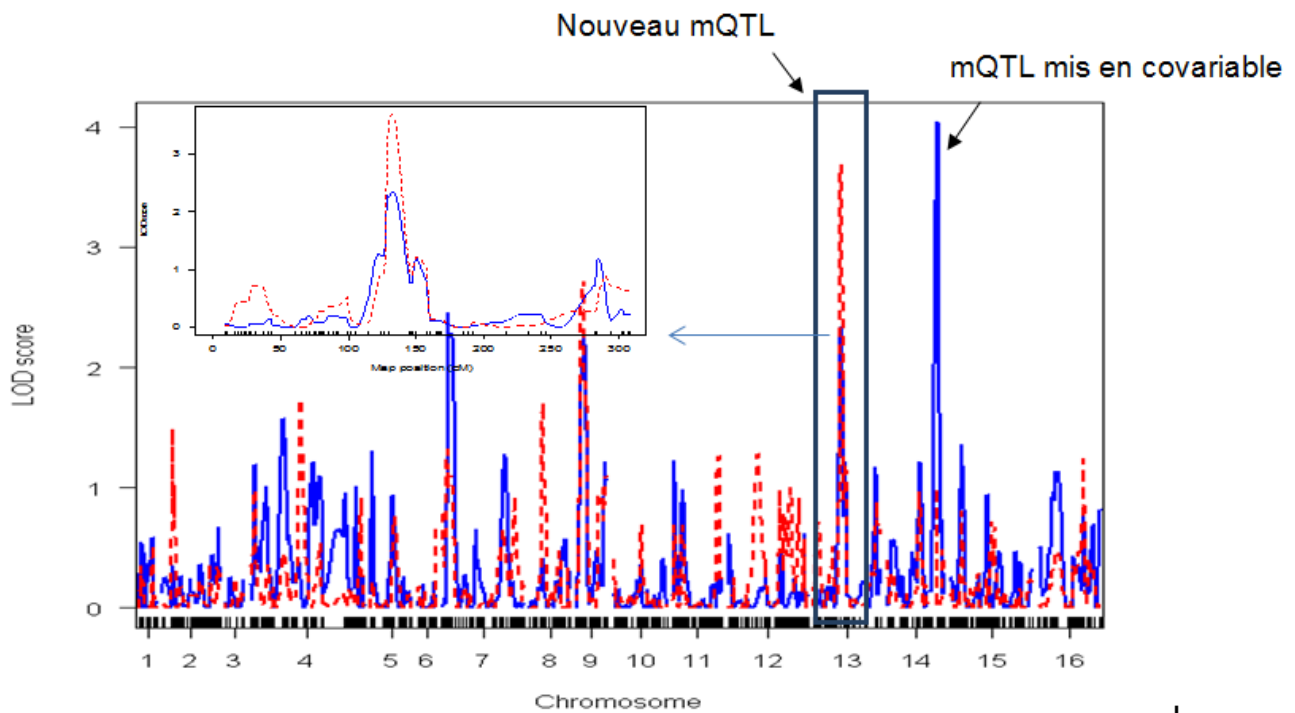


Figure 32: LOD score de l'analyse des données phénotypique du dispositif C en l'absence de co-variable (bleu) avec le marqueur le plus proche du gène ABZ1 inclus en co-variable additive (rouge pointillé) pour le phénotype 2-phényléthanol.

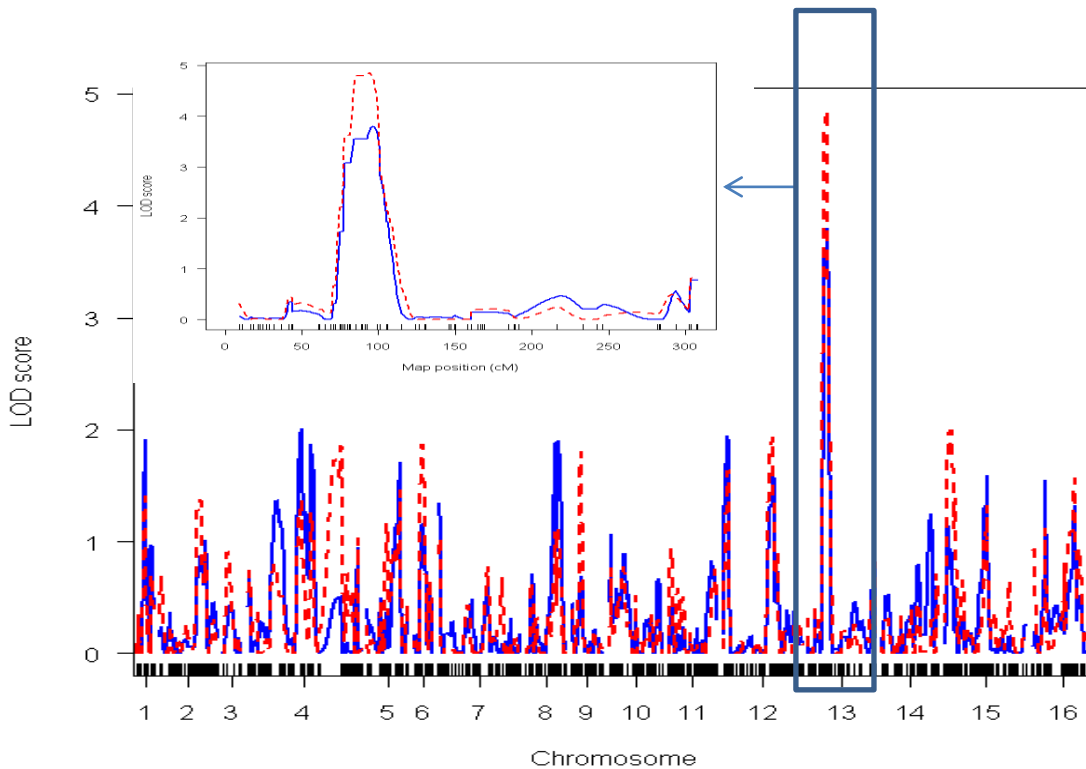


Figure 33 : LOD score de l'analyse des données phénotypique du dispositif C en l'absence de co-variable (bleu) avec le marqueur le plus proche du gène ABZ1 inclus en co-variable additive (rouge pointillé) pour le phénotype éthyl C8.

3. Conclusion

Nous avons pu trouver des QTL associés à 23 des 45 composés analysés. Certains de ces composés menant aux mêmes QTL, ce sont 13 régions génomiques différentes qui ont pu être identifiées (Tableau 34), expliquant de manière quantitative les variations de composés volatils mesurés en fin de fermentation.

Ce travail nous a permis de démontrer la puissance d'une démarche de génétique quantitative de type « génome scan » pour décortiquer les variations de profils métaboliques entre souches. Cet outil fournit des informations complémentaires aux approches combinant transcriptome et métabolome tel que celles réalisées par D.Roussouw [27,95]. Une autre équipe a réalisé une approche similaire à celle développée ici, en utilisant une population de 100 ségréants issus d'un croisement d'une souche de saké et de la souche de laboratoire S288C, génotypés avec 142 marqueurs [141]. Ce travail a permis de détecter 7QTL expliquant les variations de teneurs pour le n-propanol, l'isobutanol, l'isoamylalcool, et l'isoamylacétate. Cependant, les QTL obtenus couvrant de très larges zones du génome, l'analyse de ces mQTL est délicate mais est en cours [141]. L'équipe de P.Marullo [154] a également obtenu des QTL impliqués dans la production d'acide acétique en fermentation sur milieu synthétique.

Il nous fallait maintenant identifier les gènes d'intérêt révélés par les QTL identifiés.

Tableau 34 : Récapitulatif des QTLs identifiés

QTL	Phénotype	dispositif	coordonées
1	2-phényléthanol	A	Ch IV 810kb-954kb
2	Nérolidol et sesquiterpènes	A-B-C	Ch XII 678kb-714kb
3	2-phényléthanol	B	Ch VIII 387kb-483kb
4	Acide C8	B	Ch VII 214kb-267kb
5	Acide C10	B	Ch V 258kb-300kb
6	Citronellol	B	Ch XIII 27kb-813kb
7	Rapport Cis/trans rose oxyde	B	Ch XIV 540kb-606kb
8	α -terpinolène	B	Ch XIV 321kb-453kb
9	Ethyl C8, C10,C14,	C	Ch XIII 234-297kb
10	2-phény-éthanol/ acétate	C	Ch XIV 666kb-699kb
11	Isoamylaoctanoate	C	Ch VIII 423kb-480kb
12	Isoamylaoctanoate	C	Ch IV 300kb-1500kb
13	E,Z ou Z,E farnésol	C	Ch II 576kb-642kb

Chapitre III : Validations des mQTL

1. Introduction/contexte

Dans le chapitre précédent, nous avons identifié 13 zones de génomes potentiellement impliquées dans la concentration d'un ou plusieurs composés volatils dosés. L'étape suivante consiste à identifier, dans ces QTL, un ou plusieurs gènes candidats. Ces gènes, pour être candidats, doivent :

- avoir une fonction en lien avec le phénotype observé
- présenter des différences de séquence entre la version allélique « œnologique » et la version « laboratoire ».

Lorsqu'un ou plusieurs gènes identifiés comme candidats, il est nécessaire de vérifier leur réelle implication dans le phénotype observé. Pour cela, deux stratégies sont principalement utilisées :

- Validation par hémizygotie réciproque

Dans cette approche, une souche hybride est construite, avec un fond génétique homogène. Dans ce fond génétique unique sont introduits respectivement l'allèle œnologique ou l'allèle laboratoire du gène candidat. Puis les deux souches ainsi obtenues sont testées pour leur capacité à produire des composés volatils dans les fermentations. Cette approche permet de vérifier que les différences de séquence existant entre les deux allèles sont bien à l'origine d'un changement de phénotype. C'est cette approche qui a été utilisée pour le gène *EEB1* au chapitre I.

- Validation par délétion du gène candidat

Dans cette approche, on compare les concentrations de composés volatils obtenues par la souche sauvage avec celles obtenues par la souche délétée du gène candidat. Cette approche est assez rapide si l'on utilise les souches délétées disponibles chez EUROSCARF par exemple, et met en évidence l'implication du gène dans le phénotype observé. Mais elle est limitée à ce seul fond génétique.

Parmi tous les QTL identifiés au paragraphe précédent, tous n'ont pas pu être validés. Nous présentons dans ce chapitre les validations de plusieurs QTL, en commençant par celles qui ont été faites par hémizygotie réciproque, puis celles qui ont été faites par échange d'allèles.

2. Résultats

2.1. Validations par hémizyogtie réciproque

2.1.1. Le mQTL du chromosome XII : Phénotype Nérolidol

Contexte

Pour le phénotype nérolidol, 3 mQTL, ont été trouvés chacun dans un des dispositifs d'étude. Le calcul des intervalles bayésiens permet de constater que ce mQTL est en réalité commun aux trois dispositifs (les zones se chevauchent Tableau 35 et chapitre précédent). Ce mQTL est le plus robuste de tous les QTL trouvés et est étudié plus en détail. Dans les trois dispositifs, les souches possédant l'allèle œnologique produisent moins de nérolidol que les souches possédant l'allèle « laboratoire ».

Tableau 35 : Coordonnées, LODs et p-value, héritabilité et explication du mQTL des mQTL détectés pour le phénotype nérolidol

	MS300 1% FA 20°C (5 mg/L géraniole)	MS300 1% FA 20°C (1mg/L géraniole)	MS300 100% FA 28°C
mQTL	Ch XII@ 226,553cM	Ch XII@ 226,533cM	ChXII@ 246,892cM
LOD	8,422	6,481	3,885
p-value	<0,001	<0,001	0,014
Héritabilité	93,92%	86,81%	X
Explication du mQTL	72,55%	63,02%	46,59%
Intervalles bayésiens	678-696kb	678-714kb	678-747kb
Effet allèle œnologique vs allèle labo	Négatif	Négatif	Négatif

Le choix du gène candidat a été mené grâce à une étude approfondie de la bibliographie présentée ci-dessous.

Voies biochimiques de production de nérolidol/farnésol chez la levure *S.cerevisiae*

Le nérolidol dans le vin

Le nérolidol est un sesquiterpénol présent dans la bière et les vins à des concentrations variées (Tableau 36). Ses descripteurs aromatiques sont la rose, la pomme et le citron/vert, son seuil de perception est relativement mal défini puisqu'il varie de 15µg/L [88] à 1mg/L [96].

Tableau 36: concentrations en nérolidol dans différentes matrices

	Conc nérolidol (µg/L)	Matrice/variété	références
Le	0,73-1,60	Vin var. Monastrel	[155]
	30-290	Vins var. Airen et Macabeo	[96]
	6,7-29,2	Vins Rouges et blancs (cépage inconnu)	[43]
	1,49-3,18	Vins var. Fernão-Pires et Baga	[42]
	25	Bière	[156]

nérolidol présent dans le vin ou la bière est en partie d'origine végétale et en partie d'origine fermentaire. Dans la vigne, le nérolidol est présent essentiellement sous forme glycosylée [157], mais sous forme libre il est un des composés permettant une distinction entre les cépages Chardonnay, Muscat, Eva, Cayetana et Pardina [88]. En ce qui concerne la bière, ce composé provient du houblon et est présent majoritairement sous forme glycosylée [158].

Le nérolidol peut également être produit par la levure au cours de la fermentation [159,160]. Il n'existe pas de données permettant de connaître la proportion de nérolidol produite par la vigne (ou le houblon) et celle produite par la levure. La biosynthèse du nérolidol par la levure en cours de fermentation est un processus complexe que nous allons détailler ci-dessous.

Le nérolidol est un isomère du farnésol

Le nérolidol fait partie de la famille des sesquiterpénols et est un isomère du farnésol. Cette isomérisation correspond à la migration du groupe hydroxyle de la position 1 à la position 3 du farnésol (Figure 34), c'est le même type de réaction qui régit l'équilibre entre le géraniol et le linalol dans le vin. Cette réaction dépend des conditions du milieu, les pH acides favorisant la présence de nérolidol [160,161]. Notons que cette isomérisation peut être catalysée chimiquement avec du tungstène [162]. La levure ne

synthétise qu'un seul des 4 isomères de conformation du farnésol : le E,E farnésol [163], par voie de conséquence, on peut penser que le nérolidol produit est d'isométrie E,E en condition acide. Ce qui est confirmé par l'absence d'autres pics dont l'identification correspondrait à un isomère autre du nérolidol dans nos conditions lors de l'analyse GC-MS bien que dans nos conditions il n'aient pas été possible d'affirmer avec certitude que le nérolidol produit est d'isométrie E,E

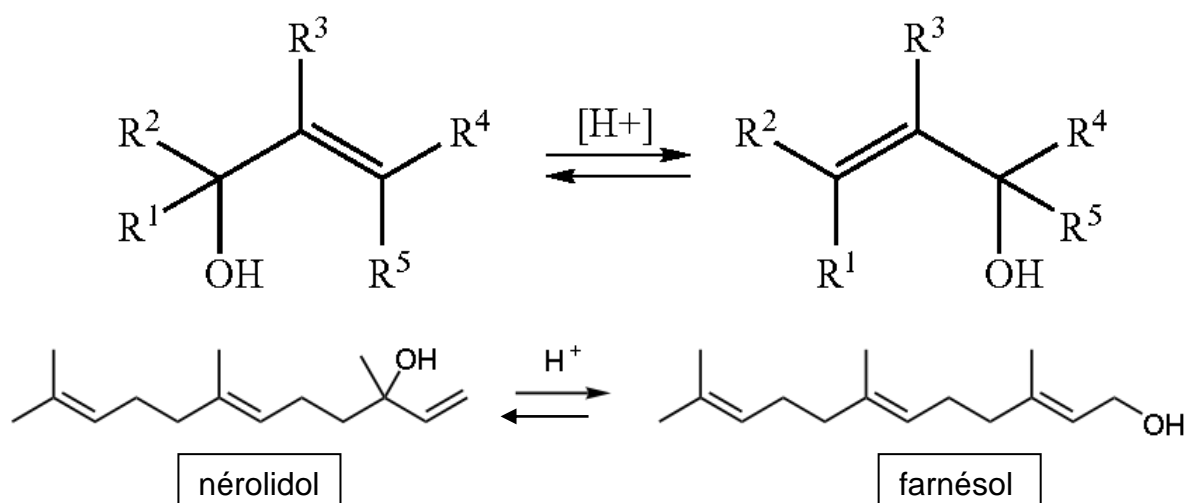


Figure 34 : isomérisation d'un alcool pérylique tertiaire (cas du nérolidol) en alcool pérylique primaire (cas du farnésol) en fonction de la concentration en ions H^+

Synthèse du farnésyl pyrophosphate, précurseur du farnésol

Le précurseur du farnésol est le farnésyl pyrophosphate. Ce dernier est un intermédiaire de synthèse du squalène qui en présence d'oxygène moléculaire [164] servira à la synthèse de l'ergostérol (Figure 35).

En absence d'oxygène (cas de la fermentation alcoolique), la synthèse de l'ergostérol ne peut être menée à son terme et le squalène s'accumule, ainsi que les composés situés en amont de la voie. Ainsi l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) (C5), le géranyl-pyrophosphate ((E)-GPP (C10)), le farnésyl-pyrophosphate (E,E)-FPP (C15) et le géranyl-géranyl-pyrophosphate (E,E,E)-(GGPP) (C20) continuent d'être synthétisés.

La présence d'un groupement pyrophosphate (ou phosphate) sur ces molécules, leur confère un caractère chargé qui les empêche de diffuser à travers les membranes.

Une fois déphosphorylés, ces intermédiaires ont des propriétés très variées qui en font des produits à très fortes valeurs économiques. De ce fait, la levure *S.cerevisiae* est

largement utilisée et étudiée afin de produire ces intermédiaires en quantité industrielle notamment pour la production de l'artémisine et de taxol (Tableau 37).

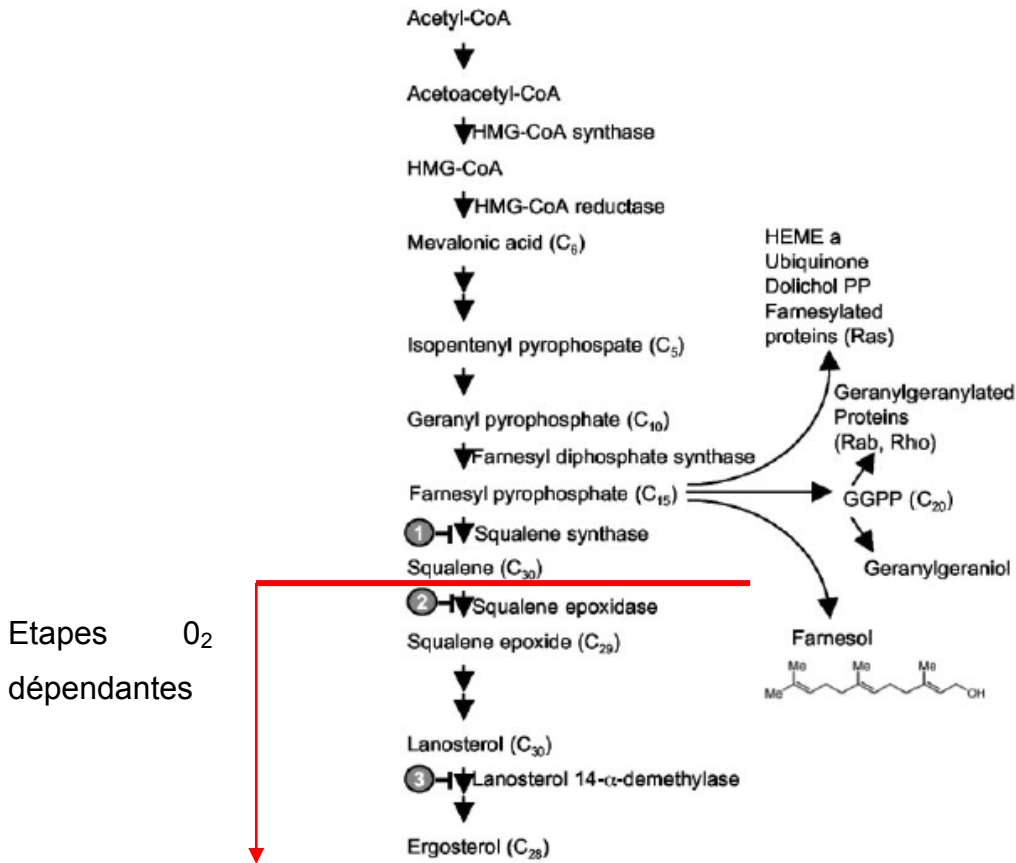


Figure 35 : Voie de synthèse de l'ergostérol chez la levure (d'après [165])

Tableau 37 : principales applications de l'utilisation des précurseurs terpéniques de la voie des stérols chez *S.cerevisiae*.

Précurs eurs	Composés	Applications	Production par <i>S.cerevisiae</i>	
			naturelle	Transformée
GPP	Géranol/ linalol	Parfumerie	15 µg/L [166]	~mg/L [167]
	Farnésol/ Nérolidol	Parfumerie, antifongique	10-300 µg/L [31]	~100mg/L [160]
FPP	Artémisine	Antipaludéen anticancéreux, herbicide, algicide		~100mg/L [168]
GGPP	Géranyl- géranol	Parfumerie, précurseur vit A et E		~g/L [169]
	Taxol	Anticancéreux		~mg/L [170]

Du farnésyl pyrophosphate au farnésol

Les recherches menées pour identifier les enzymes impliquées dans la déphosphorylation des intermédiaires de la voie de synthèse de l'ergostérol n'ont pas permis d'identifier avec certitude la ou les enzymes impliquées. Faulkner et al [171] ont montré que les protéines Lpp1p (Lipid phosphate phosphatase) et Dpp1p (Diacylglycérol pyrophosphate phosphatase) de levure permettent la déphosphorylation *in vitro* du GGPP en géranyl géraniol, néanmoins M.Oswald et al [167] ont montré que ces 2 enzymes ne permettent pas la déphosphorylation du GPP en géraniol. En 2006, Song et al [172] ont découvert l'existence d'une phosphorylase de levure active sur le GPP, le FPP et le GGPP *in vitro*. Cette enzyme correspond à la protéine codée par le gène *PHO8* tronquée des 62 derniers acides aminés, mais à notre connaissance aucune étude n'a permis de montrer que cette protéine était active *in vivo* sur le GPP ou le FPP intra-cellulaire.

L'incapacité à identifier sans ambiguïté ces enzymes conduit à postuler l'hypothèse d'une hydrolyse chimique du farnésyl pyrophosphate. Cette hydrolyse, qui nécessite un milieu acide, pourrait se faire dans la vacuole ou dans le milieu de culture. L'utilisation d'une souche déficiente pour la squalène synthase, surproductrice de FPP, permet d'étayer cette hypothèse [160]. Dans cette expérience les auteurs ont ajouté au milieu de culture cette souche de levure de la phosphatase acide de pomme de terre. Après mesure, il a été montré que les concentrations de farnésol et de nérolidol extra-cellulaire avait considérablement augmenter (facteur 6) ce qui indique la présence de FPP non hydrolysé dans le milieu de culture. Ces expériences conduisent également à postuler l'existence d'un transporteur capable d'expulser le farnésyl pyrophosphate.

En résumé, le farnésyl pyrophosphate, lors de la fermentation, s'accumulerait du fait de l'absence d'oxygène et du blocage de la voie de synthèse de l'ergostérol au-delà du squalène. Le FPP serait alors expulsé via un transporteur vacuolaire ou membranaire, et serait en partie hydrolysé en farnésol du fait de l'acidité du milieu. Le farnésol serait ensuite isomérisé en nérolidol.

Toxicité du farnésol

Plusieurs études indiquent que le farnésol est toxique pour différentes souches de levure *S. cerevisiae*, à des concentrations variées 5-500 μ M sur boîte YPG à 30°C (fond génétique BY) [152]; 6,25 à 100 μ M de farnésol à 30°C sur boîte YPG (fond X2180) [153,173]. Ces études ne précisent pas l'isomérisation du farnésol utilisé, mais elles

montrent que la toxicité serait liée à la production de ROS (oxygen reactive species) lors du transfert des électrons dans la respiration, en particulier au niveau du complexe III [153]. En réponse à l'ajout de farnésol, on observe chez la levure, une modification de sa paroi cellulaire et une inhibition du transport mitochondrial d'électrons [152] ce qui permet d'expliquer que les souches mutantes petite¹ (Rho-) soient insensibles au farnésol [152].

Dans notre cas, ce phénomène de toxicité du farnésol ne pourrait alors avoir lieu qu'au tout début de la fermentation, c'est-à-dire, au moment où les mitochondries sont encore actives.

Néanmoins, la toxicité du farnésol ne semble pas parfaitement comprise. En effet, *S.cerevisiae* est utilisée pour surproduire du E,E farnésol dans des concentrations qui dépassent largement celles décrites comme étant toxiques. On peut ainsi obtenir dans un milieu complexe (galactose supplémenté en acides aminés) à 26°C, avec des souches de levures surexprimant l'HMG-Coa-réductase, plus de 140 mg/L de farnésol lorsque le pH est maintenu à 7 ou un mélange de 122mg/L de farnésol et 99 mg/L de nérolidol lorsque le pH n'est pas contrôlé [165]. L'utilisation de mutant de la squalène synthase (*ERG9*) permet même d'atteindre jusqu'à 2,5g/L de E,E farnésol en fed batch [174].

De telles concentrations de farnésol (qqm mM) dépassent largement les doses toxiques de farnésol ajoutées lors des études de toxicité citées plus haut (ordre du μ M). Il est possible que cette résistance soit souche-dépendante ou provienne des composants du milieu, ou encore que les isomères utilisés dans les études de toxicité ne soient pas ceux tolérés par la levure.

Les effets toxiques du nérolidol n'ont pas été étudiés chez la levure *S. cerevisiae*. Il est possible que la formation de ce composé puisse être un moyen de détoxification du farnésol.

Il est aussi intéressant de noter que l'ajout de E,E farnésol et E,E nérolidol à des doses de 30 et 60 μ M respectivement proches de celles évaluées comme étant toxiques pour *S.cerevisiae* induisent des mécanismes de quorum sensing (QSM) chez *Candida albicans* conduisant l'organisme à passer d'un état de développement par division clonale à celui de filament [175].

¹ Levure ayant des mitochondries déficientes

Recherche du gène candidat porté par le mQTL

La bibliographie montre que le farnésol et le nérolidol font partie des molécules du métabolisme secondaire de la levure, que leur production est plus élevée en anaérobiose qu'en aérobiose, et que le farnésol au moins est toxique pour la levure, ce qui permet d'orienter les recherches de gènes candidats. Ce dernier devrait donc être au choix impliqué

- dans le métabolisme de l'ergostérol
- dans des voies de détoxification (transporteurs...)
- dans des mécanismes de protection contre les ROS
- dans des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation

Nous avons identifiés un mQTL du nérolidol dans chacun des trois dispositifs d'étude. Comme les zones chromosomiques de ces mQTL se recouvrent, nous avons décidé de ne retenir qu'une seule zone, celle pour lequel le LOD score est le plus élevé et la zone couverte la plus petite (dispositif A). Cette zone porte plusieurs gènes (Tableau 38), dont un qui a retenu plus particulièrement notre attention : le gène *PDR8*. Ce gène est un facteur de transcription de la famille des « doigts de zinc » activant 16 gènes dans le fond génétique BY (laboratoire) [176]. Ce facteur de transcription a été identifié par homologie avec d'autres facteurs de transcription de levure mais son rôle physiologique n'est pas connu.

Les fonctions des gènes cibles modulés par *PDR8* correspondent à plusieurs des fonctions attendues pour le gène candidat recherché. On trouve ainsi parmi les 16 gènes cibles : le gène *ERG8* qui est impliqué dans la synthèse des précurseurs de la voie du stérol, mais également des gènes codant pour des transporteurs membranaires (*AZR1*, *QDR2*, *YOR1*, *PDR15*), un gène impliqué dans la résistance aux ROS (*CTT1*), et enfin deux phosphorylases (*DAK2* et *GPH1*), (Tableau 39).

La fonction du gène *PDR8* pourrait donc être compatible avec son implication dans la concentration de farnésol présent dans le milieu. Mais il faut rappeler qu'un gène ne peut être considéré comme candidat que s'il existe des variations dans les gènes issus des deux parents.

Tableau 38 : gènes du QTL du nérolidol ([source SGD](#))

Gènes	Noms systématiques	Descriptions
<i>NEJ1</i>	<i>YLR265C</i>	Protein involved in regulation of nonhomologous end joining; interacts with DNA ligase IV components Dnl4p and Lif1p; repressed by MAT heterozygosity; regulates cellular distribution of Lif1p
<i>PDR8</i>	<i>YLR266C</i>	Transcription factor; targets include ATP-binding cassette (ABC) transporters, major facilitator superfamily transporters, and other genes involved in the pleiotropic drug resistance (PDR) phenomenon
<i>BOP2</i> <i>SEC22</i>	<i>YLR267W</i> <i>YLR268W</i>	Protein of unknown function R-SNARE protein; assembles into SNARE complex with Bet1p, Bos1p and Sed5p; cycles between the ER and Golgi complex; involved in anterograde and retrograde transport between the ER and Golgi; synaptobrevin homolog
	<i>YLR269C</i>	Dubious open reading frame unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data
<i>DCS1</i>	<i>YLR270W</i>	Non-essential hydrolase involved in mRNA decapping, may function in a feedback mechanism to regulate deadenylation, contains pyrophosphatase activity and a HIT (histidine triad) motif; interacts with neutral trehalase Nth1p
	<i>YLR271W</i>	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm and the nucleus and is induced in response to the DNA-damaging agent MMS
<i>YCS4</i>	<i>YLR272C</i>	Subunit of the condensin complex; required for establishment and maintenance of chromosome condensation, chromosome segregation, chromatin binding of condensin, tRNA gene clustering at the nucleolus, and silencing at the mating type locus
	<i>tV(AAC)L</i>	tRNA-Val
	<i>YLRCDelta16</i>	Ty1 LTR
	<i>YLRWDelta17</i>	Ty1 LTR
<i>PIG1</i>	<i>YLR273C</i>	Putative targeting subunit for the type-1 protein phosphatase Glc7p that tethers it to the Gsy2p glycogen synthase

Tableau 39 : gènes activés par le facteur de transcription PDR8 chez la levure *S.cerevisiae* (fond BY) [176]

Cibles de PDR8	Fonctions	Cibles de PDR8	Fonctions
AZR1	Transporteur membranaire	YGR035c	Fonction inconnue
YJL216c	A glucosidase	GTT2	Glutathione S-transferase
YLL056c	Fonction inconnue	YLR179c	Fonction inconnue
CTT1	Catalase protège contre les ROS	SNG1	Protéine impliquée dans la résistance à la nitrosoguanidine
QDR2	Transporteur membranaire	DAK2	Dihydroxyacetone kinase
YOR1	Transporteur ABC	PDR15	Transporteur ABC
GPH1	Glycogène phosphorylase	CIN5	Facteur de transcription de la famille YAP1
YMR315w	NADP(H) oxidoreductase activity	ERG8	Phosphomevalonate kinase, impliquée dans la biosynthèse des isoprenoides et sterols

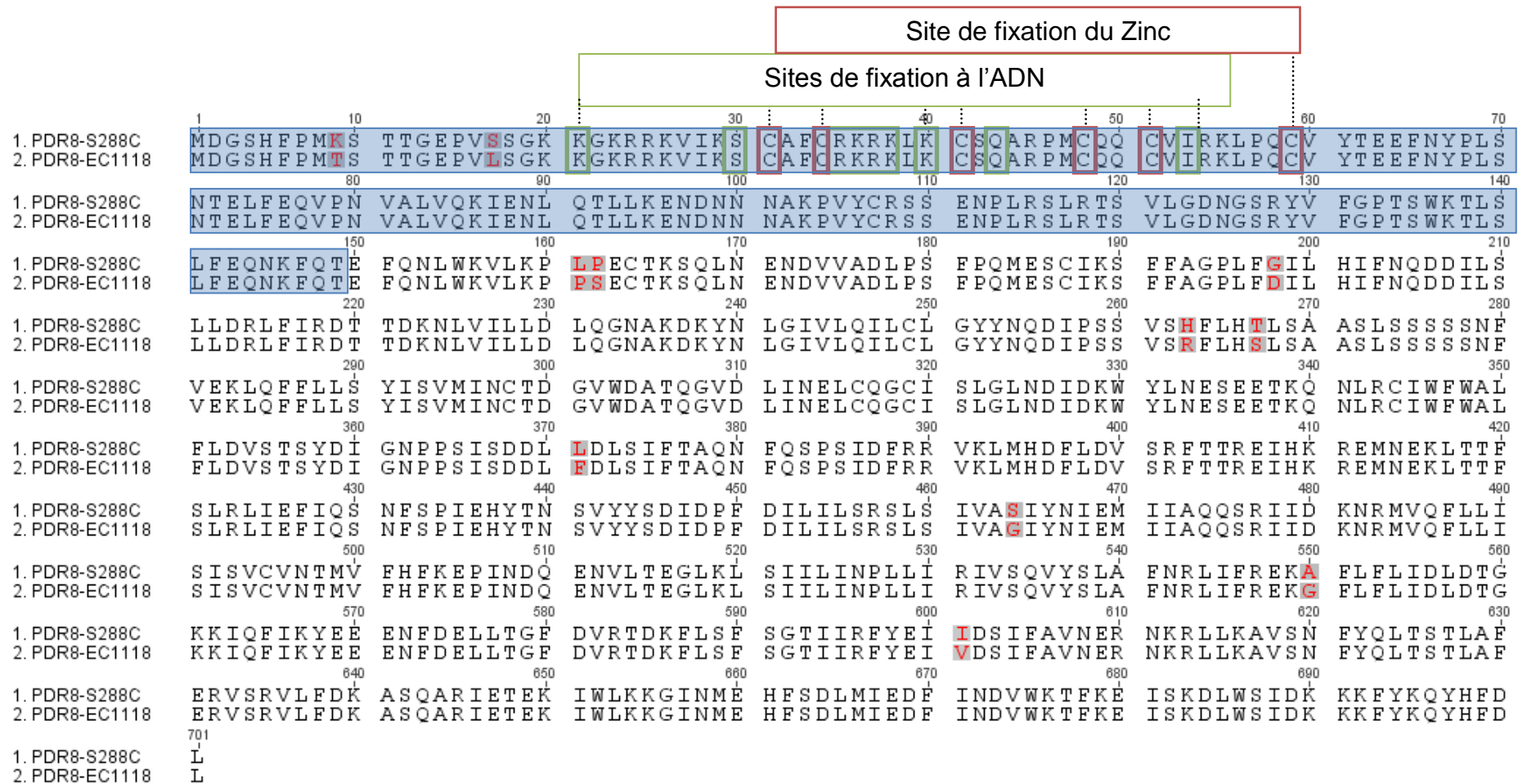


Figure 36 : domaines du gène PDR8 et alignement entre la souche EC1118 et S288C. Les acides aminés divergeant entre les deux séquences sont représentés en rouge et surlignés en gris. Les acides aminés impliqués dans la fixation de l'ADN et du zinc sont entourés en vert et en rouge respectivement

Polymorphisme et domaines de Pdr8p

Le gène *PDR8* porte 11 mutations non synonymes entre les souches 59a (ou EC1118) et S288C (Figure 36). Les facteurs de transcription de cette famille étant assez bien connus, il est possible de localiser sur les séquences protéiques, les acides aminés impliqués dans la fixation du zinc et la fixation à l'ADN. Deux de ces mutations sont localisées dans la zone de reconnaissance de l'ADN de *PDR8*¹ (Figure 36).

Les alignements de séquences réalisés avec les gènes homologues de *S. mikatae* ou *S. paradoxus*, puis avec les gènes homologues des souches de levures disponibles dans la banque de données de l'Institut SANGER ne permettent pas de tirer de conclusions quant à l'origine de ces mutations contrairement aux gènes des mQTLs suivants. Il apparaît que ce gène est extrêmement polymorphe au sein de l'espèce *cerevisiae*.

Le gène *PDR8* paraît donc être un bon gène candidat pour expliquer les variations de concentration de farnésol entre la souche 59a et S288c. Il rassemble en effet les deux conditions (fonctions probables et polymorphisme). Nous avons choisi d'étudier ce gène plus en détails.

Validation de l'influence du polymorphisme du gène PDR8 sur la concentration en nérolidol dans le milieu.

Validation par étude du délétant : Pour évaluer l'influence du gène *PDR8*, la première étape consiste à vérifier que la délétion de ce gène dans un fond génétique BY4741 entraîne bien une baisse de la production de nérolidol. Le milieu de référence choisi pour travailler sur le/les gène(s) candidat(s) est le MS300 1% de FA sans ajout de géraniol à 20°C car ce milieu permet d'avoir le mQTL le plus fort pour ce composé (explication de plus de 72% des différences observées sur les 30 ségréants). Les souches BY sauvage et $\Delta PDR8$ ont été mise à fermenter suivant les protocoles décrits en Matériels et Méthodes et les surnageants analysés par SBSE-LD-GC-MS.

¹ identifié par homologie de séquence avec la séquence de reconnaissance du facteur de transcription *GAL4* par analyse BLASTp [271]

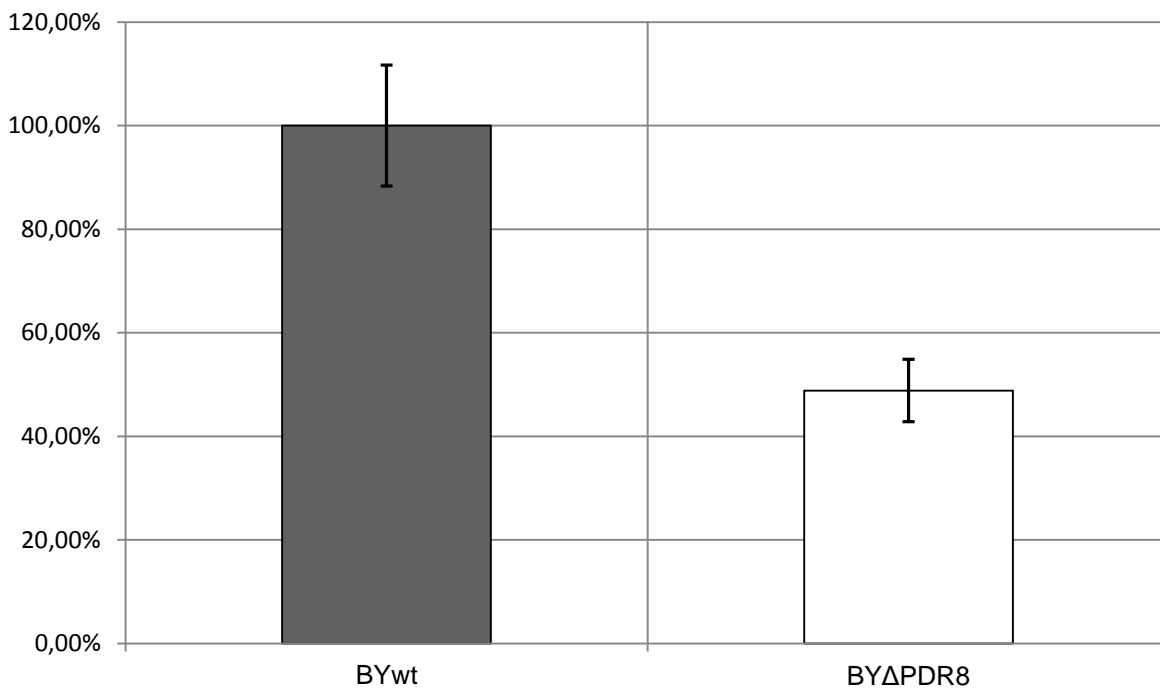


Figure 37 : Effet de la délétion du gène *PDR8* sur la concentration en néroïdol (fond BY ; milieu MS300 1% FA ; T°=20°C ; n=3)

En absence du gène *PDR8*, la concentration de néroïdol trouvée dans le milieu diminue de moitié, (p -value<0,001 pour un t-test comparant l'égalité) ce qui met bien en évidence l'implication du gène *PDR8* dans ce phénotype (Figure 37).

