



HAL
open science

**Étude des causes génétiques de la plasticité
phénotypique par une approche de cartographie de
QTLs : cas de la levure oenologique *Saccharomyces
cerevisiae***

Emilien Peltier

► **To cite this version:**

Emilien Peltier. Étude des causes génétiques de la plasticité phénotypique par une approche de cartographie de QTLs : cas de la levure oenologique *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0945 . tel-01806339

HAL Id: tel-01806339

<https://theses.hal.science/tel-01806339>

Submitted on 2 Jun 2018

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : Science de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ : Œnologie

Par Emilien Peltier

**Étude des causes génétiques de la plasticité phénotypique
par une approche de cartographie de QTLs. Cas de la
levure œnologique *Saccharomyces cerevisiae***

Sous la direction de : Philippe Marullo

Soutenue le 22 décembre 2017

Membres du jury :

Mme. MASNEUF-POMAREDE Isabelle, Professeur à Bordeaux Sciences Agro Président du jury
Mme. CAMARASA Carole, Chargée de Recherche à l'INRA Montpellier Rapporteur
M. SCHACHERER Joseph, Professeur à l'Université de Strasbourg Rapporteur
M. DE VIENNE Dominique, Professeur émérite à l'Université de Paris-Sud Examineur
M. GIBON Yves, Directeur de Recherche à l'INRA Nouvelle-Aquitaine-Bordeaux Examineur
Mme. SCHURDI-LEVRAUD Valérie, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux Invité
M. MARULLO Philippe, Chargé de Recherche à BIOLAFFORT Directeur de Thèse

Titre : Étude des causes génétiques de la plasticité phénotypique par une approche de cartographie de QTL.

Cas de la levure œnologique *Saccharomyces cerevisiae*

Résumé :

La levure *S. cerevisiae* est la seule espèce capable de terminer la fermentation alcoolique du jus de raisin qui est l'étape principale de la vinification. A cause de la forte variabilité technologique retrouvée chez cette espèce, des travaux de sélection sont réalisés dans le but d'utiliser des levains performants pour l'industrie. Ces souches montrent des différences importantes à la fois dans leurs cinétiques fermentaires et leur bilans en métabolites, ce qui impacte la qualité des vins. La réponse phénotypique des levures varie également de manière considérable et non homogène face aux variations environnementales. La compréhension des mécanismes génétiques expliquant cette réponse différenciée est une question scientifique non triviale. Elle revêt une importance particulière en œnologie, où les conditions de vinifications sont très changeantes (millésimes, cépages, terroirs, conduites de vinifications...). Afin de pouvoir proposer des levains garantissant le succès des fermentations dans un large éventail de conditions, nous proposons ici de mieux comprendre ces mécanismes d'interaction Gène x Environnement dans un contexte œnologique. L'identification de locus génétiques (*Quantitative Trait Loci* (QTL)) contrôlant des caractères quantitatifs est rendue possible par des approches de cartographie de QTLs. Celles-ci nécessitent l'étude d'une vaste descendance en ségrégation qui doit être caractérisée sur le plan génétique et phénotypique. L'établissement d'un lien statistique entre des marqueurs génétiques et un phénotype permet la localisation de QTLs influant les caractères étudiés. Au cours de cette thèse, une méthode de phénotypage pour suivre les fermentations de plusieurs centaines d'individus a été mise au point. Grâce à elle, les performances fermentaires de deux descendance génotypées par séquençage à haut débit ont été mesurées en faisant varier les conditions de fermentations. Cela a permis l'identification de nombreux QTLs et d'estimer leur impact sur la robustesse des souches. L'implication des allèles de trois gènes qui montrent une forte interaction avec l'environnement et qui possèdent des effets pléiotropiques liés au métabolisme du SO₂ a été prouvée moléculairement. Les résultats obtenus font l'objet d'une discussion générale sur l'utilisation de QTLs pour la sélection de levures plus performantes.

Title: Genetic basis of phenotypic plasticity by a QTL mapping approach. Case of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract:

The yeast *S. cerevisiae* is the only species able to complete the alcoholic fermentation of grape must which is the main step of the wine-making process. Because of the high technological variability found in this species, selection work is carried out with the aim of using efficient yeasts for the industry. These strains show important differences both in their fermentation kinetics and their metabolite yield which affects the wines quality. In addition to these important phenotypic variations, the phenotypic response of yeasts varies considerably and not homogeneously against environmental variations. Understanding the genetic mechanisms that explain these differentiated responses to environmental variations is a non-trivial scientific question. This is of particular importance in oenology, where the winemaking conditions are highly variable (vintages, grape variety, terroirs, oenological practices...). In order to obtain yeasts ensuring the success of the fermentations under a wide range of conditions, we propose here to better understand these mechanisms of interaction Gene x Environment in an oenological context. The identification of genetic locus (Quantitative Trait Loci (QTL)) controlling quantitative characters is made possible by QTL mapping approaches. These approaches require the study of a large progeny in segregation that must be characterized genetically and phenotypically. The establishment of a statistical link between genotype and phenotype allows the localization of QTLs that have an impact on phenotyped characters. During this thesis a phenotyping method that allows us to follow the fermentations of several hundred individuals has been developed. Thanks to it, two progenies genotyped by whole genome sequencing have been phenotyped in different environmental conditions. This lead to the identification of many QTLs and to the estimation of their impact in strain robustness. The implication of the alleles of 3 genes showing a strong interaction with environment and pleiotropic effects linked to the SO₂ metabolism has been proved molecularly. The results achieved are discussed in the context of QTL exploitation for the selection of more efficient yeast.

Unité de recherche :

Unité de recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRA

210 chemin de Leysotte - CS50008

33882 Villenave d'Ornon, France

Remerciements

Monsieur le Professeur Denis DUBOURDIEU et Monsieur le Professeur Alain BLANCHARD, directeurs successifs de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, m'ont accueilli au sein de l'Institut. Je leur exprime toute ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Philippe DARRIET, Directeur de l'unité de recherche Œnologie. Je le remercie de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

La société Biolaffort a financé ma thèse. J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Luc LAFFORT pour ce financement.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail :

Madame la Professeur Isabelle MASNEUF-POMAREDE, Professeur à Bordeaux Sciences Agro, a accepté de présider ce jury. Je lui prie d'accepter mes sincères remerciements. Je la remercie aussi d'avoir activement participé à ma formation à la recherche lors de mon stage de deuxième année de Master qu'elle a dirigé.

Madame Carole CAMARASA, Chargée de Recherche à l'INRA Montpellier, a accepté d'être rapporteur de mon travail. Je la remercie vivement.

Monsieur le Professeur Joseph SCHACHERER, Professeur à l'Université de Strasbourg, a accepté d'être rapporteur de mon travail, je le remercie vivement.

Monsieur le Professeur Dominique DE VIENNE, Professeur Émérite à l'Université de Paris-Sud, a accepté d'être examinateur de mon travail. Je l'en remercie chaleureusement. Je le remercie aussi d'avoir participé à ma formation à la génétique quantitative.

Monsieur Yves GIBON, Directeur de Recherche à l'INRA Nouvelle-Aquitaine-Bordeaux, a accepté d'être examinateur de ce travail. Je le remercie très chaleureusement d'avoir accepté de participer à ce jury ainsi que de m'avoir accueilli à la plateforme métabolique de Bordeaux et guidé pour la réalisation des dosages enzymatiques.

Madame SCHURDI-LEVRAUD, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux, a accepté d'évaluer mon travail. Je la remercie vivement d'avoir accepté de participer à ce jury ainsi que d'avoir participé à ma formation à la génétique quantitative.

Monsieur Philippe MARULLO, a dirigé mes recherches. Je le remercie vivement d'avoir participé à ma formation à la recherche. C'était un grand bonheur d'effectuer cette thèse sous ta direction, de chercher et d'apprendre à tes côtés.

Je remercie aussi le Professeur Vladimir JIRANEK, le Professeur Richard GARDNER et Miguel RONCORONI grâce à qui j'ai pu bénéficier de la descendance M2xF15 ainsi que des données génomiques relatives à cette population.

Je remercie les membres présents ou passés de la plateforme métabolique de Bordeaux qui m'ont aidé pendant ce travail. Je remercie notamment Duyên PRODHOMME, Patricia BALLIAS et Camille BÉNARD.

Je remercie également Virginie MOINE et Joana COULON de la société Biolaffort pour leur aide et leur soutien durant ce travail.

Un grand merci aux étudiants qui ont participé à la réalisation de cette thèse dans le cadre de leur stage : Justine PAPE, Dylan DOS REIS et Elodie KAMINSKI, Thomas FAVRAUD et Jules HARROUARD.

J'adresse également mes remerciements aux membres présents ou passés de l'Unité de recherche Œnologie du laboratoire qui m'ont soutenu pendant ce travail. Un grand merci à Warren ALBERTIN, Marta AVRAMOVA, Marina BELY, Margaux BERNARD, Marion BRENIAUX, Margaux CAMELEYRE, Hugo CAMPBELL-SILLS, Alice CIBRARIO, Laura CHASSERIAUD, Lucie DUTILH, Mariette EL KHOURY, JAOMANJAKA Fety, Maria MARTI RAGA, Cécile MIOT-SERTIER, Cécile PHILIPPE, Vikas SHARMA, Brendan SMITH et Marine TRUJILLO pour leur présence et aide amicale.

Enfin je remercie ma famille pour son soutien en dehors du laboratoire. J'adresse un remerciement particulier à mes grands-parents, mes parents et mon frère. Enfin je remercie Ari que j'aime et me procure un bonheur permanent.

Productions scientifiques

Publications à comité de lecture

Martí-Raga, M., Peltier, E., Mas, A., Beltran, G., and Marullo, P. (2016).

Genetic Causes of Phenotypic Adaptation to the Second Fermentation of Sparkling Wines in *Saccharomyces cerevisiae*. G3 GenesGenomesGenetics g3.116.037283.

Peltier, E., Bernard, M., Trujillo, M., Prodhomme, D., Barbe, J.C., Gibon, Y., Marullo, P.

Wine yeast phenomics: a standardized fermentation method for assessing quantitative traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains in enological conditions. Accepted for publication with minor revision in PLOS ONE.

Peltier, E., Sharma, V., Martí-Raga, M., Roncoroni, M., Bernard, M., Jiranek, V., Gibon, Y., Marullo, P.

Dissection of the molecular bases of genetics x environmental interactions: a study of phenotypic plasticity of *Saccharomyces cerevisiae* in natural grape juices. Will be submitted in PLOS Genetics

Communications

Orales

Emilien Peltier, Dylan Dos Reis, Justine Pape, Duyen Prodhomme, Miguel Roncoroni, Vladimir Jiranek, Philippe Marullo.

Development of a wine microvinification method for tracking QTL in various backgrounds and environmental conditions.

Levures, Modèles et Outils "LMO12"

Emilien Peltier, Vikas Sharma, Maria Marti Raga, Miguel Roncoroni, Vladimir Jiranek, Yves Gibon, Philippe Marullo.

QTL mapping in various environmental conditions reveals complex GxE interactions shaping the phenotypic variation of quantitative traits in œnology.

The 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33)

Maria Marti Raga, Émilien Peltier, Albert Mas, Gemma Beltran, Philippe Marullo

Genetic causes of phenotypic adaptation to the second fermentation of sparkling wines in *Saccharomyces cerevisiae*.

The 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33)

Emilien Peltier, Dylan Dos Reis, Justine Pape, Duyen Prodhomme, Miguel Roncoroni, Vladimir Jiranek, Yves Gibon, Philippe Marullo.

Tracking genetic determinism of yeast oenological quantitative traits and their interaction with environment

9^{ème} Journée Jeunes Chercheurs 2016, Pessac, France.

Emilien Peltier, Vikas Sharma, Maria Marti Raga, Miguel Roncoroni, Vladimir Jiranek, Yves Gibon, Philippe Marullo.

How genes that interact with environment shape the phenotypic variation of quantitative traits in oenology?

17^{ème} Journée Scientifique de L'École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Posters

Emilien Peltier, Vikas Sharma, Warren Albertin, Augustin Aranda, Anne Devin, Dominique de Vienne, Michel Rigoulet, Philippe Marullo

The mt-DNA inheritance affects crucial industrial traits both for inter and intraspecific Saccharomyces hybrids.

The 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33)

Vikas Sharma, Emilien Peltier, Margaux Bernard, Philippe Marullo

Comparative genomics of industrial wine yeast strains.

The 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33)

Warren Albertin, Marta Avramova, Alice Cibrario, Emilien Peltier, Monika Coton, Emmanuel Coton, Franck Salin, Marguerite Dols-Lafargue, Chris Curtin, Isabelle Masneuf-Pomarede

The wine spoilage yeast species *Brettanomyces bruxellensis*: a diploid-triploid complex associated with contrasted sensibility to sulphites.

The 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33)

Emilien Peltier, Duyen Prodhomme, Margaux Bernard, Vladimir Jiranek, Yves Gibon, Philippe Marullo

Investigation of the phenotypic variability and the norm of reaction in two distinct meiotic populations in an oenological context.

The 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33)

Marullo, P., Marti Raga, M., Zimmer, A., Peltier, E., Bely, M., Durrens, P., Sherman, D., Mas, A., Beltran, G., Dubourdieu, D. (2015).

Identification by QTL mapping of new genes and their allelic forms conferring robustness to environmental variations in wine fermentation.

In: Abstracts of the 27th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (p. S160). Yeast, Volume 32, Issue S1. Presented at 27. International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Terme, ITA (2015-09-06 - 2015-09-12). DOI : 10.1002/yea.3092

Liste des abréviations

Abréviations utilisées	Signification
μ-OX	Effet de la micro-oxygénation
ADN-mt	ADN mitochondrial
CS14	Cabernet-Sauvignon 2014
FA	Fermentation Alcoolique
FML	Fermentation Malolactique
GM	Effet du <i>Grape Must</i>
GWAS	
GxE	Interaction gène - environnement
Indels	Insertions / délétions
ISVV	Institut des Sciences de la Vigne et du Vin
M14	Merlot 2014
M15	Merlot 2015
OGM	Organismes génétiquement modifiés
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
SAM	Sélection assistée par marqueurs
SAP	Single amino acid polymorphism
SB14	Sauvignon Blanc 2014
SB15	Sauvignon Blanc 2015
SNP	Single nucleotide polymorphism

Table des matières

VUE D'ENSEMBLE DU PROJET	1
ÉTAT DES CONNAISSANCES	4
1 LA LEVURE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	5
1.1 Généralités taxonomiques.....	5
1.2 La levure un organisme à la fois modèle et outil.....	7
1.2.1 La levure et la production de boissons fermentées	7
1.2.2 La levure comme modèle génétique et cellulaire	8
1.2.3 La levure un outil biotechnologique.....	8
1.3 Cycle de vie.....	9
1.4 Éléments de génétique des populations chez <i>S. cerevisiae</i>	10
2 PRÉSENTATION DES PRINCIPALES ÉTAPES DU PROCESSUS DE VINIFICATION ET IMPLICATION DES LEVURES CENOLOGIQUES (<i>S. CEREVISIAE</i>)	13
2.1 Rappels élémentaires sur la vinification.....	13
2.1.1 Le raisin du vin.....	13
2.1.2 Opérations pré-fermentaires	14
2.1.3 La fermentation alcoolique	15
2.1.4 Pilotage de la fermentation alcoolique	16
2.1.5 L'écoulage et l'élevage	18
2.2 Variabilité technologique des souches œnologiques (<i>S. cerevisiae</i>).....	19
2.2.1 L'activité fermentaire	19
2.2.2 La production de métabolites fermentaires.....	19
2.2.3 L'apport aromatique	21
3 ÉTUDE DU DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DES TRAITS CENOLOGIQUES	23
3.1 Généralités	23
3.2 Génétique fonctionnelle des levures de vinification	23
3.3 Génétique quantitative des levures de vinification	24
3.3.1 Généralité et Historique.....	24
3.3.2 Champ d'application de la génétique quantitative	25
3.4 La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et la génétique quantitative	26
3.4.1 Génétique d'association.....	26
3.4.2 Analyse de liaison	26
3.5 Validation expérimentale des QTLs à l'échelle du gène ou du SNP.....	29
3.5.1 Méthode de validation	29
3.5.2 Types de variations impliquées	30
3.5.3 QTLs pertinents en œnologie	31
3.5.4 Application de la cartographie de QTLs à la sélection assistée par marqueur	32

CHAPITRE 1 : MISE EN PLACE D'UNE MÉTHODE DE FERMENTATION STANDARDISÉE POUR ÉVALUER LES CARACTÈRES QUANTITATIFS DES SOUCHES DE *S. CEREVISIAE* DANS DES CONDITIONS CŒNOLOGIQUES..... 33

1	ÉTUDE PRÉLIMINAIRE : ÉLÉMENTS DE MÉTHODE	34
1.1	<i>Problématique</i>	34
1.2	<i>Mise au point d'une méthode de phénotypage des levures œnologiques à large échelle</i>	35
1.2.1	Mise au point d'un nouveau type de micro-fermenteurs	35
1.2.2	Caractères étudiés.....	35
1.2.3	Mise en place d'un protocole de dosage.....	38
1.2.4	« Gestion » des levains.....	40
1.3	<i>Étude des facteurs environnementaux générant des réponses phénotypiques divergentes</i>	41
1.3.1	Problématique.....	41
1.3.2	Influence de la composition en nutriment du moût.....	41
1.3.3	Influence des paramètres physiques.....	43
1.4	<i>Conclusion</i>	46
2	PRINCIPAUX RÉSULTATS (ARTICLE 1)	47

WINE YEAST PHENOMICS: A STANDARDIZED FERMENTATION METHOD FOR ASSESSING QUANTITATIVE TRAITS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRAINS IN ENOLOGICAL CONDITIONS..... 48