Validation par hémizygotie réciproque: Par la suite, deux diploïdes issus des croisements entre les souches haploïdes S288cΔ*PDR8* et 59a sauvage, et S288c sauvage et 59aΔ*PDR8* ont été obtenus comme le montre la Figure 38 et suivant les protocoles décrits en Matériels et Méthodes. Ces souches ne présentent qu'une seule version allélique fonctionnelle correspondant à l'un ou l'autre des types parentaux.

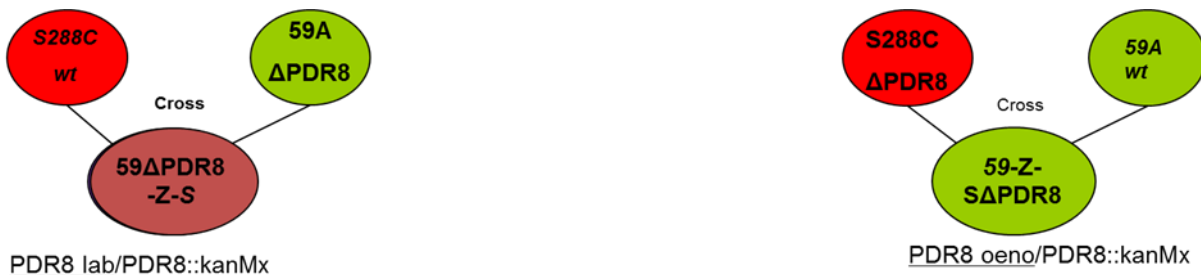


Figure 38 : Production de souches diploïdes hybrides contenant un allèle unique pour le gène *PDR8*

La production de nérolidol de chacune des souches est évaluée dans le même milieu que précédemment (MS300 1% de facteurs anaérobie, sans ajout de géraniol). Les résultats sont présentés Figure 39.

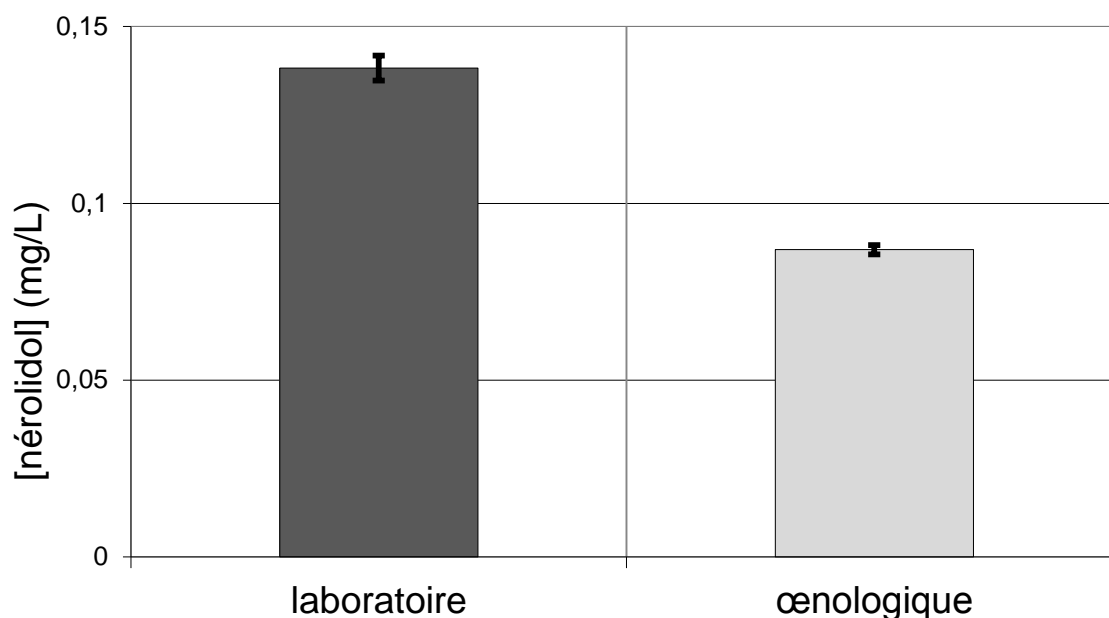


Figure 39 : Concentration en nérolidol en fonction de l'origine allélique du gène *PDR8* (n=3)

Cette expérience permet de confirmer que la différence de concentration en nérolidol est bien liée aux variations alléliques de *PDR8* et donc que les variations de séquence présentées plus haut sont bien à l'origine des phénotypes différents obtenus. Il n'a pas été observé de différence de cinétique fermentaire entre les deux souches (résultats non montrés).

Recherche des cibles du gène *PDR8* impliquées dans la production de nérolidol

Une fois ce mQTL validé, il était important d'essayer de caractériser la façon dont *PDR8* pouvait moduler la production de nérolidol. Aussi nous avons choisi d'évaluer l'effet de la délétion des 16 gènes activés par *PDR8* sur la production de nérolidol, dans le même milieu fermentaire utilisé jusqu'ici (MS300 1% de FA). Pour cela nous avons utilisé la collection EUROSCARF qui a comme fond génétique la souche BY4741 (même origine que S288c). La croissance de cette souche est faible sur milieu synthétique minimum à cause de son auxotrophie pour la leucine qui est due à une mutation sur le gène *LEU2* [177]. Cela explique les mauvaises performances de cette souche en milieu MS300 1%

de FA (Figure 40) (plus de 18 jours de fermentations (interrompue avant la consommation totale du sucre) contre 5 à 7 pour une souche œnologique). Ce retard peut expliquer le « bruit de fond » (erreurs provoquées par les répétitions) sur la composition aromatique du surnageant.

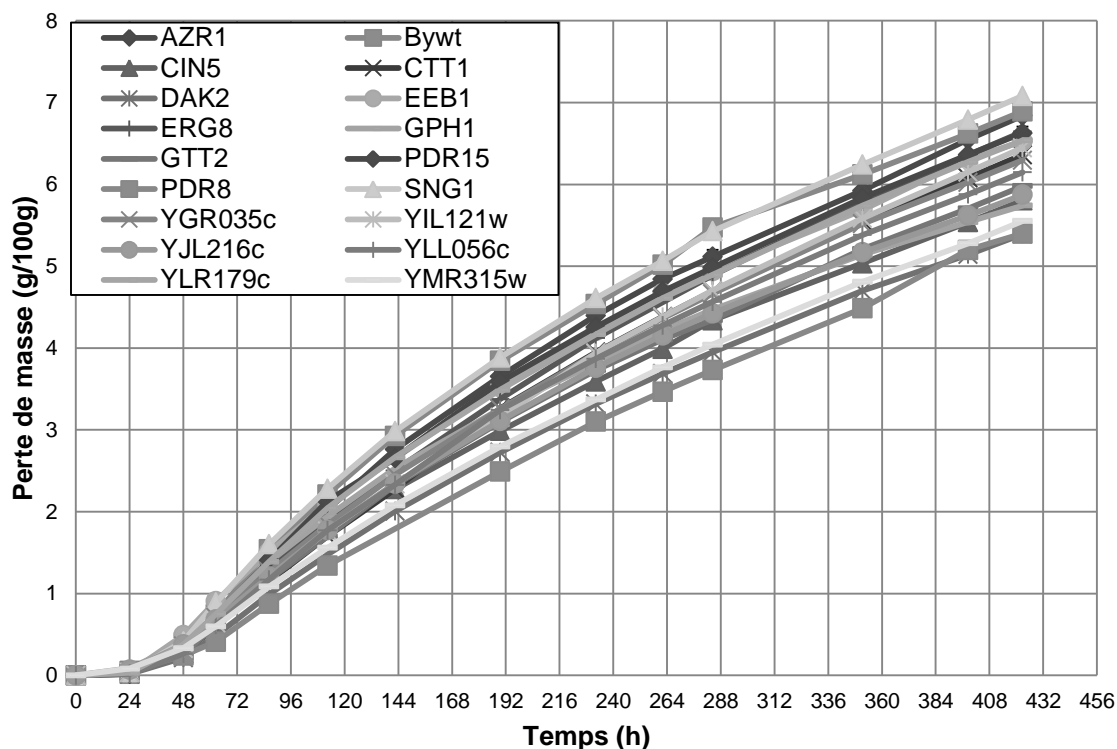


Figure 40 : Cinétique de fermentation des souches BY4741 délétées des gènes cibles du facteur de transcription *PDR8* (n=2 minimum ; sauvage n=4)

La délétion du gène *ERG8* est létale ce qui ne permet pas de l'étudier dans une souche haploïde comme BY4741. Par contre il est possible d'essayer de tester le phénotype d'une souche diploïde (BY4743) ne possédant qu'une des deux copies fonctionnelles. Nous avons pu vérifier qu'un mutant diploïde hétérozygote témoin (ici $\Delta ERG20/+$) produit autant de nérolidol qu'une souche haploïde sauvage. On peut alors comparer la concentration en nérolidol du mutant diploïde hétérozygote $\Delta ERG8/+$ soit au mutant diploïde témoin soit au mutant haploïde témoin.

Pour déterminer quels sont, parmi les gènes cibles du gène *PDR8*, les gènes impliqués dans la production de nérolidol nous avons réalisé un test de Dunnett. Ce test permet de comparer la moyenne d'un individu (ici le témoin sauvage) à celle d'une série d'autres

moyennes et classer les individus en deux groupes : ceux qui sont statistiquement égaux au témoin (groupe A) et ceux qui ne le sont pas (groupe B). Le risque α retenu est de 0,05 (Figure 41).

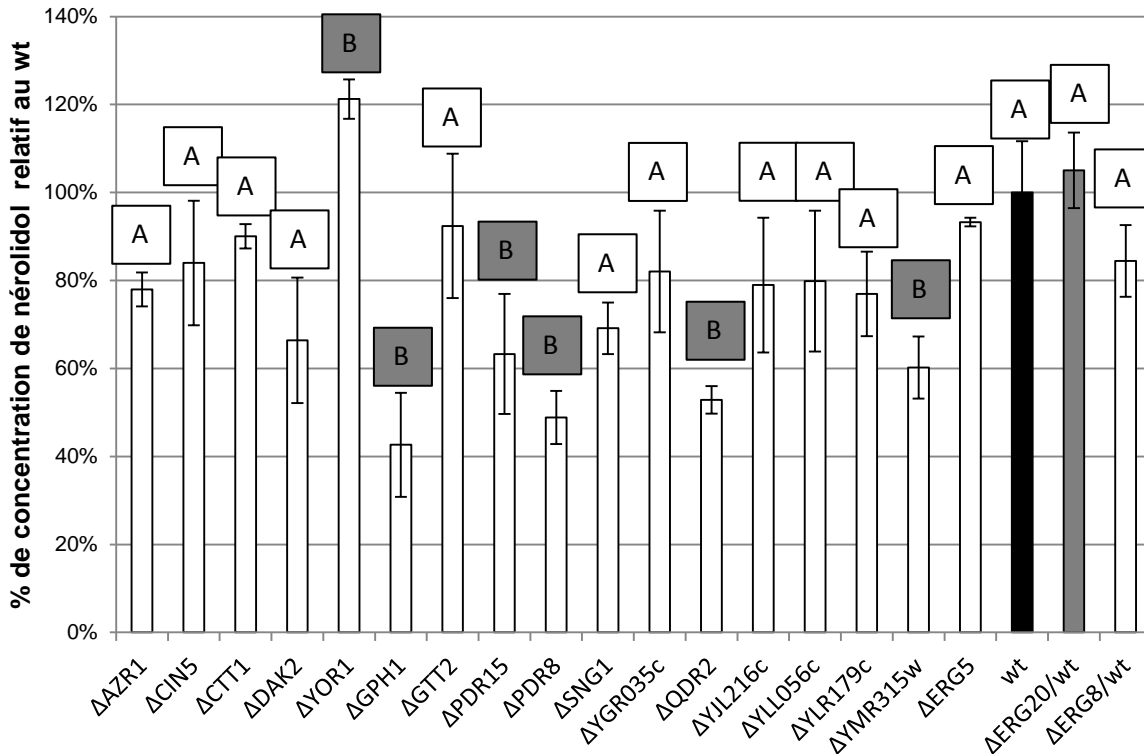


Figure 41 : Production de nérolidol par les mutants délétés des cibles du gène PDR8 en % relatif au sauvage (barre d'erreur = erreur standard ; n=2 minimum , contrôle sauvage n=4).

La délétion des gènes *PDR15*, *YIL212c* (*QDR2*), *YMR315w* et *GPH1* entraîne une baisse significative de la production de nérolidol (respectivement de -48%, -52% et -58%). Curieusement la délétion du gène *YOR1* conduit à une augmentation de la concentration de nérolidol dans le milieu. Comme *YOR1* est un transporteur, nous avons supposé que cette observation relevait plus de l'artéfact que de l'implication biologique de ce gène. Le nérolidol étant un des isomères du farnésol qui lui-même peut être réduit par la levure en 2,3 dihydro farnésol, il nous a paru utile de vérifier l'effet de la délétion de ces gènes sur les teneurs de ces deux composés (Figure 42). Dans ce set, nous avons également ajouté le délétant BY4743 Δ *ERG8*+. Ceci nous a permis de vérifier que l'effet observé n'était pas dû à une modification de l'équilibre des formes en présence.

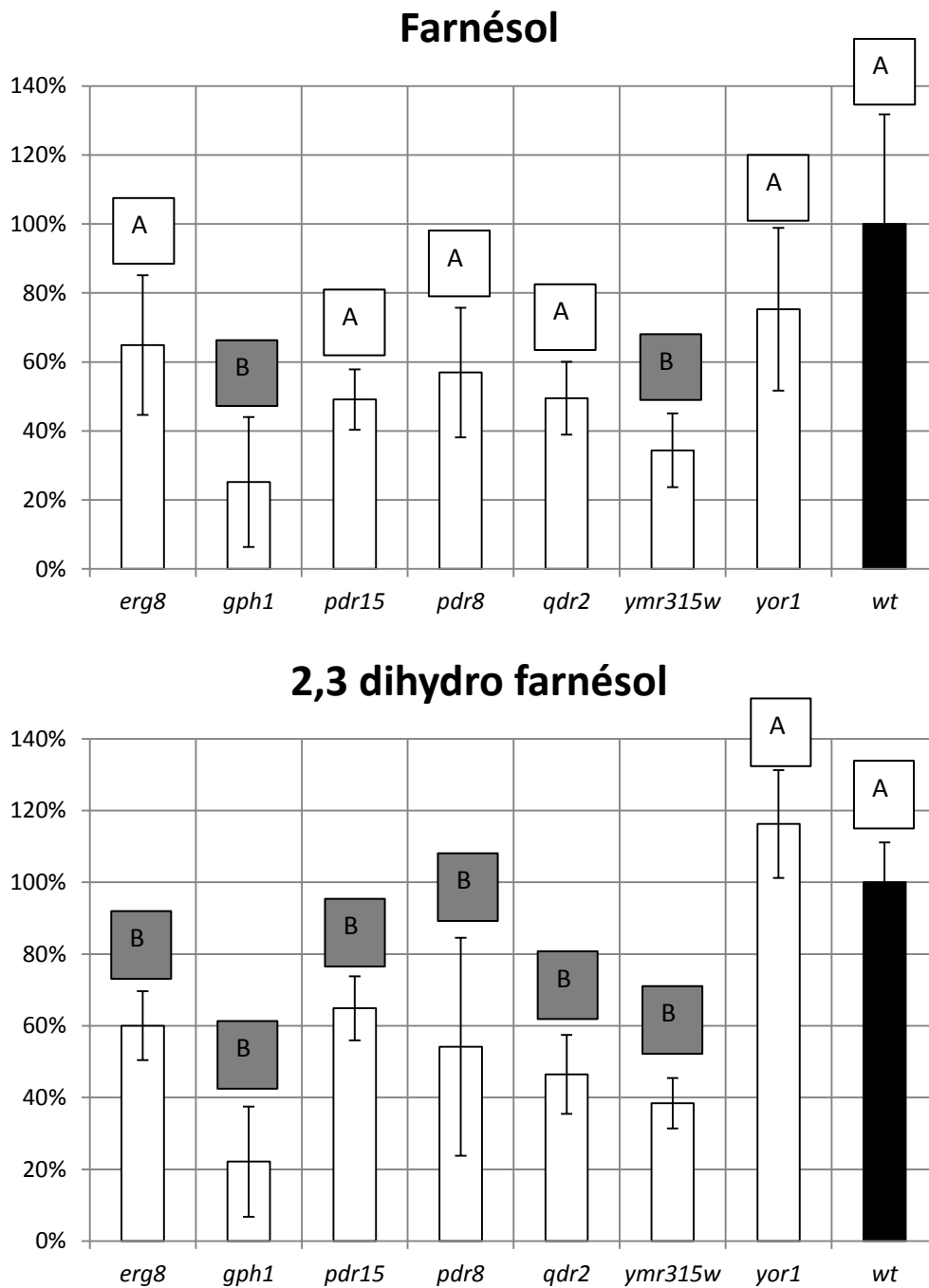


Figure 42 : Effet de la délétion des gènes ciblés par le facteur de transcription PDR8 sur la production de sesquiterpénol, Groupe A = les valeurs sont statistiquement équivalentes au témoin (sauvage), groupe B, les valeurs sont statistiquement différentes (barre d'erreur = erreur standard ; n=2 minimum , contrôle sauvage n=4)

Interprétation

Les gènes *PDR8*, *PDR15*, *YMR315w*, *QDR2* et *GPH1* ont été retenus comme étant impliqués de façon significative dans la production des sesquiterpénols suivants : nérolidol, farnésol et 2,3 dihydrofarnésol.

Afin d'expliquer le rôle probable de ces gènes, nous proposons les hypothèses suivantes :

- *Le gène PDR8 déjà décrit plus haut pourrait avoir d'autres cibles non identifiées influençant également la production de ces trois sesquiterpénols.*
- *Le gène PDR15 qui est un transporteur ABC expulsant divers métabolites.*

La baisse de la concentration des trois sesquiterpénols cités observée lors de la délétion de ce gène semble similaire à celle causée par la délétion du gène *PDR8*. Comme ce gène est un transporteur répondant à des conditions de stress comme c'est le cas lors de la fermentation [178,179], il est certainement actif lors de ce processus. Il pourrait alors s'agir d'un ou du transporteur à FPP, farnésol ou nérolidol dont l'identité est inconnue. Les recherches sur ce gène sont en cours.

- *Le gène YMR315w*

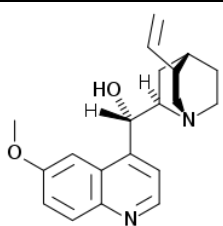
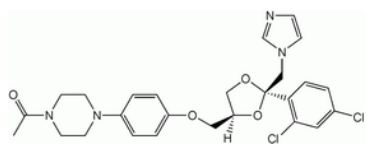
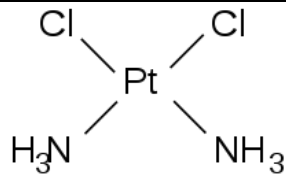
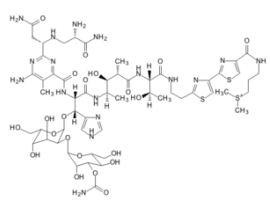
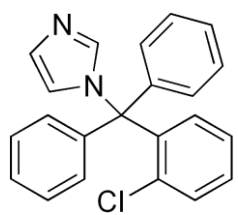
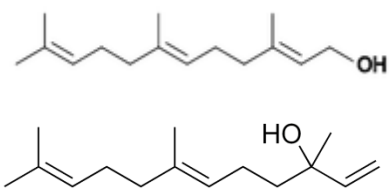
Ce gène est une oxydo-reductase [165]. Sa délétion entraîne une baisse de la production des sesquiterpénols dosés ce qui peut s'expliquer par le fait que ce gène conduit à la production de NADPH, H⁺ qui est un cofacteur essentiel de la synthèse lipidique, elle-même reliée à la synthèse de terpénols. De plus on sait que le 2,3 dihydro farnésol est issu de la réduction du farnésol par une enzyme inconnue. Cette enzyme pourrait être Ymr315wp mais cela reste à prouver.

- *Le gène QDR2*

La délétion de ce transporteur transmembranaire entraîne une sensibilité à la quinidine, au kétoconazole, à la bléomycine A2 et au Barban (4-chloro-2-butynyl [3-chlorophenyl] carbamate) [180]. Le farnésol étant toxique, une analogie de structure entre ces composés et le farnésol (ou le nérolidol ou le FPP) pourrait expliquer le rôle de ce transporteur chez la levure. Cependant, si l'on regarde la structure des molécules transportées, aucune ressemblance n'apparaît de manière immédiate (Tableau 40).

Néanmoins la grande diversité de structure des molécules expulsées par ce transporteur n'exclut pas la possibilité que ce transporteur permette un flux de FPP, nérolidol ou farnésol. Les recherches sur ce gène sont en cours.

Tableau 40 : structure des molécules expulsées par le transporteur QDR2

Quinidine	Kétoconazole	Cis platine
		
Bléomycine A2	Barban	Farnésol (haut) / Nérolidol (bas)
		

- **Le gène *GPH1* :**

Ce gène code pour une glycogène phosphorylase. La protéine Gph1p catalyse la réaction séquentielle de phosphorylation de la liaison α 1,4 des unités glucosidiques, jusqu'à ce qu'il ne reste plus que deux ou trois unités glucose avant le point de branchement du polymère, où intervient l'enzyme « débranchante » (Gdb1p).

Les auteurs ayant caractérisé les cibles de *PDR8* dans la levure [176] ont pu observer que *PDR8* se fixe sur les promoteurs des gènes *SNG1* et *PDR15* mais pas sur le promoteur du gène *GPH1*. Ils proposent que ce gène soit en fait activé indirectement par *PDR8*. En effet la délétion de *PDR8* conduit à une transcription modérée de *GPH1*. Cela permettrait d'expliquer pourquoi la délétion de ce gène entraîne une baisse plus importante de nérolidol que lorsque le gène *PDR8* est délété.

La délétion du gène *GPH1* chez *S.cerevisiae* entraîne une accumulation de glycogène [181] mais également de ROS ce qui conduit à un vieillissement prématuré du mutant [182]. Aucun phénotype anormal n'a cependant été découvert chez la levure lorsque ce gène est délété.

Métabolisme du glycogène chez la levure

Chez la levure le glycogène et le tréhalose (un protectant osmotique [183]) sont les deux formes de stockage de sucre. Ces deux polymères peuvent représenter jusqu'à 25% de la masse sèche de la levure de laboratoire [184]. On notera que pour les levures de vin, cette proportion est de 10 à 20% pour le tréhalose et 4 à 15% pour le glycogène [185]. Cette dernière donnée permet de constater le rôle central du glycogène pour la levure et tout particulièrement pour les souches œnologiques.

Conclusion

Hypothèse sur l'existence d'un transporteur FPP

Cette étude a permis de montrer que la délétion des transporteurs *PDR15* et *QDR2* conduisait à une baisse de la concentration en nérolidol dans le milieu. L'existence de transporteur de farnésol ou de nérolidol n'a pas été à notre connaissance mentionnée dans la littérature. En revanche il a pu être montré qu'il existait certainement un transporteur de FPP chez la levure [160]. Ce travail permet de proposer que ces deux gènes pourraient être les transporteurs de FPP. Les raisons du transport FPP vers l'extérieur de la cellule restent obscures. Pourtant cette hypothèse est supportée par les mesures que nous avons effectuées sur l'évolution de la concentration en nérolidol et farnésol dans le milieu de fermentation (Figure 43).

Ces cinétiques montrent une évolution constante de la concentration de ces molécules dans le milieu ce qui pourrait être en faveur d'une expulsion du FPP. Ce dernier serait produit et expulsé durant la phase anaérobie, s'hydrolyserait en farnésol puis s'isomériserait en nérolidol dans un processus chimique indépendant de la levure pendant tout le reste de la fermentation.

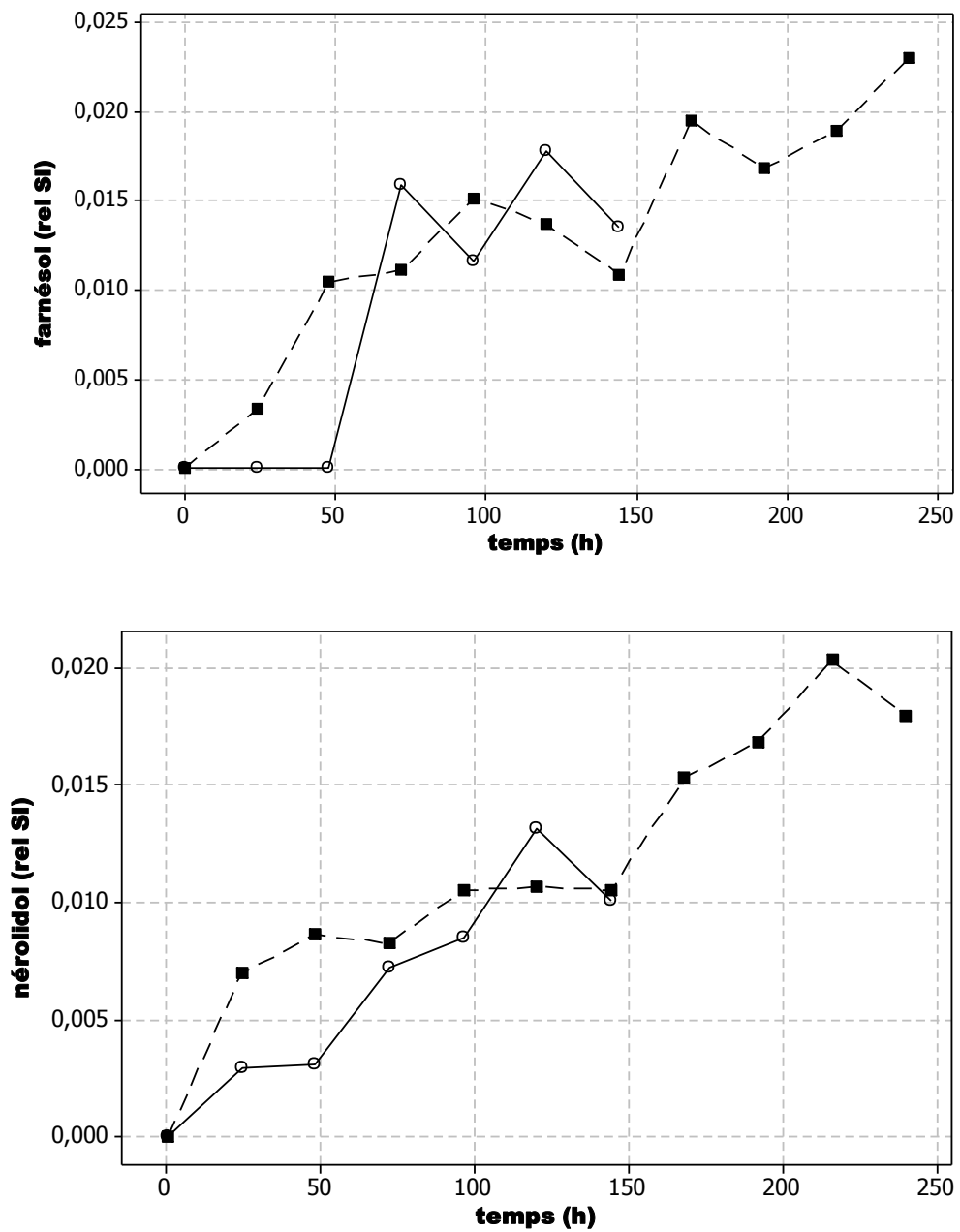


Figure 43 : Cinétique de la concentration de farnésol (haut) et nérolidol (bas) ; unité = semi-quantitatif par rapport au témoin interne 3-octanol 2mg/L ; (MS300 1% FA 20°C 5mg/L de géraniol) carrés noirs S288c, rond blancs 59a (SI= standard interne)

Hypothèses sur le rôle du glycogène dans la synthèse de nérolidol en conditions fermentaires

Comme il est peu probable d'envisager une quelconque activité de l'enzyme *GPH1* sur le FPP, il est logique de penser que l'effet observé est indirect. Il est alors pertinent de s'intéresser à l'activité de *GPH1* durant la fermentation ainsi qu'à l'utilisation du glycogène lors de ce processus.

On notera, tout d'abord, qu'à l'inverse des phosphorylases connues, le glucose-6-phosphate n'est pas un inhibiteur compétitif de *Gph1p* [181,186]. Cela explique que la consommation de sucre par la levure durant la fermentation puisse se dérouler de façon concomitante avec la dégradation du glycogène.

En effet, lors de la fermentation œnologique, la transcription du gène *GPH1* atteint un pic au bout de 40h et diminue par la suite, ce qui est corroboré par une consommation du glycogène pendant cette période [187]. Ce même phénomène a été observé lors de fermentations brassicoles [188]. Il a été montré que dans les deux cas, le glycogène est utilisé par la levure au début de la fermentation pour permettre la synthèse d'ergostérol et d'acide gras saturés [189,190]. On explique cette utilisation du glycogène par le fait que ce dernier soit très rapidement mobilisable.

Dans ce cas, on peut imaginer qu'une levure disruptée du gène *GPH1* synthétisera moins d'ergostérol et par voie de conséquence synthétisera moins de précurseurs de cette voie. Ainsi, peu de FPP est produit et par voie de conséquence on ne trouvera que peu de nérolidol dans le milieu. Cette hypothèse est schématisée Figure 44. Cette hypothèse est supportée par le dosage des AGMC dans le milieu pour la souche délétée du gène *GPH1* (donnée non montrées). En effet on observe une baisse de plus de 50% de la concentration en AGMC (C6 à C12).

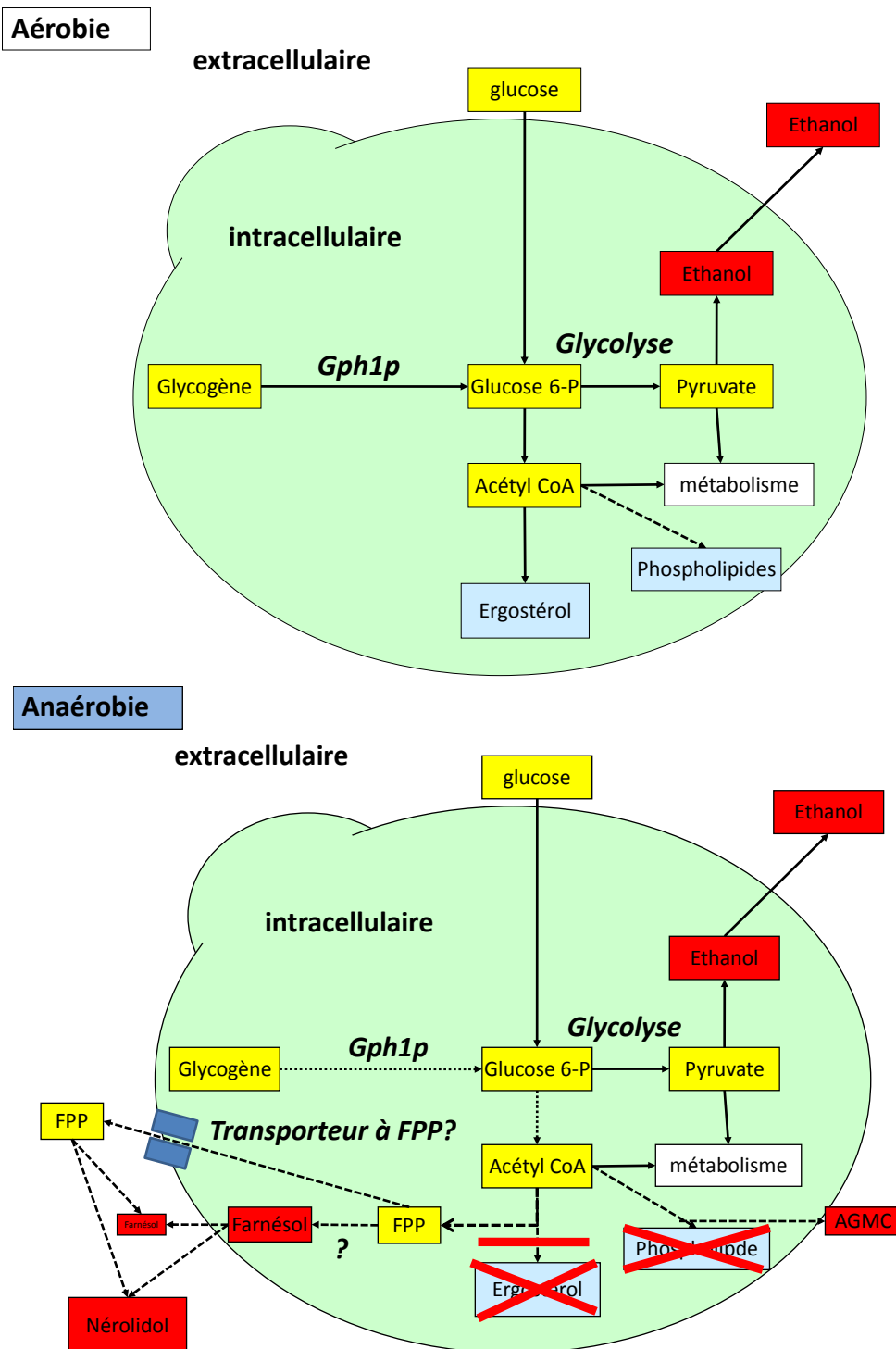


Figure 44 : Effet de la délétion du gène *GPH1* sur le métabolisme de la levure lors de la fermentation œnologique en anaérobie (*AGMC*=Acide gras à moyenne chaîne, *GPH1*=glycogène phosphorylase)

Perspectives

La surexpression des gènes *PDR8*, *PDR15*, *YMR315w*, *QDR2*, *GPH1* et *ERG8* dans un fond génétique de type laboratoire (BY) et de type œnologique (V5) sont en cours de réalisation. Cela permettra de savoir si la surexpression du gène *ERG8* peut permettre une production plus importante de nérolidol ou à l'inverse une baisse par boucle de rétro contrôle. On peut faire l'hypothèse que le gène *PDR8* permet à la levure d'induire la voie des stéroïdes tout en mettant en place des mécanismes de protection comme l'activation des transporteurs membranaires *QDR2* ou/et *PDR15*. De même cette activation concomitante avec l'activation du gène *GPH1* pourrait s'expliquer par le besoin de mobiliser rapidement de l'énergie.

2.1.2. Le mQTL du chromosome XIV : Phénotype 2-phényléthanol

Contexte

Les recherches de mQTL conduites sur les 3 dispositifs expérimentaux précédemment présentés, ont permis de détecter un mQTL par dispositif pour le 2-phényléthanol (Tableau 41). Contrairement au phénotype nérolidol, chaque mQTL identifié se trouve à des coordonnées différentes en fonction du dispositif étudié.

Nous avons étudié la zone génomique de chacun de ces trois mQTL en y recherchant un ou des gènes candidat susceptibles d'expliquer des variations en 2-phényléthanol. Dans ces 3 mQTL différents on dénombre plus de 200 gènes ce qui ne permettait pas une étude aussi approfondie que celle réalisée pour le QTL du nérolidol. La première approche a consisté ici, à faire un état de la bibliographie et de lister les principaux gènes pouvant être reliés au métabolisme du phényléthanol.

Tableau 41 : Caractéristiques des mQTL trouvés pour le 2-phényléthanol

Dispositif	A	B	C
mQTL	ChIV@284,744cM	ChVIII@143,309cM	ChXIV@230,625cM
LOD	2,77	3,206	3,859
p-value	0,044	0,056	0,022
Héritabilité	97,38%	99,05%	X
Part expliquée par le QTL	31,90%	38,86%	46,35%
Intervalles bayesiens	810-954kb	387-483kb	666-699kb
Effet allèle oeno vs allèle labo	Positif	Positif	Positif

Voies biochimiques de production du 2-phényléthanol et gènes impliqués chez *S.cerevisiae*

Le 2-phényléthanol dans le vin

Le 2 phényléthanol est un arôme particulièrement présent dans les vins (20-30mg/L), sa présence est plutôt favorable car il lui confère des arômes de rose [24]. Il est classé dans la famille des « alcools supérieurs » au même titre que l'isoamylalcool et l'isobutanol. D'un point de vue métabolique, il est le produit du catabolisme de la phénylalanine par la levure [56,191], mais son origine est aussi variétale [44].

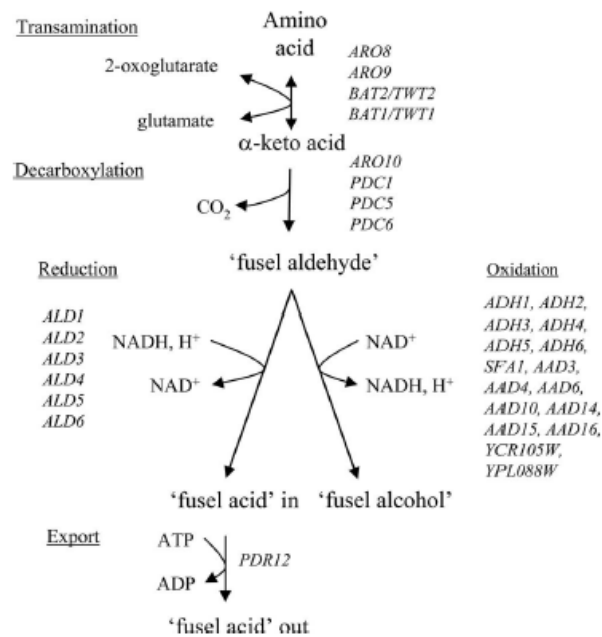


Figure 45 : mécanismes généraux de formation des alcools supérieurs chez la levure en conditions fermentaires [56]

Le phényléthanol fait partie des molécules aromatiques du vin dont la concentration est dépendante de la souche de levure utilisée [21-27], ainsi que de la température [21] et du temps de contact du vin avec les « lies » [193]. Il est donc probable que différents mécanismes contrôlent la production de ce composé lors de la fermentation œnologique.

Gènes liés au 2-phényléthanol

Les gènes impliqués dans la dégradation de la phénylalanine sont potentiellement tous candidats (Figure 45), mais d'autres gènes semblent également impliqués dans les variations de 2-phényléthanol comme par exemple les esters synthases (jouant sur le 2-phényléthylacétate [27,194]), ou des gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote d'une façon général. Ce sont les raisons pour lesquelles il a été entrepris de répertorier de manière succincte l'ensemble des gènes décrits dans la littérature ayant une influence sur la production de phényléthanol (Tableau 42).

Tableau 42 : gènes jouant un rôle dans la production de 2-phényléthanol

Gènes identifiés	Source
deshydrogénases : <i>ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, SFA1,</i> decarboxylases : <i>PDC1, PDC5, PDC6,</i> dehydratase : <i>PHA2, ARO10, ARO80</i>	SGD ¹ ; mot clé « phénylalanine »
<i>ALD1, ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6, AAD3,</i> <i>AAD4, AAD6, AAD10, AAD15, AAD16, YCR105w,</i> <i>YPL088w, THI3, PDR12.</i>	[56]
<i>ATF1, ATF2, EEB1</i>	[62,194]
<i>AAD10, BAT1</i>	[27]

Malheureusement aucun des trois mQTL de phényléthanol trouvés (Tableau 41) ne contient l'un de ces gènes.

Le gène *ABZ1* situé dans le mQTL identifié avec le dispositif C a néanmoins attiré notre attention car il a été montré par C.Ambroset dans son travail de thèse utilisant le même jeu de souche, que le polymorphisme de ce gène entre les souches 59a et S288c, est impliqué dans les cinétiques de fermentation et dans le métabolisme azoté [138].

Nous avons alors choisi d'axer notre travail sur ce mQTL (Tableau 43). Nous disposions en effet des souches diploïdes hémizygotés pour le gène *ABZ1*, grâce au travail de thèse de C.Ambroset. Il semblait fort probable que le gène identifié durant ce travail soit impliqué dans des altérations du métabolisme importantes pouvant expliquer la variation de 2-phényléthanol observée. Un travail a donc été entrepris en utilisant ses mutants pour valider le gène candidat identifié.

Il faut souligner également que ce mQTL est le plus robuste des trois mQTL de 2-phényléthanol identifiés. Il a le Lod-score, la p-value et l'explication la plus élevée des trois mQTL, sa zone génomique contient moins de gènes que les deux autres², et enfin, il a également été identifié pour le 2-phényéthylacétate dans les mêmes conditions ce qui est cohérent avec le métabolisme du 2-phényléthanol.

¹ *S. cerevisiae* Genom Browser (site internet du génome de la levure *S. cerevisiae* souche S288c)

² Le mQTL du dispositif A couvre plus de 100 gènes, celui du dispositif B plus de 61 gènes, pour des raisons de clarté ces derniers ne sont pas présentés au lecteur qui pourra se référer aux liens http du Tableau 41

Tableau 43 : gènes du QTL du phényléthanol (dispositif C) ([source SGD](#))

Gènes	Noms systématiques	Descriptions
<i>ARE2</i>	<i>YNR019W</i>	Acyl-CoA:sterol acyltransferase, isozyme of Are1p; endoplasmic reticulum enzyme that contributes the major sterol esterification activity in the presence of oxygen
<i>ATP23</i>	<i>YNR020C</i>	Putative metalloprotease of the mitochondrial inner membrane, required for processing of Atp6p; has an additional role in assembly of the F0 sector of the F1F0 ATP synthase complex
	<i>YNR021W</i>	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the endoplasmic reticulum; YNR021W is not an essential gene
<i>MRPL50</i>	<i>YNR022C</i>	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit, not essential for mitochondrial translation
<i>SNF12</i>	<i>YNR023W</i>	73 kDa subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex involved in transcriptional regulation; homolog of Rsc6p subunit of the RSC chromatin remodeling complex; deletion mutants are temperature-sensitive
<i>MPP6</i>	<i>YNR024W</i>	Nuclear exosome-associated RNA binding protein; involved in surveillance of pre-rRNAs and pre-mRNAs, and the degradation of cryptic non-coding RNAs (ncRNA); copurifies with ribosomes
	<i>YNR025C</i>	Dubious open reading frame unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; deletion reduces expression of PIS1 gene encoding phosphatidylinositol synthase
<i>SEC12</i>	<i>YNR026C</i>	Guanine nucleotide exchange factor (GEF), activates Sar1p by catalyzing the exchange of GDP for GTP; required for the initiation of COPII vesicle formation in ER to Golgi transport; glycosylated integral membrane protein of the ER
<i>BUD17</i>	<i>YNR027W</i>	Putative pyridoxal kinase, a key enzyme in vitamin B6 metabolism; involved in bud-site selection; diploid mutants display a random rather than a bipolar budding pattern; similarity to yeast BUD16 and human pyridoxal kinase (PDXK)
<i>CPR8</i>	<i>YNR028W</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclophilin), catalyzes the cis-trans isomerization of peptide bonds N-terminal to proline residues; similarity to Cpr4p suggests a potential role in the secretory pathway
	<i>YNR029C</i>	Putative protein of unknown function, deletion confers reduced fitness in saline
<i>ALG12</i>	<i>YNR030W</i>	A-1,6-mannosyltransferase localized to the ER; responsible for the addition of the α -1,6 mannose to dolichol-linked Man7GlcNAc2, acts in the dolichol pathway for N-glycosylation
<i>SSK2</i>	<i>YNR031C</i>	MAP kinase kinase kinase of the HOG1 mitogen-activated signaling pathway; interacts with Ssk1p, leading to autophosphorylation and activation of Ssk2p which phosphorylates Pbs2p; also mediates actin cytoskeleton recovery from osmotic stress
<i>PPG1</i>	<i>YNR032W</i>	Putative serine/threonine protein phosphatase of the type 2A-like phosphatase family, required for glycogen accumulation; interacts with Tap42p, which binds to and regulates other protein phosphatases
<i>HUB1</i>	<i>YNR032C-A</i>	Ubiquitin-like protein modifier, may function in modification of Sph1p and Hbt1p, functionally complemented by the human or <i>S. pombe</i> ortholog; mechanism of Hub1p adduct formation not yet clear
ABZ1	YNR033W	Para-aminobenzoate (PABA) synthase, has similarity to Escherichia coli PABA synthase components PabA and PabB; required for the synthesis of para-aminobenzoic acid, an important intermediate for folate and ubiquinone Q biosynthesis
<i>SOL1</i>	<i>YNR034W</i>	Protein with a possible role in tRNA export; shows similarity to 6-phosphogluconolactonase non-catalytic domains but does not exhibit this enzymatic activity; homologous to Sol2p, Sol3p, and Sol4p
	<i>ARS1427</i>	Autonomously Replicating Sequence
	<i>YNR034W-A</i>	Putative protein of unknown function; expression is regulated by Msn2p/Msn4p
<i>ARC35</i>	<i>YNR035C</i>	Subunit of the ARP2/3 complex, which is required for the motility and integrity of cortical actin patches; required for cortical localization of calmodulin
<i>MRPS12</i>	<i>YNR036C</i>	Mitochondrial protein; may interact with ribosomes based on co-purification experiments; similar to E. coli and human mitochondrial S12 ribosomal proteins
<i>RSM19</i>	<i>YNR037C</i>	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit, has similarity to E. coli S19 ribosomal protein
<i>DBP6</i>	<i>YNR038W</i>	Essential protein involved in ribosome biogenesis; putative ATP-dependent RNA helicase of the DEAD-box protein family
<i>ZRG17</i>	<i>YNR039C</i>	Endoplasmic reticulum protein of unknown function, transcription is induced under conditions of zinc deficiency; mutant phenotype suggests a role in uptake of zinc

Validation de l'influence du polymorphisme du gène *ABZ1* sur la production de 2-phényléthanol

Pour étudier l'influence du polymorphisme du gène *ABZ1* sur la concentration en 2-phényléthanol l'approche utilisant les hémizygotés BY4742 Δ *ABZ1*-59a et BY4742-59a Δ *ABZ1* a été retenue. En effet ces diploïdes existaient déjà à l'UMR SPO de Montpellier. Ils ont été étudiés dans les conditions de fermentation du dispositif C (100% de facteurs anaérobie, 28°C) en triplicatas et suivant les protocoles décrits en Matériels et Méthodes. Les surnageants de fermentations analysés en SBSE-LD-GC-MS.

Les concentrations en 2-phényléthanol et 2-phényléthylacétate mesurées après fermentation des deux souches de levures sont plus élevées lorsque le diploïde porte l'allèle *ABZ1.59a* que lorsqu'il porte l'allèle *ABZ1.S288c* ce qui permet de confirmer que les mutations du gène *ABZ1* conduisent bien à modifier la concentration finale de ces deux composés (Figure 46). Cela confirme également les données obtenues lors de la recherche de QTL.

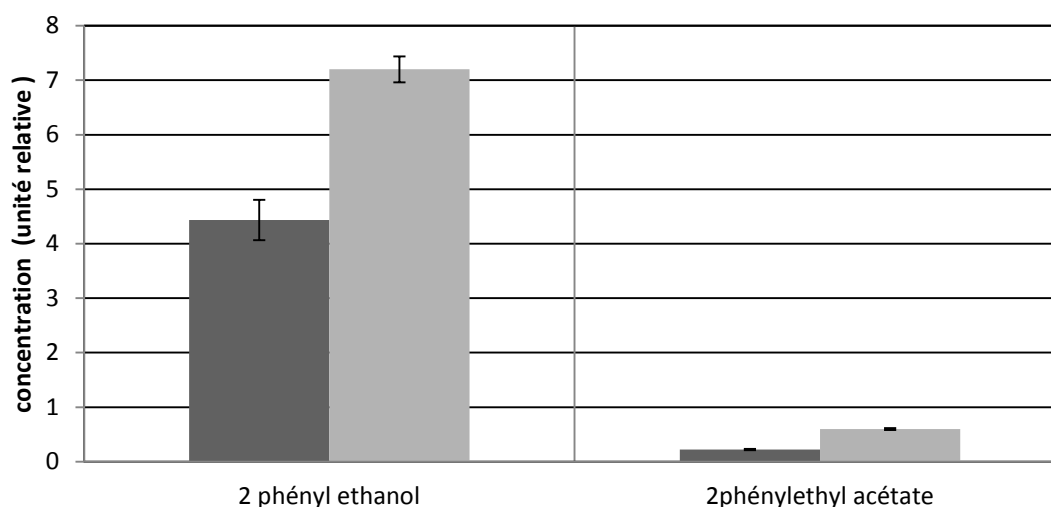


Figure 46 : Effet de l'origine allélique du gène *ABZ1* sur la concentration en phényléthanol et phényléthylacétate

■ : *ABZ1.S288c* ; ■ : *ABZ1.59a* (n=3 ; barre d'erreur : +/- erreur standard)

*Autres effets des mutations portés par le gène *ABZ1**

L'analyse par SBSE-LD-GC-MS permet d'accéder aux concentrations de nombreux autres composés. Ainsi nous avons comparé l'influence des allèles *ABZ1* sur l'ensemble des composés volatils mesurés. Le test utilisé dans ce cas est un test de Student

évaluant l'hypothèse de l'égalité des moyennes des concentrations des composés mesurés (Tableau 44).

Comme on peut le constater les deux tiers (19/27) des composés dosés sont influencés par l'origine allélique du gène *ABZ1* : à l'exception de l'éthyl octanoate, de l'éthyl-3-hydroxy décanoate et du farnésol, les concentrations des composés volatiles influencés par les mutations du gène *ABZ1* sont plus élevées lorsque la souche de levure porte l'allèle « œnologique » de ce gène.

Tableau 44 : Effet de l'origine allélique du gène *ABZ1* sur la concentration des composés fermentaires dosés en SBSE-LD-GC-MS (unité semi-relative par rapport au témoin interne) ; en gras, les composés dont la teneur varie de façon significative

Composés	ABZ1 labo	ABZ1 oeno	p-value
Isoamylacétate	0,521 ± 0,015	1,011 ± 0,045	0,006
farnésyl acétate	0,439 ± 0,013	0,780 ± 0,046	0,006
3 méthyl butyl octanoate	0,057 ± 0,005	0,060 ± 0,006	0,729
3 méthyl butyl décanoate	0,076 ± 0,001	0,092 ± 0,004	0,048
Éthyl C6	0,510 ± 0,005	0,459 ± 0,011	0,060
Éthyl C8	3,349 ± 0,107	2,613 ± 0,065	0,006
Éthyl C10	3,846 ± 0,065	4,317 ± 0,055	0,028
Éthyl C12	0,709 ± 0,005	1,334 ± 0,057	0,006
Éthyl C14	0,035 ± 0,001	0,060 ± 0,002	0,002
Éthyl C16	0,205 ± 0,020	0,328 ± 0,015	0,040
Éthyl C18	0,068 ± 0,013	0,085 ± 0,012	0,399
Éthyl-9-décénoate	0,011 ± 0,000	0,010 ± 0,001	0,738
Éthyl 4-hydroxy butanoate	0,017 ± 0,001	0,038 ± 0,007	0,090
Éthyl-3-hydroxy octanoate	0,052 ± 0,004	0,039 ± 0,002	0,086
Éthyl 3 hydroxy décanoate	0,133 ± 0,010	0,086 ± 0,011	0,008
Éthyl 9-hexadécénoate	0,142 ± 0,015	0,456 ± 0,010	0,002
2phényléthyl acétate	0,221 ± 0,011	0,599 ± 0,022	0,015
2 phényléthyl hexanoate	0,035 ± 0,002	0,031 ± 0,002	0,001
2phényléthyl octanoate	0,011 ± 0,001	0,022 ± 0,005	0,004
Acide acétique	0,069 ± 0,004	0,059 ± 0,023	0,016
Acide C8	0,450 ± 0,018	0,558 ± 0,049	0,034
Acide C10	1,671 ± 0,068	2,092 ± 0,095	0,067
Acide C12	0,474 ± 0,030	0,823 ± 0,018	0,013
méthyl Oleate	0,172 ± 0,012	0,445 ± 0,020	0,014
isobutanol	1,508 ± 0,327	1,230 ± 0,067	0,408
isoamyl alcool	17,440 ± 1,703	20,582 ± 0,238	0,150
1-octanol	0,031 ± 0,001	0,042 ± 0,003	0,036
2 phényléthanol	4,435 ± 0,369	7,201 ± 0,238	0,003
Nérolidol	1,318 ± 0,105	1,428 ± 0,053	0,334
2,3 dihydro farnésol	3,245 ± 0,396	2,895 ± 0,220	0,411
farnésol	3,948 ± 0,220	2,361 ± 0,087	0,006
Trans-β-farnésène	0,057 ± 0,005	0,060 ± 0,006	0,623
Trans-α-farnésène	0,034 ± 0,003	0,037 ± 0,006	0,609
Cis-β-farnésène	0,036 ± 0,005	0,043 ± 0,007	0,387
Cis-bisabolène	0,006 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,372

Implication d'ABZ1 dans le métabolisme

La protéine Abz1p catalyse la réaction suivante :



Le 4-amino-4-deoxychorismate sert de précurseur à Abz2p pour réaliser la synthèse de l'acide paraminobenzoïque qui est utilisé pour synthétiser le 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-méthyl-THF) (Figure 50).

Le 5-méthyl-THF participe à plusieurs voies métaboliques. Dans le cytosol le 5-méthyl-THF est impliqué dans la synthèse de purine et de thymidilate, mais également dans la biosynthèse de certains acides aminés dont la méthionine et la glycine. Enfin le 5 méthyl-THF participe à la synthèse de Coenzyme A.

On notera qu'Abz1p est cytoplasmique [195] et la délétion de *ABZ1* entraîne une auxotrophie pour l'acide paraminobenzoïque (pABA) qui est un des précurseurs de l'acide folique [196,197].

Polymorphisme et domaines de Abz1p

L'alignement de la séquence protéique de *ABZ1.S288c* et *ABZ1.EC1118 (=59a)* permet d'identifier 5 mutations non synonymes (Figure 47). On peut donc supposer que ces dernières pourraient être responsables des différences observées dans notre situation.

De plus on note que la version œnologique de ce gène possède les mêmes acides aminés que les homologues d'*ABZ1* des souches *S.mikatae* et *S.paradoxus*. Cela permet de proposer que la souche S288c a acquis des mutations particulières sur ce gène (Figure 48).

Ceci est également confirmé par l'alignement (non montré) des séquences du gène *ABZ1* des souches de levures séquencées (SANGER) qui montre que 4 des mutations de ce gène portées par la souche S288c ne sont retrouvées que chez souche W303 qui est une souche parente de S288c (Figure 49). Cette observation permet de supposer que les souches de laboratoire pourraient avoir acquis des mutations particulières.

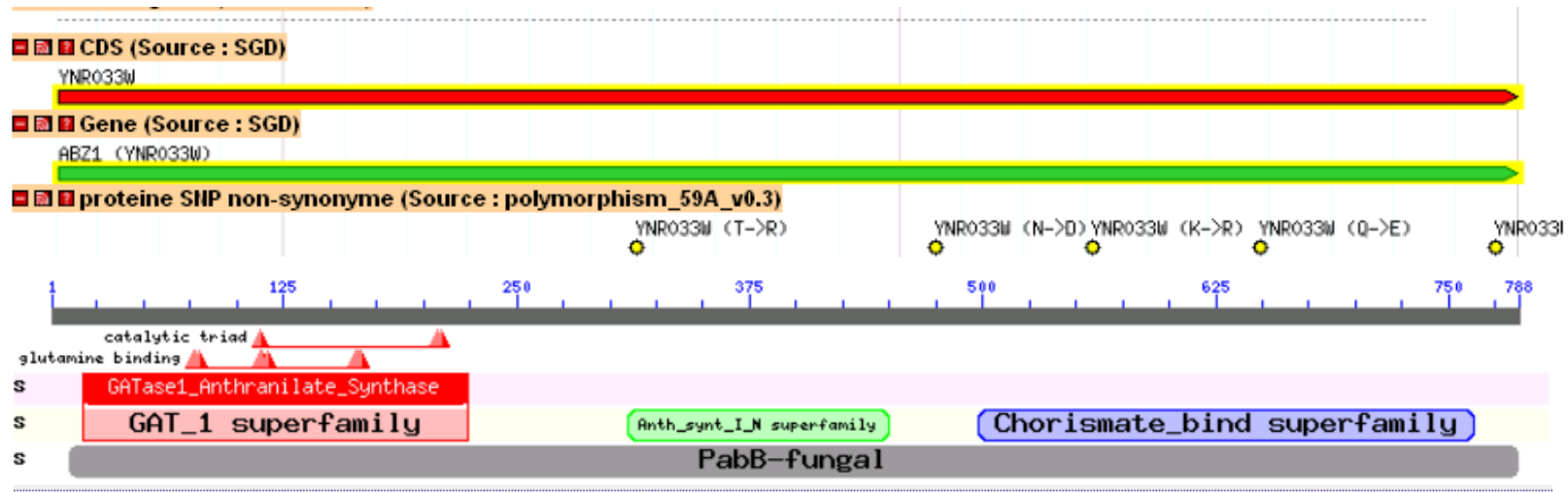


Figure 47 : polymorphisme et domaines du gène ABZ1 entre la souche 59a et S288c, les SNP non synonymes sont indiqués en jaune, la séquence d'origine (S288c) est prise comme référence

		330		400		570		660		670		790		800																																										
1. ABZ1-59a	SSVISEN	R	G	E	L	R	D	S	F	V	R	K	K	D	Q	R	N	P	A	P	F	S	S	F	F	E	F	R	D	I	I	P	E	E	F	M	S	V	E	E	Y	A	T	V	E	M	Y	T	K	L	E	S	N	L	Q	I
2. ABZ1-S88c	SSVISEN	R	G	E	L	R	D	S	F	V	R	K	K	N	Q	R	N	P	A	P	F	S	S	F	F	E	F	R	D	I	I	P	E	E	F	M	S	V	Q	E	Y	A	T	V	E	M	Y	N	K	L	E	S	N	L	Q	I
3. ABZ1-S.para	SSVISEN	R	G	E	L	I	D	C	F	V	N	K	E	D	Q	R	N	P	A	P	F	S	S	F	F	E	F	N	D	I	I	P	E	E	F	M	S	V	E	E	Y	A	T	V	E	M	Y	T	K	L	E	S	N	L	Q	I
4. ABZ1-S.mikatae	SSVISEN	R	G	E	L	I	D	N	F	V	I	K	K	D	Q	K	N	P	A	P	F	S	S	F	F	E	F	N	D	I	I	P	E	E	F	M	S	V	E	E	Y	A	T	V	E	M	Y	T	K	L	E	S	N	L	Q	I

Figure 48: alignement des protéines homologues à ABZ1 de *S.mikatae* et *S.paradoxus*, mutations non synonymes entre les deux allèles ABZ1 de S288c et 59a

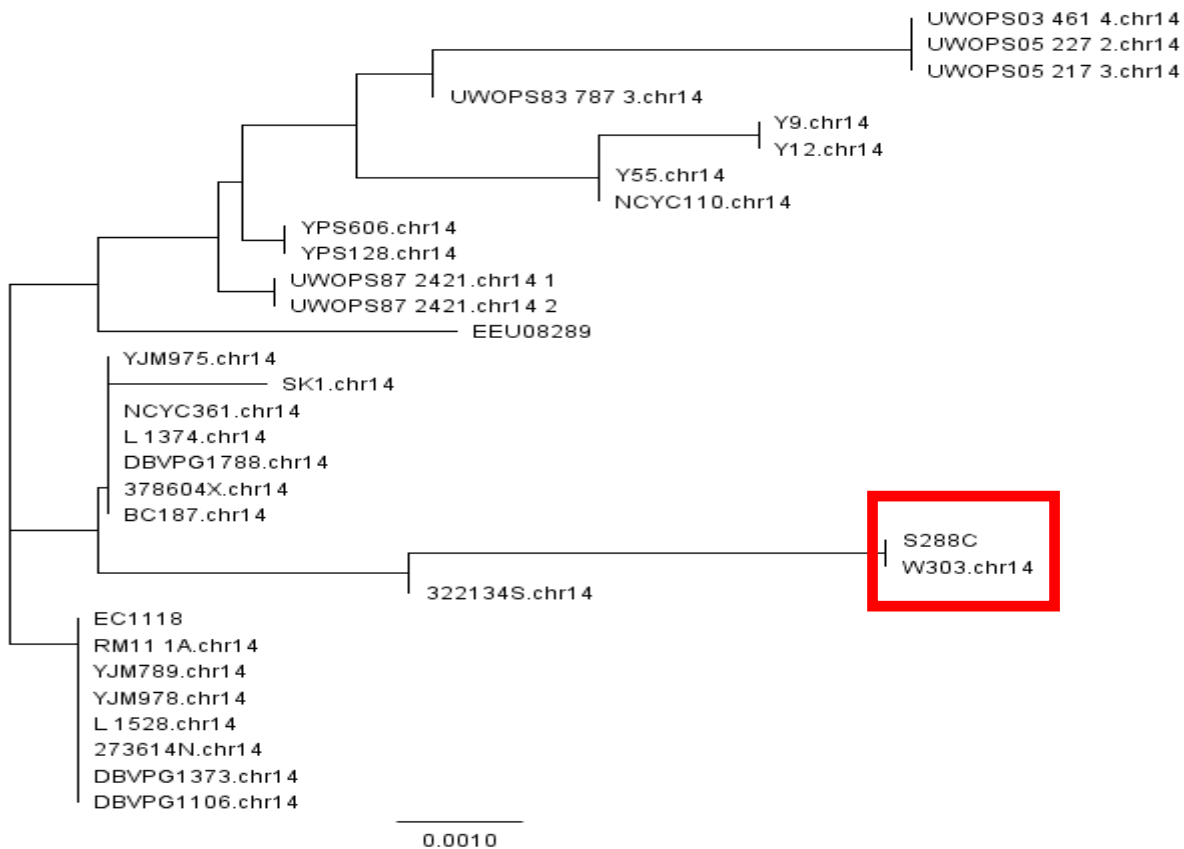


Figure 49 : arbre phylogénétique du gène ABZ1 (source des génomes : SANGER et NCBI) (ici EC1118 = 59a)

Il nous a paru intéressant de positionner les mutations de ce gène sur ses domaines fonctionnels afin de pouvoir mieux comprendre leurs implications.

ABZ1 possède 3 domaines conservés (Figure 47) :

Un domaine *glutamine amidotransférase de classe I*, dans lequel se trouve la triade catalytique de l'enzyme (cystéine, histidine and glutamate), [198,199] la séquence protéique de ce domaine est identique chez les deux souches S288C et 59a.

Un domaine *anthranilate synthase*. Dans ce deuxième domaine une thréonine remplace une arginine en position 313. Les anthranilate synthase synthétisent les réactions suivantes :



Un domaine de *fixation du chorismate*, dans lequel se trouvent 4 mutations non synonymes entre les deux souches.

On sait que le chorismate est le substrat permettant la synthèse de 2-phényléthanol et d'acide paraminobenzoïque. Comme on sait que les mutations du gène *ABZ1* influencent la production de phényléthanol, on peut donc penser que le polymorphisme d'*ABZ1* conduit à des différences d'affinité pour le chorismate ce qui pourrait se traduire par une meilleure disponibilité de ce substrat pour les enzymes permettant la synthèse des acides aminés dont la phénylalanine et donc expliquer le phénotype observé dans le cas du phényléthanol (Figure 50).

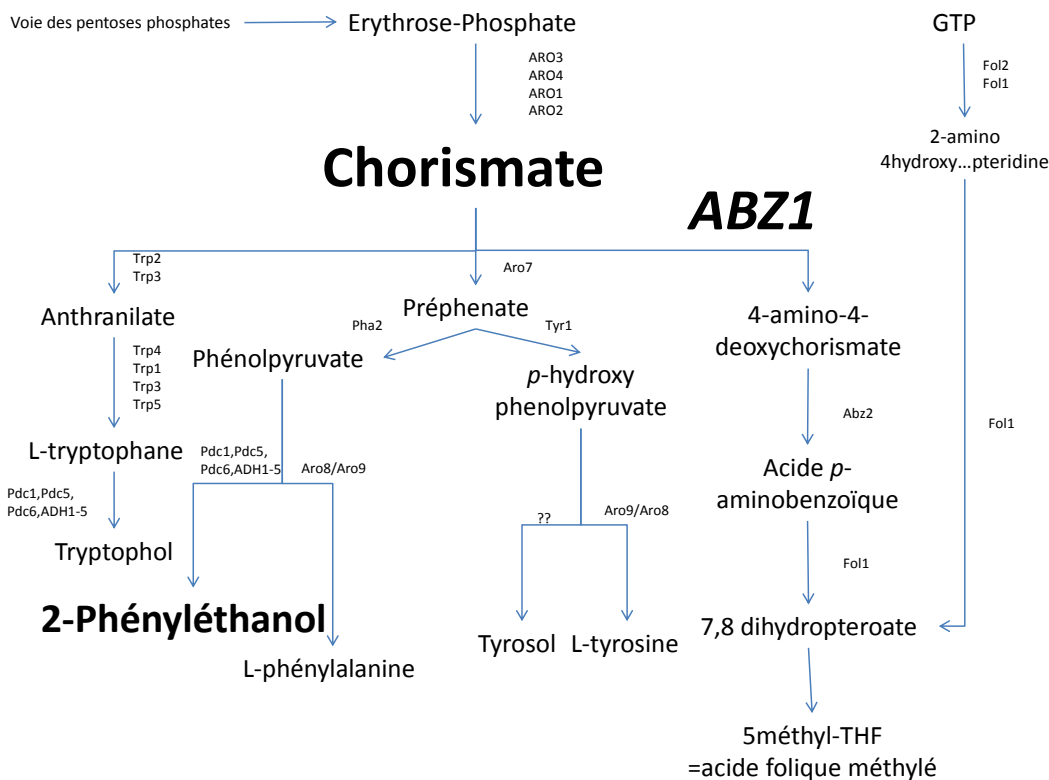


Figure 50 : voies métaboliques simplifiées impliquant le chorismate et l'acide folique (adapté des voies métaboliques de la levure source : SGD)

Cinétique de fermentation

Le suivi de la cinétique fermentaire permet de mettre en évidence que lorsque le diploïde BY4742-59a porte l'allèle œnologique du gène *ABZ1* (MTF1871) la fermentation est plus rapide puisque celle-ci arrive à son terme au bout de 90h tandis que lorsque le même diploïde porte l'allèle de laboratoire du gène *ABZ1* (MTF1881) la fermentation se

termine aux alentours des 120h (Figure 51). Cette observation confirme ce qui avait été mis en évidence par Chloé Ambroset.

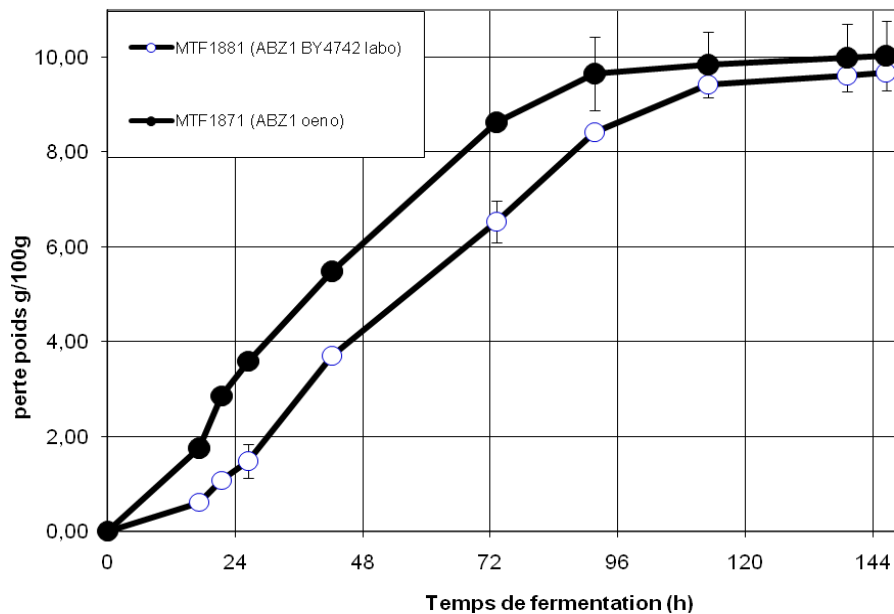


Figure 51 : Cinétique de fermentation des souches MTF1881 et MTF1871 (n=3)

Conclusions/perspectives

Nous résultats montrent que l'origine de l'allèle du gène *ABZ1* explique les variations de concentration en 2-phényléthanol observées entre les souches S288c (faible producteur) et 59a (fort producteur). Les alignements de séquence de la protéine Abz1p avec ses homologues d'autres souches de levure permettent de montrer que sur les 5 mutations non synonymes existantes entre les deux souches citées, 4 sont uniquement présentes chez le variant S288c.

Comme le gène *ABZ1* est également impliqué dans l'utilisation du chorismate qui est un substrat de la synthèse du 2-phényléthanol et de la phénylalanine et que les mutations entre les deux variants touchent spécifiquement le site de fixation du chorismate, on peut supposer un dysfonctionnement à ce niveau métabolique. Cela se traduisant probablement par une baisse de synthèse du 2-phényléthanol.

Cependant, il semble important de souligner ici que l'origine allélique du gène *ABZ1* conditionne également la synthèse de nombreux autres composés volatiles comme montré plus haut. Ce constat est à mettre en parallèle avec l'effet de l'origine allélique du gène *ABZ1* sur la cinétique de fermentation des deux souches hemizygotés (*ABZ1.S288C*= « lente » ; *ABZ1.59a*= « rapide »). Il est alors plus vraisemblable de proposer que le rôle joué par *ABZ1* dans la cinétique de fermentation puisse entraîner de

façon indirecte une modification profonde du métabolisme. Cette modification de la cinétique fermentaire traduirait un changement métabolique profond, probablement liée à la biomasse produite. Cela conduirait à une production différente de métabolites secondaires tels que les composés volatils.

Des observations similaires ont d'ailleurs été faites dans le cas de fermentation brassicole, conduisant alors aux mêmes hypothèses. Ainsi l'influence d'ajout d'acides aminés menées par Lekkas *et al* [200,201] (et des expériences complémentaires non publiées) ont permis de montrer que l'ajout de certains acides aminés dans le moût d'orge conduisait à raccourcir le temps de fermentation ou à l'inverse à l'augmenter. Par exemple, l'ajout de glutamine dans le milieu allonge significativement le temps de fermentation tandis que l'ajout de lysine le raccourcit. On observe alors que dans le cas de fermentations rapides, la concentration en éthyl octanoate est moins élevée que dans les fermentations lentes (données non publiées) ce qui correspond à ce qui est observé dans notre cas avec l'étude de l'influence de l'allèle du gène *ABZ1*.

Ainsi la production de composés volatils qui sont mesurés dans cette thèse avec la SBSE-LD-GC-MS et dans nos conditions pourrait par analogie avec les conditions brassicoles, être liée à la cinétique de fermentation. Ce lien entre cinétique de fermentation et production de composés volatils reste néanmoins à prouver, et est en cours.

Les données de ce travail ainsi que celles obtenues par Chloé Ambroset sur le gène *ABZ1* confortent l'idée que ce gène est défectueux dans le fond S288c et que des mutations se sont accumulées, peut être en raison d'absence de pression de sélection.

Il reste cependant un à identifier les autres gènes candidats des deux autres mQTL identifiés. Il est possible que la recherche de ces gènes puisse être plus fructueuse en considérant non pas l'aspect « production », mais l'aspect « réponse » de la levure à ce composé. En effet, le 2-phényethanol agit comme une molécule signale entre levures *S.cerevisiae* lors de faible concentration en azote [202] ce qui conduit à l'induction de gènes impliqués dans la floculation et la filamentation. C'est dans ce cadre que D.Wurster *et al* ont montré que l'ajout de 2-phénylethanol induit l'activation de 412 gènes chez la levure dont 53 sont des facteurs de transcription [203]. Ces gènes pourraient également des candidats potentiels et des recherches sont en cours afin de les identifier sur les deux autres mQTL trouvés.

2.2. Validations de mQTL par délétion

La validation de gènes candidats par hémizygotie réciproque est un travail qui ne permet pas facilement de réaliser de « screen » de plusieurs gènes candidats. En effet, il est nécessaire de générer des souches œnologiques délétées du gène d'intérêt, puis de réaliser deux croisements. Ce sont les raisons pour lesquelles nous avons décidé de chercher et valider certains gènes en utilisant les souches délétés de la collection EUROSCARF. Cette approche ne permet de voir que l'effet de l'absence de fonction et est donc moins puissante que la validation par hémizygotie réciproque. Néanmoins, cela permet de valider l'influence d'un gène sur des voies métaboliques conduisant à la production de composés volatils. Dans les deux expériences ci-dessous, le milieu utilisé est le MS300 1% ou 100% de FA et le fond génétique utilisé est BY (laboratoire), suivant les protocoles décrits en Matériel et Méthode. Les surnageants de fermentation sont analysés après fermentation par SBSE-LD-GC-MS.

2.2.1. mQTL du chromosome VIII : phénotype acides gras

Contexte

La recherche de mQTL conduite sur les 3 dispositifs expérimentaux précédemment présentés, a permis de détecter 2 mQTL expliquant respectivement 42% de la variation observée pour l'acide octanoïque et 40% pour l'acide décanoïque dans le cas du dispositif B (Tableau 45). Nous avons décidé d'étudier ces 2 mQTL et de rechercher des gènes candidats dans les deux zones génomiques identifiées. Pour retenir un éventuel gène candidat, chaque gène de cette zone est évalué en recherchant un lien entre fonction du gène et métabolisme lipidique.

Tableau 45 : caractéristiques des mQTL d'acides gras à moyennes chaînes détectés dans le dispositif B

MS300 1% FA 20°C (5mg/L géraniol)				
Acide	C6	C8	C10	C12
mQTL		ChVII@79,379cM	ChV@98,230cM	
LOD		3,452	3,601	
p-value		0,083	0,048	
Intervalles bayésiens		213kb-267kb	258kb-300kb	
Héritabilité	29,69%	91,08%	98,73%	98,78%
Explication du mQTL		42,46%	40,44%	
Effet allèle oeno vs allèle labo		Négatif	Négatif	

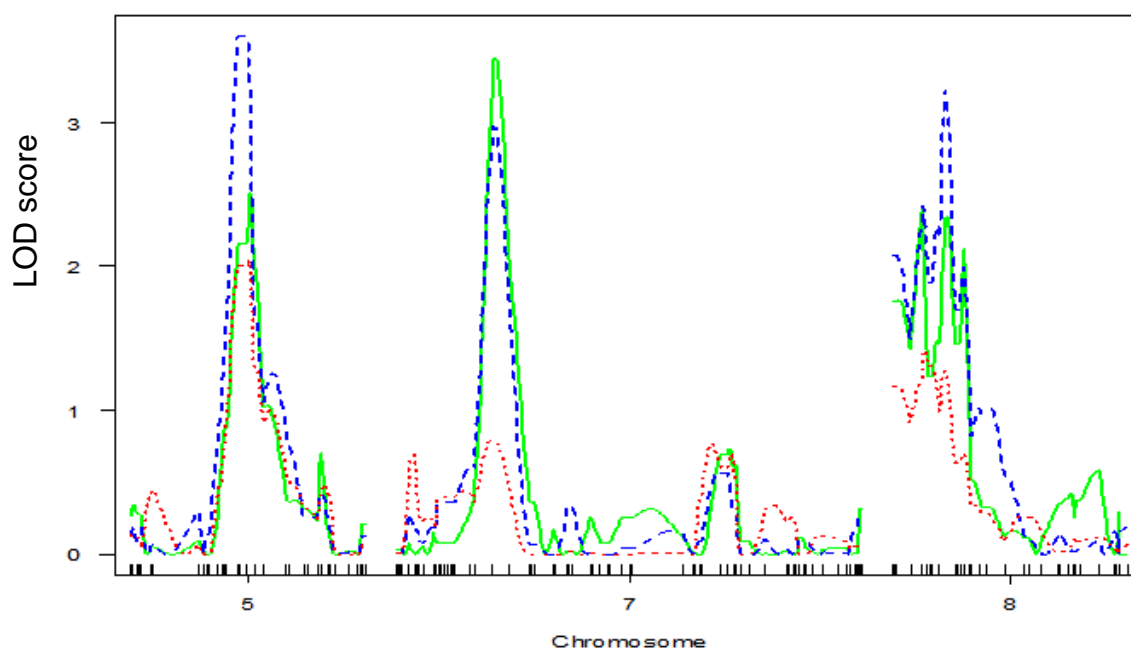


Figure 52 : Représentation graphique du « genome scan » sur les chromosomes 5, 6 et 8 pour les phénotypes concentration en acides gras à moyennes chaînes (Acide C8 en vert-continu, acide C10 en bleu-pointillé, acide C12 rouge-haché) détectés en fermentation MS300 1% de FA à 5mg/L de géraniol (dispositif B). (l'acide C6 n'est pas représenté pour clarté).

Identification de gènes candidats

Dans la zone correspondant au mQTL de l'acide octanoïque (QTL du Chromosome VII, Annexe Tableau 51), nous n'avons pas identifié de gène qui soit, de façon évidente, en lien avec l'acide octanoïque.

Toutefois, le gène *PEX14* qui code une protéine impliquée dans la machinerie d'import peroxisomale pourrait être un gène candidat. Le peroxisome est suspecté d'être un des organites dans lequel les acides gras à moyennes chaînes sont « β -oxydés » [204,205]. Cependant, il n'existe pas de différences entre les deux versions alléliques de ce gène, ni dans l'ORF, ni dans la zone promotrice du gène (Figure 53). Il est donc peu probable que ce gène soit impliqué dans les différences de concentration en acide octanoïque observées. Nous n'avons pas identifié d'autre gène candidat dans cette zone chromosomique.

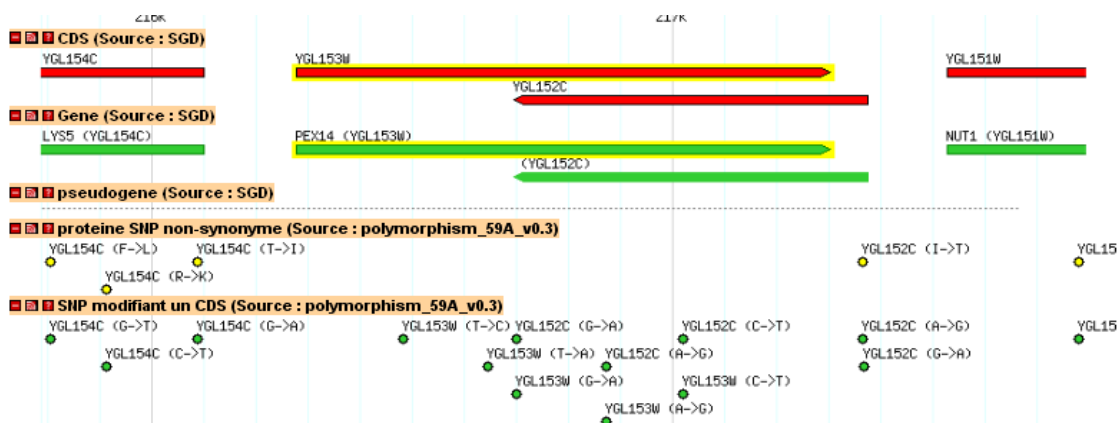


Figure 53 : polymorphisme du gène et du promoteur de PEX14 entre la souche S288C et 59a

Dans la zone correspondant au mQTL de l'acide décanoïque (Chromosome V, Tableau 46) le gène *CEM1* semble être un bon candidat. Ce gène est impliqué dans la synthèse mitochondriale d'acides gras chez la levure. Comme ce gène est étudié par la suite, une présentation succincte de son rôle dans la voie de synthèse des acides gras est exposée.