ABSTRACT	49
INTRODUCTION	49
MATERIALS AND METHODS	51
<i>Yeast strains and culture media used</i>	51
<i>Grape musts and vessels used and fermentation monitoring</i>	51
<i>Enzymatic assays</i>	53
<i>Apolar esters analysis</i>	53
<i>Dissolved oxygen measurement</i>	53
<i>Statistical analyses</i>	53
RESULTS	54
<i>Optimization of the fermentation protocol in screw capped vials</i>	54
<i>Assessment of genetics x environmental effects</i>	58
<i>Evaluation of technological properties of 35 wine yeast strains in 5 grape juices.</i>	62
DISCUSSION.....	69
<i>A new platform for measuring quantitative traits related to wine fermentation</i>	69
<i>Assessment of some GxE interactions relevant in enology</i>	70
<i>Survey of the fermentation properties of 35 enological strains in five grape musts</i>	72
ACKNOWLEDGMENTS	73
SUPPORTING INFORMATION.....	73
3 REFLEXIONS SUR L'ÉTUDE DE PHENOTYPES CŒNOLOGIQUES A LARGE ECHELLE (ELEMENTS DE DE DISCUSSION)	78

3.1	<i>Des fermentations à large échelle pour mieux étudier les facteurs physicochimiques pertinents en œnologie</i>	78
3.2	<i>Avantages de l'étude des conditions environnementales chez une large population</i>	79
3.3	<i>Discussion sur la pertinence des vials</i>	80

CHAPITRE 2: DISSECTION DES BASES MOLECULAIRES QUI CONTROLENT LA PLASTICITE PHENOTYPIQUE DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE DANS DES JUS DE RAISINS NATURELS..... 81

1	PROBLEMATIQUE	82
2	L'IMPACT DU MATERIEL GENETIQUE	83
2.1	<i>Le choix des souches parentales</i>	83
2.2	<i>Présentation des deux croisements utilisés</i>	83
2.2.1	Construction des descendance	84
2.2.2	Cartes génétiques utilisées.....	84
3	L'IMPACT DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	86
3.1	<i>Pourquoi étudier les interactions entre gène et environnement ?</i>	86
3.2	<i>Dispositif expérimental proposé</i>	87
3.2.1	Effet cépage (GM)	87
3.2.2	L'effet micro-oxygénation (μ -Ox)	88
4	PRINCIPAUX RESULTATS.....	89

DISSECTION OF THE MOLECULAR BASES OF GENETICS X ENVIRONMENTAL INTERACTIONS: A STUDY OF PHENOTYPIC PLASTICITY OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE IN NATURAL GRAPE JUICES. 90

ABSTRACT	91
INTRODUCTION	92
RESULTS	93
<i>Experimental design</i>	93
<i>Genetic and phenotypic relationships of the parental strains</i>	94
<i>Meiotic recombination emphasizes phenotypic novelty whatever the cross tested</i>	97
<i>Distribution of individual reaction norms in segregating populations</i>	100
<i>Genetic architecture of complex traits is explained by a similar number of QTLs</i>	103
<i>QTLxEnvironment interactions shape the phenotypic variability</i>	107
<i>Molecular dissection of GxE interactions</i>	108
DISCUSSION.....	110
<i>Lesson from QTL mapping with divergent wine parental pairs</i>	111
<i>Phenotypic plasticity is the rule and QTL mapping allows capturing its genetic determinism</i>	112
<i>The Ssu1p sulfite pump a protein under balanced selection has pleiotropic effects</i>	113
ACKNOWLEDGMENTS	115
MATERIALS AND METHODS	115
<i>Yeast strains and culture media</i>	115

<i>Fermentations</i>	115
<i>Metabolic compounds</i>	116
<i>Genotyping and marker map construction by high throughput sequencing</i>	117
<i>Microsatellite genotyping</i>	117
<i>Data analyses</i>	118
Estimation of environment, cross and strain effect.....	118
Estimation of the genetic distances within strains.	118
Norm of reaction clustering.....	119
Estimation of heritability, transgression level and phenotypic distance within segregating population	119
QTL mapping.....	119
Principal component analysis.	120
Estimation of the level of QTL interaction	120
SUPPORTING INFORMATION.....	121
5 RESULTATS COMPLEMENTAIRES : IMPACT DE VARIATIONS GENETIQUES NON MENDELIENNES SUR LA DETECTION DE QTL.	129
5.1 <i>Présentation du matériel génétique utilisé</i>	129
5.2 <i>La mitochondrie a-t-elle un effet sur la cinétique fermentaire ?</i>	130
5.2.1 Rappel de la transmission de l'hérédité mitochondriale de <i>S. cerevisiae</i>	130
5.2.2 Cas des hybrides hoSBxGN et SBxGN	130
5.2.3 Effet de la mitochondrie sur les performances fermentaires de <i>S. cerevisiae</i>	131
5.3 <i>Impact du génome mitochondrial sur la cinétique fermentaire</i>	132
5.4 <i>Evènements de recombinaison indépendants entre les 2 hybrides</i>	133
5.5 <i>Impact de facteurs non mendéliens sur l'héritabilité de caractères complexes</i>	135
5.5.1 Différences phénotypiques entre les deux descendance	135
5.6 <i>Le paramètre « croisement », un microenvironnement génétique qui influence la détection de QTL.</i>	
137	
5.6.1 Mise en évidence de l'impact d'un événement de recombinaison sur la production de pyruvate.....	140
5.6.2 Impact de l'ADN-mt sur la vitesse de fermentation	142
5.7 <i>Discussion sur l'impact d'événements génétiques non mendéliens impactant l'expressivité de QTLs dans un contexte quasi-isogénique.</i>	143
5.7.1 Conclusion et perspectives sur la partie variations génétiques non mendéliennes.....	146
CHAPITRE 3 : VALIDATION MOLECULAIRE DE QTLs PLEIOTROPIQUES LIES AU METABOLISME DU SO₂	147
1 VALIDATION MOLECULAIRE DE QTLs IMPLIQUES DANS LA PRODUCTION DE SO₂	148
1.1 <i>Choix des gènes étudiés et stratégie générale</i>	148
1.2 <i>QTLs identifiés pour la production de SO₂</i>	149
1.3 <i>Validation de l'effet de la translocation VIII-t-XVI dans le contexte M2xF15</i>	152
1.4 <i>Le gène MCH1 un nouveau transporteur de sulfites ?</i>	153
1.5 <i>Etude du gène STR2 impliqué dans le métabolisme du soufre</i>	159
1.6 <i>Intégrations des résultats présenté et éléments de discussion</i>	162
1.6.1 Etude de des translocations sur 34 souches dans cinq moûts	162

1.6.2	L'Expulsion du SO ₂ conduit-elle à une modification de l'environnement cellulaire ?	165
2	MATERIEL ET METHODE.....	167
2.1	<i>QTLs dissection</i>	167
2.2	<i>Molecular methods</i>	167
2.2.1	PCR to amplify deletion cassettes to transform	167
2.2.2	PCR to verify amplification	169
2.3	<i>RFLP</i>	170
CHAPITRE 4 : PROJETS ANNEXES		173
1	PROJETS ANNEXES	174
1.1	<i>Identification et validation de QTLs impliqués dans l'adaptation de S. cerevisiae à la seconde fermentation de vins pétillants</i>	174
1.2	<i>Identification de QTLs liés à des mécanismes d'interaction levure-bactérie</i>	175
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		177
1	CONCLUSIONS	178
2	PERSPECTIVES	180
2.1	<i>Repousser les limites de la variabilité génétique du système biparental</i>	180
2.2	<i>La robustesse des QTLs à l'environnement et au fonds génétique</i>	182
2.2.1	Mise en place de la SAM	183
RÉFÉRENCES		184
ANNEXES.....		210

Liste des Figures

Fig 1 Classification phylogénétique des champignons	6
Fig 2 Relation entre les sept espèces naturelles de <i>S. cerevisiae</i> et leur hybrides industriels.....	7
Fig 3 Cycle de vie de <i>S. cerevisiae</i>	10
Fig 4 Diversité génétique de <i>S. cerevisiae</i>	12
Fig 5 Schéma des principales étapes de vinifications (vin rouge)	14
Fig 6 Schéma des étapes enzymatiques de la fermentation alcoolique	16
Fig 7 Représentation schématique du délestage et du remontage	18
Fig 9 État du SO ₂ en fonction du pH	21
Fig 8 Distribution normale d'un caractère quantitatif	25
Fig 9 Schéma d'une analyse de liaison	28
Fig 10 Méthode de validation des QTLs	30
Fig 11 Type des variations causatives identifiées.....	31
Fig 12 Exemple d'une cinétique obtenue et des paramètres cinétiques extraits.....	36
Fig 13 Photo d'un portoir et d'un robot pipeteur	38
Fig 14 Exemple des tests réalisés pour les dosages enzymatiques sur le SO ₂	39
Fig 15 Plan expérimental pour le test de l'effet moût, sucre et azote sur la fermentation de SB et GN.	41
Fig 16 Écart entre les souches SB et GN en fonction des conditions	42
Fig 17 Interactions identifiées	43
Fig 18 Effet du diamètre de l'aiguille sur l'oxygénation du milieu et la cinétique de fermentation.....	45
Fig 19 Surproduction d'acide acétique en condition P10	46
Fig 1 Impact of agitation on fermentation kinetics and metabolic compounds according to the fermented volume.....	55
Fig 2 Trait measurement reliability for both kinetics and metabolite concentrations according to vessel modalities.....	56
Fig 3 Measure and effect of micro-oxygenation in 5 mL SV.....	58
Fig 4 Effect of micro-oxygenation level and grape must on technological properties of wine yeast strains	61
Fig 5 PCA of winemaking properties of 35 strains in 5 grape juices	63
Fig 6 Correlation between traits.....	65
Fig 7 Relative ranking of 35 strains in 5 grape juices	66
Fig 8 Phenotypic variance of 35 strains in five grape juices.....	68

S1 Fig SV setup	73
S2 Fig Oxygen impact on ester production	74
S3 Fig Correlations between traits	75
S4 Fig Comparison of the phenotypic values between robust and non-robust strains according to grape musts.....	76
Fig 20 Les cartes génétiques utilisées pour la détection de QTL.....	85
Fig 21 Effet d'un QTL sans GxE et d'un QTL avec GxE	86
Fig 1 Experimental design.	94
Fig 2 Genetic distance between parental strains.....	96
Fig 3 Phenotypic distribution patterns differs in the two progeny population.	99
Fig 4 Environmental impact on quantitative traits.....	101
Fig 5 Divergent norm of reaction for acetic acid.....	103
Fig 6 Number of QTL identified according to cross or environment condition.....	106
Fig 7 Level of interaction of QTL.....	108
Fig 8 Effect of the XV-t-VXI translocation on phenotypic plasticity	110
S1 Fig Meiosis emphases phenotypic novelty.....	121
S3 Fig Heritability is correlated to the number of QTLs detected.....	122
S5 Fig Impact of QTL XV_M2xF15_26284 on V50_80.....	123
Fig 22 Carte génétique de la mitochondrie de SBxGN	131
Fig 23 Les souches avec le mitotype [ρ^{rec}] ont une vitesse de fermentation plus lente.....	133
Fig 24 L'hybride SBxGN a subi des évènements de recombinaison.....	134
Fig 25 Représentation schématique de l'évènement de recombinaison entre les marqueurs VIII_452058 et VIII_465492.....	135
Fig 26 Différence de production de pyruvate entre les deux descendance.....	136
Fig 27 Nombre de QTLs identifiés	138
Fig 28 Profil d'interaction des QTLs.....	139
Fig 29 Profil d'interaction par trait	140
Fig 30 Double pic identifié pour le pyruvate	141
Fig 31 L'effet du QTL VIII_446336 varie fortement en fonction du croisement	142
Fig 32 Effets des QTLs du SO ₂	151
Fig 33 Effet de SSU1.....	153
Fig 34 Effet pléiotropique de MCH1.....	155
Fig 35 Lod score dans la région génomique de MCH1	156
Fig 36 Effet de P279S sur la structure de <i>MCH1</i>	157
Fig 37 Valeur phénotypique moyenne des souches en fonction de leur génotype pour <i>MCH1</i>	158

Fig 38 Schéma du mode d'action possible de <i>MCH1</i>	159
Fig 39 Voie d'assimilation du sulfate et de synthèse des acides aminés soufrés	160
Fig 40 Effet pléiotropique de <i>STR2</i>	161
Fig 41 LOD score dans la région génomique de <i>STR2</i>	162
Fig 42 SO_2 produit prédit en fonction du génotype	163
Fig 43 Effet des translocations dans cinq goûts	164
Fig 44 Corrélation entre SO_2 et <i>acetic acid</i> pour les hemizygotes réciproques	166
Fig 45 Effet levure sur le déroulement de la fermentation malolactique	176
Fig 46 Distribution des QTLs en fonction de leur effet	181
Fig 47 Croisement utilisant quatre souches parentales	182

Liste des Tableaux

Tableau 1 Gamme de linéarité des échantillons et recovery dans le moût Merlot 2014.....	39
Table 1 - Grape musts composition.....	52
Table 2 Analysis of variance for the 11 phenotypes with 4 strains, 2 musts and 2 micro-oxygenation conditions.....	60
S2 Table Dilution and volume of sample used for robotic enzymatic assay	77
Table 1 LM2 model for the 11 phenotypes with 189 strains and 3 conditions of fermentation.....	102
Table 2 Grape juice used	116
S3 Table LM1 model for the 11 phenotypes with 189 strains and 3 conditions of fermentation	124
S4 Table Phenotypic plasticity at the population level	124
S5 Table List of QTL identified	127
S6 Table Number of QTL and their interaction level.....	128
Tableau 2 Évaluation des recombinaisons mitochondriales sur 48 hybrides isogéniques	132
Tableau 3 Différences entre hoSBxGN et SBxGN	134
Tableau 4 Différence phénotypique entre les deux descendancees	136
Tableau 5 Liste des QTLs identifiés pour le SO ₂	149
Tableau 6 Résultats de l'ANOVA pour les deux descendancees.	150

Vue d'ensemble du projet

Le travail présenté ici en vue de l'obtention du grade de docteur en biologie-santé de l'université de Bordeaux a été effectué pendant trois ans entre janvier 2015 et décembre 2017. Il s'est déroulé dans l'unité de recherche Œnologie de l'institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), plus précisément au sein de l'équipe de microbiologie. L'étude de la variabilité technologique intra et interspécifiques des micro-organismes du vin fait partie des champs d'investigation de cette équipe. Parmi les différents axes de recherche développés, des approches de génétique quantitative, de génétique fonctionnelle et de génomique visent à mieux comprendre le déterminisme génétique des levures de vinification).

Ce travail a été financé par la société Biolaffort dans le cadre d'une convention industrielle de formation par la recherche (CIFRE). Les objectifs de cette thèse s'inscrivent dans le projet de transfert de technologie SéSAM (Séquençage et Sélection Assistée par Marqueur) financé par la région Aquitaine. L'objectif général du projet SéSAM est de promouvoir l'utilisation de la sélection assistée par marqueurs (SAM) pour le développement de nouvelles levures œnologiques. La mise en place d'une telle stratégie nécessite en premier lieu de disposer de nombreux marqueurs génétiques contrôlant des caractères d'intérêt.

Dans ce contexte, le **premier objectif** de ma thèse est l'identification et la validation de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) liés aux propriétés technologiques des levures œnologiques. Dans ce travail, des caractères basiques ont été étudiés tels que le rendement sucre/éthanol de la fermentation, la cinétique fermentaire et le bilan des principaux métabolites de la levure que sont le SO₂, l'acide acétique et l'acide malique. Le **second objectif** de ma thèse est d'étudier les causes génétiques qui expliquent pourquoi les levures œnologiques ne présentent pas toujours la même réponse phénotypique (ou plasticité phénotypique) aux conditions extérieures ; on parle alors de normes de réaction non parallèles. Ce type de variation est expliqué par des variations génétiques dont les effets varient en fonction de l'environnement. Pour la levure œnologique, l'évaluation du niveau d'interaction d'un QTL avec l'environnement est importante et permettra leur exploitation dans des programmes de sélection. En effet, un allèle avec un effet constitutif, quelle que soit la condition environnementale dans laquelle il s'exprime, est un bon candidat pour l'amélioration globale de la performance d'une souche. D'autre part, comprendre pourquoi certains allèles ne permettent pas l'expression désirée d'un caractère dans certaines conditions peut apporter un éclairage physiologique sur le défaut de certaines souches.

La présentation de ces travaux se fera selon un plan classique d'une thèse dite sur article. En plus d'un état des connaissances et d'une conclusion générale, ce mémoire présente trois articles rédigés en anglais dont un a été publié en 2017 et un second est en cours de révision. Un quatrième volet présente des résultats préliminaires qui devront être poursuivis pour aboutir à un article scientifique.

L'approche que nous avons choisie pour répondre aux objectifs fixés est l'utilisation de deux descendance issues de deux croisements distincts (M2xF15 et SBxGN). Ces populations (en tout 270 individus) ont été précédemment génotypées par séquençage, permettant une cartographie de QTLs optimale. Dans ce travail, la mesure de nouveaux phénotypes a été réalisée dans trois conditions environnementales simulant des conditions œnologiques différentes. Le dispositif expérimental permet ainsi d'identifier de nouveaux QTLs et d'estimer leur niveau d'interaction face aux variations environnementales testées. La cartographie réalisée sur deux descendance indépendantes a permis l'élargissement de la variabilité génétique considérée. Cette recherche double a fait émerger des questions supplémentaires sur l'impact du choix des souches parentales sur la détection de QTLs.