Tableau 46 : gènes du QTL de l'acide décanoïque (Chromosome V)

Nom du gène	Nom systématique	Description
PIC2	YER053C	Mitochondrial phosphate carrier, imports inorganic phosphate into mitochondria; functionally redundant with Mir1p but less abundant than Mir1p under normal conditions; expression is induced at high temperature
	YER053C-A	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the endoplasmic reticulum
GIP2	YER054C	Putative regulatory subunit of the protein phosphatase Glc7p, involved in glycogen metabolism; contains a conserved motif (GVNK motif) that is also found in Gac1p, Pig1p, and Pig2p
HIS1	YER055C	ATP phosphoribosyltransferase, a hexameric enzyme, catalyzes the first step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control
FCY2	YER056C	Purine-cytosine permease, mediates purine (adenine, guanine, and hypoxanthine) and cytosine accumulation
RPL34A	YER056C-A	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl34Bp and has similarity to rat L34 ribosomal protein
HMF1	YER057C	Member of the p14.5 protein family with similarity to Mmf1p, functionally complements Mmf1p function when targeted to mitochondria; heat shock inducible; high-dosage growth inhibitor; forms a homotrimer in vitro
PET117	YER058W	Protein required for assembly of cytochrome c oxidase
PCL6	YER059W	Pho85p cyclin of the Pho80p subfamily; forms the major Glc8p kinase together with Pcl7p and Pho85p; involved in the control of glycogen storage by Pho85p; stabilized by Elongin C binding
FCY21	YER060W	Putative purine-cytosine permease, very similar to Fcy2p but cannot substitute for its function
FCY22	YER060W-A	Putative purine-cytosine permease, very similar to Fcy2p but cannot substitute for its function
CEM1	YER061C	Mitochondrial beta-keto-acyl synthase with possible role in fatty acid synthesis; required for mitochondrial respiration
HOR2	YER062C	One of two redundant DL-glycerol-3-phosphatases (RHR2/GPP1 encodes the other) involved in glycerol biosynthesis; induced in response to hyperosmotic stress and oxidative stress, and during the diauxic transition
THO1	YER063W	Conserved nuclear RNA-binding protein; specifically binds to transcribed chromatin in a THO- and RNA-dependent manner, genetically interacts with shuttling hnRNP NAB2; overproduction suppresses transcriptional defect caused by hpr1 mutation
ICL1	YER064C	Non-essential nuclear protein; null mutation has global effects on transcription
	YER065C	Isocitrate lyase, catalyzes the formation of succinate and glyoxylate from isocitrate, a key reaction of the glyoxylate cycle; expression of ICL1 is induced by growth on ethanol and repressed by growth on glucose
SUP19	ARS514	Autonomously Replicating Sequence
	YERCdelta10	Ty1 LTR
RRT13	tS(UGA)E	tRNA-Ser
RG11	YER066W	Putative protein of unknown function; non-essential gene identified in a screen for mutants with decreased levels of rDNA transcription
	YER066C-A	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, partially overlaps uncharacterized ORF YER067W
MOT2	YER067W	Protein of unknown function involved in energy metabolism under respiratory conditions; protein abundance is increased upon intracellular iron depletion
	YER067C-A	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the uncharacterized ORF YER067W
ARG5,6	YER068W	Subunit of the CCR4-NOT complex, which has roles in transcription regulation, mRNA degradation, and post-transcriptional modifications; with Ubc4p, ubiquitinates nascent polypeptide-associated complex subunits and histone demethylase Jhd2p
	YER068C-A	Dubious open reading frame unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data
RNR1	YER069W	Protein that is processed in the mitochondrion to yield acetylglutamate kinase and N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, which catalyze the 2nd and 3rd steps in arginine biosynthesis; enzymes form a complex with Arg2p
	YER070W	Major isoform of the large subunit of ribonucleotide-diphosphate reductase; the RNR complex catalyzes rate-limiting step in dNTP synthesis, regulated by DNA replication and DNA damage checkpoint pathways via localization of small subunits

Voie biochimique de synthèse des acides gras à moyennes chaînes chez *S.cerevisiae*

Les acides gras sont synthétisés à partir de l'acétyl-Co-A. Celui-ci provient de différentes routes, principalement du catabolisme du pyruvate, mais également du catabolisme des acides aminés leucine, lysine, tryptophane, tyrosine et phénylalanine et de la β -oxydation des acides gras. Il peut également être formé *de novo* par l'acétyl-CoA thiokinase.

La biosynthèse des acides gras implique l'action de deux systèmes enzymatiques :

- L'acétyl Co-A carboxylase qui catalyse la première condensation de l'acétyl CoA pour former le malonyl CoA
- Le complexe de synthèse des acides gras (Fatty Acid Synthase = FAS), qui, en plusieurs étapes successives, catalyse l'élongation des acides gras en ajoutant à chaque tour de cycle une unité à deux carbones.

Il existe deux types de fatty acid synthase (FAS) chez la levure, le type I (**FAS I**) [206] que l'on trouve dans le cytosol et le type II (**FAS II**) [207] que l'on trouve dans la mitochondrie.

FAS I

La FAS de type I est multienzymatique et est composée de 6 unités α codées par FAS2 et 6 unités β codées par le gène FAS1 (Figure 54).

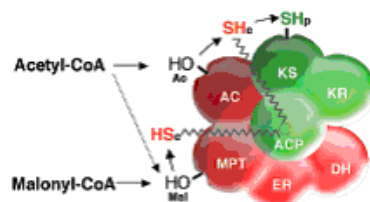


Figure 54 : schéma de la fatty acid synthase de levure de type I (en vert *FAS2p*=unités α en rouge *FAS1p*= unités β) d'après Schweizer et al 2004 [206] (ac(et)yltransferase (AC), malonyl/acetyl- ou malonyl/ palmitoyl-transacylase (AT, MPT), ketoacyl synthase (KS) ketoacyl reductase (KR), déshydrogénase (DH), enoyl reductase (ER), acyl carrier protein (ACP) et thioesterase (TE) [206]).

FAS II

L'existence d'une deuxième machinerie cellulaire de type FAS fut longtemps suspectée aussi bien dans les chloroplastes que dans les mitochondries. Chez la levure, les premières études de gènes homologues aux FAS bactériennes datent de 1993 avec la caractérisation du gène *CEM1* [208]. La voie complète de cette **FAS II** fut proposée en 2005 par Hiltunen et al [207] (Figure 55). Pourtant ce système est encore assez mal

compris. En effet, la délétion des gènes *FAS1* et *FAS2* (**FAS I**), (Figure 54) n'est pas compensée par la **FAS II** puisque ces levures mutantes ne sont pas viables. Mais peut être que le système mitochondrial de synthèse des acides gras n'est pas assez efficace pour compenser l'absence de la **FAS I**. Rappelons enfin que chez la levure, la dégradation des acides gras ne se fait pas dans la mitochondrie, comme chez les mammifères mais dans le peroxisome.

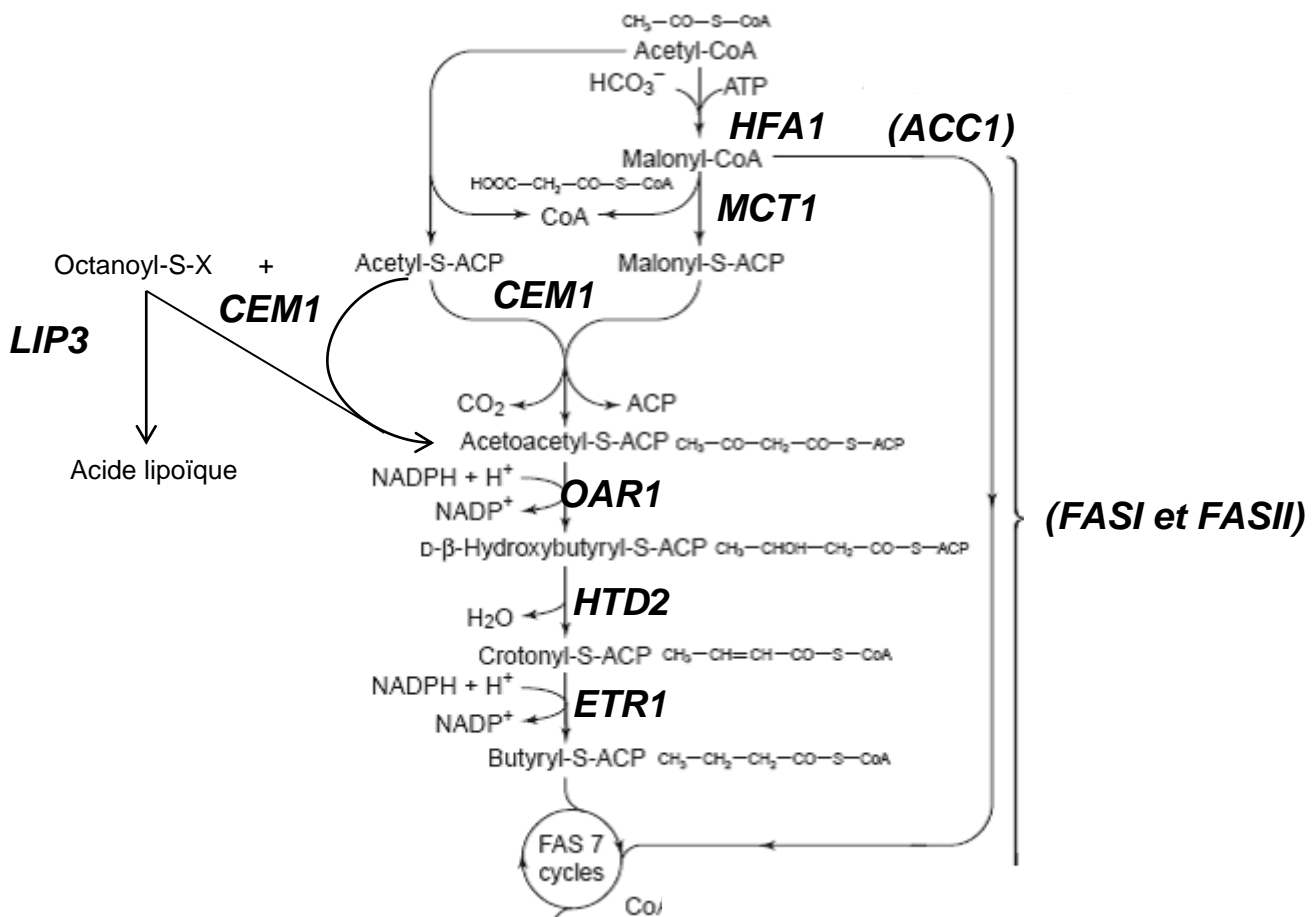


Figure 55 : Biosynthèse des acides gras chez la levure [158] et réaction catalysée par les gènes de **FASII** de levure, gène de la **FAS I** indiqués entre parenthèses [207-213] X= ACP ou CoA

Chez les plantes, les mammifères et les champignons, le rôle de cette **FAS II** mitochondriale est mal défini, elle permettrait de synthétiser des acides gras pour le remodelage des lipides mitochondriaux de la membrane interne [211,214], mais également la synthèse de l'acide lipoiïque [215,216] qui est un co-facteur nécessaire au fonctionnement de l' α -cétocoacide deshydrogénase, enzyme clé du cycle de Krebs. Cela explique le fait que les levures délétées des gènes de la **FAS II** soient *petite*.

La production d'acide octanoïque constitue un nœud métabolique lors de la synthèse des acides gras par la **FAS II** puisque ce dernier peut au choix être allongé en acide gras plus long (C10, C12, C14 ou C16) ou servir de précurseur à la synthèse de l'acide lipoïque [207].

Il est intéressant de noter que l'enzyme Cem1p a parmi ses substrats, l'octanoyl-CoA. On a montré que son homologue humaine (Human Mitochondrial beta-Ketoacyl Synthase) permettait de restaurer le phénotype d'un mutant $BY\Delta CEM1$ [217]. Les auteurs en concluent que ces deux enzymes se comportent de la même façon et ont des spectres d'activités similaires. Ce spectre est bimodal avec une forte affinité pour l'octanoyl-CoA $K_m=11\mu M$ ($K_m=2\mu M$ pour l'hexanoyl et decanoyl-CoA) et pour le tétradécanoyl-Coa (C14) $K_m=50\mu M$ [217].

Etude bioinformatique du gène CEM1

La protéine Cem1p est dimérique, les alignements multiples avec ses homologues de mammifères révèlent que des acides aminés sont conservés. Ces derniers sont constitués d'une cystéine nucléophile (aa 188), deux histidines catalytiques (aa 322 et 362) impliquées dans la décarboxylation du malonyl-ACP, une lysine (aa 380) de fonction inconnue, une glycine permettant l'entrée du substrat (aa 251), deux thréonines formant des liaisons hydrogène avec l'ACP phosphopantéthéine (aa 387 et aa 394) et un motif riche en glycine près de l'extrémité C-terminal (aa 426-442) [217]. Ces sites catalytiques sont prédits à partir de l'alignement de séquence entre la protéine humaine homologue à *CEM1* qui a été cristallisée et qui permet de restaurer le phénotype d'un mutant $\Delta CEM1$ [217].

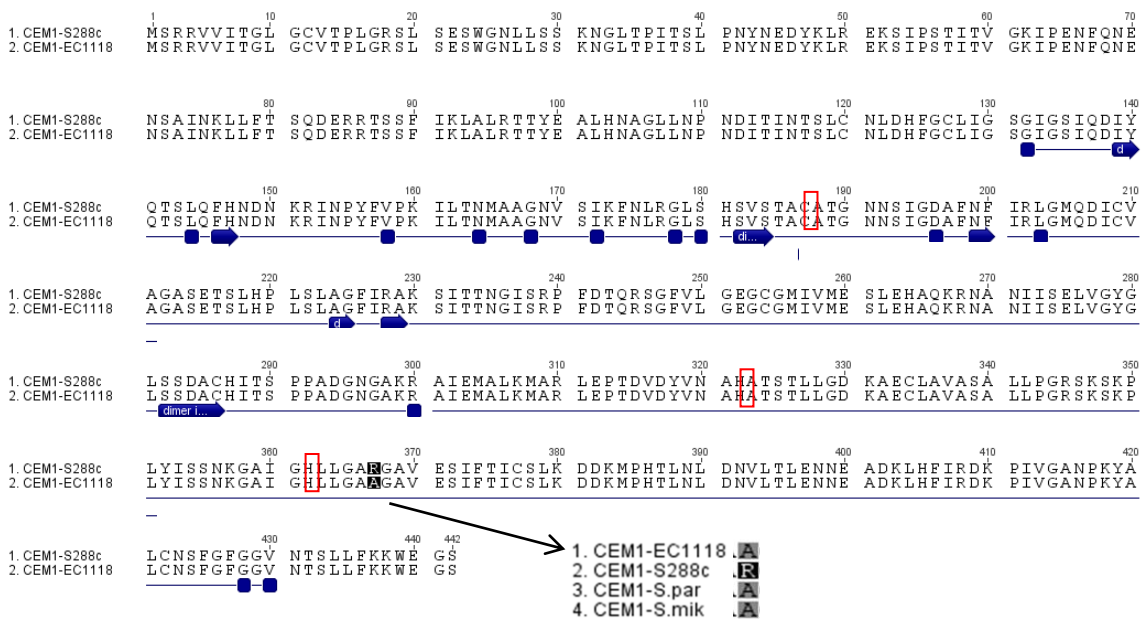


Tableau 47 : alignement des protéines codées par le gène *CEM1* de la souche S288c et EC1118 et de ces homologues chez *S.par*=*S.paradoxus* ; *S.mik*=*S.mikatae*

 : sites catalytiques [217], : interface dimérique [217].

L'étude bioinformatique réalisée ici permet de constater la présence d'une mutation non synonyme d'un R en A en position 367. Cette mutation est proche d'une des histidines catalytiques (H362) ce qui pourrait permettre d'expliquer notre phénotype. L'alignement des séquences protéiques des homologues du gène *CEM1* des autres espèces de *Saccharomyces* permet de montrer que l'acide aminé 367 est conservé et est un A. Un alignement similaire avec les séquences protéiques du gène *CEM1* des souches du SANGER permet de constater que l'acide aminé 367 est toujours un A (mutation de type EC1118) (alignement non montré). Si l'on regarde les homologues à *CEM1* répartis dans le règne vivant (200 séquences, alignement réalisé sous [PIPEALIGN](#) [218]) on constate qu'à cette position l'acide aminé est toujours un A, seule la séquence de la souche S288c (*CEM1.S288c*) contient un R à cette position. Cela laisse donc penser que la souche S288c a acquis une mutation particulière puisqu'elle n'est pas retrouvée dans le reste des séquences homologues connues.

Effet de la délétion du gène *CEM1* sur la production de d'acides C8, C10 et C12 en condition fermentaire

Les souches BY sauvage et $\Delta CEM1$ sont mises à fermenter dans du MS300 1% de FA à 20°C sans ajout de géraniol suivant le protocole décrit en Matériel et Méthode. Après fermentation les surnageants sont analysés par SBSE-LD-GC-MS.

La Figure 56 montre les résultats de l'influence de la délétion du gène *CEM1* sur la concentration en acide gras C8 et C10 dans le milieu. De façon surprenante on constate que l'absence de ce gène conduit à une augmentation sensible de la concentration en acide C8 et C10 ce qui est confirmé par la présence d'une concentration plus élevée en éthyl C8 et C10 (non montrées).

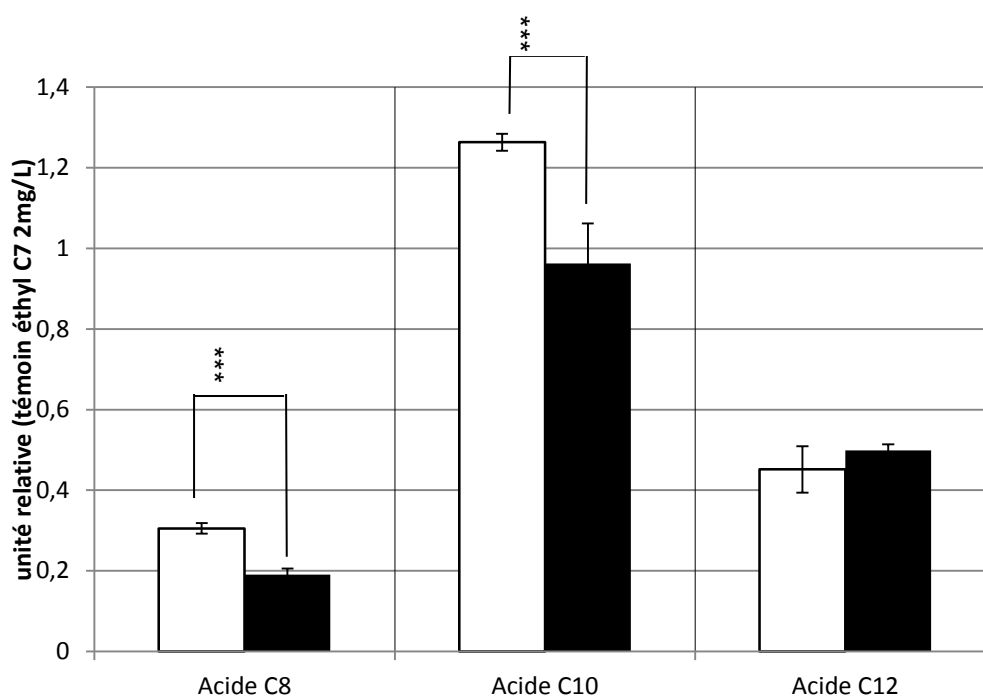


Figure 56 : Effet de la délétion du gène *CEM1* sur la concentration en acide C8, C10 et C12 après fermentation de MS300 1% de FA T°=20°C fond BY ; n=3 ; *** p-value <0,001 (test de student rejetant l'égalité)

□ : BY4741 Δ CEM1, ■ : BY4741sauvage

Conclusions/perspectives

La délétion du gène *CEM1* entraîne une hausse de la production d'acide octanoïque et décanoïque dans le milieu dans un fond BY. Cela confirme ce qui est observé dans les fermentations des ségrégants utilisés pour la recherche de mQTL, en effet, ceux portant les marqueurs œnologiques produisent moins d'acide décanoïque (et dans une moindre mesure moins d'acide octanoïque (Figure 52)). Ces deux données permettent de proposer que l'enzyme *CEM1* de la souche S288c est défective (son phénotype se rapproche de celui d'un $\Delta CEM1$). Cette hypothèse est également supportée par le fait que la version allélique du gène *CEM1* de la souche S288c porte une mutation particulière sur un acide aminé qui est conservé dans le règne vivant.

Néanmoins, il est surprenant de constater une augmentation de la concentration de ces deux acides et de leurs deux esters respectifs dans le milieu. On sait que la délétion du gène *CEM1* conduit à une baisse de production d'acide lipoïque dans la levure [208]. Puisque le mutant $\Delta CEM1$ produit de l'acide octanoïque en condition fermentaire, alors même que la **FAS II** est censée être non fonctionnelle, ce dernier ne peut alors provenir que de la **FAS I**. On pourrait alors proposer que lorsque la FAS II fonctionne normalement, une partie de l'octanoyl-CoA produit par la FAS I est envoyé via un transport de type acetyl carnitine transferase (gènes : *YAT1*, *YAT2*, *CRC1*, *AGP2*, *CAT2*) vers la mitochondrie par l'intermédiaire de l'Acyl Carrier Protein mitochondriale (*ACP1*), où il serait le substrat de LIP5 [219] pour produire de l'acide lipoïque. L'existence de ce type de transport a pu être montrée pour des acides gras à moyennes chaînes [220-223]. Ainsi dans cette hypothèse, lorsque la FAS II ne fonctionne pas, la production d'octanoyl-CoA par la FAS I continue, entraînant un excès de ce composé qui est alors, expulsé pour permettre le recyclage du CoA, estérifié, ou allongé en acide décanoïque. On notera que la délétion du gène *CEM1* entraîne une croissance respiratoire nulle [224] ou très faible [225] ce qui peut entraîner une modification importante du métabolisme, notamment lipidique et expliquer la production plus forte d'acide gras à moyennes chaînes.

L'hypothèse proposant la FASII mitochondriale de levure comme étant directement ou indirectement responsable de la synthèse des acides gras à moyennes chaînes lors de la fermentation œnologique a d'ailleurs déjà été suggéré par Beltran *et al* [226].

L'étude des liens entre la synthèse d'acide lipoïque et la synthèse d'acide octanoïque en relation avec la FAS II de levure et notamment le gène *CEM1* permettrait de mieux comprendre et contrôler la production de cet acide dans le milieu. C'est dans cette optique qu'il pourrait être intéressant de mesurer la concentration en acide lipoïque dans les souches de levures œnologiques.

2.2.2. mQTL du chromosome XII : phénotype Esters éthyliques

Contexte

Une recherche de mQTL dans le dispositif C (100% de FA, 28°C) a permis d'identifier deux gènes candidats responsables de la production d'éthyl octanoate (C8), décanoate (C10) et tétradécanoate (C14) (Tableau 48). Comme ces composés sont de structures très proches, on peut supposer qu'ils empruntent des voies métaboliques identiques très voisines. De plus, les bornes génomiques de ces 3 mQTL se superposent, de ce fait on considère dans la suite de cette expérience qu'il n'y a en fait qu'un seul et même mQTL pour les 3 esters éthyliques cités. Les gènes présents dans cette zone sont montrés Tableau 49 et Tableau 50.

Tableau 48 : Caractéristiques du mQTL lié aux concentrations en éthyl C8, C10 et C14 dispositif C

	MS300 100% FA 28°C		
	Éthyl C8	Éthyl C10	Éthyl C14
mQTL	ChXIII@ 291kb	ChXIII@ 285kb	ChXIII@ 279kb
LOD	3,746	3,674	3,972
p-value	0,034	0,052	0,008
héritabilité	X	X	X
Explication du mQTL	44,64%	43,61%	47,96%
Intervalles bayésien	234-297kb	231-297kb	234-291kb
Effet allèle oeno vs allèle labo	Positif	Positif	Positif

Tableau 49 : gènes du QTL des esters éthyliques

Nom du gène	Nom systématique	Description
OST6	YML019W	Subunit of the oligosaccharyltransferase complex of the ER lumen, which catalyzes asparagine-linked glycosylation of newly synthesized proteins; similar to and partially functionally redundant with Ost3p
	YML018C	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the membrane of the vacuole; physical interaction with Atg27p suggests a possible role in autophagy; YML018C is not an essential gene
PSP2	YML017W	Asn rich cytoplasmic protein that contains RGG motifs; high-copy suppressor of group II intron-splicing defects of a mutation in MRS2 and of a conditional mutation in POL1 (DNA polymerase α); possible role in mitochondrial mRNA splicing
PPZ1	YML016C	Serine/threonine protein phosphatase Z, isoform of Ppz2p; involved in regulation of potassium transport, which affects osmotic stability, cell cycle progression, and halotolerance
TAF11	YML015C	TFIID subunit (40 kDa), involved in RNA polymerase II transcription initiation, similar to histone H3 with atypical histone fold motif of Spt3-like transcription factors
TRM9	YML014W	tRNA méthyltransferase, catalyzes esterification of modified uridine nucleotides in tRNA(Arg3) and tRNA(Glu), likely as part of a complex with Trm112p; deletion confers resistance to zymocin
UBX2	YML013W	Protein involved in ER-associated protein degradation; proposed to coordinate the assembly of proteins involved in ERAD; contains a UBX (ubiquitin regulatory X) domain and a ubiquitin-associated (UBA) domain
	YML012C-A	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified gene SEL1
ERV25	YML012W	Protein that forms a heterotrimeric complex with Erp1, Erp2p, and Emp24, member of the p24 family involved in endoplasmic reticulum to Golgi transport
RAD33	YML011C	Protein involved in nucleotide excision repair; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the nucleus
SPT5	YML010W	Protein involved in regulating Pol I and Pol II transcription and pre-mRNA processing; forms a complex with Spt4p; contains a C-terminal repeat domain that is a target for phosphorylation by Sgv1p
	YML009W-B	Dubious ORF unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; deletion mutation confers an increase in Ty1 transposition
	YML009C-A	Dubious open reading frame unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data
MRPL39	YML009C	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
ERG6	YML008C	Delta(24)-sterol C-méthyltransferase, converts zymosterol to fecosterol in the ergosterol biosynthetic pathway by méthylating position C-24; localized to both lipid particles and mitochondrial outer membrane
	YML007C-A	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to mitochondria
YAP1	YML007W	Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor required for oxidative stress tolerance; activated by H ₂ O ₂ through the multistep formation of disulfide bonds and transit from the cytoplasm to the nucleus; mediates resistance to cadmium
GIS4	YML006C	CAAX box containing protein of unknown function, proposed to be involved in the RAS/cAMP signaling pathway
	tS(AGA)M	tRNA-Ser
TRM12	YML005W	S-adenosylmethionine-dependent méthyltransferase of the seven beta-strand family; required for wybutosine formation in phenylalanine-accepting tRNA
GLO1	YML004C	Monomeric glyoxalase I, catalyzes the detoxification of méthylglyoxal (a by-product of glycolysis) via condensation with glutathione to produce S-D-lactoylglutathione; expression regulated by méthylglyoxal levels and osmotic stress
	ARS1309	Autonomously Replicating Sequence
	YML003W	Putative protein of unknown function
	YML002W	Putative protein of unknown function; expression induced by heat and by calcium shortage
YPT7	YML001W	Rab family GTPase; GTP-binding protein of the rab family; required for homotypic fusion event in vacuole inheritance, for endosome-endosome fusion, similar to mammalian Rab7
CEN13	CEN13	Chromosome XIII centromere

Tableau 50 : gènes du QTL des esters éthyliques (suite)

Nom du gène	Nom systématique	Description
CDC5	YMR001C	Polo-like kinase with multiple functions in mitosis and cytokinesis through substrate phosphorylation, also functions in adaptation to DNA damage during meiosis; has similarity to <i>Xenopus</i> Plx1 and <i>S. pombe</i> Plo1p; possible Cdc28p substrate
	YMR001C-A	Putative protein of unknown function
MIC17	YMR002W	Mitochondrial intermembrane space protein, required for normal oxygen consumption; contains twin cysteine-x9-cysteine motifs
AIM34	YMR003W	Protein of unknown function; GFP-fusion protein localizes to the mitochondria; null mutant is viable and displays reduced frequency of mitochondrial genome loss
MVP1	YMR004W	Protein required for sorting proteins to the vacuole; overproduction of Mvp1p suppresses several dominant VPS1 mutations; Mvp1p and Vps1p act in concert to promote membrane traffic to the vacuole
TAF4	YMR005W	TFIID subunit (48 kDa), involved in RNA polymerase II transcription initiation; potential Cdc28p substrate
PLB2	YMR006C	Phospholipase B (lysophospholipase) involved in phospholipid metabolism; displays transacylase activity in vitro; overproduction confers resistance to lysophosphatidylcholine
	YMR007W	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data
PLB1	YMR008C	Phospholipase B (lysophospholipase) involved in lipid metabolism, required for deacylation of phosphatidylcholine and phosphatidyléthanamine but not phosphatidylinositol
ADI1	YMR009W	Acireductone dioxygenase involved in the methionine salvage pathway; ortholog of human MTCBP-1; transcribed with YMR010W and regulated post-transcriptionally by RNase III (Rnt1p) cleavage; ADI1 mRNA is induced in heat shock conditions
	YMR010W	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm; YMR010W is not an essential gene; YMR010W mRNA is transcribed with ADI1
	ARS1310	Autonomously Replicating Sequence
HXT2	YMR011W	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, expression is induced by low levels of glucose and repressed by high levels of glucose
	YMRc τ 1	Ty4 LTR
	tE(UUC)M	tRNA-Glu; thiolation of uridine at wobble position (34) requires Ncs6p
CLU1	YMR012W	eIF3 component of unknown function; deletion causes defects in mitochondrial organization but not in growth or translation initiation, can rescue cytokinesis and mitochondrial organization defects of the <i>Dictyostelium</i> cluA- mutant
SEC59	YMR013C	Dolichol kinase, catalyzes the terminal step in dolichyl monophosphate (Dol-P) biosynthesis; required for viability and for normal rates of lipid intermediate synthesis and protein N-glycosylation
	YMR013C-A	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; completely overlaps the verified ORF SEC59/YML013C

Gènes candidats

Les gènes candidats identifiés sur ce mQTL sont *PLB1* et *PLB2*. Ces gènes codent pour des phospholipases B (lysophospholipases) impliquées dans le métabolisme des phospholipides [227,228] et ont des activités transacylase *in vitro*. Les phospholipases B hydrolysent les fonctions esters des acides gras liés aux fonctions alcool primaire et secondaire du glycérol, ce faisant, elles libèrent deux acides gras et un glycérophosphorylalcool (Figure 57). Elles sont donc en mesure de libérer des acides gras et donc d'influencer directement ou indirectement la concentration en esters éthyliques. Les deux gènes *PLB1* et *PLB2* étant en tandem, ils sont considérés comme candidats tous les deux.

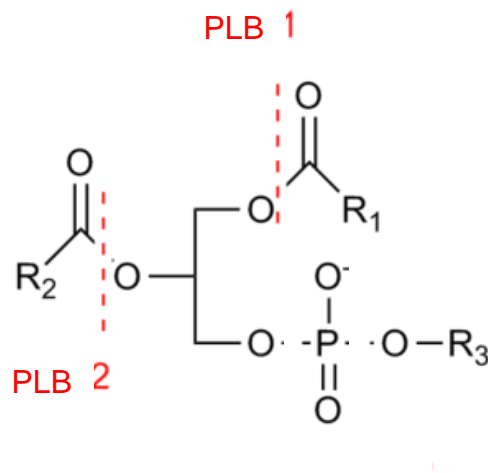


Figure 57 : Site de clivage des phospholipases. R1, R2, chaînes carbonées de 4 à 18 carbones, R3 = choline, éthanolamine, sérine, inositol,

La protéine Plb1p est périplasmique et permet la désacétylation de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine mais pas du phosphatidylinositol. La protéine Plb2p a la même substrat que Plb1p en plus du phosphatidylinositol. On notera que Plb2p est localisée dans la région extra-cellulaire et pourrait contribuer à l'hydrolyse du TWEEN 80 (Polyoxyéthylène (20) sorbitan monooleate) qui est une source d'acide oléique pour la levure et qui est présent dans les facteurs anaérobies ajouté au MS300 [229]. Ceci expliquerait pourquoi ce mQTL n'a été trouvé qu'en présence de la forte concentration de facteurs anaérobies.

Ces deux gènes ont des spécificités de substrat qui sont pH dépendantes : au pH optimal (2,5-3,5) l'ordre du substrat préférentiel de *PLB1* et *PLB2* est le suivant :

Phosphatidylserine > phosphatidylinositol (sauf *PLB1*) > phosphatidylcholine > phosphatidyléthanolamine [227,228].

Polymorphisme de *PLB1* et *PLB2*

Polymorphisme de *PLB1*

Les alignements des séquences protéiques du gène *PLB1* des souches EC1118 et S288C révèlent la présence de deux mutations non synonymes en position 188 et 189 ainsi qu'une zone répétée supplémentaire pour la version *PLB1.S288c* en position 620. Ce gène semble peu polymorphe si on regarde son polymorphisme au sein des levures séquencées du SANGER et de NCBI (alignements non montré)

```

PLB1.S288C      1  MKLQSLLVSAAVLTSLTENVNANWSPNNSYVPANVTCDDDIINLVREASGLSDNETEWLKKRDAYTKEALHSFLNRRATSNFS
PLB1.ECC118    1  MKLQSLLVSAAVLTSLTENVNANWSPNNSYVPANVTCDDDIINLVREASGLSDNETEWLKKRDAYTKEALHSFLNRRATSNFS
               90  100  110  120  130  140  150  160
PLB1.S288C      90  DTSLLSTLPGSNSSNMPKIAVACSGGGYRAMLSGAGMLAAMDNRDGDANEGHGLGGLQGATYLAGLSGGNWLSTLAWNN
PLB1.ECC118    90  DTSLLSTLPGSNSSNMPKIAVACSGGGYRAMLSGAGMLAAMDNRDGDANEGHGLGGLQGATYLAGLSGGNWLSTLAWNN
               170  180  190  200  210  220  230  240
PLB1.S288C     170  WTSVQAIVDNNTTESNSIWDISHSILTPDGINIEFKTGSRWDDISDDVQDKKRDAGFNISLADVWGRALAYNFWPSLHRGGVG
PLB1.ECC118    170  WTSVQAIVDNNTTESNSIWDISHSILTPGGINIEFKTGSRWDDISDDVQDKKRDAGFNISLADVWGRALAYNFWPSLHRGGVG
               250  260  270  280  290  300  310  320
PLB1.S288C     250  YTWSTLREADVFKNGEMFPIITVADGRYPGTTVINLNATLFEFNPFEMGSWDPTLNAPTQVVKYLGTVNVTNGKPVNKGQCI
PLB1.ECC118    250  YTWSTLREADVFKNGEMFPIITVADGRYPGTTVINLNATLFEFNPFEMGSWDPTLNAPTQVVKYLGTVNVTNGKPVNKGQCI
               330  340  350  360  370  380  390  400
PLB1.S288C     330  AGFDNTGFIATSSSTLNFQELLRLNSTDLPSFIANLATDFLEDLSDNSDDIAIYAPNPFKEANFLQKNATSSIISEYLF
PLB1.ECC118    330  AGFDNTGFIATSSSTLNFQELLRLNSTDLPSFIANLATDFLEDLSDNSDDIAIYAPNPFKEANFLQKNATSSIISEYLF
               410  420  430  440  450  460  470  480
PLB1.S288C     410  LVDGGEDNQNIPLVPLLQKERELDVIFALDNSADTDDYWPDGASLVNTYQRQFGSQGLNLSFFPYVPDVNTFVNLGLNKKP
PLB1.ECC118    410  LVDGGEDNQNIPLVPLLQKERELDVIFALDNSADTDDYWPDGASLVNTYQRQFGSQGLNLSFFPYVPDVNTFVNLGLNKKP
               490  500  510  520  530  540  550  560
PLB1.S288C     490  TFFGCDARNLTDLEYIPPLIVYIPNSRHSFNGNQSTFKMYSYDSERLGMIKNGFEAATMGNFDDSDFLGCVGCAIIRRK
PLB1.ECC118    490  TFFGCDARNLTDLEYIPPLIVYIPNSRHSFNGNQSTFKMYSYDSERLGMIKNGFEAATMGNFDDSDFLGCVGCAIIRRK
               570  580  590  600  610  620  630  640
PLB1.S288C     570  QQNLNATLPS ECSQCETNYCWNGTIDSRVS VGVGNDYSS SASLSASAAAASASASASASASGSS THKKNAGNALV
PLB1.ECC118    570  QQNLNATLPS ECSQCETNYCWNGTIDSRVS VGVGNDYSS SASLSASAAAASASASASASASGSS THKKNAGNALV
               650  660  664
PLB1.S288C     650  NYSNLNNTNTEFIGVLSVISAVEGLI
PLB1.ECC118    650  NYSNLNNTNTEFIGVLSVISAVEGLI
    
```

Figure 58 : Etude du polymorphisme de séquence entre *PLB1-S288C* et *PLB1-EC1118*

Polymorphisme de *PLB2*

La séquence du gène *PLB2* ne présente que deux mutations non synonymes entre la souche EC1118 et S288c (Figure 59), mais la mutation située en position 378 sur ce gène semble particulière pour plusieurs raisons. Premièrement, il s'agit d'une mutation proline en alanine, or on sait que la proline génère généralement des « coudes » dans la structure 3D de la protéine ce qui pourrait donc affecter fortement la conformation finale de la protéine. Deuxièmement, il est intéressant de constater que cette mutation P->A n'est présente que dans la souche W303, alors que l'ensemble des autres souches séquencées dont le génome est disponible portent une proline à cet endroit. Enfin l'alignement de la séquence protéique de *PLB1.S288c*, *PLB1.EC1118*, *PLB2.EC1118* et leurs homologues respectifs des souches *S.mikatae* et *S.paradoxus* avec la séquence *PLB2.S288c* permet de constater que le résidu proline est conservé et que la mutation P378A n'est présente que chez la souche S288c.

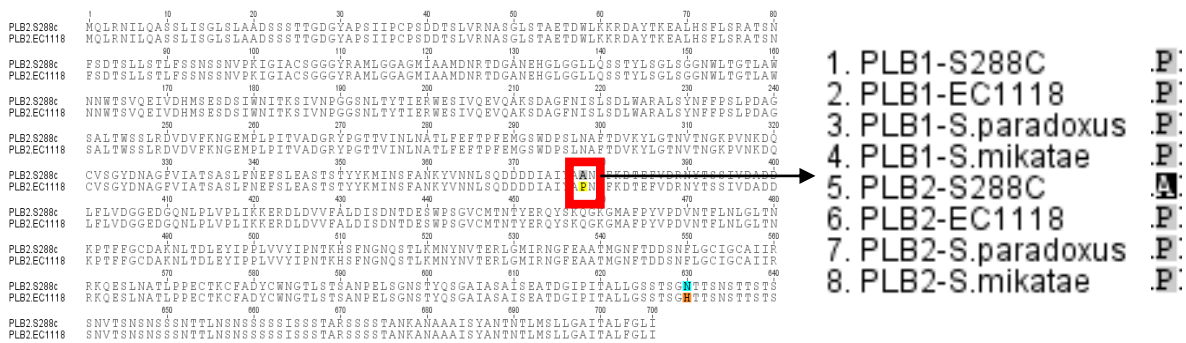


Figure 59 : Etude du polymorphisme de séquence entre *PLB1-S288C* et *PLB1-EC1118*

Effet de la délétion des gènes *PLB1* et *PLB2* sur le phénotype éthyl C8 et C10 (et leurs précurseurs) en conditions fermentaires

Cette expérience vise à identifier le gène candidat identifié dans le mQTL des éthyl esters. Les souches $BY\Delta PLB1$ et $\Delta PLB2$ sont mises à fermenter dans du MS300 100% de FA à 28°C. Comme cette expérience étudie le métabolisme des esters éthyliques, il a été décidé d'ajouter la souche $BY\Delta EEB1$ dans le plan d'expérience, permettant ainsi d'avoir un point de comparaison double entre le témoin et un mutant délété du gène responsable de la synthèse des esters éthyliques.

Après fermentation les surnageants sont analysés par SBSE-LD-GC-MS.

Validation des gènes candidat (phénotype éthyl C8 et C10)

Dans les conditions de fermentation utilisées, il n'a pas été possible de détecter la présence d'éthyl C14. Il semble donc que le fond BY ne produise pas ce composé en quantité suffisante dans nos conditions, contrairement aux souches issues du croisement 59a-S288c (cf partie QTL). Les concentrations d'esters et d'acides obtenues sont traitées par un test de Dunnett et sont présentées Figure 60. Comme attendu, la délétion du gène *EEB1* dans un fond BY4741 en milieu MS300 entraîne une baisse de production des acides C8 et C10 et de leurs esters respectifs. On constate également que la délétion du gène *PLB2* conduit à une baisse de la concentration en éthyl décanoate et octanoate (inférieure dans le cas de cette dernière à celle observée lors de la délétion du gène *EEB1*). De façon surprenante la délétion de ce gène entraîne également une augmentation de la concentration en acide décanoïque dans le milieu. La délétion du gène *PLB1*, quant à elle, ne conduit qu'à une diminution de la production d'éthyl C8 les

concentrations des autres composés restant comparable à celle du témoin sauvage. Cette expérience ne permet pas de savoir quel est le gène candidat responsable du phénotype observé, bien qu'il semble très probable que ce soit le gène *PLB2* car sa délétion conduit à un effet très fort sur la concentration en ethyl esters. De plus, ce dernier semble essentiel dans la croissance anaérobie [229] ce qui est confirmé dans notre cas Figure 61.

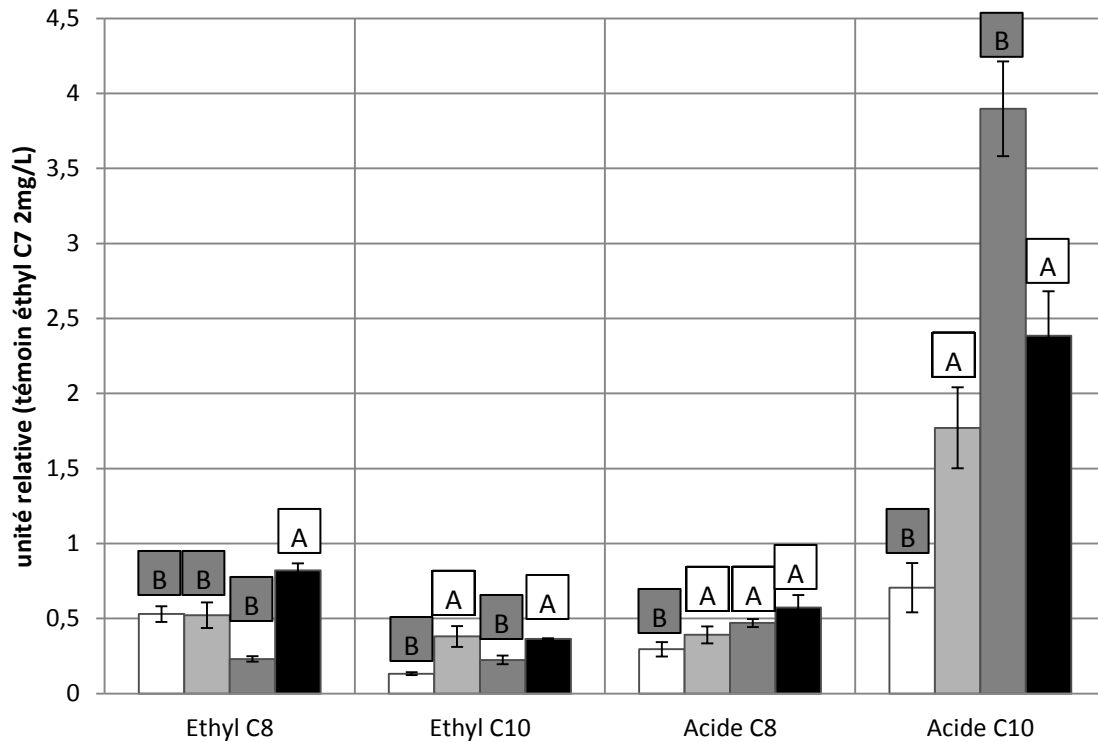


Figure 60 : Effet de la délétion des gènes *EEB1*, *PLB1* et *PLB2* et sur la concentration en esters éthyliques C8 et C10 et leur acides respectifs (n=6 ; milieu MS300 100% FA)

□ : *BYΔEEB1*, ◻ : *BYΔPLB1*, ◼ : *BYΔPLB2*, ◼ : *BY4741 sauvage* ; Groupe A = les valeurs sont statistiquement équivalentes au témoin (sauvage), groupe B, les valeurs sont statistiquement différentes du témoin (sauvage) test de Dunnett au risque $\alpha=0,05$.

La cinétique de fermentation présentée ci-dessous permet de constater que la délétion gène *PLB2* entraîne une fermentation languissante de la souche BY.

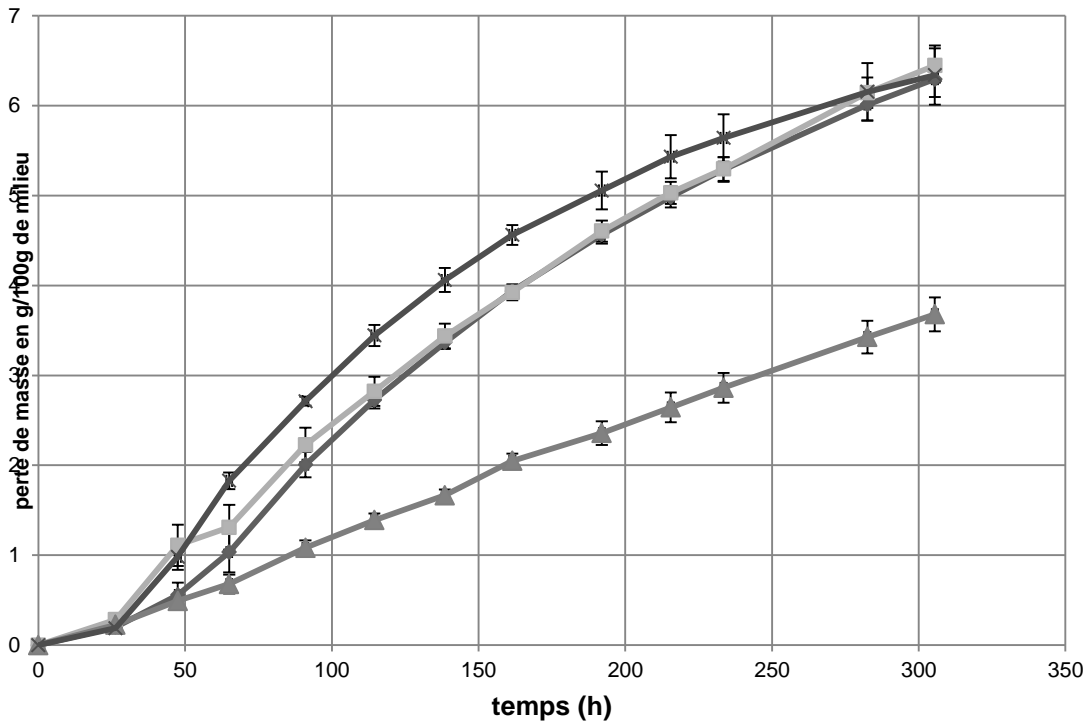


Figure 61 : cinétique de fermentation des souches *BY4741sauvage*, $\Delta PLB1$, $\Delta PLB2$ et $\Delta EEB1$ en MS300 100% FA n=6

 *BY* $\Delta EEB1$
 *By* $\Delta PLB1$
 *BY* $\Delta PLB2$
 *BY4741sauvage*

Conclusion/Perspectives

Les gènes *PLB1* et *PLB2* semblent être des gènes candidats impliqués dans la production d'esters éthyliques. Leur délétion dans un fond génétique de laboratoire, conduit à une baisse significative de production des esters éthyliques C8 et C10, mais seule la délétion du gène *PLB2* conduit à une augmentation de la synthèse d'acide décanoïque.

De telles modifications du métabolisme peuvent s'expliquer notamment par le fait que la protéine codée par ce gène (*PLB2*), participe à l'hydrolyse du TWEEN 80 composant majoritaire des facteurs anaérobies rajoutés dans le milieu MS300. Cette activité pourrait expliquer pourquoi un mutant $\Delta PLB2$ a une cinétique de fermentation beaucoup plus lente qu'une souche sauvage, qu'un mutant $\Delta PLB1$ ou $\Delta EEB1$. Ainsi, une baisse d'activité fermentaire due à une mauvaise hydrolyse du TWEEN80 sont peut être la cause du phénotype observé.

Chez la levure, il a été montré que les phosphatidylcholines sont remodelés par des réactions d'échange d'acyle. Cet échange se fait généralement par une désacétylation de la phosphatidylcholine en un intermédiaire lysophospholipide par une phospholipase A ou B, suivi d'une réaction de réacylation par une acyltransférase. L'échange d'acyl peut également avoir lieu dans l'autre sens, un phospholipide étant donneur d'acyle et le lysophospholipide servant d'accepteur [230,231]. Il a pu être montré que l'ajout de choline [230] ou d'éthanolamine [231] portant spécifiquement des résidus octanoyl ou décanoyl sont facilement métabolisable par la levure. De plus, Beltran et al [232] notent que lors de la fermentation œnologique, les acides gras sont en partie incorporés dans les phospholipides entre 9 et 31%, l'acide majoritairement incorporé étant l'acide dodécanoïque (C12). On peut alors proposer qu'un des moyens de recyclage du CoA et de détoxification des AGMC produits lors de la fermentation puisse être l'incorporation des chaînes acyl dans les phospholipides grâce à *PLB1* ou *PLB2*. Les acides gras C16 :0, C16 :1, C18 :0, C18 :1 en position sn-1 ou sn-2 seraient alors retirés par *PLB1* et *PLB2* et recyclés pour une autre utilisation ou pour augmenter le pool de phospholipides sans réduire le stock d'acide gras C16 :1 et C18 :1 qui n'est pas renouvelable en condition anaérobie. Cette hypothèse ne permet toutefois pas d'expliquer quelles sont les raisons conduisant une baisse si forte de la synthèse de l'éthyl C8 dans le cas de la délétion du gène *PLB2*.

3. Conclusion

Pour les 13 zones génomiques identifiées par l'approche QTL, nous avons pu identifier et valider 4 gènes, chacun porté par un mQTL différent. L'implication de ces gènes sur le phénotype ayant permis leur identification a été vérifiée par échange d'allèle et délétion. Pour les 9 autres mQTLs identifiés, certains gènes candidats ont été testés sans résultats probant ou avec des résultats nécessitant des confirmations, pour certains mQTLs aucun gène candidat n'a été identifié.

**Chapitre IV : Métabolisme du géraniol en
conditions fermentaires
par *S.cerevisiae***

1. Introduction

Sur terre, on estime que les terpènes (et particulièrement l'isoprène) sont les hydrocarbures les plus présents après le méthane [233,234]. Ces molécules sont produites majoritairement par les plantes. Ce constat est derrière la citation de R.Reagan : « (Puisqu')environ 80% de la pollution a pour origine les hydrocarbures émis par la végétation, n'allons pas trop loin dans la mise en place et l'application de normes sévères de l'activité humaine¹ ».

Il est vrai que les terpènes sont produits en quantité si importante par les plantes qu'ils jouent un rôle non négligeable sur la concentration en ozone [235] et participent même à la formation d'aérosols [236].

Ces molécules sont en réalité des signaux chimiques émis par les plantes pour diverses raisons telles que la pollinisation ou la défense contre l'attaque de pathogènes. De façon plus surprenante il a pu être mis en évidence que certains terpènes étaient synthétisés en réponse à des hausses de température [237,238]. Les terpènes participent ainsi à la communication intra et inter-espèce dans la nature. C'est pourquoi, on les retrouve dans de nombreux fruits (clémentine [239], kiwi [240], raisin [37,44]...) et même récemment dans des céréales telle que l'orge [241].

Ces molécules sont très olfactives et les industries agro-alimentaires et cosmétiques s'en servent abondamment. On en retrouve la trace dans de nombreux produits, comme le chewing-gum, le shampoing, le dentifrice et évidemment les parfums.

Parmi les 200 cépages plantés en France, les cépages alsaciens possèdent des caractéristiques originales qui les rendent reconnaissables par le consommateur. En effet certains d'entre eux sont considérés comme « aromatiques ». Le Gewurztraminer, le Riesling et le Muscat se démarquent en effet des autres vins par leur caractère olfactif et gustatif dû à la présence de terpènes particuliers : les monoterpénols. Ces derniers leur confèrent des caractères floraux qui en font des vins typiques et uniques parmi les grands vins. Ce sont les raisons pour lesquelles ces monoterpénols sont considérés comme des marqueurs de qualité des vins alsaciens. Ceci est dû à leur faible seuil de

¹“approximately 80% of our air pollution stems from hydrocarbons released by vegetation, so let's not go overboard in setting and enforcing tough emission standards from man-made sources”

perception et leurs concentrations relativement importantes dans le Muscat (linalol [44]) ou le Gewurztraminer (géraniol et rose oxyde [34]).

Les monoterpènes que l'on trouve dans le vin sont des molécules volatiles d'origine variétale et sont donc synthétisés par la vigne. Ils sont produits sous forme glycosylée ou libre dans la pellicule du raisin et se révéleront en partie lors de la fermentation et du vieillissement du vin.

Bien sûr, en fonction du cépage de vigne utilisé, du climat, du terroir mais aussi des pratiques viticoles, les concentrations de ces composés varient.

Une meilleure connaissance du métabolisme des terpènes par la levure en conditions fermentaires pourrait permettre de mieux prévoir leur nature et leur concentration totale dans le vin. Ainsi étudie-t-on les levures pour permettre une meilleure déglycosylation des précurseurs terpéniques [242,243] mais également pour essayer de contrôler la concentration de ces terpènes [244,245]. Enfin on signalera que certains auteurs suggèrent que des monoterpènes (le linalol) peuvent être produits par la levure durant la fermentation (de l'ordre de 1 à 3 µg/L), leurs concentrations seraient alors dépendantes de la souche utilisée [166]. Dans le travail ici présenté, aucune production de monoterpènes naturels par la levure n'a pu être observée ce que confirme deux autres publications [244,245], de ce fait, nous avons considéré cette production comme négligeable puisque non détectable.

On notera encore une fois ici, le parallèle avec la bière dans laquelle on trouve également des terpènes, essentiellement du linalol [248,249] provenant du houblon, mais également de l'humulène, du myrcène et du géraniol.

Dans le cadre de cette thèse, un monoterpène particulier a été retenu pour être étudié en condition fermentaire : le géraniol. On le trouve en quantité importante (plusieurs centaines de µg/L) majoritairement sous forme glycosylée dans le Gewurztraminer, mais c'est bien sa forme libre, bien que minoritaire par rapport à la forme liée, qui lui confère un arôme floral.

Ce composé a été relativement bien étudié aussi bien dans la bière que dans le vin. Pourtant son métabolisme par *S.cerevisiae* est mal connu.

Il semble relativement difficile d'étudier le métabolisme du géraniol par la levure en conditions fermentaires. En effet, on sait que ce monoterpène pénètre dans les membranes plasmiques de *S.cerevisiae* [150] mais on ne connaît pas exactement son

devenir. L'équipe de Vaudano *et al*, propose que ce composé soit métabolisé par la levure et qu'il intègre la voie de formation de composés stéroïdiens [250], bien que ces composés en questions n'aient pas été identifiés. Toutefois à partir des composés dosés dans le milieu de culture on peut expliquer une partie du métabolisme du géraniol par la levure :

On sait tout d'abord que le géraniol est réduit en citronellool durant la fermentation [244,251] mais la (ou les) enzyme(s) contrôlant cette réaction est (sont) inconnues. Le géraniol subirait également une série de réactions d'isomérisation pH-dépendantes conduisant à la formation de nérol et linalol. Cette dernière isomérisation est similaire à celle conduisant à la formation de nérolidol à partir de farnésol, passant ainsi d'un alcool primaire à un alcool tertiaire. Cette isomérisation de position conduirait par la suite à la formation de l' α -terpinéol par cyclisation [250].

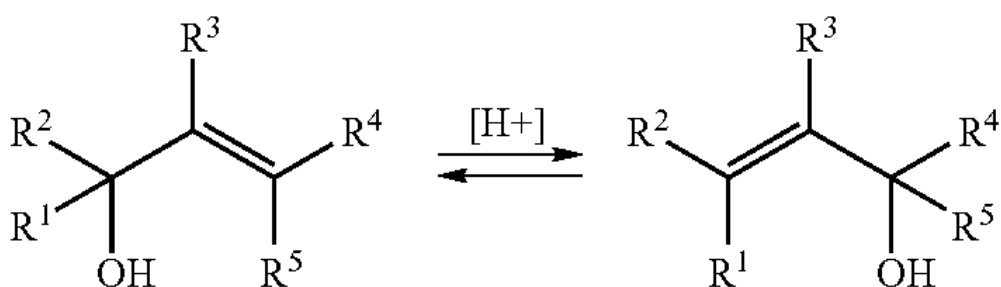


Figure 62 : isomérisation d'un alcool perylique tertiaire en alcool pérylique primaire en fonction du pH

On sait également que le géraniol, le nérol ou le citronellool peuvent être transformés en diols. Cette nouvelle molécule sert alors de précurseur à la levure pour la biosynthèse de rose oxyde¹ suivant des mécanismes non élucidés mais qui feraient intervenir le NADPH,H⁺ [252]. Le géraniol en fermentation se retrouve donc métabolisé ou transformé chimiquement en citronellool, rose oxyde, nérol, α -terpinéol et linalol.

¹La concentration de ce composé étant minoritaire (1 à 10 $\mu\text{g/L}$) il sera considéré comme négligeable dans les bilans réalisés plus bas

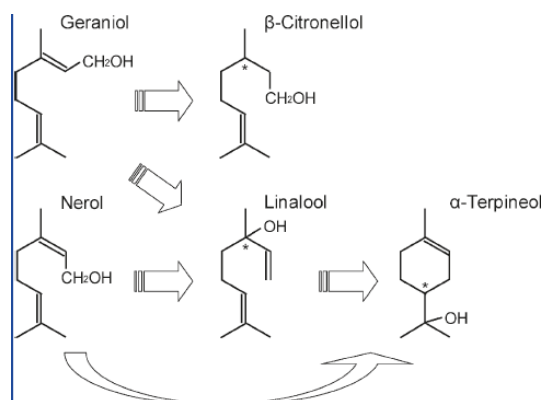


Figure 63 : formation de citronellol, nérol, linalol et α-terpinéol à partir de géraniol en conditions fermentaires d'après King et al [244,245], schématisé par Takoi et al [243].

Pourtant lorsque les auteurs font la somme de la concentration de ces composés, ils ne retrouvent que la moitié de la dose initialement ajoutée au milieu [244]. Différentes théories ont été avancées pour expliquer cette disparition, le géraniol peut être métabolisé en stéroïdes [250], incorporé dans les membranes [150], entraîné par « stripping » [244] ou acétylé [245].

Or à l'heure actuelle il est techniquement possible de mesurer la concentration de composés dans le milieu de fermentation, mais il est beaucoup plus difficile de mesurer les composés dans la levure, ne permettant pas de savoir si le géraniol pourrait être éventuellement dégradé (β -oxydé) par la levure ou incorporé dans ses membranes.

Les résultats de ce chapitre permettent de proposer d'autres voies métaboliques conduisant à la baisse de la concentration de géraniol dans le vin et identifient des gènes candidats impliqués dans ces voies.

L'approche QTL (cf Chapitre II) n'a pas permis d'identifier de gènes impliqués dans le métabolisme du géraniol. C'est donc l'approche « gène candidat » qui a été retenue pour ce travail. La collection de souche EUROSCARF est utilisée (fond BY=S288c= laboratoire). Les conditions fermentaires sont celles décrites dans le Matériel et Méthode. Tous les milieux utilisés sont supplémentés après pasteurisation ou stérilisation avec 5mg/L de géraniol. Au cours de l'étude nous avons décidé de changer de milieu (MS300 1% FA (milieu utilisé pour la détection de QTL) vs YPG 8% (milieu utilisé dans le cas de cette étude) car nous avons observé des dégradations chimiques du géraniol dans les fermentations longues (telles que celles qui sont réalisées en MS300 avec les souches BY).

2. Résultats

2.1. Existence des terpénylacétates dans les fermentations

La recherche de mQTL impliqué dans le métabolisme du géraniol à l'aide des 30 ségréants issus du croisement S288c et 59a n'a pas permis de détecter des gènes candidats pouvant expliquer les variations de concentration de terpénols observées. Par contre, des composés issus du métabolisme spécifique du géraniol ont été quantifiés lors de l'étude QTL (cf Chapitre II). Parmi ces composés se trouvent le géranyl acétate, le néryl acétate et le citronellyl acétate (Figure 64 : structure chimiques des monoterpénols et terpényl acétates dosés en présence de géraniol durant la fermentation Figure 64).

Ces composés sont des esters d'acétate. A. King et J.R. Dickinson ont déjà observé ces esters d'acétate dans le cas de fermentations de type brassicole sans toutefois proposer de mécanismes de formation [245].

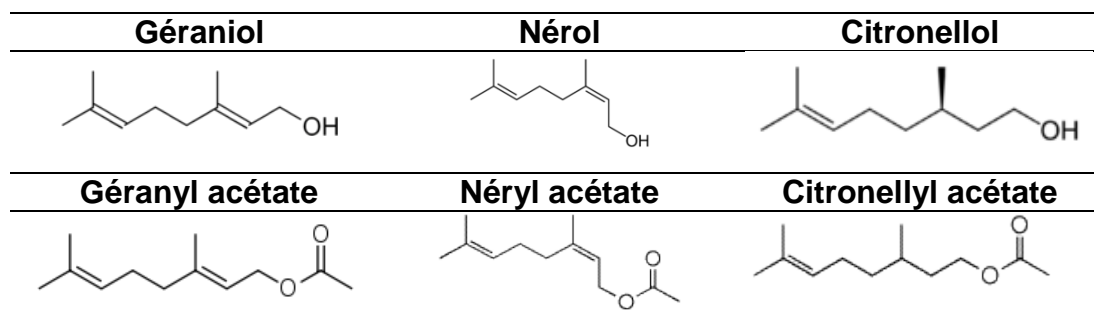


Figure 64 : structure chimiques des monoterpénols et terpényl acétates dosés en présence de géraniol durant la fermentation

Nous avons décidé d'étudier de manière plus approfondie la production des esters d'acétate au cours de la fermentation. Pour cela une cinétique de production de ces esters et des terpénols issus du métabolisme de *S.cerevisiae* en condition fermentaire a été réalisée pour les deux souches d'étude S288c et 59a dans du MS300 supplémenté avec 1mg/L de géraniol (Figure 65).

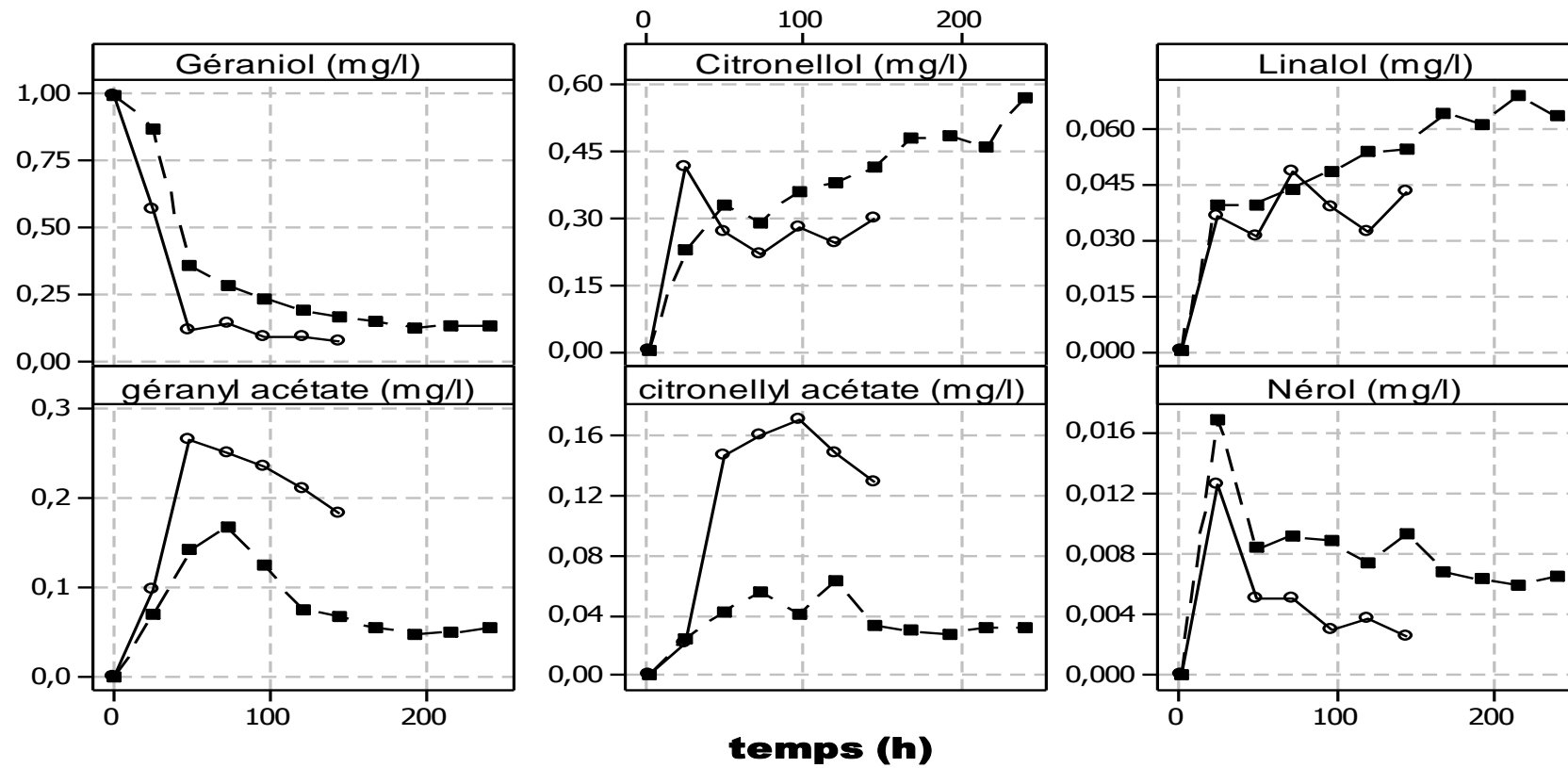


Figure 65 : Evolution de la concentration en terpényl acétate et terpénols au cours de la fermentation alcoolique (MS300 1% de FA, 20°C) par les souches carrés noirs = 59a et ronds ouverts = S288c

Dans cette expérience, le néryl acétate et l' α terpinéol n'ont pas été détectés. On observe que la synthèse du géranyl acétate du citronellol, du nérol, et du linalol est concomitante à la baisse de la concentration en géraniol. D'un point de vue technologique il est également intéressant de noter que la concentration en géranyl acétate et citronellyl acétate chute après 50h pour la souche 59a et 100h pour la souche S288c. Il est possible alors de proposer que ces esters ne soient pas stables en conditions acides et soient hydrolysés en monoterpéol + acide acétique.

La somme totale de terpénoles présents dans le milieu a pu être quantifiée grâce aux droites d'étalonnage présentées dans le Chapitre Matériels et Méthodes (en tenant compte des masses molaires de chacun des constituants). Les résultats sont représentés (Figure 66).

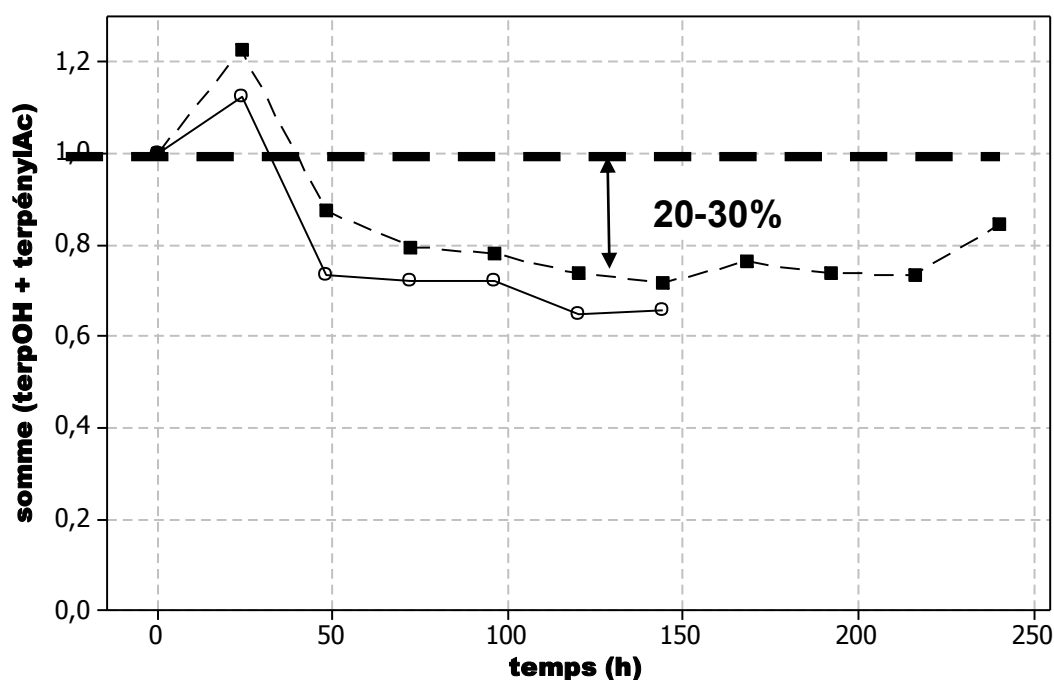


Figure 66 : Evolution de la concentration totale en terpénoles (terpOH) et terpénylacétate (terpénylAc) au cours du temps pendant en fermentation (MS300 1% FA, 20°C), carrés noirs= S288c ronds ouverts =59a

Curieusement il semble y avoir un « gain » de terpénoles au tout début de la fermentation avec les deux souches utilisées. Cela pourrait correspondre à une production de géraniol par la levure (tel que décrite [166]) qui est masquée dans le graphe montrant l'évolution de ce composé car il est estérifié beaucoup plus vite qu'il n'est produit. Néanmoins il

semble peu probable que la levure produise naturellement des monoterpénols durant la fermentation [244,245]. L'évolution de la somme des terpénols fait également apparaître qu'entre 20 et 30 % de l' « équivalent géraniol » initial n'est pas retrouvé dans le milieu (Figure 65). Ce point précis sera traité dans la partie suivante.

2.2. Gènes impliqués dans la synthèse de terpényl acétates

La voie de formation pour expliquer la présence des terpénylacétates dans le milieu est proposée en Figure 67.

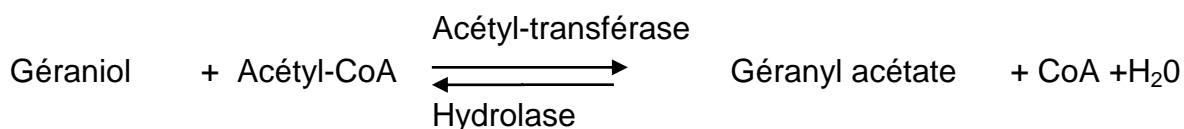


Figure 67 : Réaction d'estérification (proposée) du géraniol en géranyl acétate

Cette réaction est similaire à celle de l'estérification de l'isoamylalcool en isoamylacétate et est contrôlée par les gènes *ATF1* [253] et *ATF2* [254]. Ces gènes sont responsables de la formation des esters d'acétates dans le vin (isoamylacétate, phényéthylacétate et hexanylacétate). Le linalyl acétate n'a pas été détecté dans les différentes expériences menées ce qui pourrait s'expliquer par le fait ce monoterpénol est un alcool tertiaire, la position de sa fonction OH ne serait donc pas accessible aux esters synthèses de levure. Il pourrait en être de même pour l' α -terpinéol, qui n'a pas été retrouvé sous forme estérifiée.

On peut donc proposer de considérer les gènes *ATF1* et *ATF2* comme gènes candidat responsables de la synthèse des terpényl acétates cités plus haut.

Pour le vérifier, les mutants *By* Δ *ATF1* et Δ *ATF2* ont été mis à fermenter en duplicata dans un milieu MS300 1% de FA avec un ajout 5mg/L de géraniol et les concentrations en terpénylacétate et terpénols ont été mesurées et quantifiées par SBSE-LD-GC-MS.

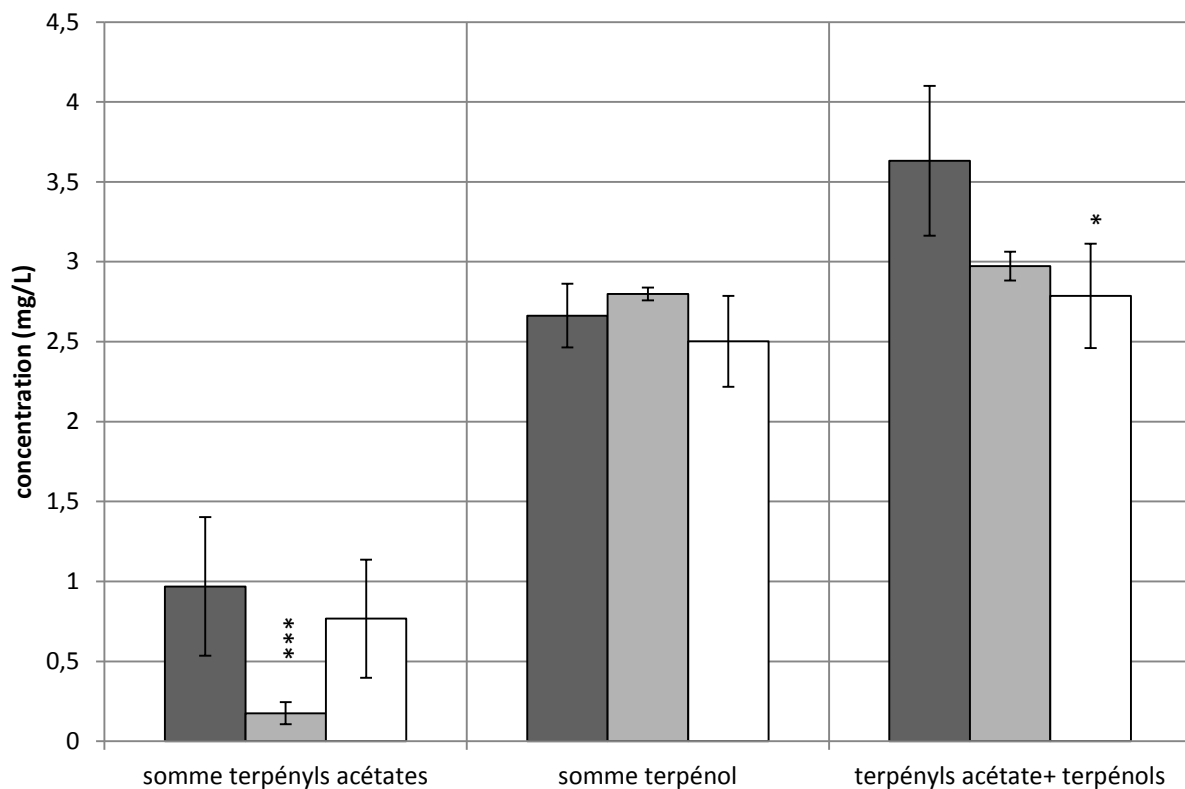


Figure 68 : effet de la délétion des gènes *ATF1* et *ATF2* sur la concentration en terpénols et terpényl-acétates

■ : *BYsauvage*, ■ *ByΔATF1* □ *BYΔATF2* ; n=2 ; (***) p-value<0,001 ; * p-value<0,05 test de Dunnett témoin *BYsauvage*)

On peut constater que la délétion du gène *ATF1* conduit bien à une baisse de la concentration en terpényl acétate (Figure 68). Le gène *ATF1* pourrait donc bien être impliqué dans la conversion du géraniol en géranyl acétate. Le gène *ATF2* semble quant à lui être moins impliqué dans ce processus.

2.3. Recherche du gène codant pour la géraniol-réductase de levure

Comme il l'a déjà été mentionné, le géraniol est réduit en citronellol durant la fermentation par la levure *S.cerevisiae*. L'enzyme permettant de réaliser cette réaction est inconnue et doit probablement être une réductase NADPH, H⁺ dépendante [245]. Dans le cadre de cette thèse il était intéressant de pouvoir identifier cette enzyme. En effet, le citronellol est un composé moins apprécié dans un vin de type gewurztraminer que le géraniol. L'identification de la réductase impliquée dans la conversion du géraniol en citronellol pourrait permettre la sélection de levures plus appropriées pour la fermentation de ce type de vin.

La bibliographie nous a permis d'identifier un gène candidat, grâce à l'étude d'un brevet publié en 2009.

Les inventeurs (Howard Chou et D Jay Keasling) [255] revendiquent la propriété d'une invention concernant l'utilisation de cellules de levure *S. cerevisiae* pour produire du 3-méthyl-2-buten-1-ol, du 3-méthyl-3-buten-1-ol et du 3-méthyl-butan-1-ol. Ils montrent que le 3-méthyl -2-buten-1-ol est d'abord réduit en 3-méthyl -2-buten-1-al par le couple Adh6p/Adh7p puis cet aldéhyde est réduit par Oye2p (et dans une moindre mesure par Oye3p) en 3-méthyl -2-butan-1-al lequel est ensuite à son tour réduit en 3 méthylbutanol (=alcool isoamylique) (Figure 69).

En observant le 3-méthylbutenol et le 3-méthylbutanol, on constate que leurs structures sont similaires respectivement aux structures portant la fonction OH du géraniol et du citronellol. Donc il pourrait être possible, par analogie de conformation de substrat, que la réduction du géraniol en citronellol soit contrôlée par Oye2p (Figure 70).