Le plan expérimental choisi pour la cartographie de QTLs nécessite le phénotypage d'environ 270 individus dans trois conditions environnementales avec deux répétitions, soit 1620 fermentations. Pour pouvoir effectuer un tel travail en moins d'un an, il était nécessaire de changer d'échelle dans les capacités de phénotypage dont nous disposons au laboratoire. Ainsi, la première étape de ma thèse a été le développement d'une méthode de fermentation standardisée, permettant le débit d'analyse souhaité. Les résultats associés à ce travail sont présentés dans le **chapitre 1 : Mise en place d'une méthode de fermentation standardisée pour évaluer les caractères quantitatifs des souches de *S. cerevisiae* dans des conditions œnologiques**. Dans ce premier chapitre, la problématique est remise dans son contexte et des éléments techniques liés au développement de la méthode sont détaillés. Au cours de ce développement, l'effet de différents paramètres environnementaux (sucre, azote, agitation, moût...) sur la réponse phénotypique des souches a été testé, permettant de sélectionner trois conditions pour la cartographie de QTLs. Le cœur de ce chapitre est constitué d'un article scientifique « *Wine yeast phenomics: a standardized fermentation method for assessing quantitative traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains in enological conditions* » soumis à la revue PLOS ONE et en cours de révision. Cet article illustre l'utilité de la méthode développée en évaluant sa fiabilité et en analysant le comportement phénotypique de 35 souches œnologiques dans cinq moûts. Cette étude resitue le profil des souches parentales dans un contexte œnologique assez vaste (35 souches, 5 moûts différents).

Le **chapitre 2** constitue le cœur de cet ouvrage. Il est intitulé: **Dissection des bases moléculaires qui contrôlent la plasticité phénotypique de *Saccharomyces cerevisiae* dans des jus de raisins naturels**.

La méthode de fermentation mise en place a été utilisée afin de phénotyper les deux descendances et effectuer la cartographie de QTLs. Dans une partie introductive, le dispositif expérimental est détaillé et discuté en regard des principaux paramètres qui influencent la cartographie de QTLs. Au cours de ce chapitre onze caractères quantitatifs ont été étudiés, permettant la détection de 132 QTLs. Dans un article intitulé « *Dissection of the molecular bases of genetics x environmental interactions: a study of phenotypic plasticity of *Saccharomyces cerevisiae* in natural grape juices* » l'accent est mis sur les QTLs qui contrôlent la plasticité phénotypique et sur l'impact des fonds génétiques utilisés. Notre dispositif expérimental nous a également permis de réaliser une cartographie de QTLs à partir d'hybrides quasiment isogéniques (hoSBxGN et SBxGN) se distinguant par des phénomènes génétiques non mendéliens tels que la ploïdie, la nature du génome mitochondrial et quelques réarrangements chromosomiques. Les résultats obtenus montrent que ces facteurs façonnent un "microenvironnement" génétique qui influence fortement la détection de QTLs. L'étude de ces données constitue la troisième partie de ce chapitre.

Le dernier volet présenté est la validation moléculaire de certains des QTLs identifiés. Certains de ces résultats sont présentés dans le **chapitre 3 : Validation moléculaire de QTLs pléiotropiques liés au métabolisme du SO₂**. L'effet de trois variations alléliques a été validé et leurs répercussions pléiotropiques sur la physiologie des levures en relation avec le SO₂ sont discutées.

Au cours de ma thèse j'ai eu l'occasion de participer à deux projets annexes. Ils sont détaillés brièvement dans le **chapitre 4 : Projets annexes**. Le premier a donné lieu à un article intitulé « *Genetic causes of phenotypic adaptation to the second fermentation of sparkling wines in *Saccharomyces cerevisiae** ». Il présente un travail de cartographie mettant en évidence les causes génétiques d'un phénomène d'hétérosis. L'autre projet s'intéresse aux interactions levures bactéries et sera brièvement présenté.

L'ensemble de ce travail et de ses perspectives seront discutés dans une conclusion générale.

État des connaissances

1 La levure *Saccharomyces cerevisiae*

1.1 Généralités taxonomiques

Les individus étudiés au cours de cette thèse appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, un eucaryote unicellulaire qui fait partie du règne des *champignons*. Il est assimilé à l'ensemble polyphylétique des levures qui englobe les champignons unicellulaires pouvant effectuer la fermentation de matières organiques animales ou végétales. L'espèce *Saccharomyces cerevisiae* appartient à l'embranchement des ascomycètes qui sont caractérisés par la formation de spores (Hibbett et al., 2007). Ce vaste embranchement contient la classe des *Saccharomycetes* (anciennement *Hemiascomycetes*) qui a fait l'objet de nombreuses études de génomique comparative (Dujon, 2006) (Fig 1). Le genre *Saccharomyces* est certainement le plus étudié de cette classe et a fait l'objet de nombreuses études génétiques (pour revue voir (Albertin and Marullo, 2012; Dujon, 2010; Hittinger, 2013)). Constitué d'au moins sept espèces distinctes (Fig 2), il est caractérisé par la formation de nombreux hybrides interspécifiques présentant des caractéristiques phénotypiques particulières (Morales and Dujon, 2012).

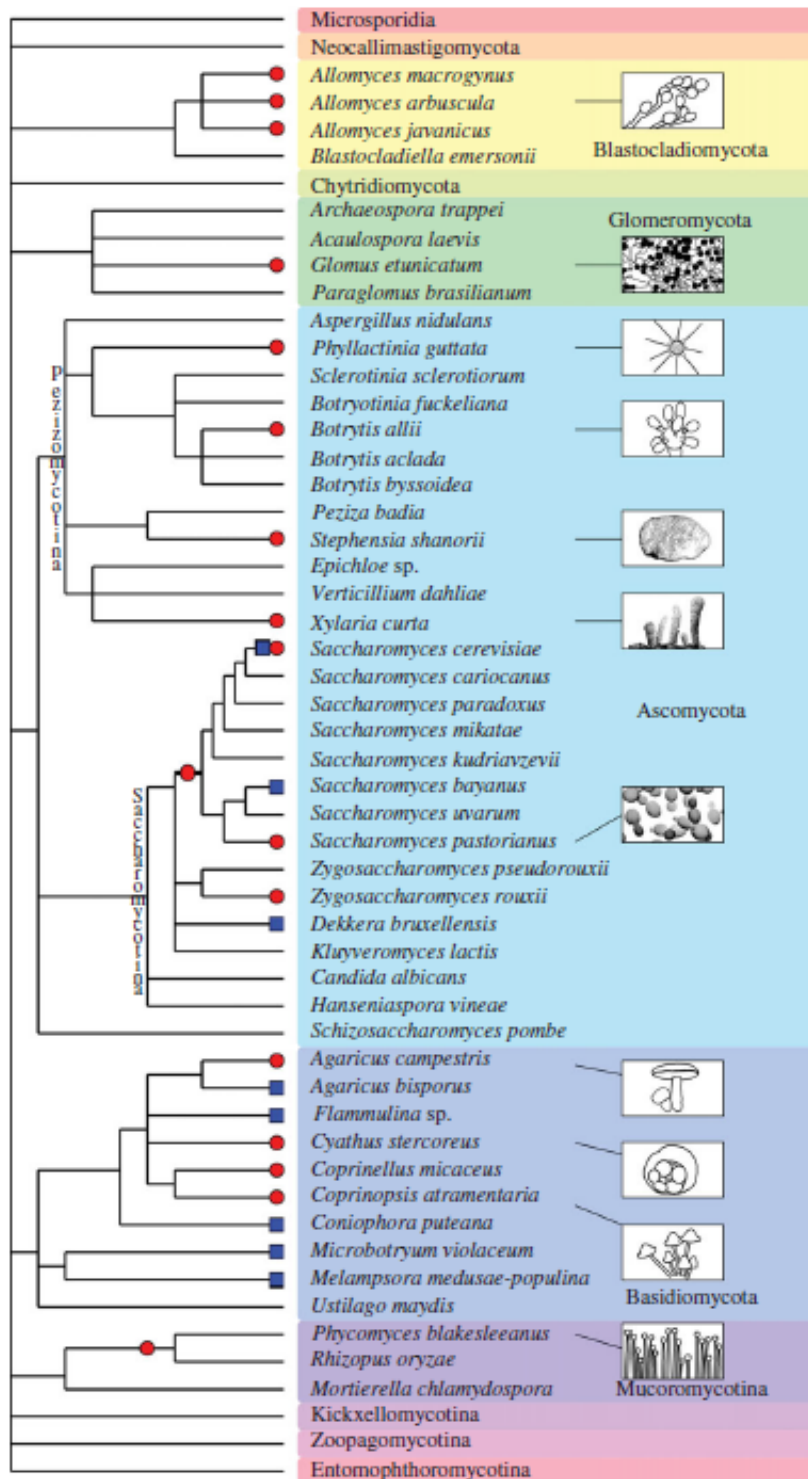


Fig 1 Classification phylogénétique des champignons

Figure d’après (Albertin and Marullo, 2012). Représentation schématique de la classification phylogénétique des champignons. Les ronds rouges indiquent des polypléidies suspectées, les carrés bleus des lignés avec des individus qui ont des origines hybrides.

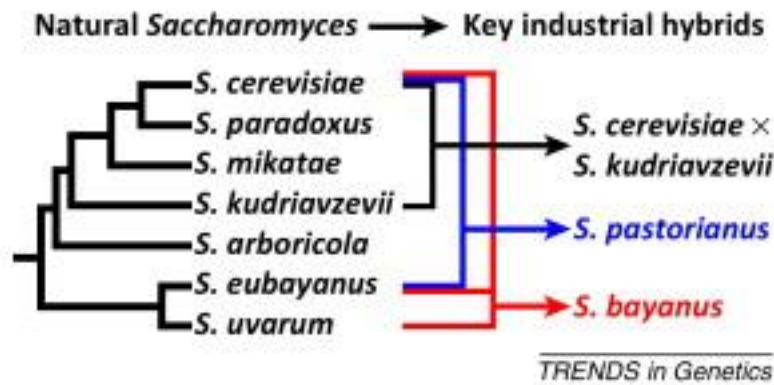


Fig 2 Relation entre les sept espèces naturelles de *S. cerevisiae* et leur hybrides industriels

Figure d'après (Hittinger, 2013).

L'espèce *Saccharomyces cerevisiae* possède de nombreuses niches écologiques. Dans la nature, elle est isolée sur les exsudats d'arbres, les fruits fermentés (Goddard and Greig, 2015) et les insectes (Stefanini et al., 2012). Cette espèce est également associée à un grand nombre de produits de fermentation dont la panification, la vinification et le brassage de la bière (Sicard and Legras, 2011). Pour la facilité de lecture de cet ouvrage, le terme de levure sera à partir de maintenant utilisé pour désigner l'espèce *S. cerevisiae*. Sa domestication est ancienne puisque la première preuve de production par l'homme d'une boisson fermentée remonte au septième millénaire avant Jésus-Christ (McGovern et al., 2004) et la première trace de son implication dans ce processus remonte au troisième millénaire avant Jésus-Christ (Cavalieri et al., 2003). Si l'utilisation de la levure à cette époque était inconsciente, la découverte de son implication dans le processus de la fermentation par Louis Pasteur a entraîné l'essor de son utilisation industrielle.

1.2 La levure un organisme à la fois modèle et outil.

1.2.1 La levure et la production de boissons fermentées

En effectuant la fermentation alcoolique (FA), la levure est capable de convertir du sucre en éthanol et CO₂. La fermentation est un moyen efficace de préserver la qualité et la sécurité des boissons et aliments. Elle est notamment utilisée dans l'industrie pour la production de boissons fermentées telles que la bière, le vin et le saké (Sicard and Legras, 2011). Les procédés dans lesquels elle est impliquée sont variés et nécessitent des spécificités technologiques. Aujourd'hui, des souches de *S. cerevisiae* sont sélectionnées en fonction de leurs caractéristiques, sont produites en condition industrielle et sont utilisées pour inoculer des milieux à fermenter (Deak, 2009).

1.2.2 La levure comme modèle génétique et cellulaire

Certainement grâce à son implication dans les activités agroalimentaires, *S. cerevisiae* a été l'un des organismes modèle le plus utilisé en génétique et en biologie cellulaire (Botstein, Chervitz, and Cherry 1997; Botstein and Fink 2011). Bien que l'occurrence de ces citations dans les moteurs de recherche stagne depuis une dizaine d'année, la levure demeure un modèle d'étude de choix. Elle offre l'avantage d'être facilement cultivable en laboratoire avec un temps de génération court. Sa nature unicellulaire a été avantageusement utilisée pour l'étude des principaux mécanismes cellulaires qui sont conservés à travers les eucaryotes (cycle cellulaire, organisation du cytosquelette, transcription, autophagie, etc.) (Botstein and Fink, 2011). L'espèce *S. cerevisiae* a également contribué à l'essor de la génomique fonctionnelle. Premier génome eucaryote entièrement séquencé (Goffeau et al., 1996), la levure est devenue à partir des années 2000 une plateforme expérimentale de génétique très puissante. En premier lieu, la création de diverses collections de souches a permis d'élucider la fonction de nombreux mécanismes cellulaires. Citons ici la délétion systématique de chacun de ses gènes (Giaever et al., 2002) ou leur fusion avec une *green fluorescent protein* (GFP) (Huh et al., 2003). L'étude de l'interaction des gènes par construction de synthétiques létaux (Tong et al., 2004) ou par la fixation systématique de chacun de ses gènes avec des épitopes pour précipiter les protéines qui interagissent physiquement (Krogan et al., 2006) a ouvert de nouvelles perspectives dans l'étude systématique de l'épistasie.

La relative petite taille de son génome (12 Mpb) a favorisé son utilisation comme organisme modèle pour le développement de nouvelles méthodes à haut débit telles que la génomique, la transcriptomique, la protéomique ou la métabolomique (Botstein and Fink, 2011; Schoolnik, 2001; Ward and Fraser, 2005). Enfin, l'aptitude de cette espèce à se reproduire de façon sexuée au laboratoire a favorisé le développement d'outils génétiques classiques (Botstein et al., 1997). La possibilité de générer des hybrides et d'obtenir une vaste descendance explique aussi pourquoi *S. cerevisiae* est parvenue à s'imposer comme un organisme modèle pour la génétique quantitative (Brem et al., 2002; Steinmetz et al., 2002; Yvert et al., 2003) (voir partie 3 de cet état des connaissances).

1.2.3 La levure un outil biotechnologique

Plus récemment, la levure a aussi été utilisée dans l'industrie du bioéthanol et dans la production de composés hétérologues comme l'insuline, les vaccins de l'hépatite ou du papillomavirus (Graf et al., 2009; Hou et al., 2012). Elle combine les avantages d'une manipulation génétique simple, d'une capacité de production élevée, d'une croissance rapide sur des sources de carbones relativement bon marché, d'être capable de sécréter les protéines et de les modifier selon le mode eucaryote (Hou et al., 2012; Idiris et al., 2010). Parmi les levures, *S. cerevisiae* est de loin la plus utilisée au monde pour la production de composés hétérologues (Steensels et al., 2014). Le génie génétique et la biologie

synthétique a permis l'amélioration des rendements de production avec la création de souches spécialisées (Jensen and Keasling, 2015). La synthèse totale d'un chromosome fonctionnel de levure a récemment été réalisée (Annaluru et al., 2014) et laisse entrevoir la possibilité future de synthétiser à façon un génome entier en combinant des centaines de gènes pour la création d'une plateforme de production de nouvelles drogues, produits chimiques ou biomatériaux (Jovicevic et al., 2014).

1.3 Cycle de vie

S. cerevisiae a un cycle de vie haplodiplobiontique. Cela signifie qu'elle peut se développer sous forme diploïde et haploïde (Fig 3). En condition de croissance favorable, elle se multiplie de manière végétative (par mitose). En condition de croissance défavorable, les cellules diploïdes peuvent effectuer une méiose qui entraîne la formation de 4 spores haploïdes regroupées sous forme d'une tétrade dans un asque. Ces spores peuvent survivre durant une longue période à des conditions défavorables et germer par la suite.

S. cerevisiae possède deux signes sexuels qui sont dénommés *MAT α* et *MATa*. Deux cellules haploïdes de signes sexuels opposés peuvent se croiser pour former une cellule diploïde qui sera par définition de signe *MATa/MAT α* . Pour favoriser les croisements, la levure dispose d'un système de phéromones qui diffusent dans le milieu et sont détectés par les cellules de signe sexuel opposé (Reed, 1991). Les cellules se développent vers le gradient de phéromone émanant d'un partenaire potentiel. A chaque mitose, une cellule haploïde présente environ une chance sur deux de changer de signe sexuel. Ce mécanisme très fréquemment rencontré chez les champignons (Dyer and O'Gorman, 2012) est connu sous le nom de homothallisme. L'espèce *S. cerevisiae* est majoritairement homothallique : lorsqu'une souche haploïde se croise avec sa cellule fille (suite à un changement de signe sexuel) elle devient diploïde et totalement homozygote. Ce mécanisme, connu sous le terme de *genome renewal*, serait sur le plan de l'adaptation un moyen d'éliminer rapidement des mutations délétères en les exposant à la sélection naturelle (Mortimer et al., 1994).

Le changement de signe sexuel est effectué par la protéine codée par le gène *HO* (Haber 2012; Butler et al. 2004). Lorsque le gène *HO* n'est pas fonctionnel (génotype *ho*), la souche qui porte cet allèle ne change pas de signe sexuel à chaque mitose. Elle est dite hétérothallique car elle ne peut plus se croiser avec sa cellule fille. C'est le cas de la plupart des souches de laboratoire (Meiron et al., 1995). Une construction génétique entraînant la disruption du locus *HO* permet donc de contrôler le signe sexuel de la levure en conservant des lignées haploïdes stables. Cette particularité a permis l'émergence d'une génétique « facile » entraînant la maîtrise les croisements au laboratoire. Il faut cependant garder à l'esprit que si des clones haploïdes peuvent être cultivés, ils ne correspondent pas à l'état physiologique « normal » des levures.