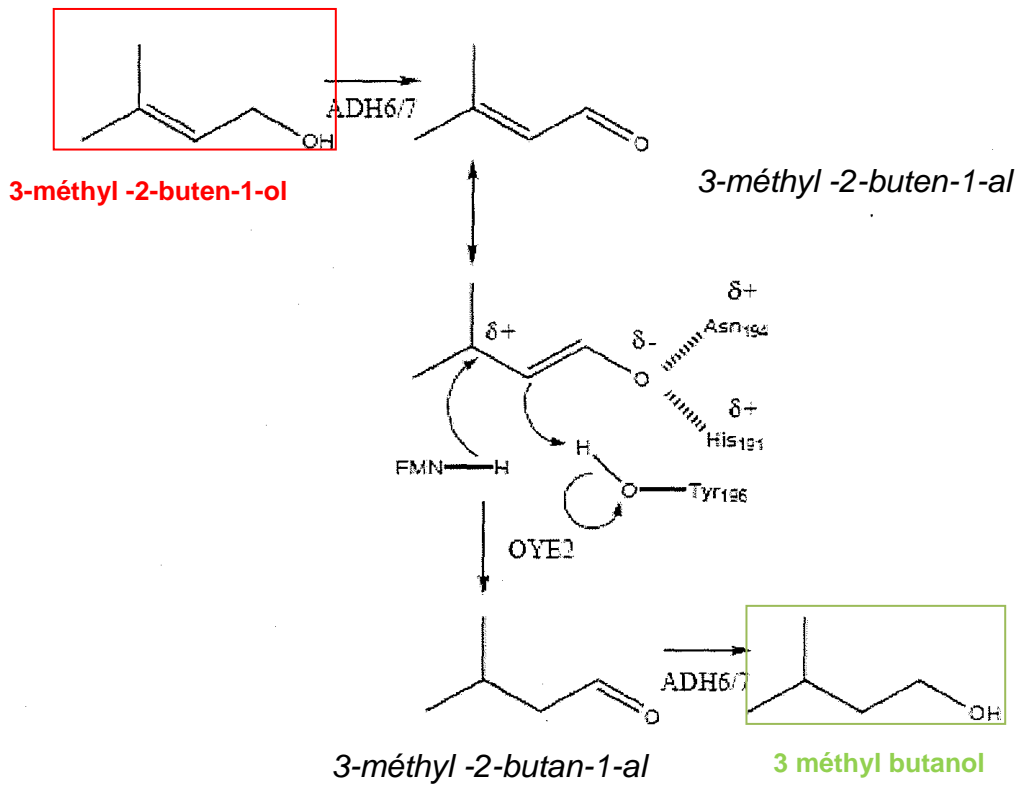


Figure 69 : Schéma réactionnel du brevet Cho et al 2009 proposant le mécanisme de transformation du 3-méthyl-2-butèn-1-ol en 3 méthylbutanol

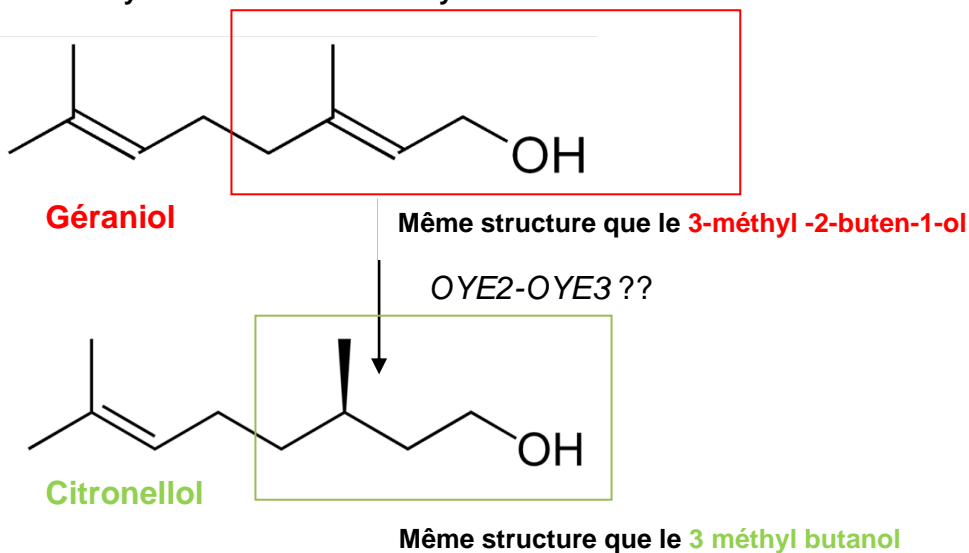


Figure 70 Analogie de structure entre le géraniol et le 3 méthyl-2-buten-1ol et entre le citronellool et le 3 méthylbutanol

Pour étudier l'influence des gènes *OYE2* et *OYE3* sur le métabolisme du géraniol, des mutants $BY4741\Delta OYE2$ et $\Delta OYE3$ (gène homologue à *OYE2* chez *S.cerevisiae*) ont été testés en conditions fermentaires, en triplicats, dans du YPG 8% supplémenté en géraniol (5mg/L). Après fermentation le surnageant a été analysé par SBSE-LD-GC-MS et les concentrations exprimées en unités relatives (témoins internes = 3 octanol 2mg/L pour les monoterpénols et éthyl C7 2mg/L pour les terpényles acétate). Le milieu choisi ici permet de minimiser le temps de fermentation et les éventuelles modifications chimiques que pourraient subir le géraniol.

Les résultats sont présentés Figure 71, ils permettent de constater que la délétion du gène *OYE2* conduit à une baisse significative de la concentration en citronellol dans le milieu ce qui est confirmé par une baisse de la concentration en citronellylacétate et une hausse de la concentration en linalol, nérol, géraniol et géranyl acétate.

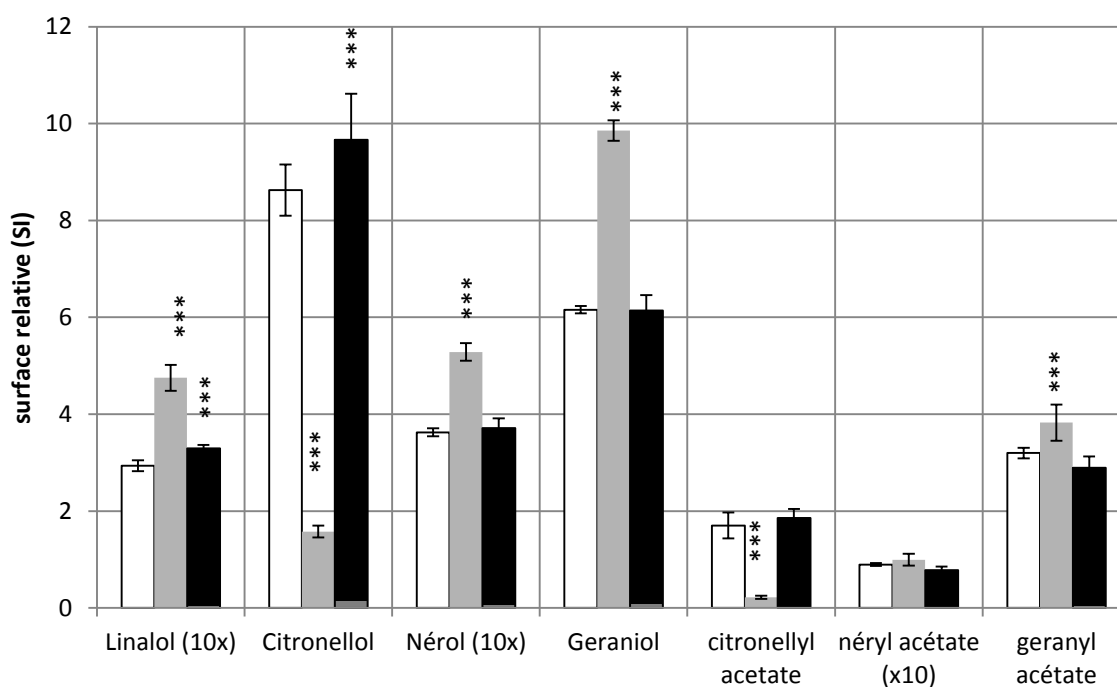


Figure 71 : Effet de la délétion du gène *OYE2* ou *OYE3* sur la concentration en terpénols ou terpénylacétates (milieu YPG 8%, 5mg/L de géraniol, n=3)

□ *BYsauvage*, ■ *BYΔOYE2*, ■ *BYΔOYE3*, *** $p\text{-value} < 0,001$ t-test évaluant l'hypothèse d'égalité avec le témoin=*BYsauvage*.

Le gène *OYE2* semble donc être le gène responsable de la transformation du géraniol en citronellol. Cette expérience nécessite néanmoins d'être adaptée en condition

œnologique sur un milieu de type MS300. Par ailleurs des expériences de surexpression de ce gène sont en cours.

Oye2p est une NADPH oxido-reductase portant une flavine mononucléotide (FMN)¹. Sa fonction précise est inconnue bien qu'elle ait de nombreux substrats.

Il est intéressant de noter que ce gène a été décrit comme étant impliqué dans le métabolisme des stérols [256] son activation, en fermentation, en liaison avec ce métabolisme a d'ailleurs été confirmée [257], bien que l'on ne sache pas à l'heure actuelle si Oye2p participe directement à cette voie ou si sa contribution consiste à apporter du NADPH,H⁺ nécessaire à la synthèse de l'ergostérol.

2.4. Existence d'autres terpènes dans le milieu de fermentation

Lors des recherches de mQTL, un dispositif (dispositif B) était supplémenté avec une dose importante de géraniol (5mg/L). Dans cette situation il a été possible de détecter des terpènes dans le milieu de fermentation. Ces terpènes sont le limonène, le myrcène, le cis- β -ocimène, l' α -terpinène et l' α -terpinolène. Pour des raisons de temps et de priorité d'expérience il a été décidé de ne pas calibrer ces composés ce qui ne permet pas de proposer de valeur quantitative. Toutefois, comme on sait que ces terpènes sont issus de transformations chimiques ou biochimiques par la levure, on peut supposer qu'ils sont pour partie au moins dans les 20% d' « équivalent géraniol » non retrouvé.

Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer la présence de ces composés. Les terpènes en chimie organique sont souvent cités comme molécules modèles représentatives des alcènes. On remarque alors qu'ils sont très réactifs en présence de catalyseur comme la lumière [258] ou en fonction de modification du pH [259,260] (Figure 72).

A= ; B= limonène ; C= α -terpinène ; D= cyclohexène ; E= γ -terpinène

Bien qu'il n'y ait pas présence d'acidité équivalente à 33% d'H₂SO₄ dans le vin, la présence d'acides organiques divers (acide tartrique, acide malique, AGMC...) et le pH relativement bas (pH 3,3) pourraient permettre à ce type de réaction de se produire sur

¹ ce qui lui confère sa couleur jaune d'où son nom : Old Yellow Enzyme

une durée de 1 mois telle qu'observée pour les fermentations menées dans nos expériences.

On peut également proposer que l'étape de transformation du géraniol en linalol, nérol soit génératrice de carbocations. Ces carbocations peuvent alors être réhydratés ou stabilisés en myrcène, cis- β -ocimène, α -pinène, limonène (Figure 73).

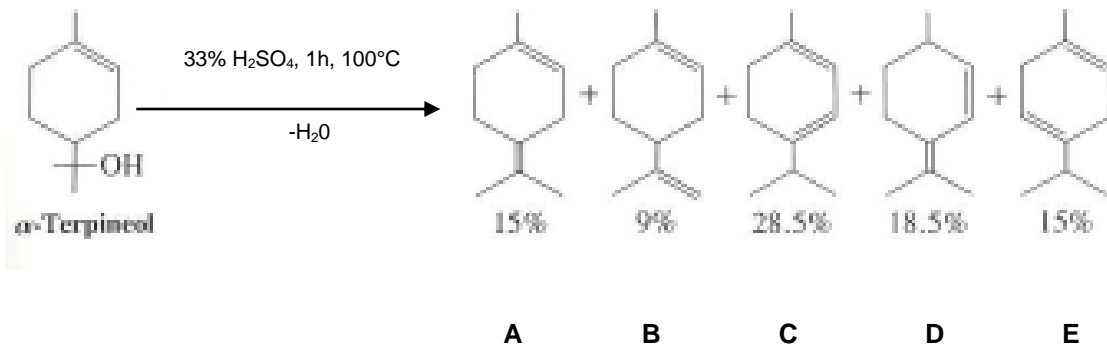


Figure 72 : deshydratation de l' α terpinéol en terpènes cycliques en condition acide [260],

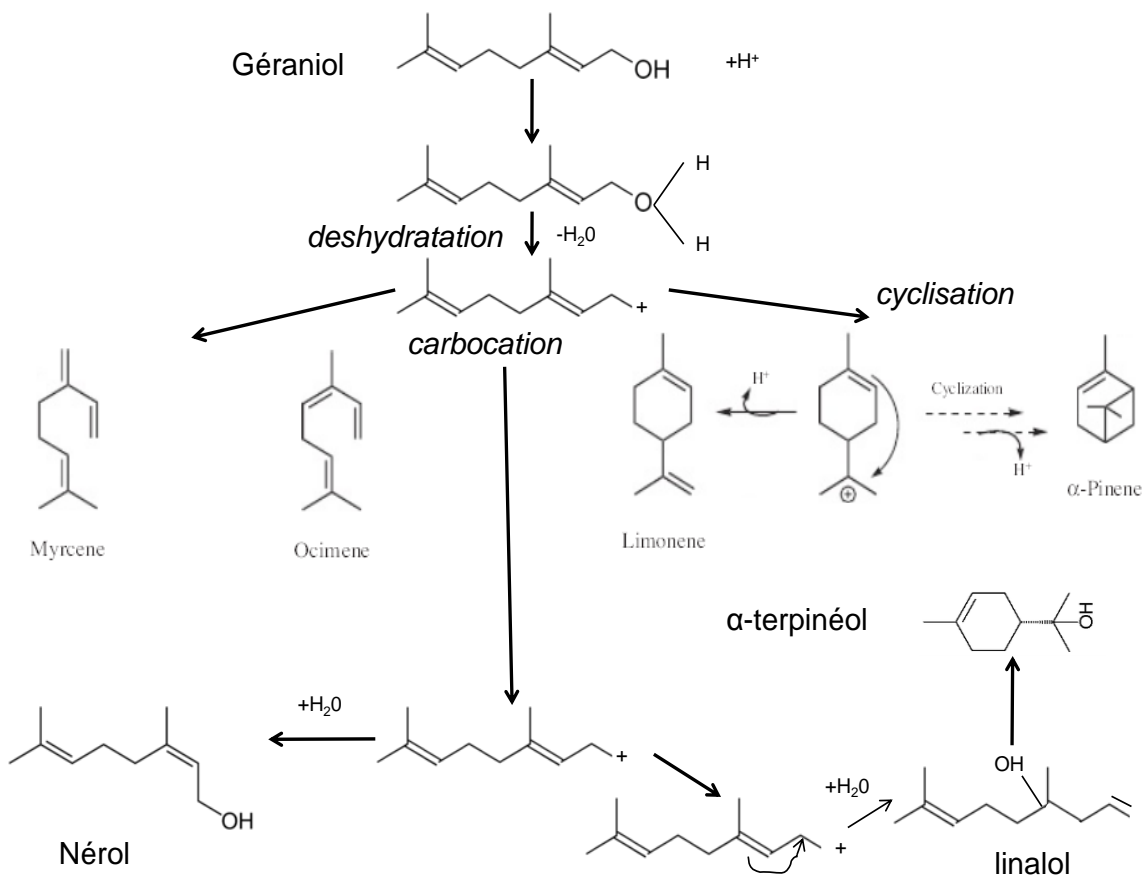


Figure 73 : voie de formation du myrcène, ocimène, limonène et α pinène proposée à partir du carbocation du géraniol

3. Conclusions/Perspectives

A travers cette étude, il est possible de proposer deux voies biochimiques et une voie chimique du devenir du géraniol en fermentation.

Voie biochimique

- i) L'estérification : Elle serait contrôlée par *ATF1* et serait responsable d'une diminution de l'ordre de 30-40% du géraniol/citronellol/nérol initial
- ii) La réduction en citronellol : Elle serait contrôlée par *OYE2*

Voie chimique

L'isomérisation chimique : La présence de certains terpènes issus de la dégradation du géraniol dans le milieu de fermentation conduit à proposer des mécanismes chimiques participant à la diminution du géraniol. On peut supposer que ces derniers sont dépendant du temps et pourraient représenter la part manquante dans la plupart des bilans effectués au cours des études qui ont été menées sur ce composé.

Les surexpressions des gènes *ATF1/ATF2* et *OYE2* sont prévues et permettront d'apporter des renseignements complémentaires aux expériences présentées. De même la dégradation chimique du géraniol dans une solution modèle est prévue afin d'évaluer sa transformation au cours du temps.

Lorsque l'on analyse un Gewurztraminer par SBSE-LD-GC-MS (non montrées), on note la présence de géraniol, de citronellol, de linalol, d' α -terpinéol mais aussi des terpényles acétate et des terpènes identifiés plus haut. Cela permet de constater que ces composés sont effectivement présents dans le vin, et que leur origine pourrait être, du moins en partie, le géraniol et son métabolisme par la levure. Ce constat doit également être pris en compte si l'on souhaite faire de la sélection de levures.

Enfin, il est important de mentionner qu'il n'y a pas que la levure qui va influencer le devenir du géraniol. En effet, au cours de l'élevage et de la garde des vins, des physico-chimiques complexes vont avoir lieu qui vont profondément modifier l'équilibre et la nature des composés présents. Cet aspect mériterait d'être étudié ce qui permettrait de relier le potentiel aromatique d'un vin, son vieillissement et les conditions de stockage optimal.

Conclusion Générale

Les objectifs de ce travail de thèse étaient multiples, étude du gène *EEB1* en contexte œnologique en lien avec une détoxification de l'acide décanoïque, recherche de QTL impliqués dans la production de molécules aromatiques, validation fonctionnelle de gènes candidat et étude du métabolisme du géraniol en conditions fermentaires et cette thèse présente les trois ans de travail qui lui ont été consacré.

Etude du gène *EEB1* et détoxification de l'acide décanoïque

Au début de ce travail, l'étude du gène *EEB1* en conditions fermentaires a monopolisé l'essentiel de l'activité car les souches permettant de réaliser l'étude QTL n'étaient pas disponibles. Les résultats obtenus par d'autres équipes (S.Saerens) en 2007 et 2008 ne proposaient pas d'explications claires du rôle du gène *EEB1* sur la détoxification de l'acide décanoïque mais plaçaient ce gène dans un contexte de production d'esters éthyliques.

Du côté de l'équipe que je rejoignais, celle-ci venait de démontrer l'activation du gène *EEB1* lors de l'ajout d'acide décanoïque. Il s'agissait alors de faire le lien entre cette activation, une détoxification de l'acide décanoïque et la production d'esters éthyliques. Les résultats que nous avons obtenus permettent de confirmer le rôle de ce gène sur la présence des esters éthyliques mais également de montrer qu'il est impliqué dans la synthèse de leurs précurseurs (acide octanoïque et décanoïque), en conditions fermentaires et ceci dans une souche de laboratoire et œnologique.

Il semble donc intéressant de se demander si le gène *EEB1* est responsable de la synthèse des esters éthyliques, ou si son rôle est de participer à la synthèse des précurseurs de ces derniers.

L'absence de ce gène conduit également à une concentration plus élevée dans le milieu de décanol en présence d'acide décanoïque ce qui permet de suggérer une autre voie de détoxification de l'acide décanoïque bien que cela reste à prouver. Enfin dans le cadre de cette thèse, il était pertinent de vérifier l'influence du polymorphisme du gène *EEB1* qui existe entre l'allèle issu de la souche de levure œnologique et l'allèle de la souche de laboratoire montrant qu'il existait un allèle fort conduisant à une production élevée d'éthyl décanoate.

Recherche de mQTL responsables de la production de composés volatils

Par la suite, la disponibilité des ségréants issus du croisement entre une souche de laboratoire (S288c) et une souche œnologique (59a) a permis d'entreprendre une approche originale et nouvelle en cherchant des QTL responsables de la production de composés volatils chez la levure en condition fermentaire. Ce travail a conduit à détecter 23 QTL sur 3 dispositifs expérimentaux différents. De tous les mQTL détectés dans ces 3 conditions un seul est commun aux 3 dispositifs et a été étudié plus en détail.

Nous avons pu valider 4 gènes candidats détectés susceptibles d'expliquer les phénotypes observés. Toutefois, nous n'avons pas pu résoudre l'origine des variations d'un certain nombre de composés comme l'isoamylacétate, certains esters éthyliques, ou encore la concentration en géraniol en fin de fermentation, alors que l'héritabilité des caractères observés était excellente (>90%). Aussi, on peut penser que cela provient sans doute d'une régulation complexe de ces métabolites, qui ne peut être détectée à l'aide d'un dispositif expérimental comprenant seulement trente ségréants. Le QTL obtenu pour l'isoamylalcool en plaçant le caractère floculation en co-variable, ou les différents QTL obtenus pour un même composé dans les différentes conditions explorées montrent la plasticité du métabolome face aux conditions environnementales.

Validation des mQTL et des gènes candidats

Pour réaliser la validation des mQTL (et des gènes candidats) deux approches ont été utilisées.

La première a consisté à réaliser des études sur les hémizygotés, les deux fonds génétiques (laboratoire et œnologique) sont croisés mais un des deux allèles du gène candidat est délété. Deux QTL ont ainsi pu être validés.

Le nérolidol tout d'abord, il est influencé par le polymorphisme du facteur de transcription *PDR8*, ce qui nous a permis d'identifier entre autre le gène *GPH1* (*glycogène phosphorylase 1*) comme gène clé dans sa production, bien que les mécanismes mis en œuvre n'aient pas été identifiés. Le nérolidol semble peu étudié d'un point de vue œnologique, pourtant il fait partie avec le farnésol des seuls sesquiterpénols produits par la levure. Ces deux composés sont extrêmement volatils. A partir de leurs descripteurs olfactifs respectifs, on peut dire que leur présence apporte sans doute des

notes positives au vin. De façon surprenante, dans notre situation, la version allélique de laboratoire du gène *PDR8* conduit à une augmentation de la production de nérolidol. A *contrario* du vin, le farnésol (isomère du nérolidol) est relativement bien étudié dans le cas de *Candida albicans*. Il a pu être montré récemment que la production de E,E farnésol par *Candida albicans* pouvait avoir un rôle dans la communication entre individus et permettre non seulement de contrôler sa morphologie mais également le métabolisme de cet organisme [261]. Par analogie, on peut alors envisager la production de farnésol et de nérolidol par la levure en tant que signal et non en tant que déchet comme cela est supposé. Cette analogie est d'ailleurs valable pour la majorité des molécules volatiles fermentaires.

Ensuite, l'étude des variations de phényléthanol a permis d'identifier un mQTL et de localiser les mutations du gène *ABZ1* (para-aminobenzoate (PABA) synthase) comme responsables des variations observées. Comme l'a montré Chloé Ambroset, ce gène est au cœur du métabolisme azoté chez la levure. Dans sa version de laboratoire, il conduit à des cinétiques de fermentation plus lentes qui pourraient être dues à une carence en acide paraminobenzoïque. L'étude des allèles du gène *ABZ1* a permis, dans notre situation, d'observer des différences non seulement sur le phényléthanol mais également sur les 2/3 des composés dosés. L'allèle œnologique du gène *ABZ1* conduit quasi-systématiquement à une hausse de la production des composés volatils mesurés. Les explications et les mécanismes mis en jeu n'ont pas été élucidés. Il pourrait s'agir d'une conséquence indirecte d'une cinétique plus faible, à moins que cela ne soit lié directement au métabolisme azoté.

La deuxième approche consiste à comparer la production du composé étudié par un mutant délété du gène candidat et un témoin sauvage.

Le mQTL responsable de la production d'acide décanoïque a conduit à localiser le gène *CEM1* (une céto-acyl réductase mitochondriale) comme gène candidat. L'étude de l'effet de la délétion du gène *CEM1* permet d'apporter un nouvel éclairage sur les raisons de la production d'acides gras à moyennes chaînes par la levure en condition fermentaire. Cette délétion entraîne en effet une production plus forte d'acide gras à moyennes chaînes (acides C8 et C10) dans le milieu. Cette surproduction pourrait être due à un besoin de synthèse d'acide lipoïque dont l'acide octanoïque est le précurseur. La délétion du gène *CEM1* ne permet pas à la levure de gérer convenablement cet acide

qui est alors expulsé. On ne peut malheureusement pas espérer réduire la production d'acide gras à moyenne chaîne en rajoutant de l'acide lipoïque dans le milieu car *S.cerevisiae* ne peut incorporer ce composé de l'extérieur [262]. Le gène *CEM1* semble défectif dans la souche de laboratoire S288c ce qui explique qu'elle soit forte productrice d'acide gras à moyenne chaîne.

Les gènes codant pour des phospholipases B, *PLB1* et *PLB2* sont localisés sur le mQTL responsable des variations d'esters éthyliques. La délétion de ces gènes conduit dans les deux cas à des baisses de production d'ester éthyliques. Le gène *PLB2* semble être le candidat le plus probable pour expliquer les variations observées, mais à nouveau, tout comme pour *ABZ1*, ce gène modifie très fortement la cinétique fermentaire ce qui ne permet pas de savoir si les variations de production des esters éthyliques sont une conséquence directe ou indirecte de la délétion du gène. Néanmoins, de par sa fonction, son rôle dans le métabolisme des facteurs anaérobies et la présence de mutations particulières de ce gène chez la souche de laboratoire, le gène *PLB2* est probablement le gène candidat recherché dans notre cas. Il est intéressant de noter que le gène *PLB2* est lié au métabolisme de l'inositol. En effet, lors de la fermentation, l'ajout d'inositol limite la production d'esters éthyliques [263] (peut être en raison de la répression du gène *EEB1* [264]), tandis que sa carence l'augmente [265], et entraîne également une production plus importante d'AGMC [266]. De façon surprenante, s'il a été montré que la concentration en inositol influence la production des esters éthyliques, la réciproque l'est également. Il a pu être montré que l'ajout de l'éthyl butanoate (éthyl C4) mais également des esters éthyliques à plus longues chaînes (C6, C7, C8, C9, C10) entraîne une baisse de la concentration intracellulaire d'inositol chez la levure [267,268] et augmente l'expression de *INO1* [269]. L'ensemble de ces données montre qu'il doit exister une régulation fine de la production des esters éthyliques en liaison avec la teneur en inositol. L'inositol pourrait par exemple servir de molécule accepteuse d'acides gras à moyennes chaînes faisant apparaître un autre moyen de détoxification que celui évoqué dans le chapitre sur le gène *EEB1*.

La validation de deux gènes par hémizygotie réciproque ainsi que la validation de deux autres gènes par délétion montrent la puissance du jeu de souche et de l'approche QTL utilisée. Evidemment, le choix des parents ayant permis d'obtenir le jeu de souche est

discutable. En effet la souche S288c n'est plus « naturelle » du fait de son évolution en milieu de laboratoire [270] , pourtant les résultats de ce travail de thèse (ainsi que ceux de Chloé Ambroset) montrent que cette approche est pertinente et reste originale car elle permet l'identification précise de gènes. Cela est du notamment au fait que les génomes des deux parents aient été déchiffrés et annotés avec précision.

Métabolisme du géraniol

L'objectif initial de cette thèse a clairement été d'identifier les voies du métabolisme du géraniol par *S.cerevisiae* au cours de la fermentation et surtout le ou les gènes contrôlant sa réduction en citronellol.

L'approche QTL devait permettre d'identifier les gènes clés du métabolisme du géraniol par *S.cerevisiae*. Au cours des différentes expériences menées lors de la recherche de ces mQTL, il a paru évident que le géraniol était non seulement transformé en terpénylacétates mais également modifié chimiquement en terpènes, bien qu'il fût impossible d'identifier un mQTL permettant d'expliquer les variations observées.

La production de terpényl acétate a donc été étudiée. Compte tenu de la littérature, les gènes *ATF1* et *ATF2* semblaient être les gènes susceptibles de réaliser l'acétylation des terpénols. Les résultats des études menées sur les délétants de ces gènes ont confirmé que le gène *ATF1* permettait bien à la levure d'acétyler le géraniol (mais également le nérol et le citronellol), il sera nécessaire de valider ces données par une surexpression des deux gènes.

Les analyses en composante principales (ACP) réalisées lors de l'approche QTL (chapitre II) montrent que les esters d'acétate (isoamylacétate et phénylacétate) sont fortement corrélés avec les terpényl acétates. Cela suppose donc qu'une levure fortement productrice d'esters d'acétates sera également forte productrice de terpényl acétates. D'un point de vue œnologique (et même brassicole) cela va à l'encontre de la sélection. En effet, l'isoamylacétate et le phényléthylacétate sont des molécules favorables à l'arôme du vin ou de la bière et les levures industrielles sont généralement de fortes productrices d'esters d'acétates. La concentration des terpénols (géraniol, citronellol et nérol) va diminuer si l'on utilise ces levures alors même que l'on cherche à protéger et conserver une concentration élevée de ces molécules dans les vins. On notera tout de même que le linalol n'est pas concerné par l'estérification car c'est un alcool tertiaire.

Le métabolisme du géraniol chez la levure passe également par une production relativement élevée de citronellol. Durant ce travail, de nombreuses expériences ont été menées pour identifier la ou les géraniol réductase(s) de levure sans apporter de résultats probant (données non montrées). Nous avons ainsi analysé plus de 43 délétants d'oxydo-réductases de la collection EUROSCARF à la recherche d'une fonction géraniol deshydrogénase (sans succès).

L'existence d'un brevet et le lien entre substrats de structures proches (ici 3-méthyl -2-buten-1-ol avec le géraniol et le 3 méthyl butanol avec le citronellol) ont permis d'identifier deux gènes, *OYE2* et *OYE3*, comme étant les possibles réductases recherchées. L'étude de leur délétant a permis de confirmer le rôle du gène *OYE2* dans la réduction du géraniol en citronellol. Ces deux gènes n'ont à l'heure actuelle aucune fonction ou rôle clairement défini chez la levure, ce travail permet de proposer une fonction de géraniol réductase à *OYE2*.

Enfin la présence de molécules terpéniques dérivées du géraniol laisse sous-entendre que des mécanismes de transformations chimiques de ce terpénol pourraient également contribuer à une diminution de sa concentration telle que celle observé dans d'autres expériences de fermentation, même s'il reste à élucider plus en détail les équilibres qui régissent ces réactions.

Annexe

Effet du gène *AMN1* sur la morphologie des levures

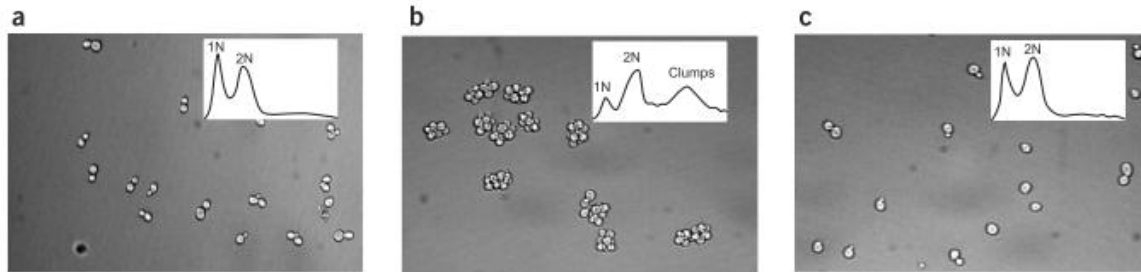


Figure 3 Effect of *AMN1* on clumpiness. Clumps of cells stained with DNA-binding dye generate fluorescence reflecting a particle (clump of cells) with DNA content greater than 2N. (a) BY. (b) RM. (c) RM *amn1Δ*.

Figure 74 : Résultats obtenus par Gael Yvert en 2007, la version allélique « œnologique » du gène *AMN1* confère à la levure la capacité de former des amas (« clump »)

Le Logiciel J/QTL

La recherche de QTL s'effectue en utilisant le logiciel R/QTL 1.14-2 et l'interface graphique J/QTL 1.3.0 du laboratoire Jackson <http://churchill.jax.org/research/QTL.shtml>
 Cette interface a été choisie car elle ne nécessite pas de ligne de commande et bénéficie d'une interface graphique sous java qui la rend facilement accessible.

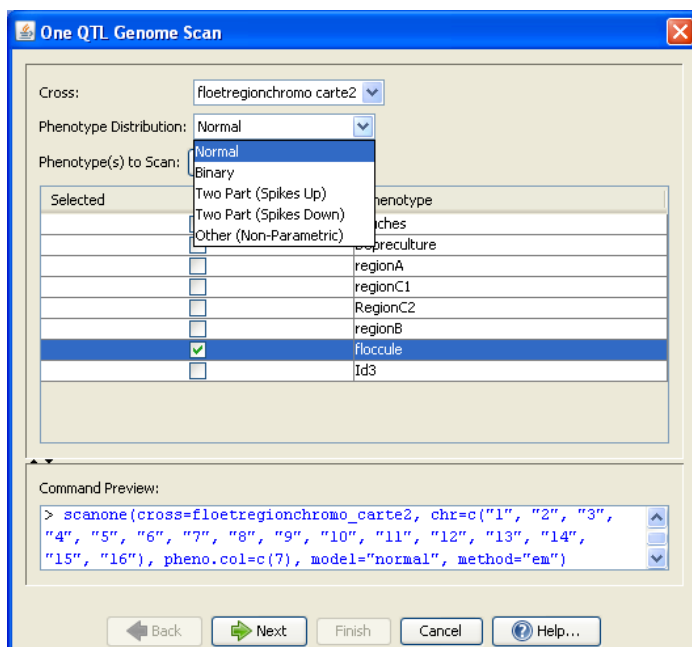


Figure 75 : Interface de paramétrage de la distribution phénotypique et choix du phénotype

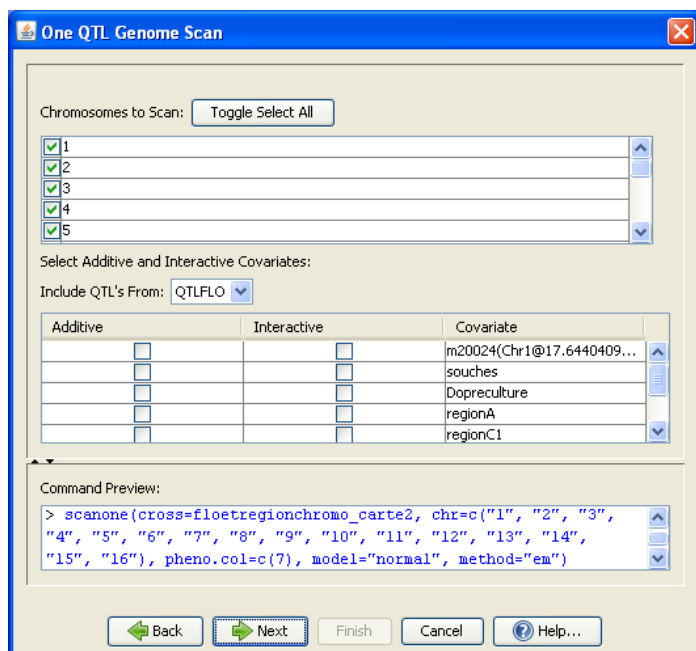


Figure 76 : Interface de choix de la zone génomique et ajout de co-variable

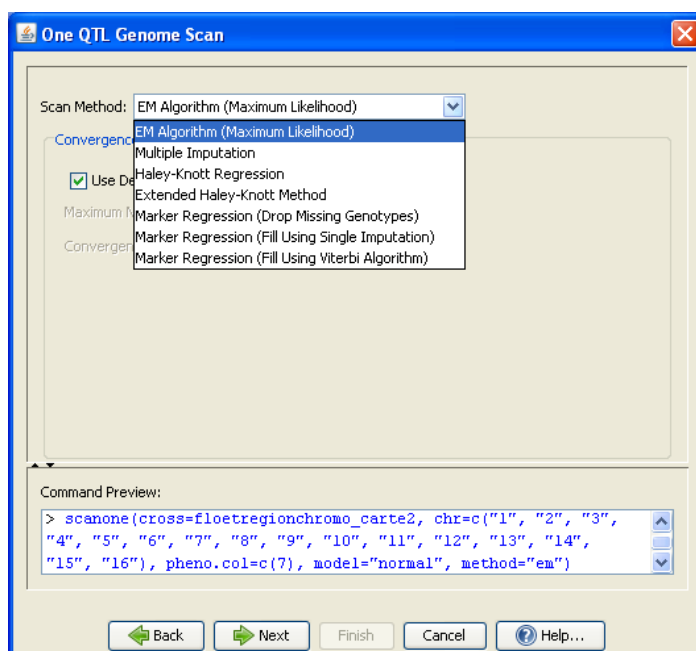


Figure 77 : Interface de choix de la méthode de scan

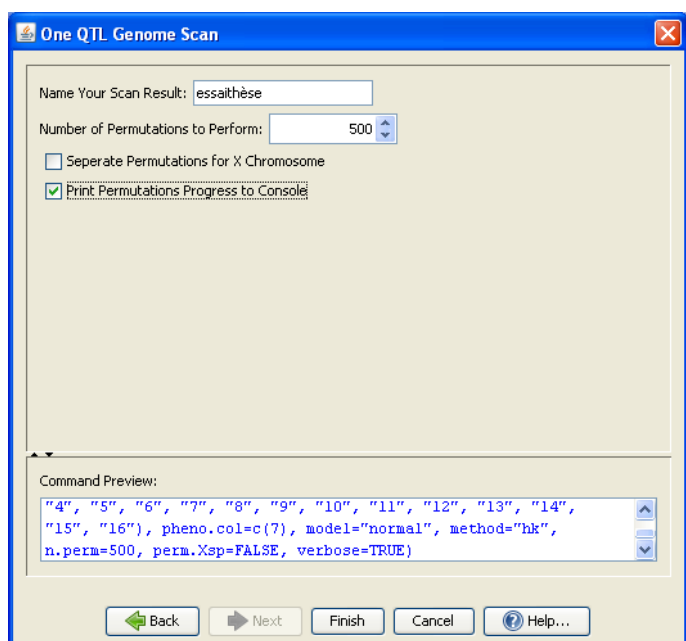


Figure 78 : Interface de choix du nombre de permutations à réaliser

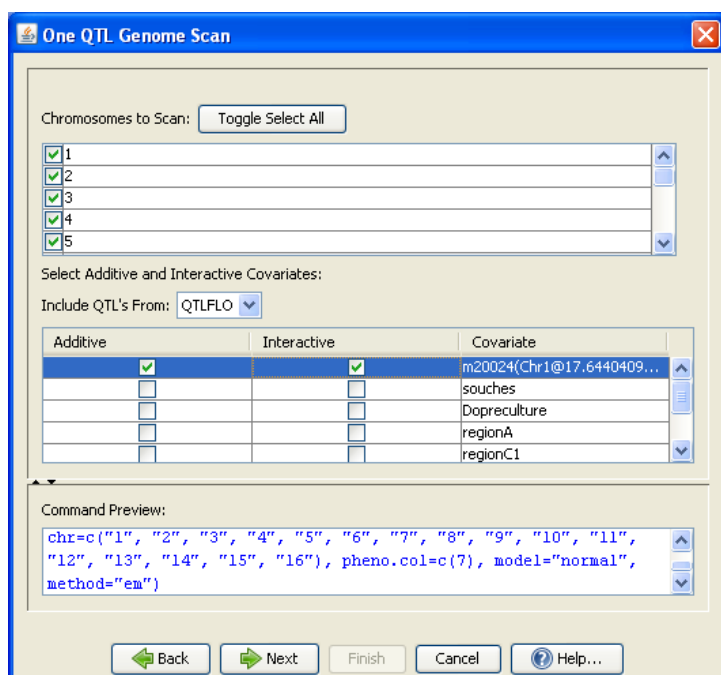


Figure 79 : Interface permettant l'ajout d'une co-variable lors de la recherche de QTL de floculation

QTL de l'acide octanoïque

Tableau 51 : gènes du QTL de l'acide octanoïque

Gene Name	Systematic Name	Description
AMS1	YGL156W	Vacuolar α mannosidase, involved in free oligosaccharide (fOS) degradation; delivered to the vacuole in a novel pathway separate from the secretory pathway
CDC43	YGL155W	Beta subunit of geranylgeranyltransferase type I, catalyzes geranylgeranylation to the cysteine residue in proteins containing a C-terminal CaaX sequence ending in Leu or Phe; has substrates important for morphogenesis
LYS5	YGL154C	Phosphopantetheinyl transferase involved in lysine biosynthesis; converts inactive apo-form of Lys2p (α -aminoacidpate reductase) into catalytically active holo-form by posttranslational addition of phosphopantetheine
PEX14	YGL153W	Peroxisomal membrane peroxin that is a central component of the peroxisomal protein import machinery; interacts with both PTS1 (Pex5p) and PTS2 (Pex7p), peroxisomal matrix protein signal recognition factors and membrane receptor Pex13p
	YGL152C	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified ORF PEX14/YGL153W
NUT1	YGL151W	Component of the RNA polymerase II mediator complex, which is required for transcriptional activation and also has a role in basal transcription
INO80	YGL150C	ATPase, subunit of a complex containing actin and several actin-related proteins that has chromatin remodeling activity and 3' to 5' DNA helicase activity in vitro; has a role in modulating stress gene transcription
	YGL149W	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified ORF INO80/YGL150C.
ARO2	YGL148W	Bifunctional chorismate synthase and flavin reductase, catalyzes the conversion of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) to form chorismate, which is a precursor to aromatic amino acids
RPL9A	YGL147C	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl9Bp and has similarity to E. coli L6 and rat L9 ribosomal proteins
RRT6	YGL146C	Putative protein of unknown function; non-essential gene identified in a screen for mutants with increased levels of rDNA transcription; contains two putative transmembrane spans, but no significant homology to other known proteins
TIP20	YGL145W	Peripheral membrane protein required for fusion of COPI vesicles with the ER; prohibits back-fusion of COPII vesicles with the ER; forms a tethering complex with Sec39p and Dsl1p that interacts with ER SNAREs Sec20p and Use1p
	ARS701	Autonomously Replicating Sequence that contains only an imperfect match to the core consensus sequence
ROG1	YGL144C	Protein with putative serine active lipase domain
MRF1	YGL143C	Mitochondrial translation release factor, involved in stop codon recognition and hydrolysis of the peptidyl-tRNA bond during mitochondrial translation; lack of MRF1 causes mitochondrial genome instability
GPI10	YGL142C	Integral membrane protein involved in glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor synthesis; putative α 1,2 mannosyltransferase required for addition of the third mannose onto the GPI core structure; human PIG-Bp is a functional homolog
HUL5	YGL141W	Ubiquitin-conjugating enzyme (E4), elongates polyubiquitin chains on substrate proteins; works in opposition to Ubp6p polyubiquitin-shortening activity; required for retrograde transport of misfolded proteins into cytoplasm during ERAD
	ARS712	Putative replication origin, identified in multiple array studies, not yet confirmed by plasmid-based assay
	YGL140C	Putative protein of unknown function; non-essential gene; contains multiple predicted transmembrane domains

Gene Name	Systematic Name	Description
FLC3	YGL139W	Putative FAD transporter, similar to Flc1p and Flc2p; localized to the ER
	YGL138C	Putative protein of unknown function; has no significant sequence similarity to any known protein
SEC27	YGL137W	Essential beta'-coat protein of the COPI coatomer, involved in ER-to-Golgi and Golgi-to-ER transport; contains WD40 domains that mediate cargo selective interactions; 45% sequence identity to mammalian beta'-COP
MRM2	YGL136C	Mitochondrial 2' O-ribose méthyltransferase, required for méthylation of U(2791) in 21S rRNA; MRM2 deletion confers thermosensitive respiration and loss of mitochondrial DNA; has similarity to Spb1p and Trm7p, and to E. coli FtsJ/RrmJ
RPL1B	YGL135W	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl1Ap and has similarity to E. coli L1 and rat L10a ribosomal proteins; rpl1a rpl1b double null mutation is léthal
PCL10	YGL134W	Pho85p cyclin; recruits, activates, and targets Pho85p cyclin-dependent protein kinase to its substrate
ITC1	YGL133W	Component of the ATP-dependent Isw2p-Itc1p chromatin remodeling complex, required for repression of a-specific genes, repression of early meiotic genes during mitotic growth, and repression of INO1
	YGL132W	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; overlaps the verified gene SNT2/YGL131C
SNT2	YGL131C	DNA binding protein with similarity to the S. pombe Snt2 protein; computational analysis suggests a role in regulation of expression of genes encoding amine transporters
CEG1	YGL130W	A (guanylyltransferase) subunit of the mRNA capping enzyme, a heterodimer (the other subunit is CET1, an RNA 5'-triphosphatase) involved in adding the 5' cap to mRNA; the mammalian enzyme is a single bifunctional polypeptide

Liste des tableaux

Tableau 1 : principales boissons fermentées et distillats produits dans le monde (adapté de Bamforth 2005)	8
Tableau 2 : Exemples de molécules volatiles variétales identifiées dans le vin	15
Tableau 3 : Exemples de molécules volatiles fermentaires identifiées dans le vin	22
Tableau 4 : Souches de levure séquencées et disponibles dans les bases de données NCBI.....	25
Tableau 5 : Composition d'un litre de MS300	28
Tableau 6 : Solution mère de vitamine.....	29
Tableau 7 : Solution mère d'oligoéléments.....	29
Tableau 8 : Solution de facteurs anaérobies	29
Tableau 9 : Solution mère d'acides aminés	29
Tableau 10 : Souches de levures utilisées dans cette thèse	32
Tableau 11: Caractéristiques des calibrations des 23 composés dosés en SBSE-LD-GC-MS	37
Tableau 12 : Pourcentage d'excrétion et impact olfactif des principaux esters éthyliques et acides gras à moyennes chaînes	40
Tableau 13 : Substrat et produits des principales esters synthèses de la levure en condition fermentaire	44
Tableau 14 : Principales découvertes liées à l'étude des 3 esters éthyliques synthèses/hydrolases de levure	48
Tableau 15 : Coefficient de corrélation R^2 et p-value associée du modèle de régression linéaire liant la concentration de l'ester en fonction de son acide.	52
Tableau 16 : matrice de croisement pour l'étude des allèles du gène <i>EEB1</i>	67
Tableau 17 : Exemple d'études ayant utilisé la stratégie des QTL chez la levure.....	74
Tableau 18 : Conditions utilisées dans les différents dispositifs expérimentaux	76
Tableau 19 : Plan d'expérience utilisé pour le dispositif A	83
Tableau 20 : Résultats des tests ANOVA (Fischer et R^2) pour l'isoamylacétate, l'isoamylalcool, l'4éthyl octanoate, l'acide décanoïque et le citronellol ; *** p-value<0,001	84
Tableau 21 : Exemple de matrice phénotype-génotype pour la recherche d'un QTL.....	94
Tableau 22 : Coordonnées, LODs, p-value, part expliquée par le QTL et effet de l'allèle œnologique du QTL de floculation	96
Tableau 23 : Comparaison des estimations de l'intervalle permettant de positionner le QTL trouvé avec la méthode « LOD support interval » et la méthode bayésienne.	97
Tableau 24 : Ensemble des gènes trouvés dans la zone génomique de la levure 59a contenant le QTL1	99
Tableau 25 : Caractéristiques du QTL 2 lié à la floculation	101
Tableau 26 : Caractéristiques du QTL de densité optique.....	102
Tableau 27 : Principaux mQTL du dispositif A (1mg/L géraniol).....	104
Tableau 28 : Principaux mQTL identifiés pour le dispositif B (5mg/L géraniol).....	106
Tableau 29 : Principaux mQTL identifiés pour le dispositif C (100% de FA)	108
Tableau 30 : Caractéristiques du QTL lié à la concentration en Nérol, Phényléthanol, Éthyl C6, Éthyl C8, Éthyl C10 avec en co-variable la floculation (co-variable interactive) dispositif A.....	110
Tableau 31 : Caractéristiques du QTL lié à la concentration en éthyl C6 avec en co-variable la floculation dispositif B	110

Tableau 32 : Caractéristiques du QTL lié à la concentration en isoamylalcool, éthyl-9-décénoate, éthyl-4-hydroxy butanoate et 2-phényléthylhexanoate avec en co-variable la floculation (co-variable interactive) dispositif C	111
Tableau 33 : comparaison des caractéristiques des mQTL trouvés pour les esters éthyliques sans ou avec l'addition de la co-variable « ABZ1 » dans le modèle (dispositif C)	112
Tableau 34 : Récapitulatif des QTLs identifiés	114
Tableau 35 : Coordonnées, LODs et p-value, héritabilité et explication du mQTL des mQTL détectés pour le phénotype nérolidol	119
Tableau 36: concentrations en nérolidol dans différentes matrices	120
Tableau 37 : principales applications de l'utilisation des précurseurs terpéniques de la voie des stérols chez <i>S.cerevisiae</i>	122
Tableau 38 : gènes du QTL du nérolidol (source SGD)	126
Tableau 39 : gènes activés par le facteur de transcription PDR8 chez la levure <i>S.cerevisiae</i> (fond BY) [176]	126
Tableau 40 : structure des molécules expulsées par le transporteur QDR2	135
Tableau 41 : Caractéristiques des mQTL trouvés pour le 2-phényléthanol.....	141
Tableau 42 : gènes jouant un rôle dans la production de 2-phényléthanol.....	143
Tableau 43 : gènes du QTL du phényléthanol (dispositif C) (source SGD).....	144
Tableau 44 : Effet de l'origine allélique du gène ABZ1 sur la concentration des composés fermentaires dosés en SBSE-LD-GC-MS (unité semi-relative par rapport au témoin interne) ; en gras, les composés dont la teneur varie de façon significative.....	146
Tableau 45 : caractéristiques des mQTL d'acides gras à moyennes chaînes détectés dans le dispositif B154	
Tableau 46 : gènes du QTL de l'acide décanoïque (Chromosome V)	156
Tableau 47 : alignement des protéines codées par le gène <i>CEM1</i> de la souche S288c et EC1118 et de ces homologues chez <i>S.par=S.paradoxus</i> ; <i>S.mik=S.mikatae</i>	160
Tableau 48 : Caractéristiques du mQTL lié aux concentrations en éthyl C8, C10 et C14 dispositif C.....	164
Tableau 49 : gènes du QTL des esters éthyliques	165
Tableau 50 : gènes du QTL des esters éthyliques (suite).....	166
Tableau 51 : gènes du QTL de l'acide octanoïque	205

Liste des figures

Figure 1 : Jarres du site 3 de la plaine des Jarres au Laos.....	4
Figure 2 : Voie de synthèse simplifiée des mono- et sesqui- terpènes ; MonoTPS = monoterpène synthase ; SesquiTPS = sesquiterpènes synthase que représentent les frontières bleues. (pour plus de clarté le cytoplasme et le chloroplaste ne sont pas représentés)	18
Figure 3 : Schéma de la production de quelques arômes fermentaires dans le vin.....	23
Figure 4 : Schéma du dispositif de fermentation des fermentations (Doi= densité optique initiale)	31
Figure 5 : Schéma de l'influence de l'oxygène sur la synthèse des acides gras et de leur détoxification supposée en fermentation chez la levure (simplifié)	45
Figure 6: cinétique de fermentation (perte de masse et pH) des deux souches S288C (carrés) , 59a (ronds)	50
Figure 7 : Cinétique de production des esters éthyliques et des AGMC en fermentation par les souches S288C (carré) et 59a (ronds).....	51
Figure 8: Cinétique du taux de conversion ester / acide par S288C (carrés) et 59a (ronds)	53
Figure 9 : Effet de la délétion des gènes <i>EEB1</i> , <i>EHT1</i> et <i>YMR210w</i> sur la concentration en ester éthyliques et en acides gras (YPG8% fond FY)	55
Figure 10 : Effet de la délétion du gène <i>EEB1</i> sur la concentration en esters éthyliques et en acides gras (milieu YPG 8% ; pas d'ajout d'acide décanoïque ; n=2) ; ■ <i>V5 sauvage</i> , ■ <i>V5 ΔEEB1</i> , ■ <i>BYsauvage</i> , □ <i>BYΔEEB1</i> *** <i>p-value</i> <0,001 <i>t-test rejetant l'égalité</i>	57
Figure 11: Effet de la délétion du gène <i>EEB1</i> sur la concentration en esters éthyliques et en acides gras (milieu YPG 8% ; ajout d'acide décanoïque = 0,1mM ; n=2) , ■ <i>V5 sauvage</i> , ■ <i>V5 ΔEEB1</i> , ■ <i>BYsauvage</i> , □ <i>BYΔEEB1</i> *** <i>p-value</i> <0,001 <i>t-test rejetant l'égalité</i>	59
Figure 12 : cinétique de fermentation des souches <i>V5</i> et <i>V5ΔEEB1</i> en fonction de l'ajout d'acide décanoïque 0 ; 0,05mM ; 0,1mM (n=1)	61
Figure 13 : Effet de l'ajout d'acide décanoïque sur la production d'AGMC et d'ester d'AGMC à 6 et 8 carbones sur les souches <i>V5 sauvage</i> et <i>V5ΔEEB1</i> ; surface de pic exprimé en % relatif au témoin <i>V5 sauvage</i> sans ajout d'acide décanoïque (n=3)	62
Figure 14 : Effet de l'ajout d'acide décanoïque sur la production d'AGMC et d'ester d'AGMC à 10 et 12 carbones sur les souches <i>V5 sauvage</i> et <i>V5ΔEEB1</i> ; surface de pic exprimée en % relatif au témoin <i>V5 sauvage</i> sans ajout d'acide décanoïque (n=3).....	64
Figure 15 : Effet de l'ajout d'acide décanoïque sur la production de décanol sur les souches <i>V5sauvage</i> et <i>V5ΔEEB1</i> (concentration obtenues à partir de la courbe de calibration du décanol) (n=3).....	66
Figure 16 : Alignement de <i>EEB1.S288c</i> et <i>EEB1.EC1118</i>	67
Figure 17 : Effet de l'allèle <i>EEB1</i> sur la concentration en éthyl décanoate en milieu MS300 1% de FA (n=3)	68
Figure 18 : Carte génétique des 30 ségrégants	73
Figure 19 : exemple de distribution « normale » des concentrations relatives en isoamylacétate (dispositif A)	77
Figure 20 : exemple de test de Shapiro-Francia (ici <i>p-value</i> < 0,006) et exemple d'une autre représentation graphique de la dispersion des valeurs (droite de Henry)	78
Figure 21 : cinétique de production d'isomaylacétate, d'isoamylalcool, de phényéthyl acétate et de phényléthanol (milieu synthétique MS300 1% FA ; 1mg/L de géraniol) avec la souche S288C (carrés noirs) et 59a (ronds ouverts), la fin de la fermentation est indiqué par une flèche	81
Figure 22 : Analyse en composante principale des données volatiles du dispositif A (AGMC= acides gras à moyennes chaînes)	86

Figure 23 : Analyse en composante principales des individus du dispositif B	88
Figure 24 : Analyse en composante principale des molécules volatiles issues du métabolisme des 30 souches du dispositif B (V=200mL; T°=20°C, 5 mg/L de géranol milieu MS300 1% FA)	90
Figure 25 : Analyse en composante principale des composés volatiles produits dans le dispositif C (a: trans β farnesene ; b: Z,E α farnesene, c: α bisabolene, d: β bisabolene, e: E,E α farnesene	92
Figure 26 : Sortie "genome scan" de J/QTL pour le phénotype floculation	95
Figure 27 : Zone génomique de la levure 59a contenant le QTL1 identifié comme impliqué dans la floculation, chaque point jaune est un polymorphisme de séquence (source genome browser de l'INRA de JOUY)	98
Figure 28 : Zone génomique de la levure 59a contenant le QTL2 identifié comme impliqué dans la floculation, (source genome browser de l'INRA de JOUY)	101
Figure 29 : Localisation des mQTL impliqués dans la production de composés volatils par <i>S.cerevisiae</i> sur la carte génétique	105
Figure 30 : Localisation des mQTL impliqués dans la production de composés volatils par <i>S.cerevisiae</i> sur la carte génétique	107
Figure 31 : Localisation des mQTL impliqués dans la production de composés volatils par <i>S.cerevisiae</i> sur la carte génétique	109
Figure 32: LOD score de l'analyse des données phénotypique du dispositif C en l'absence de co-variable (bleu) avec le marqueur le plus proche du gène ABZ1 inclus en co-variable additive (rouge pointillé) pour le phénotype 2-phényléthanol.	113
Figure 33 : LOD score de l'analyse des données phénotypique du dispositif C en l'absence de co-variable (bleu) avec le marqueur le plus proche du gène ABZ1 inclus en co-variable additive (rouge pointillé) pour le phénotype éthyl C8.	113
Figure 34 : isomérisation d'un alcool pérylique tertiaire (cas du nérolidol) en alcool pérylique primaire (cas du farnésol) en fonction de la concentration en ions H ⁺	121
Figure 35 : Voie de synthèse de l'ergostérol chez la levure (d'après [165])	122
Figure 36 : domaines du gène PDR8 et alignement entre la souche EC1118 et S288C. Les acides aminés divergeant entre les deux séquences sont représentés en rouge et surlignés en gris. Les acides aminés impliqués dans la fixation de l'ADN et du zinc sont entourés en vert et en rouge respectivement	127
Figure 37 : Effet de la délétion du gène PDR8 sur la concentration en nérolidol (fond BY ; milieu MS300 1% FA ; T°=20°C ; n=3)	129
Figure 38 : Production de souches diploïdes hybrides contenant un allèle unique pour le gène <i>PDR8</i> ..	129
Figure 39 : Concentration en nérolidol en fonction de l'origine allélique du gène <i>PDR8</i> (n=3)	130
Figure 40 : Cinétique de fermentation des souches BY4741 délétés des gènes cibles du facteur de transcription <i>PDR8</i> (n=2 minimum ; sauvage n=4).....	131
Figure 41 : Production de nérolidol par les mutants délétés des cibles du gène <i>PDR8</i> en % relatif au sauvage (barre d'erreur = erreur standard ; n=2 minimum , contrôle sauvage n=4).	132
Figure 42 : Effet de la délétion des gènes ciblés par le facteur de transcription <i>PDR8</i> sur la production de sesquiterpénol, Groupe A = les valeurs sont statistiquement équivalentes au témoin (sauvage), groupe B, les valeurs sont statistiquement différentes (barre d'erreur = erreur standard ; n=2 minimum , contrôle sauvage n=4).....	133
Figure 43 : Cinétique de la concentration de farnésol (gauche) et nérolidol (droite) ; unité = semi-quantitatif par rapport au témoin interne 3-octanol 2mg/L ; (MS300 1% FA 20°C 5mg/L de géranol) carrés noirs S288c, rond blancs 59a (SI= standard interne)	137

Figure 44 : Effet de la délétion du gène GPH1 sur le métabolisme de la levure lors de la fermentation œnologique en anaérobie (AGMC=Acide gras à moyenne chaîne, GPH1=glycogène phosphorylase)	139
Figure 45 : mécanismes généraux de formation des alcools supérieurs chez la levure en conditions fermentaires [56]	142
Figure 46 : Effet de l'origine allélique du gène ABZ1 sur la concentration en phényléthanol et phényléthylacétate	145
Figure 47 : polymorphisme et domaines du gène ABZ1 entre la souche 59a et S288c, les SNP non synonymes sont indiqués en jaune, la séquence d'origine (S288c) est prise comme référence.....	148
Figure 48: alignement des protéines homologues à ABZ1 de <i>S.mikatae</i> et <i>S.paradoxus</i> , mutations non synonymes entre les deux allèles ABZ1 de S288c et 59a.....	148
Figure 49 : arbre phylogénétique du gène ABZ1 (source des génomes : SANGER et NCBI) (ici EC1118 = 59a)	149
Figure 50 : voies métabolique simplifiés impliquant le chorismate et l'acide folique (adapté des voies métaboliques de la levure source : SGD)	150
Figure 51 : Cinétique de fermentation des souches MTF1881 et MTF1871 (n=3)	151
Figure 52 : Représentation graphique du « genome scan » sur les chromosomes 5, 6 et 8 pour les phénotypes concentration en acides gras à moyennes chaînes (<i>Acide C8 en vert-continu, acide C10 en bleu-pointillé, acide C12 rouge-haché</i>) détectés en fermentation MS300 1% de FA à 5mg/L de géraniole (dispositif B). (<i>l'acide C6 n'est pas représenté pour clarté</i>).	154
Figure 53 : polymorphisme du gène et du promoteur de PEX14 entre la souche S288C et 59a.....	155
Figure 54 : schéma de la fatty acid synthase de levure de type I (en vert <i>FAS2p</i> =unités α en rouge <i>FAS1p</i> = unités β) d'après Schweizer et al 2004 [206] (ac(et)yltransferase (AC), malonyl/acetyl- ou malonyl/ palmitoyl-transacylase (AT, MPT), ketoacyl synthase (KS) ketoacyl reductase (KR), déhydratase (DH), enoyl reductase (ER), acyl carrier protein (ACP) et thioesterase (TE) [206])......	157
Figure 55 : Biosynthèse des acides gras chez la levure [158] et réaction catalysée par les gènes de FASII de levure, gènes de la FAS I indiqués entre parenthèses [207-213] X= ACP ou CoA.....	158
Figure 56 : Effet de la délétion du gène <i>CEM1</i> sur la concentration en acide C8, C10 et C12 après fermentation de MS300 1% de FA T°=20°C fond BY ; n=3 ; *** p-value <0,001 (test de student rejetant l'égalité).161	
Figure 57 : Site de clivage des phospholipases. R1, R2, chaînes carbonées de 4 à 18 carbones, R3 = choline, éthanolamine, sérine, inositol,	167
Figure 58 : Etude du polymorphisme de séquence entre <i>PLB1</i> -S288C et <i>PLB1</i> -EC1118	168
Figure 59 : Etude du polymorphisme de séquence entre <i>PLB1</i> -S288C et <i>PLB1</i> -EC1118	169
Figure 60 : Effet de la délétion des gènes <i>EEB1</i> , <i>PLB1</i> et <i>PLB2</i> et sur la concentration en esters éthyliques C8 et C10 et leur acides respectifs (n=6 ; milieu MS300 100% FA)	170
Figure 61 : cinétique de fermentation des souches BY4741sauvage, Δ <i>PLB1</i> , Δ <i>PLB2</i> et Δ <i>EEB1</i> en MS300 100% FA n=6	171
Figure 62 : isomérisation d'un alcool perylique tertiaire en alcool perylique primaire en fonction du pH178	
Figure 63 : formation de citronellol, nérol, linalol et α -terpinéol à partir de géraniole en conditions fermentaires d'après King et al [244,245], schématisé par Takoi et al [243].	179
Figure 64 : structure chimiques des monoterpénols et terpényl acétates dosés en présence de géraniole durant la fermentation.....	180
Figure 65 : Evolution de la concentration en terpényl acétate et terpénols au cours de la fermentation alcoolique (MS300 1% de FA, 20°C) par les souches carrés noirs = 59a et ronds ouverts = S288c	181

Figure 66 : Evolution de la concentration totale en terpènes (terpOH) et terpénylacétate (terpénylac) au cours du temps pendant en fermentation (MS300 1% FA, 20°C), carrés noirs= S288c ronds ouverts =59a.	182
Figure 67 : Réaction d'estérification (proposée) du géraniol en géranyl acétate	183
Figure 68 : effet de la délétion des gènes ATF1 et ATF2 sur la concentration en terpènes et terpénylacétates	184
Figure 69 : Schéma réactionnel du brevet Cho et al 2009 proposant le mécanisme de transformation du 3-méthyl-2-butène-1-ol en 3 méthylbutanol.....	186
Figure 70 Analogie de structure entre le géraniol et le 3 méthyl-2-buten-1ol et entre le citronellol et le 3 méthylbutanol.....	186
Figure 71 : Effet de la délétion du gène <i>OYE2</i> ou <i>OYE3</i> sur la concentration en terpènes ou terpénylacétates (milieu YPG 8%, 5mg/L de géraniol, n=3).....	187
Figure 72 : deshydratation de l' α terpinéol en terpènes cycliques en condition acide [260],	190
Figure 73 : voie de formation du myrcène, ocimène, limonène et α pinène proposée à partir du carbocation du géraniol	190
Figure 74 : Résultats obtenus par Gael Yvert en 2007, la version allélique « œnologique » du gène AMN1 confère à la levure la capacité de former des amas (« clump »).....	202
Figure 75 : Interface de paramétrage de la distribution phénotypique et choix du phénotype	202
Figure 76 : Interface de choix de la zone génomique et ajout de co-variable.....	203
Figure 77 : Interface de choix de la méthode de scan.....	203
Figure 78 : Interface de choix du nombre de permutations à réaliser	204
Figure 79 : Interface permettant l'ajout d'une co-variable lors de la recherche de QTL de floculation .	204

Bibliographie

- [1] S. Fitzgerald, J. Sullivan, and R. Everson, "Suspected ethanol toxicosis in two wild cedar waxwings," *Avian Diseases*, vol. 34, 1990, p. 488–490.
- [2] S. Morris, D. Humphreys, and D. Reynolds, "Assessment of Voluntary Ethanol Intoxication of the African Elephant (*Loxodonta africana*) Following Feeding on the Fruit of the Marula Tree (*Sclerocarya birrea*," and *Biochemical Zoology*, 2006.
- [3] R. Dudley, "Fermenting fruit and the historical ecology of ethanol ingestion: is alcoholism in modern humans an evolutionary hangover?," *Addiction*, vol. 97, Apr. 2002, pp. 381-388.
- [4] R. Dudley, "Ethanol, fruit ripening, and the historical origins of human alcoholism in primate frugivory," *Integrative and Comparative Biology*, 2004.
- [5] F. Wiens, A. Zitzmann, M.-A. Lachance, M. Yegles, F. Pragst, F.M. Wurst, D. von Holst, S.L. Guan, and R. Spanagel, "Chronic intake of fermented floral nectar by wild treeshrews.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, Jul. 2008, pp. 10426-31.
- [6] Y. Chen, M. Yu, J. Xu, X. Chen, and J. Shi, "Differentiation of eight tea (*Camellia sinensis*) cultivars in China by elemental fingerprint of their leaves," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 89, Nov. 2009, pp. 2350-2355.
- [7] D. Samuel, "Archaeology of ancient Egyptian beer," *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 54, 1996, p. 3–12.
- [8] P.E. McGovern, U. Hartung, V.R. Badler, D.L. Glusker, and L.J. Exner, "The beginnings of winemaking and viniculture in the ancient Near East and Egypt," *Expedition*, vol. 39, 1997, p. 3–21.
- [9] D. Cavalieri, P.E. McGovern, D.L. Hartl, R. Mortimer, and M. Polsinelli, "Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine," *Journal of molecular evolution*, vol. 57, 2003, p. 226–232.
- [10] C. Bamforth, *Food, Fermentation and Micro-organisms*, Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2005.
- [11] H. Barnard, A.N. Dooley, G. Areshian, B. Gasparyan, and K.F. Faull, "Chemical Evidence for Wine Production Around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern Highlands," *Journal of Archaeological Science*, 2010.
- [12] P.E. McGovern, J. Zhang, J. Tang, Z. Zhang, G.R. Hall, R.A. Moreau, A. Nuñez, E.D. Butrym, M.P. Richards, and C. Wang, others, "Fermented beverages of pre-and proto-historic China," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, 2004, p. 17593.
- [13] P.E. McGovern, *Uncorking the past: the quest for wine, beer, and other alcoholic beverages*, Univ of California Press, 2009.
- [14] K.H. Steinkraus, "Nutritional significance of fermented foods," *Food Research International*, vol. 27, 1994, p. 259–267.
- [15] A. LOÏEZ, "Production de la levure de panification par biotechnologie," *Techniques*, 2003, pp. 1-10.
- [16] J.J. Infante, K.M. Dombek, L. Rebordinos, J.M. Cantoral, and E.T. Young, "Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast," *Genetics*, vol. 165, 2003, p. 1745.
- [17] K.H. Wolfe and D.C. Shields, "Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome," *Nature*, vol. 387, 1997, p. 708–713.

- [18] R.B. Langkjaer, P.F. Cliften, M. Johnston, and J. Piškur, "Yeast genome duplication was followed by asynchronous differentiation of duplicated genes," *Nature*, vol. 421, 2003, p. 848–852.
- [19] L. Kuepfer, U. Sauer, and L.M. Blank, "Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genome research*, vol. 15, 2005, p. 1421.
- [20] J. Pikur, "Origin of the duplicated regions in the yeast genomes," *Trends in Genetics*, vol. 17, 2001, p. 302–303.
- [21] M.J. Torija, G. Beltran, M. Novo, M. Poblet, J.M. Guillamón, A. Mas, and N. Rozes, "Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine," *International journal of food microbiology*, vol. 85, 2003, p. 127–136.
- [22] M. Vilanova, M. Ugliano, C. Varela, T. Siebert, I.S. Pretorius, and P. a Henschke, "Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts.," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 77, Nov. 2007, pp. 145-57.
- [23] J.H. Swiegers, R.L. Kievit, T. Siebert, K.A. Lattey, B.R. Bramley, I.L. Francis, E.S. King, and I.S. Pretorius, "The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine," *Food microbiology*, vol. 26, 2009, p. 204–211.
- [24] S. Patel, "Effect of 20 different yeast strains on the production of volatile components in Symphony wine," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 16, Aug. 2003, pp. 469-476.
- [25] C. Barbosa, V. Falco, A. Mendes-Faia, and A. Mendes-Ferreira, "Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains.," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 108, Aug. 2009, pp. 99-104.
- [26] S. Patel and T. Shibamoto, "Effect of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on production of volatiles in Napa Gamay wine and Petite Sirah wine.," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 50, Sep. 2002, pp. 5649-53.
- [27] D. Rossouw, T. Naes, and F.F. Bauer, "Linking gene regulation and the exo-metabolome: a comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast.," *BMC genomics*, vol. 9, Jan. 2008, p. 530.
- [28] S.S. Stevens, "On the psychophysical law," *Psychological Review*, vol. 64, 1957, p. 153–181.
- [29] V. Ferreira, A. Escudero, E. Campo, and J. Cachoe, "Understanding the role played by the odorants and their interactions on wine flavour," *Wine active compounds*, Beaunes: 2008.
- [30] E. Boido, A. Lloret, K. Medina, F. Carrau, and E. Dellacassa, "Effect of β -Glycosidase Activity of *Oenococcus oeni* on the Glycosylated Flavor Precursors of Tannat Wine during Malolactic Fermentation," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, Apr. 2002, pp. 2344-2349.
- [31] L. Zea, J. Moreno, J.M. Ortega, and M. Medina, "Content of free terpenic compounds in cells and musts during vinification with three *Saccharomyces cerevisiae* races," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43, Apr. 1995, pp. 1110-1114.
- [32] R. Cordonnier and C. Bayonove, "Etude de la phase préfermentaire de la vinification: extraction et formation de certains composés de l'arôme; cas des terpénols, des aldéhydes et des alcools en C6," *Conn. Vigne. Vin*, vol. 15, 1981, pp. 269-286.
- [33] H. Maarse, *Volatile compounds in foods and beverages*, CRC, 1991.
- [34] H. Guth, "Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, Aug. 1997, pp. 3027-3032.

- [35] P.K. Bedoukian, "Seven primary hexenols and their olfactory characteristics," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 19, 1971, p. 1111–1114.
- [36] M. Allen and M. Lacey, "Existence of Different Origins for Methoxypyrazines of Grapes and Wines," *ACS Symposium Series*, 1996.
- [37] P. Ribereau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, and D. Dubourdieu, "Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments," 2000.
- [38] T. Tominaga, A. Furrer, R. Henry, and D. Dubourdieu, "Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 13, 1998, p. 159–162.
- [39] P. Darriet, T. Tominaga, V. Lavigne, J.N. Boidron, and D. Dubourdieu, "Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 10, 1995, p. 385–392.
- [40] T. Tominaga, Y. Niclass, E. Frérot, and D. Dubourdieu, "Stereoisomeric distribution of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in dry and sweet white wines made from *Vitis vinifera* (Var. Sauvignon Blanc and Semillon)," *J. Agric. Food Chem*, vol. 54, 2006, p. 7251–7255.
- [41] D. Dubourdieu, T. Tominaga, I. Masneuf, C. Peyrot Des Gachons, and M.L. Murat, "The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: the example of Sauvignon blanc," *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 57, 2006, p. 81.
- [42] E. Coelho, M. a Coimbra, J.M.F. Nogueira, and S.M. Rocha, "Quantification approach for assessment of sparkling wine volatiles from different soils, ripening stages, and varieties by stir bar sorptive extraction with liquid desorption.," *Analytica chimica acta*, vol. 635, Mar. 2009, pp. 214-21.
- [43] E. Coelho, R. Perestrelo, N.R. Neng, J.S. Câmara, M. a Coimbra, J.M.F. Nogueira, and S.M. Rocha, "Optimisation of stir bar sorptive extraction and liquid desorption combined with large volume injection-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry for the determination of volatile compounds in wines.," *Analytica chimica acta*, vol. 624, Aug. 2008, pp. 79-89.
- [44] P. Ribereau-Gayon, D. Dubourdieu, and B. Doneche, "Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications, Vol. 1," *Microbiology*, vol. 1, 2000, pp. 0-470.
- [45] N. Dudareva and E. Pichersky, "Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents.," *Plant physiology*, vol. 122, Mar. 2000, pp. 627-33.
- [46] T. Tominaga, C.P. des Gachons, and D. Dubourdieu, "A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc: S-cysteine conjugates," *J. Agric. Food Chem*, vol. 46, 1998, p. 5215–5219.
- [47] J.H. Swiegers, R. Willmott, A. Hill-Ling, D.L. Capone, K.H. Pardon, G.M. Elsey, K.S. Howell, M.A. de Barros Lopes, M.A. Sefton, and M. Lilly, others, "Modulation of volatile thiol and ester aromas by modified wine yeast," *Developments in Food Science*, vol. 43, 2006, p. 113–116.
- [48] B. Doneche, "Les acquisitions récentes en chromatographie du vin," *Applications à l'analyse sensorielle des vins. Parl'vis: Tec-Doc ed*, vol. 255, 1993.
- [49] M. Wüst, A. Rexroth, T. Beck, and A. Mosandl, "Structure elucidation of cis- and trans-rose oxide ketone and its enantioselective analysis in geranium oils," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 12, Nov. 1997, pp. 381-386.
- [50] F. Luan, A. Mosandl, A. Münch, and M. Wüst, "Metabolism of geraniol in grape berry mesocarp of *Vitis vinifera* L. cv. Scheurebe: demonstration of stereoselective reduction, E/Z-isomerization, oxidation and glycosylation," *Phytochemistry*, vol. 66, 2005, p. 295–303.
- [51] L. Wright, "Biosynthesis of isoprenoid compounds," *Annual Review of Biochemistry*, 1961.

- [52] J. Schwender, M. Seemann, H.K. Lichtenthaler, and M. Rohmer, "Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*," *The Biochemical journal*, vol. 316 (Pt 1, May. 1996, pp. 73-80.
- [53] J.A. Bick and B.M. Lange, "Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 415, Jul. 2003, pp. 146-54.
- [54] D. Banthorpe, "Biosynthesis of geraniol and related monoterpenes in *Pelargonium graveolens*," *Phytochemistry*, vol. 22, 1983, pp. 2459-2463.
- [55] H. Maarse, *Volatile compounds in foods and beverages*, CRC, 1991.
- [56] L.A. Hazelwood, J.-marc Daran, A.J.A. van Maris, J.T. Pronk, and J.R. Dickinson, "The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 74, Apr. 2008, pp. 2259-66.
- [57] L. Nykanen, "Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages," *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 37, 1986, p. 84.
- [58] L. Bardi, C. Crivelli, and M. Marzona, "Esterase activity and release of ethyl esters of medium-chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth.," *Canadian journal of microbiology*, vol. 44, Dec. 1998, pp. 1171-6.
- [59] L. Bardi, C. Cocito, and M. Marzona, "*Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids.," *International journal of food microbiology*, vol. 47, Mar. 1999, pp. 133-40.
- [60] C. Plata, "Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts," *Food Microbiology*, vol. 20, Apr. 2003, pp. 217-224.
- [61] K.M. Sumbly, P.R. Grbin, and V. Jiranek, "Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects," *Food Chemistry*, vol. 121, Jul. 2010, pp. 1-16.
- [62] K.J. Verstrepen, S.D.M. Van Laere, B.M.P. Vanderhaegen, G. Derdelinckx, J.P. Dufour, I.S. Pretorius, J. Winderickx, J.M. Thevelein, and F.R. Delvaux, "Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters," *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, 2003, p. 5228.
- [63] S. Saerens, F. Delvaux, K. Verstrepen, P. Van Dijck, and J. Thevelein, "Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation," *Applied and environmental microbiology*, vol. 74, 2008, p. 454.
- [64] C. Plata, J. Mauricio, C. Millan, and J. Ortega, "Influence of glucose and oxygen on the production of ethyl acetate and isoamyl acetate by a *Saccharomyces cerevisiae* strain during alcoholic fermentation," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 21, 2005, p. 115–121.
- [65] S. Saerens, J. Thevelein, and F. Delvaux, "Ethyl ester production during brewery fermentation, a review," *status: published*, vol. 33, 2008, pp. 2008-2008.
- [66] S.M.G. Saerens, F.R. Delvaux, K.J. Verstrepen, and J.M. Thevelein, "Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*," *Microbial Biotechnology*, vol. 3, Mar. 2010, pp. 165-177.
- [67] *Brewing yeast fermentation performance*.
- [68] M. Lilly, F. Bauer, M. Lambrechts, and J. Swiegers, "The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates," *Yeast*, 2006, pp. 641-659.