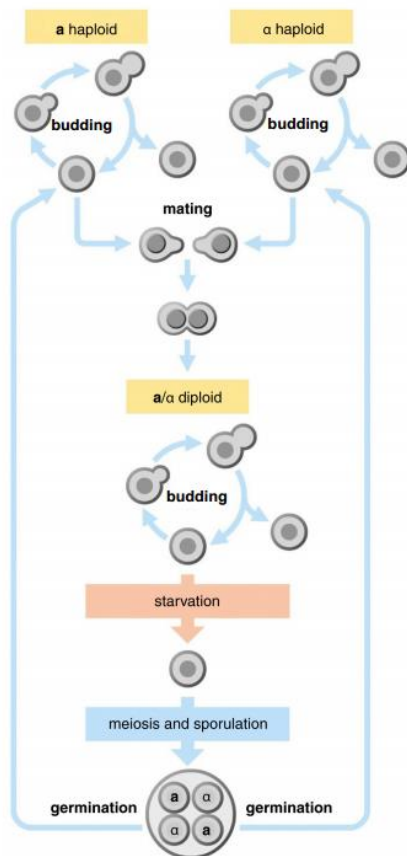


Fig 3 Cycle de vie de *S. cerevisiae*
Figure adaptée de (Sun and Heitman, 2011).

1.4 Éléments de génétique des populations chez *S. cerevisiae*

L'étude de la structure de la population de *S. cerevisiae* a permis de mieux comprendre son histoire évolutive, sa domestication et son écologie. Le séquençage du premier génome eucaryote pour la souche de référence S288c (Goffeau et al., 1996) a servi de point de départ pour étudier la variabilité génétique de cette espèce. Dans un premier temps, la variabilité génétique a été étudiée en comparant des portions restreintes du génome (Fay and Benavides 2005; Ezov et al. 2006; Legras et al. 2007; Goddard et al. 2010; Cromie et al. 2013), puis l'avènement des technologies de séquençage à haut débit a permis la comparaison de génomes entiers (Liti et al. 2009; Schacherer et al. 2009; Almeida et al. 2015; Strobe et al. 2015; Borneman et al. 2016; Gallone et al. 2016; Coi et al. 2017; Wang et al. 2012). La diversité génétique de cette espèce est désormais estimée à partir d'une centaine de souches isolées depuis un grand nombre de substrats : vin, saké, fève de cacao, olives de table, levain de boulangerie, levure de voile, isolats naturels et patients infectés et provenant de différentes zones géographiques. Prochainement, cette masse de donnée sera multipliée par 10 puisqu'un nombre

encore plus important de souches est actuellement à l'étude (<http://1002genomes.u-strasbg.fr/index.html>).

Les analyses phylogénétiques basées sur la divergence nucléotidique de cette espèce ($\pi \sim 5.10^{-3}$) ont permis l'identification de groupes génétiques distincts au sein de la population de *S. cerevisiae*. Ces groupes discriminent principalement les souches en fonction de leur origine géographique (Européenne, Amérique du Nord, Asiatique, Africaine de l'Ouest) (Fig 4). Une exception claire à cette répartition géographique concerne les souches de vin qui sont apparentées aux souches européennes bien qu'elles soient isolées dans des régions diverses de la planète (Cromie et al., 2013). Contrairement aux isolats naturels, les souches du vignoble sont génétiquement similaires. Cette structure suggère donc une origine ancestrale européenne liée à la vigne ou aux pratiques œnologiques. Elles auraient été par la suite dispersées à travers la planète en suivant la migration humaine (Fay and Benavides 2005; Legras et al. 2007; Liti et al. 2009; Goddard et al. 2010). Cette hypothèse est partagée chez d'autres espèces de levures montrant des signes de domestication tels que tel que *Torulaspora delbrueckii* (Albertin et al., 2014). Cette structure est également marquée pour d'autres types de biotopes telles que les souches de bière (Gallone et al., 2016). A une échelle moins grande, et avec un nombre de souches plus restreint, d'autres groupes génétiques constitués de souches isolées sur des substrats associés aux activités humaines se distinguent des souches d'isolats naturels, c'est le cas des souches de saké, de vin de palme, de fermentation de fèves de cacao de café et d'olive de table (Ludlow et al. 2016; Cromie et al. 2013). La comparaison de la variabilité génétique entre les souches domestiquées (en particulier celle de vin et de bière) et les souches naturelles révèle que les lignées les plus anciennes présentant la plus grande variabilité génétique sont des souches isolées dans des biotopes naturels alors que les souches domestiquées abritent moins de diversité (Fay and Benavides, 2005; Gallone et al., 2016). Ce constat est en accord avec l'hypothèse d'une origine naturelle de l'espèce *S. cerevisiae* suivie par une domestication humaine. Il a récemment été proposé une théorie légèrement différente présentant la levure comme un organisme « nomade » pouvant s'adapter à de nombreuses niches de façon rapide (Goddard and Greig, 2015).

Neighbor-joining tree of the 262 *S. cerevisiae* strains based on multiple alignments of 116,880 bases.

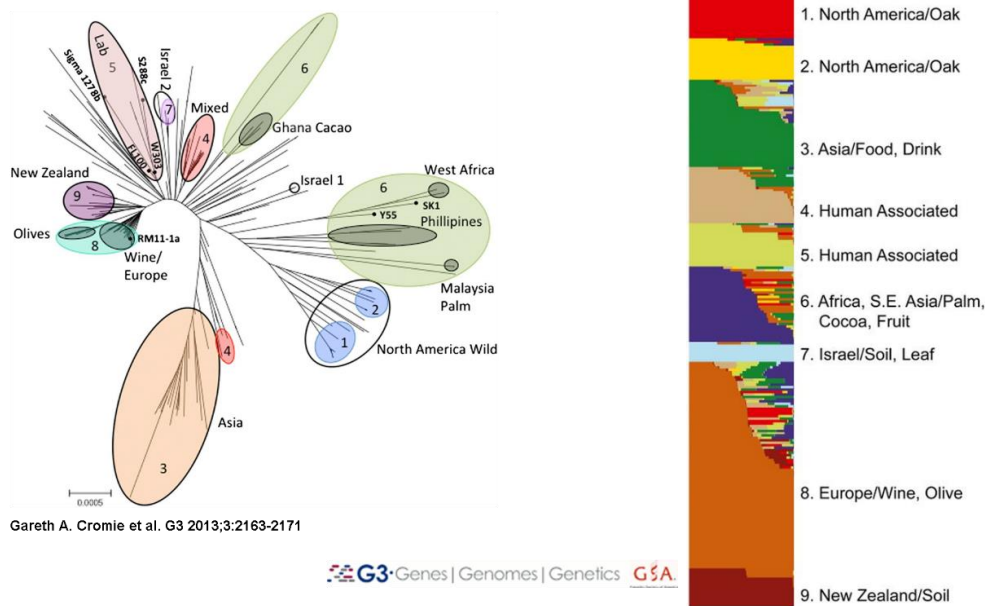


Fig 4 Diversité génétique de *S. cerevisiae*

A droite, *Neighbor-joining tree* de 262 souches de *S. cerevisiae*. A gauche, Structure de la population (Cromie et al., 2013).

De manière intéressante, un lien certain a pu être tissé entre les principaux groupes génétiques de *S. cerevisiae* et leurs caractéristiques phénotypiques. En effet, le comportement phénotypique général des souches appartenant au même groupe génétique est similaire. Par exemple, des souches du groupe Afrique de l'Ouest se distinguent par une plus faible utilisation du galactose et une sensibilité accrue à la température (Warringer et al., 2011). Les souches du groupe Asia/Palm se distinguent par leur capacité à métaboliser le mélibiose. De leur côté, les souches du groupe Européen/Vin et les souches de saké ont une résistance accrue au cuivre grâce à des événements indépendants d'amplification en tandem de *CUP1*, qui code une protéine qui fixe le cuivre (Fogel and Welch 1982; Warringer et al. 2011). Cette amplification exclusive à ces deux groupes génétiques illustre un cas d'évolution convergente due à la sélection dirigée par l'homme pour la production industrielle.

2 Présentation des principales étapes du processus de vinification et implication des levures œnologiques (*S. cerevisiae*)

2.1 Rappels élémentaires sur la vinification

Le vin est défini par l'Organisation Internationale de la vigne et du Vin comme étant exclusivement la boisson résultant de la fermentation alcoolique complète ou partielle du raisin frais, foulé ou non, ou du moût de raisin. Son titre alcoométrique acquis ne peut être inférieur à 8,5 % vol (<http://www.oiv.int/fr/>).

2.1.1 Le raisin du vin

Le raisin utilisé en œnologie provient essentiellement de l'espèce *Vitis vinifera*, au sein de laquelle plusieurs cépages ou cultivars se distinguent par des caractéristiques biochimiques qui assurent la typicité du produit final (Ribéreau-Gayon et al. 2006a). Leur utilisation varie en fonction des habitudes culturelles, des contraintes climatiques et du type de vin souhaité. Les cépages les plus utilisés dans le monde pour la vinification sont le Cabernet-Sauvignon, le Merlot Noir, le Airen Blanc, le Tempranillo Noir et le Chardonnay Blanc ("Wine Economics Research Centre | Databases," n.d.). Leur principale différence réside dans la couleur de la baie qui est liée à leur concentration en anthocyanes distinguant les cépages blancs et rouges. Cependant, de très nombreuses autres spécificités ampélogiques ou biochimiques caractérisent les cépages. Citons par exemple la date de maturité, la teneur en tannins ou la teneur en précurseurs variétaux qui confèrent aux vins leur typicité. Lorsqu'il parvient à maturité, le raisin est vendangé ce qui constitue la première étape du processus de la vinification (qui est schématisé dans la Fig 5).



Fig 5 Schéma des principales étapes de vinifications (vin rouge)

2.1.2 Opérations pré-fermentaires

Après avoir été égrappée afin de ne recueillir que les baies, la vendange va subir une étape de foulage et/ou de pressurage afin de faire éclater les grains et de recueillir le jus. Pour la production de vin blanc, le pressurage est effectué avant la fermentation. C'est le contact prolongé du moût avec les pellicules du raisin qui participe à sa coloration et distingue ces deux types de vins. A cette étape, de nombreux traitements pré-fermentaires peuvent être appliqués en fonction des itinéraires de vinification (mise sous atmosphère inerte, stabulation à froid, macération carbonique, etc.) (Ribéreau-Gayon et al. 2006a). De manière assez générale, le moût est sulfité avec l'ajout de dioxyde de soufre (SO_2) dont la valeur légale limite haute est de 260 mg. L^{-1} selon les types de vins produits. En pratique, ce composé est introduit à des doses bien plus faibles à cause de sa forte toxicité. Cependant son utilisation est très souvent requise car elle permet d'éviter l'oxydation du moût et limite la croissance d'une partie des microorganismes indigènes (Divol et al., 2012; Henick-Kling et al., 1998).

2.1.3 La fermentation alcoolique

L'étape suivante est la fermentation alcoolique. C'est une étape essentielle de la vinification au cours de laquelle le moût est transformé en vin sous l'action des levures. La population de microorganismes présents sur la baie de raisin est complexe et changeante au moment de sa récolte (Barata et al., 2012; Martins et al., 2014; Mortimer and Polsinelli, 1999). Elle est composée de nombreuses espèces de levures et de bactéries et parfois d'une quantité importante de champignons filamenteux lorsque la grappe est touchée par la pourriture. Parmi ces micro-organismes, *S. cerevisiae* est parfois présente, cependant sa population est largement minoritaire (R. Mortimer and Polsinelli 1999). A la suite du foulage ou du pressurage, l'augmentation de la pression osmotique va considérablement favoriser cette levure qui, contrairement à de nombreuses autres espèces, peut se développer rapidement dans des concentrations en sucres supérieures à 200 g.L⁻¹. La levure *S. cerevisiae* est de loin l'espèce la plus performante pour l'accomplissement de cette étape (Beltran et al., 2002; Heard and Fleet, 1988; Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Torija et al., 2001).

La fermentation alcoolique consiste en la transformation du sucre (glucose et fructose) en éthanol et dioxyde de carbone (CO₂). Une représentation schématique de la réaction est présentée dans la Fig 6. La levure métabolise le glucose et le fructose à travers la glycolyse pour former du pyruvate. Cette réaction commune à de très nombreux organismes conduit à la formation de deux molécules d'ATP et fourni la principale source d'énergie dans ces conditions (Faria-Oliveira et al., 2013). En effet, *Saccharomyces cerevisiae* étant une levure dite Cabtree positive (Pronk et al., 1996), elle ne peut respirer en présence d'importantes quantités de sucre. Afin de régénérer les cofacteurs nécessaires à la poursuite de la réaction, le pyruvate produit lors de la glycolyse doit alors être décarboxylé par l'intermédiaire de la pyruvate décarboxylase pour former de l'acétaldéhyde qui est ensuite réduit en éthanol par l'alcool déshydrogénase. L'éthanol et le CO₂ sont relâchés dans le milieu de fermentation.

A cause de la présence quasi systématique de levures sur la vendange, la fermentation alcoolique d'un moût démarre sans inoculation volontaire, elle est alors dite spontanée. Les fermentations spontanées sont souvent le fait de plusieurs espèces et de souches de levures différentes. Cette action conjointe peut apporter une certaine complexité organoleptique (Albertin et al., 2017) mais peut parfois conduire à des déviances organoleptiques et à des fermentations languissantes (Ribéreau-Gayon et al. 2006a). Afin de mieux contrôler les fermentations, les cuves de vinification sont majoritairement inoculées avec des levains industriels. Au cours de la fermentation alcoolique, le métabolisme de la levure va profondément modifier la composition chimique du jus de raisin pour aboutir à celle du vin. L'impact des métabolites secondaires et des transformations biochimiques des levures sur la composante aromatique des vins a été largement décrite dans la littérature (Rainieri and Pretorius

2000; Philippe Marullo and Dubourdiou 2010; Ribéreau-Gayon et al. 2006a). Celui-ci sera rapidement évoqué dans les paragraphes suivants.

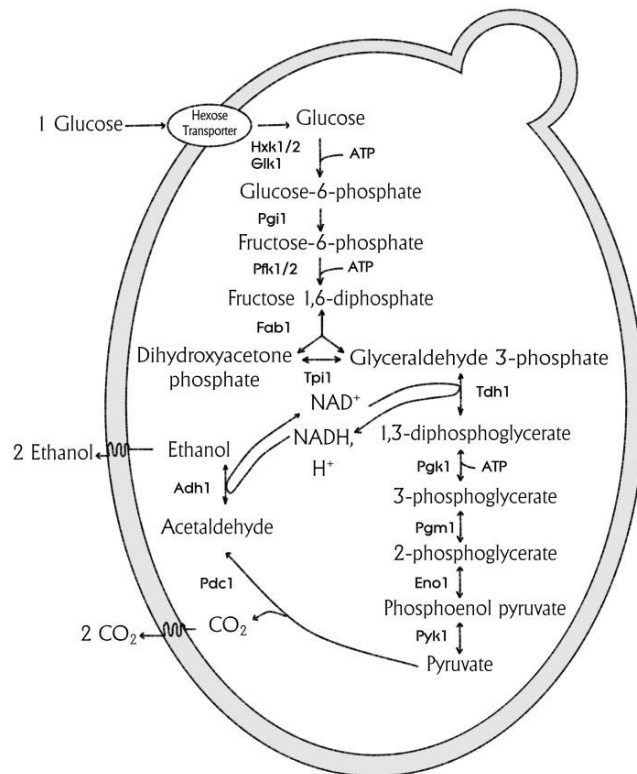


Fig 6 Schéma des étapes enzymatiques de la fermentation alcoolique
Figure d'après (Faria-Oliveira et al., 2013)

2.1.4 Pilotage de la fermentation alcoolique

Le contrôle de la fermentation est un enjeu majeur en œnologie. La fermentation doit être rapide et complète en ne laissant aucun sucre résiduel (sauf pour le cas des vins moelleux). Ces caractéristiques optimales limitent le développement d'autres micro-organismes dont les répercussions sur la qualité du vin peuvent être défavorables. Les types de problèmes rencontrés sont (1) des fermentations lentes tout au long de la fermentation, (2) des fermentations avec une chute brutale de la vitesse de fermentation vers la fin de fermentation (fermentations languissantes) et (3) des fermentations bloquées qui laissent du sucre résiduel (Bateyron and Sablayrolles 2001). Le vinificateur dispose de trois principaux leviers permettant de contrôler le succès de cette étape cruciale. (i) Le contrôle de la température, (ii) le contrôle de la nutrition des levures et de la turbidité du moût et (iii) l'apport d'oxygène. En plus d'impacter directement le bon déroulement de la fermentation, ces actions ont un

effet conséquent sur les qualités organoleptiques du produit fini (Rollero et al., 2014; du Toit et al., 2006).

Le contrôle de la température est certainement le paramètre le plus simple. En œnologie la plage de température varie habituellement entre 13 °C et 30 °C. Les vins blancs sont généralement fermentés à des températures inférieures à 22 °C pour préserver leur potentiel aromatique (Masneuf-Pomarède et al., 2006; Molina et al., 2007; Torija et al., 2003). En revanche, les raisins rouges sont fermentés à des températures supérieures afin de favoriser l'extraction des composés phénoliques (Marullo et al., 2009; Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Il existe un lien direct et prédictible entre la vitesse de fermentation et la température (Bely et al., 1990; Colombié et al., 2005). Cependant, lorsque celle-ci est trop importante le risque d'arrêt de fermentation est augmenté. Ce risque dépend fortement de la souche de levure utilisée (Marullo et al., 2009).

L'étude des facteurs nutritifs des levures en condition œnologique est complexe à résumer (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Nous ne citerons ici que les facteurs que le vinificateur est autorisé à contrôler. C'est la concentration en azote assimilable qui est le facteur le plus important. En deçà d'un certain seuil (environ 140 mgN.L⁻¹), les moûts sont considérés comme carencés en azote et des arrêts prématurés de fermentation risquent de survenir (Bely et al., 1990; Blateyron and Sablayrolles, 2001; Gutiérrez et al., 2012; Julien et al., 2000). Un apport d'azote permet de palier à ces carences. Il peut être réalisé en un ou deux ajouts selon le type de vinification et la teneur en sucre du moût (Bely et al., 2003). Ce complément azoté est généralement administré sous forme d'azote ammoniacal, cependant des dérivés de levures agissant comme adjuvants nutritionnels sont également autorisés et permettent d'apporter une dose modérée d'azote dit organique (acides aminés). Comme pour la température, l'impact du fonds génétique sur les besoins azotés est très important. Bien que phototrophes pour la plupart des vitamines et acides aminés, les levures peuvent être affectées par des limitations en biotine ou en thiamine (Bisson, 1999; Bohlscheid et al., 2007; Ribéreau-Gayon et al., 2006b). La législation autorise un apport en thiamine pour palier à ces carences.

Le dernier volet du contrôle de la cinétique fermentaire par l'œnologue concerne la micro-oxygénation. La présence d'oxygène moléculaire dans le moût joue un rôle important durant la fermentation alcoolique. En condition anaérobie la synthèse lipidique des levures est affectée (Fornairon-Bonnefond et al., 2003; Salmon et al., 1998; Schweizer, 1984). Leur synthèse est essentielle pour la croissance cellulaire et le maintien de l'intégrité membranaire (Deytieux et al., 2005; Fornairon-Bonnefond et al., 2002). Par conséquent l'absence d'oxygène ou de lipides exogènes a des effets néfastes sur la viabilité et l'activité fermentaire de la levure en empêchant le déroulement optimal de la fermentation qui peut être bloquée ou languissante (Bisson, 1999; Blateyron and Sablayrolles, 2001).

La disponibilité en oxygène et en lipides affecte aussi la formation de composés volatils importants pour l'arôme des vins (Malcorps et al., 1991; Rollero et al., 2014; Valero et al., 2002; Varela et al., 2012). Pour éviter des carences en lipides le vinificateur peut ajouter des préparations de levures inactivées ou des dérivés de levures pendant la réhydratation des levures qui seront utilisées pour l'inoculation. Ces préparations contiennent des lipides qui peuvent être utilisés par la levure (Soubeyrand et al., 2005). Le vinificateur peut également contrôler le niveau de turbidité des moûts à partir de bourbes, ce qui a un impact indirect sur la nutrition lipidique des levures. Il a été montré que des apports d'oxygène à la fin de la phase de croissance sont très efficaces pour éviter les arrêts de fermentation (Blateyron and Sablayrolles, 2001). Lors de la fermentation la partie solide du moût (le marc) flotte naturellement à la surface et forme un chapeau de marc. Dans ce contexte un apport d'oxygène peut être fourni par des stratégies de remontage ou de délestage. Le délestage consiste à vider la cuve de sa phase liquide pendant la fermentation et de la remplir à nouveau en arrosant la surface du marc qui est tombé au fond de la cuve. Le remontage consiste à pomper la partie liquide de la cuve et de l'arroser simultanément (Fig 7). Il faut noter que ces opérations sont loin d'avoir pour seul objectif d'apporter de l'oxygène au moût et permettent notamment d'augmenter l'extraction vers la phase liquide des composés d'intérêt qui se situent dans le chapeau de marc.

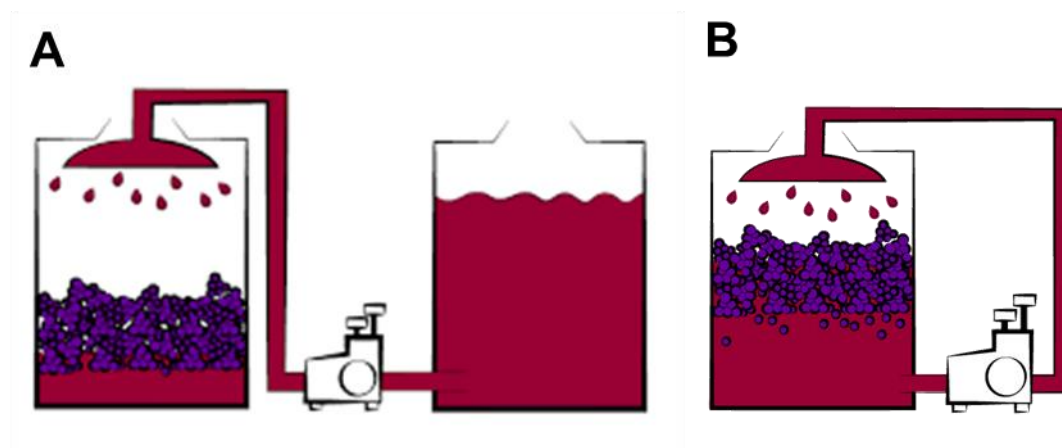


Fig 7 Représentation schématique du délestage et du remontage

Panel A. Délestage. La phase liquide est soutirée dans une autre cuve avant d'y être mise à nouveau en arrosant le chapeau de marc. **Panel B.** La phase liquide est pompée et directement utilisée pour arroser le chapeau de marc (Figure d'après Le blog du Clos Romain).

2.1.5 L'écoulage et l'élevage

L'étape qui suit la fermentation consiste en la séparation des parties liquides et solides du produit de fermentation. Pour la vinification du vin rouge, la partie du vin qui s'écoule directement de la cuve constitue le vin de goutte ; tandis qu'un pressurage permet d'extraire du vin depuis le marc (vin de

presse). Dans la très grande majorité des vins rouges et certains vins blancs une seconde fermentation réalisée par la bactérie *Oenococcus oeni* peut avoir lieu. Il s'agit de la fermentation malolactique qui diminue l'acidité des vins et leur confère plus de souplesse (Ribéreau-Gayon et al. 2006a). Dans certains cas, une étape dite d'élevage au cours de laquelle le vin mis en barrique subit des modifications sous l'action du bois et de l'oxygène est effectuée. Dans certaines régions telle que Bordeaux, les vins de l'année peuvent être assemblés. Cela consiste à mélanger les vins provenant de cuves et/ou de cépages différents afin de créer un produit fini ayant des caractéristiques organoleptiques plus complexes.

2.2 Variabilité technologique des souches œnologiques (*S. cerevisiae*)

Comparées à des souches isolées d'autres biotopes, les souches de vin sont bien adaptées à la fermentation alcoolique de jus de raisin. Elles sont en effet capables de fermenter des quantités importantes de sucre et produisent de faibles valeurs d'acidité volatile (Albertin et al., 2011; Camarasa et al., 2011). Leur performance fermentaire démontre le rôle joué par la sélection naturelle dans cet environnement sélectif. Cependant au sein des souches œnologiques il existe une variabilité technologique très importante qui contraste avec l'image de groupe homogène donné par les analyses phylogénétiques (voir section précédente).

2.2.1 L'activité fermentaire

En ce qui concerne les aptitudes fermentaires des souches de levures, les phénotypes étudiés se déclinent en plusieurs catégories qui peuvent ou non avoir les mêmes causes physiologiques. Les souches de vin se distinguent principalement par leur taux de fermentation maximal (Bely et al., 1990; Jiménez and Benítez, 1986; Marullo et al., 2006), leur affinité à consommer rapidement le fructose (Berthels et al., 2004; Guillaume et al., 2007; Tronchoni et al., 2009), leur besoin en azote (Jiranek, Langridge, and Henschke 1995; Manginot, Roustan, and Sablayrolles 1998; Taillandier et al. 2007; Gutiérrez et al. 2013; Brice et al. 2014; Julien et al. 2000), leur résistance aux températures élevées (Gao and Fleet 1988; Charoenchai, Fleet, and Henschke 1998; Ma.Jesús Torija et al. 2003; Philippe Marullo et al. 2009) et basses (Beltran et al., 2006; García-Ríos et al., 2017).

2.2.2 La production de métabolites fermentaires

Les levures œnologiques montrent également de fortes différences dans la production et/ou la consommation de métabolites directement connectés à leur activité fermentaire. Ces composés peuvent avoir un impact sur la qualité organoleptique des vins mais aussi sur ses propriétés sanitaires.

L'acide acétique

L'acide acétique est l'un des composés organiques les plus volatils du vin et constitue un défaut organoleptique majeur à des concentrations supérieures à $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ en donnant au vin une note vinaigrée (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Il est principalement produit par la levure pendant la fermentation alcoolique. La production varie en fonction des souches (Giudici and Zambonelli, 1992; Marullo et al., 2004; Patel and Shibamoto, 2002; Remize et al., 2000; Romano et al., 1994; Torrens et al., 2008). Les souches ayant un besoin important d'azote peuvent en surproduire lors de la fermentation d'un moût carencé en azote (Vilanova et al., 2007).

Glycérol

Le glycérol est derrière l'éthanol le principal composé carboné produit lors de la fermentation. Sa production est elle aussi variable en fonction des souches avec une production entre 5 et 9 g.L^{-1} (Gardner et al., 1993; Remize et al., 2003; Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Il joue un rôle majeur dans l'homéostasie redox et la résistance au stress osmotique (Blomberg and Adler, 1992). Ce composé est relativement inodore. Contrairement à certaines études lui attribuant un rôle sur le corps et la douceur du vin (Gawel et al., 2007a; Noble and Bursick, 1984), le glycérol ne participe pas à la qualité du vin (Marchal et al., 2011). La production de glycérol par la levure est directement reliée avec le rendement sucre/éthanol de la FA puisque sa production nécessite la déviation d'une partie du flux glycolytique avec la conversion du fructose-1.6-biphosphate en dihydroxyacétone phosphate (Fig 6, page 16).

Acide malique

Il existe au sein de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* une variabilité génétique naturelle avec des souches ayant une activité démaliquante (Rankine, 1966) ou acidifiante (Yéramian et al., 2007). Cette propriété dépend principalement des teneurs en acide malique mais varie également selon les moûts et leur pH. Lorsque la concentration d'acide malique dépasse $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ (ce qui est habituellement le cas en œnologie), certaines souches peuvent consommer jusqu'à 60% de ce composé alors que d'autres ne le métabolisent pas (Delcourt et al., 1995; Redzepovic et al., 2003). A l'inverse, lorsque les concentrations d'acide malique des moûts sont inférieures à $0,6 \text{ g.L}^{-1}$, certaines en produisent quelques centaines de mg.L^{-1} (Yéramian et al., 2007).

SO₂ H₂S et composés combinant associés (pyruvate, acétaldéhyde 2-oxoglutarate)

La levure réduit le sulfate inorganique en ions sulfides (H₂S) qui sont essentiels pour la biosynthèse des acides aminés soufrés. Au cours de cette assimilation, la levure peut relâcher dans le milieu du SO₂ et du H₂S (Swiegers and Pretorius, 2007; Thomas and Surdin-Kerjan, 1997). Les quantités laissées par la levure sont fortement variables (Kumar et al., 2010; Mendes-Ferreira et al., 2009; Thomas et al., 1993; Ugliano et al., 2011). Le H₂S confère au vin produit une odeur désagréable d'œuf pourri (Mendes-Ferreira et al., 2009; Swiegers and Pretorius, 2007). De son côté le SO₂ est toxique pour l'homme à des

concentrations élevées (Freedman, 1980) et sa teneur maximale dans les vins est réglementée. Dans le vin, le SO_2 est en équilibre sous plusieurs formes moléculaires. Une partie réagit avec les composés carbonylés pour donner du bisulfite de carbonyle (SO_2 combiné). L'autre partie constitue le SO_2 libre. Dans les conditions physicochimiques standards du vin la plus grande partie du SO_2 libre est inactive sous forme d'hydrogénosulfite (HSO_3^-) tandis qu'une faible part est active sous la forme $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fig 9).

Le ratio entre la forme inactive et active du SO_2 libre dépend du pH du milieu et de la constante d'acidité fonction elle-même de la teneur en éthanol et de la température du milieu. Ainsi, une diminution du pH, une augmentation de la teneur en éthanol ou de la température entraîne une augmentation de SO_2 actif (Barbe et al., 2000; Divol et al., 2012). Certains des composés combinant le SO_2 sont produits par la levure. Les trois principaux sont le pyruvate l'acétaldéhyde et le 2-oxoglutarate (Barbe et al., 2000). Ces composés font partie du métabolisme central de la levure et sont présents en fin de fermentation à des concentrations variables qui dépendent de la souche de levure (Barbe et al., 2000; Morata et al., 2003; Romano et al., 1994). Par soucis sanitaire, le rôle du vigneron est d'obtenir un vin ayant une teneur en SO_2 active satisfaisante pour préserver le vin et une teneur totale en SO_2 la plus basse possible.

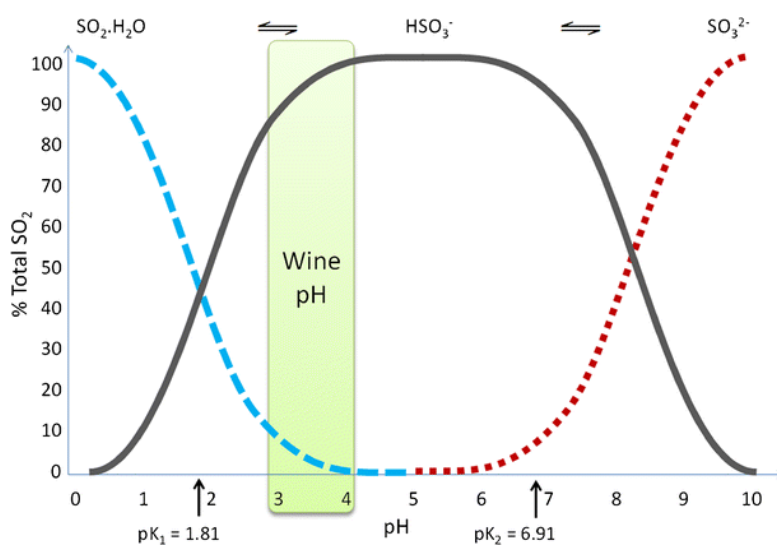


Fig 9 État du SO_2 en fonction du pH
Figure d'après (Divol et al., 2012)

2.2.3 L'apport aromatique

Comme nous l'avons déjà évoqué, la contribution des levures ne se résume pas à la simple transformation des sucres en alcool et à la production de métabolites issus de son métabolisme central. La fermentation alcoolique est en effet le siège de très nombreuses synthèses, dégradations

et transformations biochimiques qui vont révéler à partir d'une matrice relativement inodore (le raisin) une boisson appréciée avant tout pour sa richesse en composés volatils. Détailler les multiples contributions de la levure sur l'arôme des vins dépasse les objectifs de cette étude bibliographique. Rappelons ici que les levures ont à la fois un rôle direct en produisant des composés volatils issus de son métabolisme secondaire et un rôle indirect en participant à des réactions de biotransformation de molécules précurseurs d'arômes présentes dans le raisin. Les quelques revues listées ci-dessous aideront le lecteur à appréhender l'importante variabilité technologique rencontrée chez les souches de levures œnologiques (Murat et al. 2001; Swiegers et al. 2005; Carrau et al. 2008; Dufour et al. 2013; Philippe Marullo and Dubourdieu 2010).

3 Étude du déterminisme génétique des traits œnologiques

3.1 Généralités

La génétique (du grec *genno γεννώ*, « donner naissance ») est la science qui étudie l'hérédité et les gènes. D'une part, elle s'intéresse à la transmission des caractères héréditaires entre des géniteurs et leur descendance (génétique formelle ou mendélienne). D'autre part elle a pour but d'étudier les gènes et leur fonction en s'appuyant sur la biologie moléculaire, la biologie cellulaire et la biochimie. Dans le contexte de notre étude, nous nous intéressons au déterminisme génétique des traits œnologiques chez les levures de vinification. L'existence d'une variabilité phénotypique héritable au sein des souches du vin montre qu'il existe une base génétique qui contrôle ces traits (Marullo et al., 2004; Romano et al., 1985). La compréhension de cette base génétique peut être conduite par deux approches complémentaires. D'une part, il est fondamental de pouvoir évaluer le rôle fonctionnel (et souvent les rôles) de chacun des gènes d'un organisme. Cette approche est nommée génétique fonctionnelle. D'autre part, il s'agit de comprendre les bases génétiques des différences phénotypiques observées entre les individus d'une même espèce. Cette seconde approche qui nous intéresse plus particulièrement est couverte par le champ de la génétique quantitative.

3.2 Génétique fonctionnelle des levures de vinification

L'analyse fonctionnelle des gènes est une discipline ancienne chez la levure. La méthode la plus simple consiste à muter aléatoirement, interrompre ou surexprimer un gène et à observer l'effet produit sur la physiologie de la cellule. Les facilités d'application du génie génétique chez cet organisme ont permis des avancées considérables puisque plus de $\frac{3}{4}$ des gènes de la levure ont une fonction connue (www.yeastgenome.org). Avec le développement de banques de mutants systématiques (Euroscarf), de très nombreux laboratoires dans le monde ont étudié le rôle des gènes à commencer par leur effet sur la viabilité (Giaever et al., 2002). Cependant, cette fonction peut varier avec l'environnement dans lequel l'organisme évolue (Piglucci, 2005), il est donc important d'étudier la fonction des gènes dans un contexte physiologique particulier. A partir des années 2000, de très nombreux laboratoires ont donc étudié la fonction de gènes dans un contexte œnologique démontrant leur implication dans des voies métaboliques les plus pertinentes (Linderholm et al., 2008; Remize et al., 2000, 2003; Thibon et al., 2008). En plus de l'acquisition de connaissances, une des idées sous-jacentes à cette stratégie était celle de l'amélioration des souches par génie génétique (Dequin, 2001; Pretorius, 2000), ce qui n'a pas pu être conduit notamment à cause de la très faible acceptation des organismes génétiquement modifiés (OGM) par les consommateurs (Pretorius and Bauer, 2002). Bien qu'essentielle pour

comprendre la physiologie moléculaire des levures dans le contexte de la fermentation du jus de raisin, la délétion et/ou la surexpression de gènes ne permet pas d'appréhender directement le second volet de la génétique qui consiste à identifier les variations génétiques naturelles responsables de la variabilité technologique des levures.