- [69] J.H. Swiegers and I.S. Pretorius, "Yeast modulation of wine flavor," *Advances in applied microbiology*, vol. 57, 2005, p. 131–175.
- [70] C.R. Landry, J.P. Townsend, D.L. Hartl, and D. Cavalieri, "Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*," *Molecular ecology*, vol. 15, Mar. 2006, pp. 575-91.
- [71] A. Goffeau, B. Barrell, H. Bussey, and R. Davis, "Life with 6000 genes," *Science*, 1996.
- [72] R.K. Mortimer and J.R. Johnston, "Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center.," *Genetics*, vol. 113, May. 1986, pp. 35-43.
- [73] Legras, "Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history," *Molecular Ecology*, vol. 16, 2007, p. 2091.
- [74] A.T. Bakalinsky and R. Snow, "The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, vol. 6, 1990, p. 367–382.
- [75] S. Guijo, J.C. Mauricio, J.M. Salmon, and J.M. Ortega, "Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and 'flor' film ageing of dry sherry-type wines.," *Yeast*, vol. 13, 1997, pp. 101-117.
- [76] D.M. Carter, "Saccharomyces genome resequencing project," *Wellcome Trust Sanger Institute*, 2005.
- [77] W. Wei, J.H. McCusker, R.W. Hyman, T. Jones, Y. Ning, Z. Cao, Z. Gu, D. Bruno, M. Miranda, and M. Nguyen, others, "Genome sequencing and comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strain YJM789," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, 2007, p. 12825.
- [78] Broad Institute Of Harvard And MIT, "Saccharomyces cerevisiae RM11-1a Sequencing Project."
- [79] A.R. Borneman, A.H. Forgan, I.S. Pretorius, and P.J. Chambers, "Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain," *FEMS yeast research*, vol. 8, 2008, p. 1185–1195.
- [80] M. Novo, F. Bigey, E. Beyne, V. Galeote, F. Gavory, S. Mallet, B. Cambon, J.-L. Legras, P. Wincker, S. Casaregola, and S. Dequin, "Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, Sep. 2009, pp. 16333-8.
- [81] S.W. Doniger, H.S. Kim, D. Swain, D. Corcuera, M. Williams, S.P. Yang, and J.C. Fay, "A catalog of neutral and deleterious polymorphism in yeast," *PLoS Genet*, vol. 4, 2008, p. e1000183.
- [82] M. Bely, J. Sablayrolles, and P. Barre, "Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance," *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 41, 1990, p. 319.
- [83] F. LE, others, "Evolution of phytosterols in Chardonnay grape berry skins during last stages of ripening," *Vitis*, vol. 33, 1994, p. 127–131.
- [84] V. Luparia, V. Soubeyrand, T. Berges, A. Julien, and J.-M. Salmon, "Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations.," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 65, Jul. 2004, pp. 25-32.
- [85] A. Morin, A.W. Moores, and M. Sacher, "Dissection of *Saccharomyces cerevisiae* asci.," *Journal of visualized experiments : JoVE*, Jan. 2009.
- [86] R.H. Schiestl and R.D. Gietz, "High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier," *Current Genetics*, vol. 16, 1989, p. 339–346.
- [87] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, and C. Cramers, "Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) , a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples : Theory and Principles," *Micro*, 1999, pp. 737-747.

- [88] A. Zalacain, J. Mar, G.L. Alonso, and M.R. Salinas, "Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction," *Talanta*, vol. 71, 2007, pp. 1610-1615.
- [89] R. Team, "R: A language and environment for statistical computing," *R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria ISBN*, vol. 3, 2008.
- [90] H. Smyth, D. Cozzolino, M. Herderich, and M. Sefton, "Relating volatile composition to wine aroma: identification of key aroma compounds in Australian white wines," *Proceedings of the 12th Australian Wine Industry Technical Conference*, 2005, p. 31-33.
- [91] R. Perestrelo, A. Fernandes, and F. Albuquerque, "Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds," *Analytica Chimica*, 2006.
- [92] C. Edwards, R. Beelman, C. Bartley, and A. McConnell, "Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification," *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 41, 1990, p. 48.
- [93] V. Ferreira, R. Lopez, and J.F. Cacho, "Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 80, Sep. 2000, pp. 1659-1667.
- [94] L. Nykanen and I. Nykanen, "Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations," *J. Inst. Brew*, vol. 83, 1977, p. 30-31.
- [95] D. Rossouw and F.F. Bauer, "Comparing the transcriptomes of wine yeast strains: toward understanding the interaction between environment and transcriptome during fermentation.," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 84, Oct. 2009, pp. 937-54.
- [96] R. Peinado, "Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration," *Food Chemistry*, vol. 84, Mar. 2004, pp. 585-590.
- [97] S. Lafon-Lafourcade, C. Geneix, and P. Ribereau-Gayon, "Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts," *Applied and environmental microbiology*, vol. 47, 1984, p. 1246.
- [98] G. Taylor and B. Kirsop, "The origin of medium chain length fatty acids present in beer," *J. Inst. Brew*, vol. 83, 1977, p. 241-243.
- [99] C. Viegas, M.F. Rosa, I. Sá-Correia, and J.M. Novais, "Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanolic Fermentation.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 55, Jan. 1989, pp. 21-8.
- [100] C. Viegas and I. Sá-Correia, "Toxicity of octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* at temperatures between 8.5 and 30 C," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 0229, 1995, pp. 826-831.
- [101] H. Alexandre, B. Mathieu, and C. Charpentier, "Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H(+)-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid.," *Microbiology*, vol. 142 (Pt 3, Mar. 1996, pp. 469-475.
- [102] F. Larue, Y. Murakami, J. Boidron, and L. Fohr, "[First observations on the use of octanoic and decanoic acids as adjuvants to sulphur dioxide for the stabilization of sweet wines: organoleptic effects]," *Connaissance de la Vigne et du Vin (France)*, 1986.
- [103] J. -P Dufour, P.H. Malcorps, and P. Silcock, *Control of Ester Synthesis During Brewery Fermentation*, Wiley Online Library, 2008.
- [104] K. Hatzixanthis, M. Mollapour, I. Seymour, B.E. Bauer, G. Krapf, C. Schuller, K. Kuchler, and P.W. Piper, "Moderately lipophilic carboxylate compounds are the selective inducers of the *Saccharomyces cerevisiae* Pdr12p ATP-binding cassette transporter," *Yeast*, vol. 20, 2003, p. 575-585.
- [105] J.L. Legras, C. Erny, C. Le Jeune, M. Lollier, Y. Adolphe, C. Demuyter, P. Delobel, B. Blondin, and F. Karst, "*Saccharomyces cerevisiae* activates two different resistance

- mechanisms when exposed to octanoic and decanoic acids.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 2, Sep. 2010.
- [106] F. Dittrich, D. Zajonc, K. H\"uhne, U. Hoja, A. Ekici, E. Greiner, H. Klein, J. Hofmann, J.J. Bessoule, and P. Sperling, others, "Fatty acid elongation in yeast," *European Journal of Biochemistry*, vol. 252, 1998, p. 477–485.
- [107] J.L. DeRisi, V.R. Iyer, and P.O. Brown, "Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale," *Science*, vol. 278, 1997, p. 680.
- [108] K. Nordström, "Effect of higher fatty acids and toxicity of lower fatty acids.," 1966.
- [109] E. Freese, C.W. Sheu, and E. Galliers, "Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives.," *Nature*, vol. 241, Feb. 1973, pp. 321-5.
- [110] I. Sá-Correia, "Synergistic effects of ethanol, octanoic, and decanoic acids on the kinetics and the activation parameters of thermal death in *Saccharomyces bayanus*." *Biotechnology and bioengineering*, vol. 28, May. 1986, pp. 761-3.
- [111] a B. Mason and J.-P. Dufour, "Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast," *Yeast*, vol. 16, Oct. 2000, pp. 1287-1298.
- [112] K. Asahina, M. Louis, and S. Piccinotti, "A circuit supporting concentration-invariant odor perception in *Drosophila*," *Journal of biology*, 2009.
- [113] R. Mortimer and M. Polsinelli, "On the origins of wine yeast," *Research in microbiology*, vol. 150, 1999, p. 199–204.
- [114] K.J. Verstrepen, G.U.Y. Derdelinckx, J.-pierre Dufour, J. Winderickx, J.M. Thevelein, I.S. Pretorius, and F.R. Delvaux, "Flavor-Active Esters : Adding Fruitiness to Beer," *Yeast*, vol. 96, 2003, pp. 110-118.
- [115] G. Cauet, E. Degryse, C. Ledoux, R. Spagnoli, and T. Achstetter, "Pregnenolone esterification in *Saccharomyces cerevisiae*. A potential detoxification mechanism.," *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 261, Apr. 1999, pp. 317-24.
- [116] S.M.G. Saerens, K.J. Verstrepen, S.D.M. Van Laere, A.R.D. Voet, P. Van Dijck, F.R. Delvaux, and J.M. Thevelein, "The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, Feb. 2006, pp. 4446-56.
- [117] S.M.G. Saerens, K.J. Verstrepen, S.D.M. Van Laere, A.R.D. Voet, P. Van Dijck, F.R. Delvaux, and J.M. Thevelein, "The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, Feb. 2006, pp. 4446-56.
- [118] S.M.G. Saerens, F. Delvaux, K.J. Verstrepen, P. Van Dijck, J.M. Thevelein, and F.R. Delvaux, "Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 74, Jan. 2008, pp. 454-61.
- [119] S. Saerens, P. Verbelen, and N. Vanbeneden, JM, "Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast," *Applied microbiology*, 2008.
- [120] S.M.G. Saerens, P.J. Verbelen, N. Vanbeneden, J.M. Thevelein, and F.R. Delvaux, "Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast.," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 80, Oct. 2008, pp. 1039-1051.
- [121] S.M.G. Saerens, P.J. Verbelen, N. Vanbeneden, J.M. Thevelein, and F.R. Delvaux, "Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast.," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 80, Oct. 2008, pp. 1039-1051.

- [122] D. Rossouw, T. Næs, and F.F. Bauer, "Linking gene regulation and the exo-metabolome : A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast," *BMC Genomics*, vol. 18, 2008, pp. 1-18.
- [123] I. Kubo, "Modes of antifungal action of alkanols against *Saccharomyces cerevisiae*," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 11, Mar. 2003, pp. 1117-1122.
- [124] I. Karpichev, "Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*," *Molecular and cellular biology*, vol. 18, 1998, pp. 6560-6570.
- [125] L.M. Steinmetz, H. Sinha, D.R. Richards, J.I. Spiegelman, P.J. Oefner, J.H. McCusker, and R.W. Davis, "Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast," *Nature*, vol. 416, 2002, p. 326–330.
- [126] E.A. Winzeler, C.I. Castillo-Davis, G. Oshiro, D. Liang, D.R. Richards, Y. Zhou, and D.L. Hartl, "Genetic diversity in yeast assessed with whole-genome oligonucleotide arrays," *Genetics*, vol. 163, 2003, p. 79.
- [127] A.M. Deutschbauer and R.W. Davis, "Quantitative trait loci mapped to single-nucleotide resolution in yeast," *Nature genetics*, vol. 37, 2005, p. 1333–1340.
- [128] K.W. Broman, H. Wu, S. Sen, and G.A. Churchill, "R/qtl: QTL mapping in experimental crosses," *Bioinformatics*, vol. 19, 2003, p. 889.
- [129] E.S. Lander, P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln, and L. Newburg, "MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations," *Genomics*, vol. 1, 1987, p. 174–181.
- [130] K.F. Manly, R.H. Cudmore Jr, and J.M. Meer, "Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping," *Mammalian Genome*, vol. 12, 2001, p. 930–932.
- [131] S. Sen and G.A. Churchill, "A statistical framework for quantitative trait mapping," *Genetics*, vol. 159, 2001, p. 371.
- [132] E.S. Lander and D. Botstein, "Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps," *Genetics*, vol. 121, 1989, p. 185.
- [133] A.P. Dempster, N.M. Laird, and D.B. Rubin, others, "Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm," *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, vol. 39, 1977, p. 1–38.
- [134] C.S. Haley and S.A. Knott, "A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers.," *Heredity*, vol. 69, Oct. 1992, pp. 315-24.
- [135] P. Marullo, M. Bely, I. Masneuf-Pomarède, M. Pons, M. Aigle, and D. Dubourdiou, "Breeding strategies for combining fermentative qualities and reducing off-flavor production in a wine yeast model," *FEMS yeast research*, vol. 6, 2006, p. 268–279.
- [136] P. Marullo, M. Bely, I. Masneuf-Pomarede, M. Aigle, and D. Dubourdiou, "Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains," *FEMS yeast research*, vol. 4, 2004, p. 711–719.
- [137] P. Marullo, M. Aigle, M. Bely, I. Masneuf-Pomarède, P. Durrens, D. Dubourdiou, and G. Yvert, "Single QTL mapping and nucleotide-level resolution of a physiologic trait in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains," *FEMS yeast research*, vol. 7, 2007, p. 941–952.
- [138] C. Ambroset, "Une approche intégrée génétique et génomique des propriétés d'une levure oenologique : relation entre expression des gènes et phénotypes," 2009.
- [139] G. Yvert, R.B. Brem, J. Whittle, J.M. Akey, E. Foss, E.N. Smith, R. Mackelprang, and L. Kruglyak, "Trans-acting regulatory variation in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of transcription factors.," *Nature genetics*, vol. 35, Sep. 2003, pp. 57-64.

- [140] J. Ansel, H. Bottin, C. Rodriguez-Beltran, C. Damon, M. Nagarajan, S. Fehrmann, J. François, and G. Yvert, "Cell-to-cell stochastic variation in gene expression is a complex genetic trait," *PLoS Genet*, vol. 4, 2008, p. e1000049.
- [141] T. Katou, M. Namise, H. Kitagaki, T. Akao, and H. Shimoi, "QTL mapping of sake brewing characteristics of yeast.," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 107, Apr. 2009, pp. 383-93.
- [142] G. Ben-Ari, D. Zenvirth, A. Sherman, L. David, M. Klutstein, U. Lavi, J. Hillel, and G. Simchen, "Four linked genes participate in controlling sporulation efficiency in budding yeast," *PLoS Genet*, vol. 2, 2006, p. e195.
- [143] X. Hu, M. Wang, T. Tan, J. Li, H. Yang, L. Leach, R. Zhang, and Z. Luo, "Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 175, 2007, p. 1479.
- [144] H. Sinha, B.P. Nicholson, L.M. Steinmetz, and J.H. McCusker, "Complex genetic interactions in a quantitative trait locus," *PLoS Genet*, vol. 2, 2006, p. e13.
- [145] J. Pagès and F. Husson, "Statistiques Générales pour Utilisateurs-Tome 1 & 2," *Presses Universitaires de Rennes*, 2005.
- [146] J. Bohlscheid, J. Fellman, X. Wang, D. Ansen, and C. Edwards, "The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations," *Journal of applied microbiology*, vol. 102, 2007, p. 390–400.
- [147] H. Liu, C. Styles, and G. Fink, "*Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth," *Genetics*, 1996.
- [148] K. Broman and S. Sen, "A Guide to QTL Mapping with R/qtl," 2009.
- [149] I.S. Pretorius, "Gene Technology in Winemaking : New Approaches to an Ancient Art," *Techniques*, vol. 66, 2001, pp. 27-47.
- [150] M. Bard, M.R. Albrecht, N. Gupta, C.J. Guynn, and W. Stillwell, "Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*," *Lipids*, vol. 23, Jun. 1988, pp. 534-8.
- [151] a D.V. Turina, M.V. Nolan, J. a Zygadlo, and M. a Perillo, "Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning.," *Biophysical chemistry*, vol. 122, Jul. 2006, pp. 101-13.
- [152] G.D. Fairn, K. Macdonald, and C.R. McMaster, "A Chemogenomic Screen in *Saccharomyces cerevisiae* Uncovers a Primary Role for the Mitochondria in Farnesol Toxicity and Its Regulation by the Pkc1 Pathway *," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, 2007, pp. 4868 -4874.
- [153] K. Machida, T. Tanaka, K. Fujita, and M. Taniguchi, "Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of bacteriology*, vol. 180, Sep. 1998, pp. 4460-5.
- [154] P. Marullo, M. Aigle, M. Bely, I. Masneuf-Pomarède, P. Durrens, D. Dubourdiou, and G. Yvert, "Single QTL mapping and nucleotide-level resolution of a physiologic trait in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains.," *FEMS yeast research*, vol. 7, Sep. 2007, pp. 941-52.
- [155] J. Oliva, S. Navarro, a Barba, G. Navarro, and M.R. Salinas, "Effect of pesticide residues on the aromatic composition of red wines.," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 47, Jul. 1999, pp. 2830-6.
- [156] R. Tressl, L. Friese, and F. Fendesack, "Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of hop aroma constituents in beer," *Journal of Agricultural*, 1978.
- [157] G.L.K. Hunter and M.G. Moshonas, "Analysis of Alcohols in Essential Oils of Grapefruit, Lemon, Lime, and Tangerine," *Journal of Food Science*, vol. 31, Mar. 1966, pp. 167-171.
- [158] D. Briggs, C. Boulton, and P. Brookes, *Brewing: science and practice*, 2004.

- [159] G. Fagan and R. Kepner, "Production of linalool, cis-nerolidol and trans-nerolidol, and trans, trans-farnesol by *Saccharomyces fermentati* growing as a film on simulated wine," *Vitis*, 1981.
- [160] M. Muramatsu, C. Ohto, S. Obata, E. Sakuradani, and S. Shimizu, "Alkaline pH enhances farnesol production by *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 108, Jul. 2009, pp. 52-5.
- [161] D.S. Goodman and G. Popják, "Studies on the biosynthesis of cholesterol XII. Synthesis of allyl pyrophosphates from mevalonate and their conversion into squalene with liver enzymes," *The Journal of Lipid Research*, vol. 1, 1960.
- [162] F. Haese and F. Ebel, "Méthod for Isomerizing Allyl Alcohols (WO03/047749)," , 2006.
- [163] L. Song, "Recovery of E , E-Farnesol from Cultures of Yeast *erg9* Mutants : Extraction with Polymeric Beads and Purification by Normal-Phase Chromatography," *Seven*, 2009.
- [164] C. Ratledge and C.T. Evans, "Lipids and their metabolism," *The yeasts*, vol. 3, 1989, p. 367–455.
- [165] C. Ohto, M. Muramatsu, and S. Obata, "Overexpression of the gene encoding HMG-CoA reductase in *Saccharomyces cerevisiae* for production of prenyl alcohols," *Applied microbiology*, 2009, pp. 837-845.
- [166] F. Carrau, K. Medina, and E. Boido, "De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts," *FEMS microbiology*, vol. 243, 2005, pp. 107-115.
- [167] M. Oswald, M. Fischer, N. Dirninger, and F. Karst, "Monoterpenoid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS yeast research*, vol. 7, May. 2007, pp. 413-21.
- [168] D.-K. Ro, E.M. Paradise, M. Ouellet, K.J. Fisher, K.L. Newman, J.M. Ndungu, K. a Ho, R. a Eachus, T.S. Ham, J. Kirby, M.C.Y. Chang, S.T. Withers, Y. Shiba, R. Sarpong, and J.D. Keasling, "Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast," *Nature*, vol. 440, Apr. 2006, pp. 940-3.
- [169] K. Tokuhira, M. Muramatsu, C. Ohto, T. Kawaguchi, S. Obata, N. Muramoto, M. Hirai, H. Takahashi, A. Kondo, E. Sakuradani, and S. Shimizu, "Overproduction of geranylgeraniol by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 75, Sep. 2009, pp. 5536-43.
- [170] J.M. Dejong, Y. Liu, A.P. Bollon, R.M. Long, S. Jennewein, D. Williams, and R.B. Croteau, "Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 93, Feb. 2006, pp. 212-24.
- [171] a Faulkner, X. Chen, J. Rush, B. Horazdovsky, C.J. Waechter, G.M. Carman, and P.C. Sternweis, "The LPP1 and DPP1 gene products account for most of the isoprenoid phosphate phosphatase activities in *Saccharomyces cerevisiae*," *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, May. 1999, pp. 14831-7.
- [172] L. Song, "A soluble form of phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* capable of converting farnesyl diphosphate into E, E-farnesol," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 128, 2006, p. 149–157.
- [173] K. Machida, T. Tanaka, Y. Yano, S. Otani, and M. Taniguchi, "Farnesol-induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by a cell cycle mechanism," *Microbiology (Reading, England)*, vol. 145 (Pt 2, Feb. 1999, pp. 293-9.
- [174] M. Kames, G. Saucy, J. Marina-Brunker, and T. McMullin, "method of vitamin production.pdf," , 1999.
- [175] J.M. Hornby, E.C. Jensen, A.D. Lisec, J.J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault, and K.W. Nickerson, "Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol," *Society*, vol. 67, 2001, pp. 2982-2992.

- [176] I. Hikkel, A. Lucau-Danila, T. Delaveau, P. Marc, F. Devaux, and C. Jacq, "A general strategy to uncover transcription factor properties identifies a new regulator of drug resistance in yeast," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, 2003, p. 11427.
- [177] R. Cohen and D. Engelberg, "Commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains (e.g. BY4741, W303) are growth sensitive on synthetic complete medium due to poor leucine uptake.," *FEMS microbiology letters*, vol. 273, Aug. 2007, pp. 239-43.
- [178] L.A. Hazelwood, M.C. Walsh, J.T. Pronk, and J.M. Daran, "Involvement of Vacuolar Sequestration and Active Transport in Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to Hop Iso- α -Acids," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, 2010, p. 318.
- [179] H. Wolfger, Y. Mahé, A. Parle-McDermott, A. Delahodde, and K. Kuchler, "The yeast ATP binding cassette (ABC) protein genes PDR10 and PDR15 are novel targets for the Pdr1 and Pdr3 transcriptional regulators," *FEBS letters*, vol. 418, 1997, p. 269-274.
- [180] R.C. Vargas, S. Tenreiro, M.C. Teixeira, A.R. Fernandes, and I. Sa, "*Saccharomyces cerevisiae* Multidrug Transporter Qdr2p (Yil121wp): Localization and Function as a Quinidine Resistance Determinant," *Society*, vol. 48, 2004, pp. 2531-2537.
- [181] P. Hwang and S. Tugendreich, "Molecular analysis of GPH1, the gene encoding glycogen phosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*.,," *Molecular and cellular*, vol. 9, 1989, pp. 1659-1666.
- [182] C. Favre, P.S. Aguilar, and M.C. Carrillo, "Oxidative stress and chronological aging in glycogen-phosphorylase-deleted yeast.,," *Free radical biology & medicine*, vol. 45, Nov. 2008, pp. 1446-56.
- [183] A. Wiemken, "TREHALOSE IN YEAST, STRESS PROTECTANT RATHER THAN RESERVE CARBOHYDRATE ANDRES WIEMKEN Department of Botany, University of Basel, Hebelstrasse 1, CH-4056 Basel, Switzerland," *Antonie van Leeuwenhoek*, 1990, pp. 209-217.
- [184] S. Lillie, "Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation.,," *Journal of Bacteriology*, 1980.
- [185] J. Roustan and J. Sablayrolles, "Trehalose and glycogen in wine-making yeasts: methodological aspects and variability," *Biotechnology Letters*, 2002, pp. 1059-1064.
- [186] M. Fosset, L.W. Muir, L.D. Nielsen, and E.H. Fischer, "Purification and properties of yeast glycogen phosphorylase a and b," *Biochemistry*, vol. 10, 1971, p. 4105-4113.
- [187] T. Rossignol, L. Dulau, A. Julien, and B. Blondin, "Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation.,," *Yeast (Chichester, England)*, vol. 20, Dec. 2003, pp. 1369-85.
- [188] T.C. James, S. Campbell, D. Donnelly, and U. Bond, "Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions.,," *Journal of applied microbiology*, vol. 94, Jan. 2003, pp. 432-48.
- [189] C. Boulton, D. Quain, and E. Corporation, *Brewing yeast and fermentation*, Blackwell Science Oxford, 2001.
- [190] F. Zimmermann and K. Entian, *Yeast sugar metabolism*, Lancaster, PA: 1997.
- [191] J.R. Dickinson, L.E.J. Salgado, and M.J.E. Hewlins, "The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*.,," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, Mar. 2003, pp. 8028-34.
- [192] L. a Hazelwood, J.-M. Daran, A.J. a van Maris, J.T. Pronk, and J.R. Dickinson, "The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism.,," *Applied and environmental microbiology*, vol. 74, Apr. 2008, pp. 2259-66.

- [193] J.E. Bueno, R. a Peinado, M. Medina, and J. Moreno, "Effect of a short contact time with lees on volatile composition of Airen and Macabeo wines.," *Biotechnology letters*, vol. 28, Jul. 2006, pp. 1007-11.
- [194] M. Lilly, M.G. Lambrechts, and I.S. Pretorius, "{E}ffect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates.," *Appl Environ Microbiol*, vol. 66, 2000, pp. 744-753.
- [195] W.K. Huh, J.V. Falvo, L.C. Gerke, A.S. Carroll, R.W. Howson, J.S. Weissman, and E.K. O'Shea, "Global analysis of protein localization in budding yeast," *Nature*, vol. 425, 2003, p. 686–691.
- [196] L.A. Castelli, N.P. Nguyen, and I.G. Macreadie, "Sulfa drug screening in yeast: fifteen sulfa drugs compete with p-aminobenzoate in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS microbiology letters*, vol. 199, 2001, p. 181–184.
- [197] J.C. Edman, A.L. Goldstein, and J.G. Erbe, "Para-aminobenzoate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a bifunctional enzyme," *Yeast*, vol. 9, 1993, p. 669–675.
- [198] M. Weng and H. Zalkin, "Structural role for a conserved region in the CTP synthetase glutamine amide transfer domain.," *Journal of bacteriology*, vol. 169, 1987, p. 3023.
- [199] H. Nyunoya and C. Lusty, "Sequence of the small subunit of yeast carbamyl phosphate synthetase and identification of its catalytic domain.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 259, 1984, p. 9790.
- [200] C. Lekkas, G.G. Stewart, A.E. Hill, B. Taidi, J. Hodgson, and J.I. Brew, "Elucidation of the Role of Nitrogenous Wort Components in Yeast Fermentation," *Journal Of The Institute Of Brewing*, vol. 113, 2007, pp. 3-8.
- [201] G. Steyer, Damien Lekkas, Christophoros Stewart and B. Taidi, "Influence of wort amino acids on fermentation speed," *EBC Brewing science group yeast physiology*, Wolnzach (DE): 2010.
- [202] H. Chen and G.R. Fink, "Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols," *Genes & development*, vol. 20, 2006, p. 1150.
- [203] A. Wuster and M.M. Babu, "Transcriptional control of the quorum sensing response in yeast," *Molecular BioSystems*, vol. 6, 2010, p. 134–141.
- [204] C.W.T.V. Roermund, Y. Elgersma, N. Singh, R.J.A. Wanders, and H.F. Tabak, "cerevisiae is impermeable to NAD (H) and acetyl-CoA under in vivo conditions," *EMBO Journal*, vol. 14, 1995, pp. 3480-3486.
- [205] C.W. van Roermund, H.F. Tabak, M. van Den Berg, R.J. Wanders, and E.H. Hetteema, "Pex11p plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in *Saccharomyces cerevisiae*." *The Journal of cell biology*, vol. 150, Aug. 2000, pp. 489-98.
- [206] E. Schweizer, "Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems," *Microbiology and molecular biology*, vol. 68, 2004, pp. 501-517.
- [207] J.K. Hiltunen, F. Okubo, V.A.S. Kursu, K.J. Autio, and A.J. Kastaniotis, "Mitochondrial fatty acid synthesis and maintenance of respiratory competent mitochondria in yeast.," *Biochemical Society transactions*, vol. 33, Nov. 2005, pp. 1162-5.
- [208] A. Harington, C.J. Herbert, B. Tung, G.S. Getz, and P.P. Slonimski, "Identification of a new nuclear gene (CEM1) encoding a protein homologous to a beta-keto-acyl synthase which is essential for mitochondrial respiration in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular microbiology*, vol. 9, Aug. 1993, pp. 545-55.
- [209] J.K. Hiltunen, F. Okubo, V. a S. Kursu, K.J. Autio, and a J. Kastaniotis, "Mitochondrial fatty acid synthesis and maintenance of respiratory competent mitochondria in yeast.," *Biochemical Society transactions*, vol. 33, Nov. 2005, pp. 1162-5.

- [210] U. Hoja, S. Marthol, J. Hofmann, S. Stegner, R. Schulz, S. Meier, E. Greiner, and E. Schweizer, "HFA1 encoding an organelle-specific acetyl-CoA carboxylase controls mitochondrial fatty acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, May. 2004, pp. 21779-86.
- [211] R. Schneider, B. Brors, F. Bürger, S. Camrath, and H. Weiss, "Two genes of the putative mitochondrial fatty acid synthase in the genome of *Saccharomyces cerevisiae*." *Current genetics*, vol. 32, Dec. 1997, pp. 384-8.
- [212] A.J. Kastaniotis, K.J. Autio, R.T. Sormunen, and J.K. Hiltunen, "Htd2p/Yhr067p is a yeast 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase essential for mitochondrial function and morphology." *Molecular microbiology*, vol. 53, Sep. 2004, pp. 1407-21.
- [213] J.M. Torkko, K.T. Koivuranta, I.J. Miinalainen, A.I. Yagi, W. Schmitz, A.J. Kastaniotis, T.T. Airene, A. Gurvitz, and K.J. Hiltunen, "Candida tropicalis Etr1p and *Saccharomyces cerevisiae* Ybr026p (Mrf1'p), 2-enoyl thioester reductases essential for mitochondrial respiratory competence." *Molecular and cellular biology*, vol. 21, Sep. 2001, pp. 6243-53.
- [214] V. Gueguen, D. Macherel, M. Jaquinod, R. Douce, and J. Bourguignon, "Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, 2000, p. 5016.
- [215] S. Brody, "Mitochondrial acyl carrier protein is involved in lipoic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEBS Letters*, vol. 408, May. 1997, pp. 217-220.
- [216] H. Wada, D. Shintani, and J. Ohlogge, "Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, Feb. 1997, pp. 1591-6.
- [217] L. Zhang, A.K. Joshi, J. Hofmann, E. Schweizer, and S. Smith, "Cloning, expression, and characterization of the human mitochondrial beta-ketoacyl synthase. Complementation of the yeast CEM1 knock-out strain." *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, Apr. 2005, pp. 12422-9.
- [218] F. Plewniak, L. Bianchetti, Y. Brelivet, A. Carles, F. Chalmel, O. Lecompte, T. Mochel, L. Moulinier, A. Muller, and J. Muller, others, "PipeAlign: a new toolkit for protein family analysis," *Nucleic acids research*, vol. 31, 2003, p. 3829.
- [219] P. Sulo and N.C. Martin, "Isolation and characterization of LIP5. A lipoate biosynthetic locus of *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, 1993, p. 17634.
- [220] L. Palmieri, F.M. Lasorsa, V. Iacobazzi, M.J. Runswick, F. Palmieri, and J.E. Walker, "Identification of the mitochondrial carnitine carrier in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEBS letters*, vol. 462, 1999, p. 472-476.
- [221] L. Palmieri, F.M. Lasorsa, A. Voza, G. Agrimi, G. Fiermonte, M.J. Runswick, J.E. Walker, and F. Palmieri, "Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, vol. 1459, 2000, p. 363-369.
- [222] J.H. Swiegers, N. Dippenaar, I.S. Pretorius, and F.F. Bauer, "Carnitine-dependent metabolic activities in *Saccharomyces cerevisiae*: three carnitine acetyltransferases are essential in a carnitine-dependent strain," *Yeast*, vol. 18, 2001, p. 585-595.
- [223] C.W.T. van Roermund, E.H. Hetteema, M. van Den Berg, H.F. Tabak, and R.J.A. Wanders, "Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p," *The EMBO Journal*, vol. 18, 1999, p. 5843-5852.
- [224] K. Dimmer, S. Fritz, and F. Fuchs, "Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*," *Molecular biology of*, 2002.
- [225] L. Steinmetz, C. Scharfe, and A. Deutschbauer, "Systematic screen for human disease genes in yeast," *nature genetics*, 2002.

- [226] G. Beltran, M. Novo, V. Leberre, S. Sokol, D. Labourdette, J.-M. Guillamon, A. Mas, J. François, and N. Rozes, "Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations.," *FEMS yeast research*, vol. 6, Dec. 2006, pp. 1167-83.
- [227] K. Lee, J. Patton, M. Fido, and L. Hines, "The *Saccharomyces cerevisiae* PLB1 gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity.," *Journal of Biological*, 1994.
- [228] O. Merkel, O.V. Oskolkova, F. Raab, R. El-Toukhy, and F. Paltauf, "Regulation of activity in vitro and in vivo of three phospholipases B from *Saccharomyces cerevisiae*.," *The Biochemical journal*, vol. 387, Apr. 2005, pp. 489-96.
- [229] S. Tai, I. Snoek, M. Luttik, and M. Almering, "Correlation between transcript profiles and fitness of deletion mutants in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*," 2007.
- [230] J.O. Yon, H. Nakamura, a Ohta, and M. Takagi, "Incorporation of extracellular phospholipids and their effect on the growth and lipid metabolism of the *Saccharomyces cerevisiae* cho1/pss mutant.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1394, Oct. 1998, pp. 23-32.
- [231] L. Deng, R. Fukuda, T. Kakihara, K. Narita, and A. Ohta, "Incorporation and remodeling of phosphatidylethanolamine containing short acyl residues in yeast," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1801, 2010, p. 635-645.
- [232] G. Beltran, M. Novo, J.M. Guillamón, A. Mas, and N. Rozès, "Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds.," *International journal of food microbiology*, vol. 121, Jan. 2008, pp. 169-77.
- [233] J. Kesselmeier, "Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology," *Journal of Atmospheric Chemistry*, 1999.
- [234] A. Guenther, C. Hewitt, D. Erickson, and R. Fall, "A global model of natural volatile organic compound emissions," *Journal of Geophysical*, 1995.
- [235] M. Trainer, E. Williams, D. Parrish, and M. Buhr, "Models and observations of the impact of natural hydrocarbons on rural ozone," *Nature*, 1987.
- [236] M. Claeys, B. Graham, G. Vas, and W. Wang, "Formation of secondary organic aerosols through photooxidation of isoprene," *Science*, 2004.
- [237] K. Hartikainen, A. Nerg, and M. Kivimäenpää, "Emissions of volatile organic compounds and leaf structural characteristics of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and temperature," *Tree*, 2009.
- [238] D. Purves and J. Caspersen, "Human induced changes in US biogenic volatile organic compound emissions: evidence from long-term forest inventory data," *Global Change*, 2004.
- [239] T. Miyazaki, A. Plotto, and K. Goodner, "Distribution of aroma volatile compounds in tangerine hybrids and proposed inheritance," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010.
- [240] N.J. Nieuwenhuizen, S. Green, and R.G. Atkinson, "Floral sesquiterpenes and their synthesis in dioecious kiwifruit.," *Plant signaling & behavior*, vol. 5, Jan. 2010, pp. 61-3.
- [241] M. Buško, H. Jeleń, and T. Góral, "Volatile metabolites in various cereal grains," *Food Additives &*, 2010.
- [242] M. Ugliano, E.J. Bartowsky, J. McCarthy, L. Moio, and P. a Henschke, "Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains.," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 54, Aug. 2006, pp. 6322-31.

- [243] K. Takoi, K. Koie, Y. Itoga, Y. Katayama, M. Shimase, Y. Nakayama, and J. Watari, "Biotransformation of Hop-Derived Monoterpene Alcohols by Lager Yeast and Their Contribution to the Flavor of Hopped Beer," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 58, 2010, p. 5050–5058.
- [244] A. King and J. Richard Dickinson, "Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*," *Yeast*, vol. 16, Apr. 2000, pp. 499-506.
- [245] A.J. King and J.R. Dickinson, "Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts.," *FEMS yeast research*, vol. 3, Mar. 2003, pp. 53-62.
- [246] A. King and J.R. Dickinson, "Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*," *Yeast*, 2000, pp. 499-506.
- [247] A.J. King and J.R. Dickinson, "Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts," *Control*, vol. 3, 2003, pp. 53-62.
- [248] S. Hanke, "Linalool — A Key Contributor to Hop Aroma," *Symposium A Quarterly Journal In Modern Foreign Literatures*, 2009.
- [249] T. Kishimoto, A. Wanikawa, N. Kagami, and K. Kawatsura, "Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS.," *J Agric Food Chem*, vol. 53, 2005, pp. 4701-4707.
- [250] E. Vaudano, E.G. Moruno, and R. Di Stefano, "Modulation of geraniol metabolism during alcohol fermentation," *JOURNAL-INSTITUTE OF BREWING*, vol. 110, 2004, p. 213–219.
- [251] R. Di Stefano, G. Maggiorotto, and S. Giannotti, "Trasformazioni di nerolo e geraniolo indotte dai lieviti Riv," *Vitic. Enol*, vol. 45, 1992, p. 43–49.
- [252] S. Koslitz, L. Renaud, M. Kohler, and M. Wüst, "Stereoselective formation of the varietal aroma compound rose oxide during alcoholic fermentation.," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 56, Feb. 2008, pp. 1371-5.
- [253] T. Fujii, N. Nagasawa, and A. Iwamatsu, "Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 60, 1994, pp. 2786-2792.
- [254] K.J. Verstrepen, S.D.M.V. Laere, B.M.P. Vanderhaegen, G. Derdelinckx, J.-P. Dufour, I.S. Pretorius, J. Winderickx, J.M. Thevelein, and F.R. Delvaux, "Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters.," *Appl Environ Microbiol*, vol. 69, Sep. 2003, pp. 5228-5237.
- [255] H. Chou and J.D. Keasling, "brevet deshydrogenase methyl butanol.pdf," , 2009.
- [256] K. Stott, K. Saito, and D. Thiele, "Old Yellow Enzyme. The discovery of multiple isozymes and a family of related proteins.," *Journal of Biological Chemistry*, 1993.
- [257] V. Higgins, A. Beckhouse, and A. Oliver, "Yeast genome-wide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during the initial stages of an industrial lager fermentation," *Applied and*, 2003.
- [258] H. Dincalp, "Photosynthesis of rose oxide by concentrated sunlight in the absence of singlet oxygen," *Journal of Photochemistry and Photobiology A:*, 2001.
- [259] J. Marais, "Terpenes in the aroma of grapes and wines: a review," *S. Afr. J. Enol. Vitic*, 1983.
- [260] K. Vollhardt, "Traité de chimie organique," 2004.
- [261] K. Weber, B. Schulz, and M. Ruhnke, "The quorum-sensing molecule E,E-farnesol--its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species.," *Yeast (Chichester, England)*, vol. 27, Sep. 2010, pp. 727-39.

-
- [262] M.S. Schonauer, A.J. Kastaniotis, V. Kursu, J.K. Hiltunen, and C.L. Dieckmann, "Lipoic acid synthesis and attachment in yeast mitochondria," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, 2009, p. 23234.
- [263] K. Yoshioka, "Ester Formation by Alcohol Acetyltransferase from Brewers' Yeast," *Agricultural and Biological*, vol. 45, 1981, pp. 2183-2190.
- [264] S. a Jesch, X. Zhao, M.T. Wells, and S. a Henry, "Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, Mar. 2005, pp. 9106-18.
- [265] K. Furukawa, T. Yamada, H. Mizoguchi, and S. Hara, "Increased alcohol acetyltransferase activity by inositol limitation in *Saccharomyces cerevisiae* in sake mash.," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 96, Jan. 2003, pp. 380-6.
- [266] K. Furukawa, T. Yamada, H. Mizoguchi, and S. Hara, "Increased ethyl caproate production by inositol limitation in *Saccharomyces cerevisiae*.,," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 95, Jan. 2003, pp. 448-54.
- [267] A.N. Azab, D.V. Mehta, J.E. Chesebro, and M.L. Greenberg, "Ethylbutyrate, a valproate-like compound, exhibits inositol-depleting effects--a potential mood-stabilizing drug.," *Life sciences*, vol. 84, Jan. 2009, pp. 38-44.
- [268] D. Ding and M.L. Greenberg, "Lithium and valproate decrease the membrane phosphatidylinositol/phosphatidylcholine ratio.," *Molecular microbiology*, vol. 47, Jan. 2003, pp. 373-81.
- [269] D.L. Vaden, D. Ding, B. Peterson, and M.L. Greenberg, "Lithium and valproate decrease inositol mass and increase expression of the yeast INO1 and INO2 genes for inositol biosynthesis.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, May. 2001, pp. 15466-71.
- [270] D.J. Kvittek, J.L. Will, and A.P. Gasch, "Variations in stress sensitivity and genomic expression in diverse *S. cerevisiae* isolates," *PLoS Genet*, vol. 4, 2008, p. e1000223.
- [271] A. Marchler-Bauer and S.H. Bryant, "CD-Search: protein domain annotations on the fly.," *Nucleic acids research*, vol. 32, Jul. 2004, pp. W327-31.