3.3 Génétique quantitative des levures de vinification

3.3.1 Généralité et Historique

La plupart des variations phénotypiques d'intérêts retrouvées entre des individus d'une même espèce sont quantitatives. Cela signifie que ces phénotypes sont mesurables et que leur distribution est continue au sein de la population (Fig 8). Cette distribution s'explique par un déterminisme génétique complexe qui met en jeu un grand nombre de variations génétiques. La génétique quantitative est une branche de la génétique qui cherche à élucider les causes génétiques de caractères complexes. Elle permet sans *a priori* d'identifier dans la masse des variations génétiques d'une population celles qui ont des répercussions significatives sur le phénotype étudié. Le lien théorique entre la distribution continue d'un caractère quantitatif et la ségrégation de plusieurs facteurs génétiques indépendants (éventuellement modulés par l'environnement) a été notamment développé par Edward East en 1916 (Lander and Botstein, 1989). Des travaux pionniers de cartographie génétique ont été très tôt réalisés confirmant le caractère général de cette théorie (Sax, 1923). Aujourd'hui cette identification peut être réalisée par deux approches différentes, soit à l'échelle d'une population naturelle (génétique d'association), soit à partir d'une population apparentée construite spécifiquement dans ce but (analyse de liaison) (Mackay, Stone, and Ayroles 2009; Lynch and Walsh 1998; de Vienne 1998). Ces méthodes ne permettent pas l'identification précise des variations génétiques responsables, mais définissent une région du génome dans laquelle se trouve une ou plusieurs de ces variations. Cette région est nommée QTL pour *Quantitative Trait Locus*. Leur recherche aboutissant à un positionnement sur une carte génétique on parle de cartographie de QTLs.

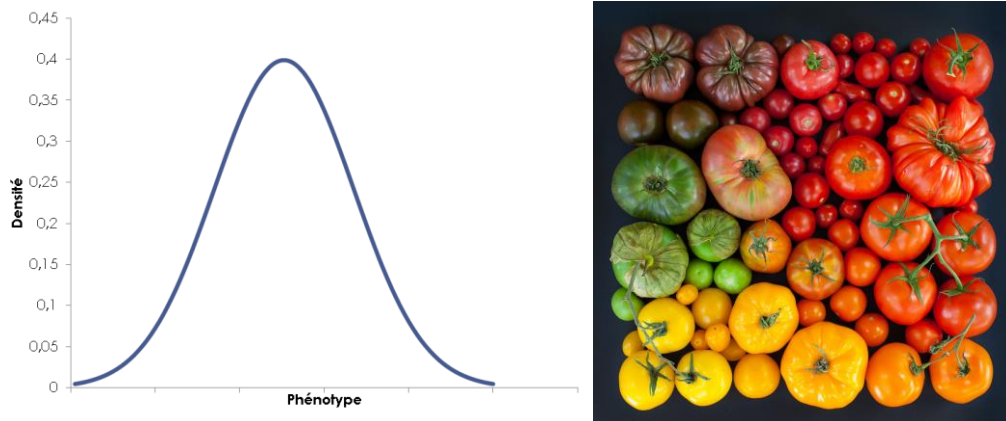


Fig 8 Distribution normale d'un caractère quantitatif

3.3.2 Champ d'application de la génétique quantitative

La génétique quantitative est une discipline qui s'ancre très tôt dans un cadre appliqué. L'identification de marqueurs génétiques contrôlant un caractère quantitatif peut en effet être utilisée par les sélectionneurs pour optimiser la sélection des individus les plus performants (de Vienne, 1998). De très nombreuses équipes dans le monde utilisent ces méthodes en routine pour sélectionner des races animales (Goddard and Hayes, 2009; Sae-Lim et al., 2015) ou des variétés végétales (Longin et al., 2013; Wallace et al., 2013). La génétique quantitative est aussi une discipline fondamentale qui permet d'étudier des phénotypes complexes et intégratifs. Ainsi, il a été possible ces dernières années de s'intéresser aux causes génétiques de l'expression de chacun des gènes d'un organisme (e-QTL) (Ponsuksili et al., 2010; Yvert et al., 2003), au niveau de traduction de chacune de ses protéines (p-QTL) (Damerval et al., 1994; Foss et al., 2007), aux causes génétiques du bruit de traduction protéique (Ansel et al., 2008) et à celui de variations épigénétiques (Filleton et al., 2015; Nagarajan et al., 2010). Nombreuses de ces études ont été réalisées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui est parvenue à s'imposer en quinze ans comme un organisme modèle puissant en génétique quantitative. Par souci de concision, nous limiterons la suite de cette revue aux travaux utilisant cet organisme. Il va de soi que les concepts utilisés dans ces études ont été développés bien antérieurement chez d'autres espèces végétales et animales.

3.4 La levure *Saccharomyces cerevisiae* et la génétique quantitative

3.4.1 Génétique d'association

La génétique d'association est très fréquemment utilisée en génétique humaine permettant l'identification de SNPs liés à des caractères quantitatifs (Beck et al., 2014; Visscher et al., 2012). Jusqu'ici elle ne montre pas d'exemples de succès très significatifs chez la levure (Connelly and Akey, 2012; Diao and Chen, 2012). Ce résultat est sans doute lié aux prérequis de cette approche. En effet, la génétique d'association nécessite une population peu structurée (idéalement en panmixie), avec un nombre important d'individus, ce qui permet des fréquences alléliques élevées et un déséquilibre de liaison faible (Nieduszynski and Liti, 2011; Peter and Schacherer, 2016). Pour la levure, les deux verrous majeurs sont le nombre d'individu étudié et la population qui est fortement structurée (Peter and Schacherer, 2016). Les données du séquençage de plus de 1000 souches d'origines diverses devraient permettre de lever le verrou du nombre d'individus permettant d'évaluer la possibilité d'effectuer ce type d'analyse chez la levure.

3.4.2 Analyse de liaison

Les premières analyses de liaison ont été effectuées chez la levure au début des années 2000 (Brem et al., 2002; Steinmetz et al., 2002). Cette approche a ensuite été utilisée avec succès chez cet organisme à de nombreuses reprises et sera détaillée dans la partie suivante. L'analyse de liaison consiste à étudier le déterminisme génétique de variations phénotypiques dans une population construite dans ce but. Dans cette partie nous allons détailler les deux principales méthodes utilisées chez la levure.

Approche classique

L'approche classique consiste à construire une population à partir de deux souches parentales. Ces deux souches se distinguent par un ensemble de polymorphismes génétiques, et l'objectif est d'identifier ceux qui ont un effet sur le phénotype étudié. Le croisement de ces deux souches permet la génération de descendants dans lesquels les allèles parentaux polymorphes ségrégent. Les événements de recombinaison qui ont lieu au cours de la méiose redistribuent ces allèles de manière très efficace chez la levure, puisque 86 crossing-over sont comptés en moyenne par méiose (Cherry et al., 1997). Les descendants obtenus possèdent donc une combinaison unique des génomes parentaux (Fig 9). Un génotypage des descendants permet de déterminer la combinaison génétique dont ils ont hérité. Pour cela, l'utilisation de puces à ADN ou le séquençage complet des souches permet l'identification des sites polymorphiques (SNPs et INDELS) qui ségrégent dans la population. Ces derniers servent de marqueurs génétiques déterminant ainsi l'origine parentale des régions

génomiques des descendants. En complément de cette caractérisation génétique, la collection de phénotypes permet d'établir leur distribution au sein de la population. Les caractères complexes montrent le plus souvent des distributions continues.

L'analyse de liaison proprement dite consiste à comparer pour chaque marqueur (locus) en ségrégation, les valeurs phénotypiques des deux groupes de descendants suivant leur hérédité parentale. Une différence significative entre ces deux sous-populations indique que le locus considéré est lié au trait quantitatif, d'où le nom de QTL.

Cette approche générale a été utilisée chez la levure par un nombre important d'auteurs sur une multitude de phénotypes : traits d'histoire de vie (Ben-Ari et al., 2006; Deutschbauer and Davis, 2005; Dimitrov et al., 2009; Gerke et al., 2009; Kwan et al., 2011; Li et al., 2013; Stumpferl et al., 2012), paramètre de croissance sur différents milieux (Ibstedt et al., 2014; Swinnen et al., 2012), résistance à des toxines ou à la température (Brion et al., 2013; Demogines et al., 2008; Greetham et al., 2014; Steinmetz et al., 2002), production de métabolites primaires et secondaires (Huang et al., 2014; Kanai et al., 2017; Marullo et al., 2007a; Salinas et al., 2012; Steyer et al., 2012), besoin en nutriments (Jara et al., 2014), expression de gènes (Yvert et al., 2003), paramètres morphologiques (Nogami et al., 2007), cinétique fermentaire (Ambroset et al., 2011; Martí-Raga et al., 2017; Zimmer et al., 2014).

Dans une population construite de manière classique, les allèles en ségrégation sont par définition apportés par deux souches parentales. Afin d'augmenter la variabilité génétique en présence, une stratégie de croisement avec quatre souches parentales d'origine différente a été réalisée avec succès (F. a. Cubillos et al. 2011; F. A. Cubillos et al. 2013; F. A. Cubillos et al. 2017).

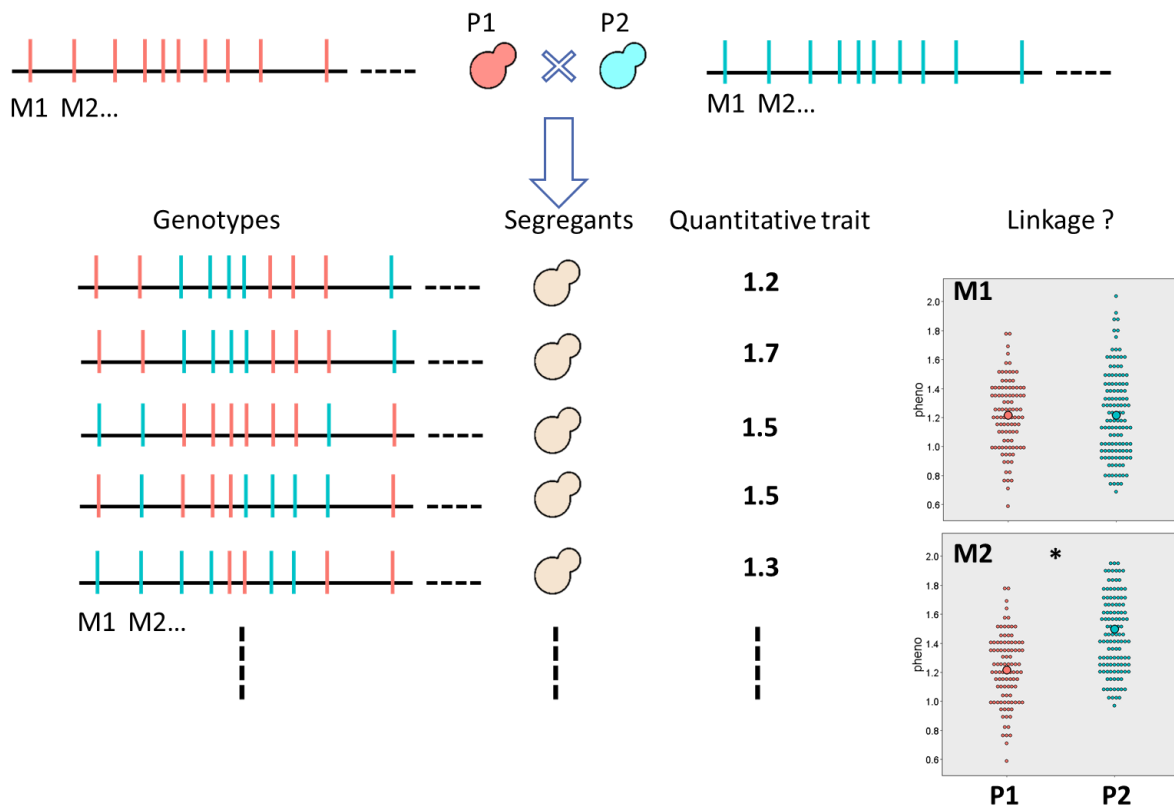


Fig 9 Schéma d'une analyse de liaison

Deux souches parentales P1 et P2 sont utilisées pour la génération d'un grand nombre de ségrégants. Des marqueurs (M1, M2 ...) indiquent des variations génétiques qui distinguent les souches parentales et qui ségrégent dans leur descendance. Les ségrégants sont génotypés afin de savoir de quelle souche ils ont hérité pour chaque marqueur. Les ségrégants sont phénotypés pour un trait quantitatif. Pour chaque marqueur les valeurs phénotypiques des ségrégants qui ont hérité de P1 sont comparées à celles de ceux qui ont hérité de P2. Une différence significative indique qu'un facteur génétique lié génétiquement à ce marqueur a un impact sur le trait. C'est le cas du marqueur M2. Il s'agit d'un QTL.

Approche par *Bulk segregant analysis*

Afin de diminuer l'effort de séquençage et de phénotypage d'un grand nombre d'individu, une autre approche nommée *Bulk segregant analysis* (BSA) a été utilisée. Elle reprend le principe du *selective genotyping* décrit par (Lander and Botstein, 1989). Ici, les descendants sont séparés en deux groupes. Un groupe contrôle est composé de descendants pris au hasard. La fréquence allélique pour chaque marqueur au sein de cette population est théoriquement de 50 %. Un autre groupe est constitué de descendants sélectionnés sur la base d'une valeur phénotypique. La sélection peut être réalisée directement sur les valeurs phénotypiques des descendants (Segrè et al., 2006; Yang et al., 2013) ou après le développement de plusieurs générations soumises à une pression de sélection (Marullo, 2015; Romano et al., 2010). Dans cette population, la fréquence allélique des marqueurs neutres reste à 50 % tandis qu'elle dévie de cet équilibre pour les marqueurs qui ont un effet sur le phénotype testé. Afin

de déterminer les fréquences alléliques dans ces populations, un séquençage est réalisé sur l'ADN total de chaque groupe. Cette stratégie s'est montrée efficace et a été utilisée par un grand nombre d'auteurs (Ben-Ari et al., 2006; Brice et al., 2014; Demogines et al., 2008; Diezmann and Dietrich, 2011; Duitama et al., 2014; García-Ríos et al., 2017; Hubmann et al., 2013a, 2013b; Meijnen et al., 2016; Pais et al., 2013; Romano et al., 2010; Segrè et al., 2006; Sigwalt et al., 2016; Swinnen et al., 2012; Taylor and Ehrenreich, 2014; Wilkening et al., 2014; Yang et al., 2013).

La méthode classique et la méthode *bulk* offrent des résolutions de cartographie similaires et des efficacités de détection comparables (Wilkening et al., 2014). La première permet la réutilisation des cartes génétiques pour des analyses différentes. Elle permet également d'estimer l'effet des QTLs identifiés sur la variance totale du phénotype et de rechercher des QTLs d'interaction (Forsberg et al., 2017). La seconde permet d'accroître la puissance statistique de détection pour un niveau de génotypage comparable (Lander and Botstein, 1989). La *Bulk segregant analysis* est véritablement puissante lorsque les méthodes de phénotypage sont très efficaces telle que la sélection d'une résistance (Wilkening et al., 2014).

3.5 Validation expérimentale des QTLs à l'échelle du gène ou du SNP

La région identifiée lors d'une cartographie est nommée QTL. Elle possède une taille variable suivant la densité de la carte génétique utilisée et le niveau de recombinaison au sein de la population (Lynch and Walsh 1998). L'identification précise des variations alléliques à l'origine de la différence de phénotype dépend notamment de cette taille. Les techniques modernes de séquençage à haut débit permettent de générer des cartes génétiques avec une haute densité, ce qui affine la résolution des QTLs (pour revue voir (Liti and Louis, 2012)). Avec un génome compact (6000 gènes, 16 chromosomes et 12 Mpb), *S. cerevisiae* est un organisme qui se prête très bien à l'identification de variations alléliques à l'échelle la plus fine.

3.5.1 Méthode de validation

La méthode la plus simple à mettre en œuvre est le test des hybrides hémizygotés réciproques (Steinmetz et al., 2002; Warringer et al., 2017) (Fig 10, panel A). Avec cette méthode, la variation allélique est testée dans l'hybride diploïde hétérozygote à partir duquel a été générée la descendance. Deux hybrides isogéniques sont comparés chacun présentant une interruption complète d'un des gènes parentaux. La délétion de gènes étant très facilement réalisable chez la levure, le test de plusieurs gènes peut être effectué afin de trouver le ou les bons candidats. Si le phénotype des hybrides hémizygotés est différent, alors l'allèle testé est impliqué dans la variation du phénotype. Le test

indépendant de plusieurs variations alléliques a plusieurs fois mis en évidence des variations alléliques causatives multiples dans un même QTL (Martí-Raga et al., 2017; Steinmetz et al., 2002).

Le test formel pour valider l'impact d'un gène situé dans une région cartographiée consiste à effectuer un remplacement allélique dans les souches parentales (Fig 10, panel B). Cela permet de comparer des souches isogéniques pour l'ensemble du génome sauf pour la variation allélique à tester. Cette approche est techniquement plus difficile mais devrait bénéficier grandement des nouveaux outils d'édition génomique basé sur des systèmes CRISPR-Cas9 (Bao et al., 2015).

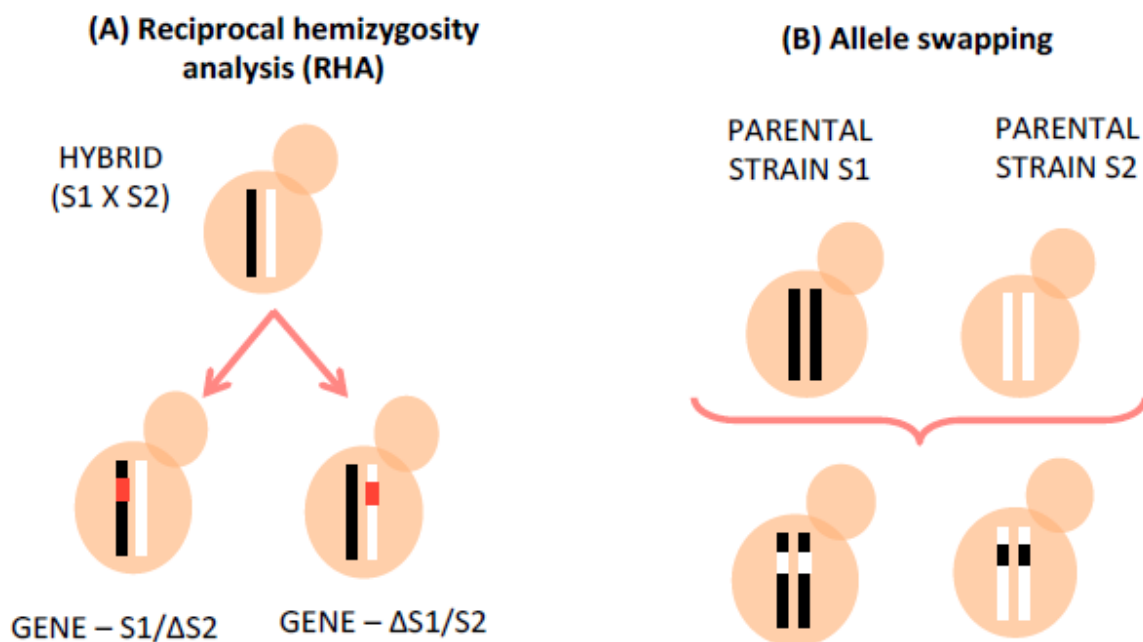


Fig 10 Méthode de validation des QTLs

Panel A. Représentation schématique du test des hybrides hémizygotés réciproques. **Panel B.** Représentation schématique du test de remplacement allélique. Figure d'après (Raga, 2015).

3.5.2 Types de variations impliquées

Une analyse bibliographique exhaustive du déterminisme génétique de caractères quantitatifs dans un contexte biotechnologique a été réalisée au cours de ce travail. Un projet de revue bibliographique devrait concrétiser ce travail après cette thèse. Sur 73 articles analysés, l'implication de 119 gènes présentant des variations alléliques sur des traits biotechnologiques a été validée. Cette étude ne tient compte que des gènes dont les effets ont été validés expérimentalement. Les variations causatives décrites sont principalement des mutations non-synonymes ponctuelles dites *Single Amino acid Polymorphism* (SAP) constituant 72 % des causes décrites (Fig 11). Ces dernières sont susceptibles

d'avoir un effet direct sur le fonctionnement de la protéine codée avec des répercussions phénotypiques. L'effet d'un changement d'acide aminée sur la stabilité de la structure d'une protéine peut être prédit par des outils comme PROVEAN (Choi and Chan, 2015) qui utilise une approche basée sur l'alignement de séquences homologues. Dans de nombreux cas, la fonction déjà connue des gènes permet d'orienter le choix de gènes candidats.

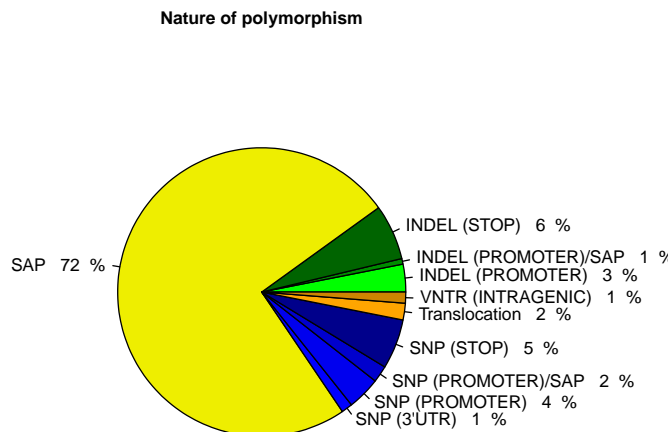


Fig 11 Type des variations causatives identifiées

Résultats calculés à partir de 119 allèles validés expérimentalement qui ont un effet sur un caractère biotechnologique

3.5.3 QTLs pertinents en œnologie

Plusieurs travaux de cartographie de QTLs ont étendu la connaissance sur les bases génétiques de plusieurs traits œnologiques. C'est le cas pour des traits comme la consommation d'azote (Ambroset et al., 2011; Brice et al., 2014; Gutiérrez et al., 2013; Jara et al., 2014), de sucre (Guillaume et al., 2007; Salinas et al., 2012), la vitesse de la prise de mousse (Martí-Raga et al., 2017), la production de composés aromatiques (Roncoroni et al., 2011; Steyer et al., 2012), d'acide acétique (Marullo et al., 2007a; Salinas et al., 2012), d'acide succinique (Salinas et al., 2012), de phénol volatils (Marullo et al., 2007b), d'esters (Steyer et al., 2012), de SO_2 (Noble, Sanchez, and Blondin 2015) ainsi que pour la durée de la phase de latence (Zimmer et al., 2014). Ces travaux démontrent que la validation de QTLs à l'échelle du gène permet d'identifier de manière indirecte la fonction de certains gènes dans le contexte phénotypique de l'étude. Ce type d'approche complète celle de la génétique fonctionnelle évoquée plus haut.

3.5.4 Application de la cartographie de QTLs à la sélection assistée par marqueur

La manière la plus intuitive d'obtenir des souches plus performantes est peut-être l'hybridation sexuelle. Elle peut être théoriquement appliquée pour toutes les espèces sexuées d'intérêt agronomique. Cette technique a été utilisée par l'homme pendant des milliers d'années, par exemple par des agriculteurs qui ont intuitivement choisi les organismes supérieurs de leurs cultures ou de leurs bétails pour des croisements afin d'obtenir des organismes avec les traits désirés. Dans ce sens, de nombreux croisements basés sur les valeurs phénotypiques des parents ont été effectués chez la levure (Eschenbruch et al., 1982; Eustace and Thornton, 1987; Giudici and Zambonelli, 1992; Gjermansen and Sigsgaard, 1981; Higgins et al., 2001; Marullo et al., 2006; Mukai et al., 2001; Romano et al., 1985).

Les variations alléliques favorables identifiées par les approches de cartographie de QTLs permettent de remplacer en partie le choix des souches parentales en fonction de leur phénotype par leur sélection avec des marqueurs génétiques. Des programmes de sélection assistée par marqueurs (SAM) peuvent être initiés en dirigeant les croisements pour combiner les allèles favorables dans un même génome et ainsi améliorer les performance de souches industrielles non optimales (Marullo et al., 2007b). L'intérêt de l'exploitation industrielle de certaines de ces mutations est notamment illustré par des brevets protégeant l'utilisation de variations alléliques pour la sélection de souches (Blondin et al. 2013; P Marullo et al. 2008; P Marullo 2009).

Chapitre 1 : Mise en place d'une méthode de fermentation standardisée pour évaluer les caractères quantitatifs des souches de *S. cerevisiae* dans des conditions œnologiques

« Et puis tout autour et au-dessus jusqu'au ciel un bruit lourd et multiple et sourd de torrents d'appareils, dur, l'entêtement des mécaniques à tourner, rouler gémir, toujours prêtes à casser et ne cassant jamais. »

Louis-Ferdinand Céline, ébahi par le *high throughput*, dans *Voyage au bout de la nuit*.

1 Étude préliminaire : éléments de méthode

1.1 Problématique

L'objectif principal de cette thèse consiste à identifier des QTLs d'intérêt œnologique et d'évaluer leur niveau d'interaction avec des paramètres environnementaux. Afin d'élargir notre champ d'investigation, nous avons utilisé deux populations distinctes d'une centaine d'individus issue de deux hybrides-F1 d'origine œnologique (M2xF15 et SBxGN). La présentation de ce matériel génétique sera donnée dans le chapitre 2 de cette thèse. Les souches parentales à l'origine de ces deux hybrides sont M2, F15, SB et GN et sont utilisées dans ce chapitre. Le premier verrou technologique rencontré était de pouvoir mesurer des traits liés aux performances fermentaires pour près de 200 individus dans plusieurs conditions expérimentales. En incluant la répétition des expériences ce dispositif expérimental nécessitait la réalisation de centaines de fermentations simultanément. Tout en intégrant cette contrainte de débit d'analyse, notre objectif était de garantir des conditions fermentaires se rapprochant le plus possible de celles rencontrées dans la pratique œnologique. De plus, nous devons choisir quels paramètres environnementaux faire varier et étudier l'impact et la pertinence de leurs variations sur le comportement des levures.

A mon arrivée au laboratoire, une méthode de fermentation dans des volumes de 125 mL avait été mise en place au laboratoire lors de la thèse de Telma da Silva (Da Silva, 2014). Cette méthode utilisée de nombreuses fois dans des programmes de croisement ou de sélection massale permet de mesurer des phénotypes fermentaires en adéquation avec ceux mesurés en conditions industrielles. Parmi ces principaux avantages, (i) elle utilise du jus de raisin à la place du milieu synthétique, (ii) elle permet un contrôle de l'inoculum en utilisant la cytométrie en flux, (iii) elle fournit une idée très précise des cinétiques fermentaires grâce à l'acquisition standardisée de la perte de poids par des scripts informatiques. Cependant, les volumes utilisés (>100 mL) limitent la parallélisation des fermentations. A titre d'exemple, cette méthode a permis la réalisation de 396 fermentations en un peu moins d'un an. Il était indispensable de mettre au point une méthode de phénotypage mieux adaptée à nos objectifs. Une méthode de fermentation pour des volumes inférieurs à 15 mL a donc été développée. La preuve de concept de son adéquation aux problématiques œnologiques a été faite en étudiant la variabilité phénotypique d'une trentaine de souches industrielles dans différentes conditions. Ces résultats sont présentés dans l'article 1 « *Wine yeast phenomics: a standardized fermentation method for assessing quantitative traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains in enological conditions* » qui a été soumis dans la revue PLOS ONE et qui est en cours de révision. La mise au point de la méthode et le test de paramètres environnementaux qui ont été effectués au préalable sont présentés ci-dessous.

1.2 Mise au point d'une méthode de phénotypage des levures œnologiques à large échelle

1.2.1 Mise au point d'un nouveau type de micro-fermenteurs

L'option adoptée pour augmenter le débit d'analyse a été de réduire le volume de fermentation jusqu'à une dizaine de mL. Il était indispensable que cette réduction d'échelle n'affecte pas les valeurs des principaux paramètres œnologiques mesurés dans les fermenteurs agités de 125 mL qui constituent notre référence. En petit volume, l'évaporation importante du milieu de fermentation est la difficulté majeure à surmonter. Nous avons utilisé en guise de micro-fermenteurs des vials de 10 mL et 20 mL utilisés en chromatographie. Leur fermeture par bouchon à vis est suffisamment hermétique pour éviter l'évaporation de solvants et par conséquent de milieu fermentaire. Une aiguille hypodermique plantée dans le septum du bouchon permet le dégagement du CO₂ qui est produit lors de la fermentation alcoolique.

1.2.2 Caractères étudiés

Au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés à des caractéristiques technologiques basiques des levures. Leur intérêt en œnologie est rappelé dans la section 2 de la revue bibliographique de cet ouvrage (p 13). Parmi les traits étudiés, certains sont liés à **la cinétique de la fermentation** d'autres permettent d'estimer le bilan des **principaux métabolites** issus de l'activité fermentaire.

Paramètres cinétiques

La cinétique de la fermentation alcoolique est suivie par la pesée régulière des fermenteurs. Lors de la fermentation alcoolique chaque molécule de glucose ou de fructose est convertie en 2 molécules d'éthanol et de CO₂. Le dégagement du CO₂ par l'aiguille entraîne la diminution du poids total du fermenteur. Cette perte de poids est directement liée à l'avancement de la fermentation alcoolique et peut être utilisée pour déduire la cinétique de la fermentation. La Fig 12 montre un exemple de cinétique fermentaire obtenue avec cette méthode.

Des variables quantitatives qui reflètent différents aspects de la cinétique fermentaire ont été extraites des cinétiques obtenues.

Le CO_{2max} (g.L⁻¹) correspond à la quantité maximale théorique de CO₂ dégagé. Il est calculé selon une formule empirique qui estime le rendement à partir de la concentration en sucre du moût : $0.482 * [\text{Sucre}]$ (Da Silva, 2014).

Les autres variables quantitatives extraites des cinétiques et qui seront utilisées tout au long de cette thèse sont les suivantes :

CO2max (g.L⁻¹): Correspond à la quantité maximale de CO₂ dégagé

lp (h) : correspond à la durée de la phase de latence, estimée comme le temps pour dégager les premiers 2 g.L⁻¹ de CO₂.

t35g, t50g et **t80g** (h) : correspondent au temps mis pour relâcher les 35, 50 et 80 premiers g.L⁻¹ de CO₂ après soustraction de la durée de la phase de latence.

t35, t50 et **t80** (h) : correspondent au temps mis pour consommer les 35, 50 et 80 % de **tCO2max** dégagé après soustraction de la durée de la phase de latence.

V15_50 (g.L⁻¹.h⁻¹) et **V50_80** (g.L⁻¹.h⁻¹) : correspond à la consommation moyenne de sucre (g.L⁻¹) par heure entre 15 % et 50 % et entre 50 % et 80 % du **CO2max** dégagé.

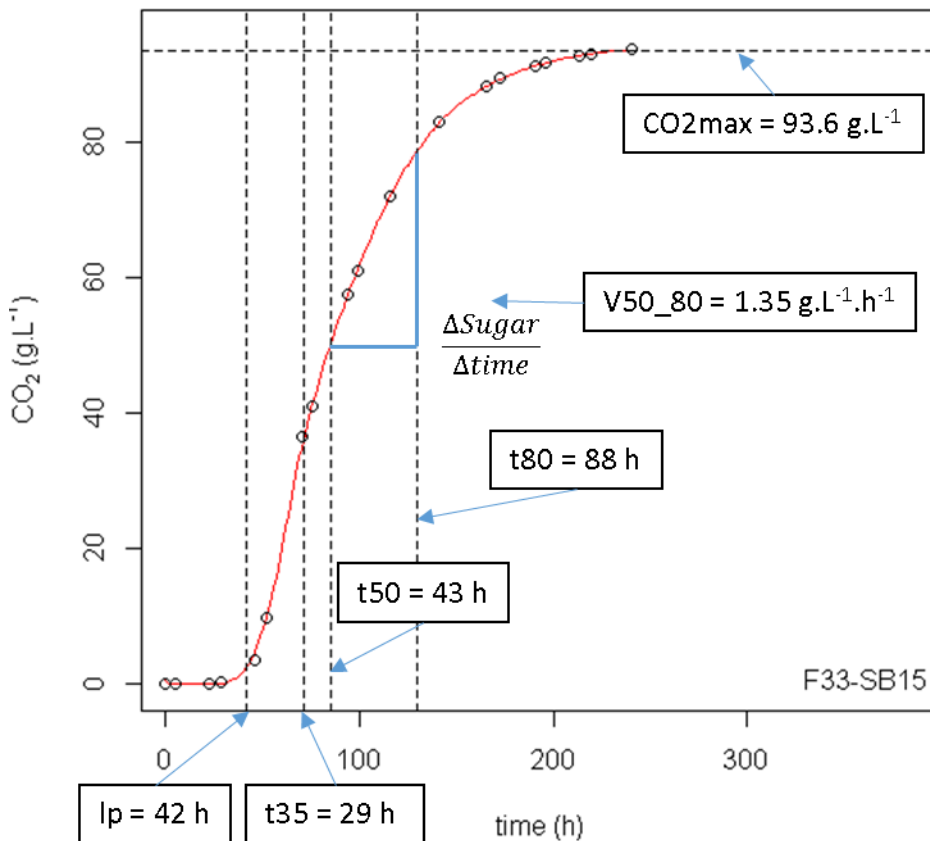


Fig 12 Exemple d'une cinétique obtenue et des paramètres cinétiques extraits
Cinétique de fermentation obtenue avec la souche F33 dans le moût Sauvignon Blanc 2015. Les points représentent les valeurs calculées de CO₂ dégagé en fonction de la pesée. La ligne rouge est la prédiction des valeurs pour chaque heure de la fermentation à partir d'une régression polynomiale locale (loess).

Le rôle primordial des cinétiques fermentaires, de leur variabilité selon la souche de levure et de leur contrôle technologique a été évoqué dans la section 2 de la partie bibliographie

Paramètres métaboliques

Nous avons également étudié la teneur finale de certains métabolites clés en œnologie issus du métabolisme fermentaire de la levure. Ces composés sont :

- **l'éthanol**, le **glucose** et le **fructose** directement liés à la fermentation alcoolique.
- le **glycérol**, principal composé carboné produit lors de la FA après l'éthanol c'est un paramètre d'intérêt car il permet de modifier sensiblement le rendement de la réaction (Tilloy et al., 2014).
- **l'acide malique**, dont les variations de concentration ont un effet sur l'acidité totale et le déroulement de la fermentation malolactique réalisée par les bactéries lactiques.
- **l'acide acétique**, dont la présence impacte négativement les qualités organoleptiques du vin.
- Le **SO₂ total**, dont la présence impacte négativement les qualités sanitaires du vin. Dans ce contexte, nous mesurons également le **pyruvate** et **l'acétaldéhyde** qui peuvent se combiner avec le SO₂.

Ces traits sont importants en œnologie et leur contrôle *via* la sélection de levures correspond à des enjeux économiques actuels tels que la diminution du rendement alcool et des concentrations en SO₂.

Au sujet du rendement de la fermentation alcoolique, le besoin actuel est de diminuer le taux de conversion sucre/éthanol (Cuello et al., 2017; Kutyna et al., 2010; Tilloy et al., 2014). Ce besoin découle d'une volonté de compenser l'augmentation croissante du degré d'alcool des vins observée au cours des vingt dernières années (Tilloy et al., 2014). Cette augmentation est due à une évolution dans la pratique de vinification, avec la récolte de raisins très mûrs qui est privilégiée pour s'adapter à la demande du consommateur en des vins avec des saveurs riches de fruits mûrs. Le réchauffement climatique a également un effet direct sur la teneur en sucre des moûts en la faisant augmenter. Cette volonté émane aussi d'un contexte de politique de santé publique qui tend à être moins tolérant envers les boissons aux degrés d'alcools élevés. Les teneurs élevées en éthanol peuvent avoir des répercussions négatives sur les qualités sensorielles des vins, principalement en masquant les saveurs de certains composés volatils et en produisant une sensation désagréable de chaleur et de lourdeur (Escudero et al., 2007; Gawel et al., 2007b, 2007a; Vidal et al., 2004). Des concentrations élevées en éthanol peuvent aussi inhiber la fin de la fermentation alcoolique et la rendre languissante ou la bloquer (Blateyron and Sablayrolles, 2001; Buescher et al., 2001).

Concernant la concentration du vin en SO₂, il est nécessaire de la réduire au maximum (Noble et al., 2015). Le SO₂ est communément ajouté dans le moût avant le démarrage de la fermentation alcoolique

pour ses propriétés antimicrobiennes qui réduit le développement des levures et bactéries indigènes. Cet agent à également un rôle antioxydant puissant qui préserve le potentiel aromatique des vins. A la fin de la fermentation alcoolique, la concentration en SO_2 est variable. Elle dépend notamment de la levure qui peut en consommer ou en produire (Henick-Kling and Park, 1994). La concentration finale du vin en SO_2 est un problème par rapport à sa toxicité et est réglementée par la loi (limite maximale de 260 mg.L^{-1} en France). De plus, une concentration élevée de SO_2 peut retarder le déclenchement de la fermentation malolactique en inhibant les bactéries lactiques (Carreté et al., 2002; Henick-Kling and Park, 1994).

1.2.3 Mise en place d'un protocole de dosage

La mesure de la concentration des composés d'intérêt est réalisée par dosage enzymatique. Cette méthode présente l'avantage de n'avoir besoin que de faibles quantités d'échantillon pour le dosage (une dizaine de μL) et s'accorde sur ce point avec le faible volume des fermentations mises en œuvre. Lorsqu'elle est couplée avec l'utilisation d'un robot pipeteur cette méthode permet de doser plusieurs milliers d'échantillons en une journée. L'utilisation d'un tel robot est rendue possible par le biais de la plateforme métabolique de Bordeaux. La gestion des nombreux échantillons est facilitée par le stockage des échantillons dans des tubes à vis de 1,1 mL (Micronic 1.10 mL Non coded Screw Cap tubes V-bottom Bulk) qui sont eux même stockés dans des portoirs de 96 emplacements (Roborack-96 Micronic) (Fig 13). La manipulation d'un grand nombre d'échantillon est facilitée par l'utilisation d'un robot pour le vissage et le dévissage des bouchons (Automated screw cap decapper, Hamilton) et d'un robot pipeteur (MICROLAB STAR, Hamilton).

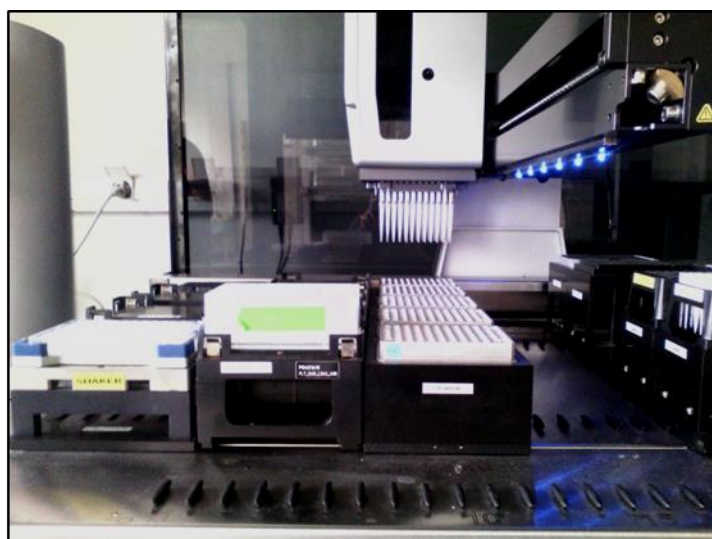


Fig 13 Photo d'un portoir et d'un robot pipeteur

Des kits enzymatiques commerciaux pour doser les composés d'intérêts dans une matrice fermentée sont disponibles. Le premier travail a été de tester leur efficacité dans notre contexte. Il était souhaitable de pouvoir doser les échantillons de vins tels quels avec un minimum de traitement à effectuer afin de ne pas alourdir le dosage avec des manipulations non automatisées.

Des échantillons de vins rouges et de vins blancs ont été produits au laboratoire et l'efficacité des dosages directement testées sur ces échantillons bruts. Afin de valider chaque dosage, la gamme linéarité du dosage est estimée ainsi que son % de *recovery* en ajoutant des concentrations croissantes en standard dans les échantillons (Fig 14). Le Tableau 1 donne pour les conditions en rouge les R^2 de linéarité et le % de *recovery* pour chaque composé dosé.

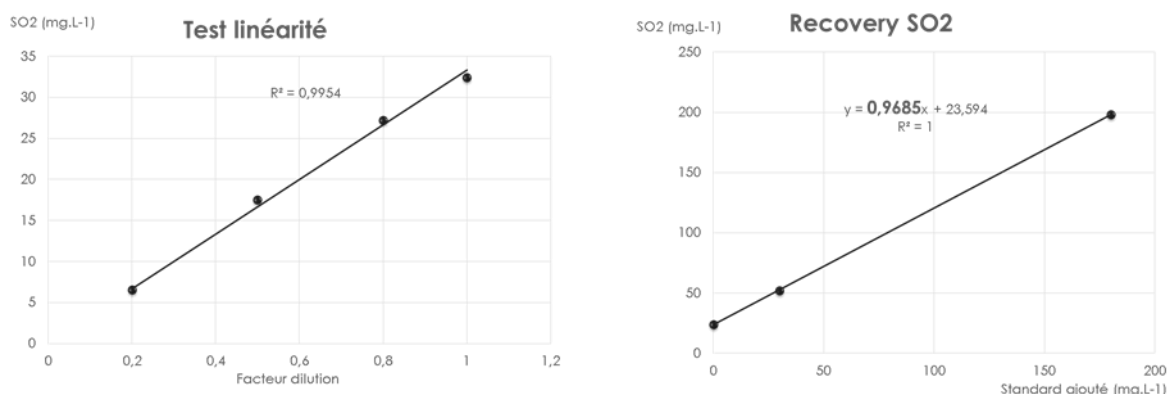


Fig 14 Exemple des tests réalisés pour les dosages enzymatiques sur le SO_2
 Les valeurs représentées sont les moyennes de deux répétitions. Le dosage a été effectué sur le moût Sauvignon blanc 2014. Echantillon de vins bruts générés par fermentation 125 mL.

Composé	Dilution	Volume échantillon (μL)	Limite linéarité basse testée	Limite linéarité haute testée	Recovery
Acide acétique ($g.L^{-1}$)	1	5	0,02	0,48	0,96
Acide malique ($g.L^{-1}$)	0,04	10	0,4	3,69	0,99
Acide pyruvique ($mg.L^{-1}$)	1	10	44	123	0,97
Glucose ($g.L^{-1}$)	0,04	50	1,44	72,06	0,9
Fructose ($g.L^{-1}$)	0,04	50	1,44	54,05	0,99
Glycérol ($g.L^{-1}$)	0,025	10	1,11	11,05	0,91
SO_2 ($mg.L^{-1}$)	1	10	3	90	0,96

Tableau 1 Gamme de linéarité des échantillons et recovery dans le moût Merlot 2014

Des difficultés ont été rencontrées pour le dosage de l'éthanol qui ne permettait pas l'obtention de valeurs suffisamment précises dans le contexte de notre travail. En effet, la concentration élevée en éthanol dans le vin nécessite pour son dosage une dilution importante qui réduit fortement la précision de la mesure. A l'opposé ce sont les faibles concentrations de pyruvate et d'acétaldéhyde retrouvées dans les échantillons qui ont posées des difficultés. Afin de détecter ces deux composés le volume d'échantillon doit être augmenté dans le volume de réaction total afin de le concentrer. Dans une certaine mesure cela ne pose pas de problème pour les échantillons de vin blanc, en revanche pour le vin rouge la pigmentation interfère avec la longueur d'onde à laquelle est lue l'absorbance lors du dosage. C'est pourquoi en rouge, le dosage de l'acétaldéhyde s'est avéré impossible et le dosage du pyruvate moins précis qu'en blanc (limite de détection 44 mg.L^{-1}). Concernant les autres composés, la méthode est pleinement efficace et reproductible. Les concentrations obtenues pour chaque composé se situent dans l'ordre de grandeur de celles classiquement retrouvées dans le vin. Les différences phénotypiques connues entre les souches et identifiées notamment lors des fermentations en volume de 125 mL ont été retrouvées (voir Article 1).

Grâce à la réduction du volume fermentaire et la mise en place de tests robotisés plus de 250 fermentations peuvent être suivies en même temps et le dosage d'un composé pour environ 2000 échantillons peut être réalisé en une demi-journée. Le bilan complet coûte 1,20 € par échantillon.

1.2.4 « Gestion » des levains

La méthodologie mise en place permet le lancement d'un grand nombre de fermentations simultanément. En fonction du plan d'expérience, la fermentation parallèle d'un grand nombre de souches différentes peut être nécessaire. Cela implique de pouvoir gérer les précultures de plusieurs centaines de souches. Afin de faciliter les précultures, elles sont réalisées en microplaque de 96 puits de 1 mL. Les souches à inoculer sont stockées à -20 °C dans un milieu YPD + 50 % de glycérol. Chaque préculture est réalisée en transférant 20 μL des cultures stockées à -20 °C dans 400 μL de YPD. Après 24 h à 30 °C , 20 μL de cette culture sont transférés à nouveau dans 400 μL d'YPD et cultivés pendant 24 h à 30 °C . Le nombre de cellules par mL ainsi que leur viabilité sont mesurés par cytométrie de flux d'après la méthode décrite par Zimmer *et al.* (2014). Le volume nécessaire pour une inoculation du milieu de fermentation à $2 \cdot 10^6$ cellules viables par mL est calculé pour l'ensemble des souches à inoculer. La moyenne de ce volume (généralement proche de 200 μL) est utilisée pour inoculer l'ensemble des souches.

1.3 Étude des facteurs environnementaux générant des réponses phénotypiques divergentes

1.3.1 Problématique

Nous avons recherché par la suite des paramètres œnologiques pertinents capables de générer des réponses différenciées chez des souches de levures œnologiques. La variation de ces paramètres devait correspondre à une plage de valeurs communément rencontrée en œnologie. Les possibilités d'investigation étaient nombreuses, incluant la composition initiale du moût en nutriments (concentration en sucre, azote ou lipide), et certaines propriétés physiques comme la température de fermentation ou le niveau d'oxygénation. Ces paramètres ont principalement été testés sur le couple de souches parentales SB et GN.

1.3.2 Influence de la composition en nutriment du moût

Dans un premier temps, l'effet des deux principaux éléments nutritifs des moûts (sucre et azote) ont été étudiés. Pour cela, 3 moûts ont été utilisés comme base : Sauvignon blanc 2014 (SB14), Merlot 2014 (M14) et Cabernet-Sauvignon 2014 (CS14), auxquels a été rajouté du sucre (quantité équivalente de glucose et de fructose) et d'azote (Sulfate d'ammonium ou mélange sulfate d'ammonium acide aminé). L'effet de ces paramètres environnementaux a été observé chez les souches parentales SB et GN. La Fig 15 décrit le plan expérimental réalisé.

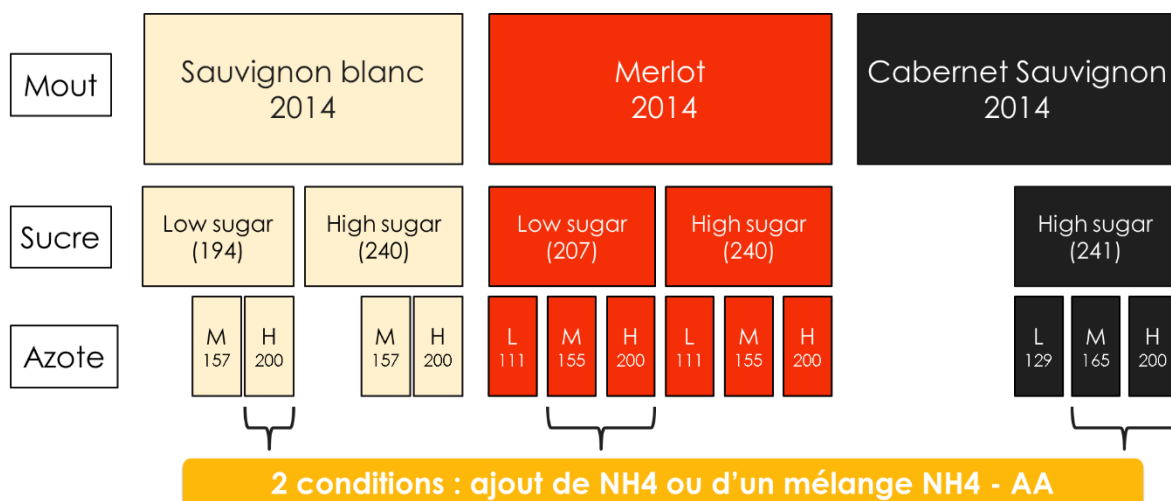


Fig 15 Plan expérimental pour le test de l'effet moût, sucre et azote sur la fermentation de SB et GN.

Pour chaque condition la concentration en sucre est indiquée en $g.L^{-1}$ et celle en azote en $mg.L^{-1}.N^{-1}$. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque condition.

Les résultats qui ont été obtenus sont présentés sous forme de *heatmap* (Fig 16). Cela permet rapidement de visualiser l'écart entre les deux souches. Ainsi on voit par exemple que SB produit plus de glycérol et qu'elle laisse moins d'acide malique que GN dans toutes les conditions. Pour certains traits comme la phase de latence, la vitesse de fermentation et la production d'acide acétique les réponses phénotypiques non homogènes ont été obtenues (Fig 17). La phase de latence et la vitesse de fermentation interagissent avec la concentration en sucre du milieu. En effet, l'augmentation de la concentration en sucre fait augmenter de 2,5 fois l'écart de la durée de la phase de latence entre les souches. De manière similaire le facteur sucre accentue les différences de vitesse de fermentation entre les deux souches (t35, t50 et t80). Concernant l'acide acétique, une forte interaction avec le moût a été identifiée puisqu'elle inverse les rangs des souches. SB produit moins d'acide acétique que GN dans les moûts rouges tandis que c'est l'inverse en blanc.

Les interactions identifiées avec le sucre ne sont que des exacerbations de phénotypes déjà identifiés (GN phase de latence plus courte, fermentation plus lente) ; elles ont donc été mises de côté. En revanche, la production d'acide acétique présentant une interaction croisée entre les deux souches correspond au type d'interaction recherché.

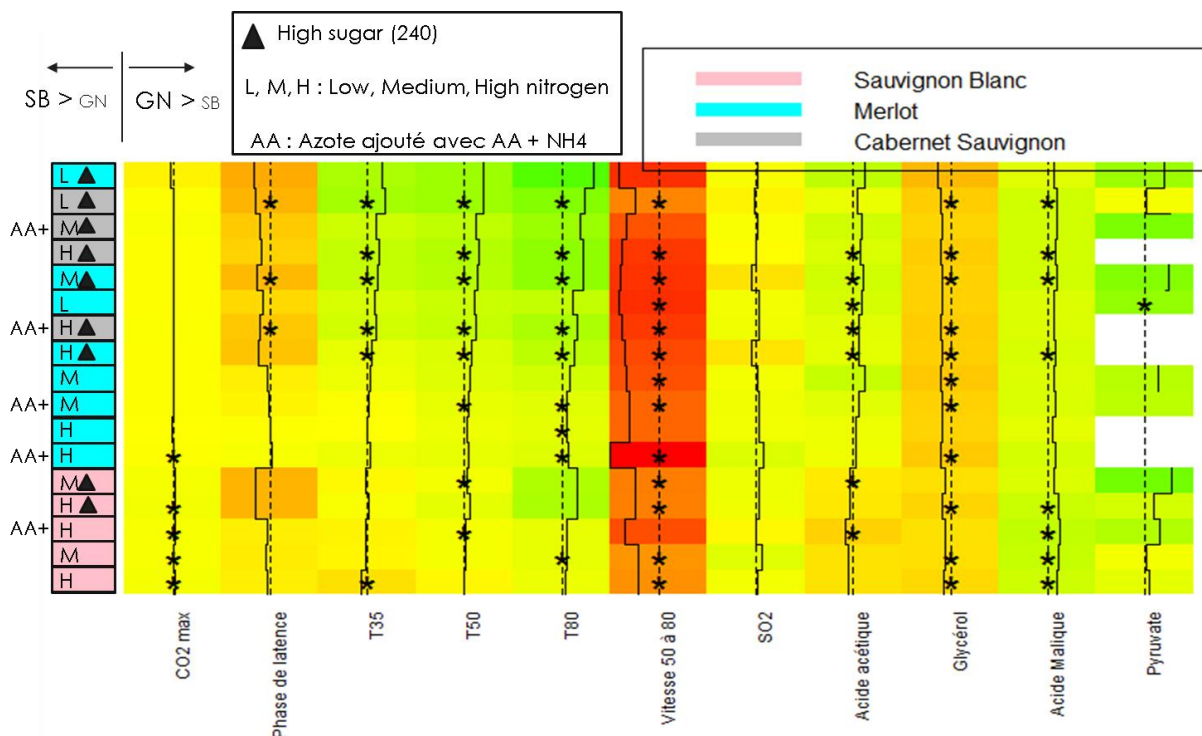


Fig 16 Écart entre les souches SB et GN en fonction des conditions
 Les valeurs représentées sont les différences entre la valeur phénotypique obtenue pour GN et pour SB (3 répétitions). Une étoile signifie une différence significatives (wilcoxon, $\alpha = 0.05$).

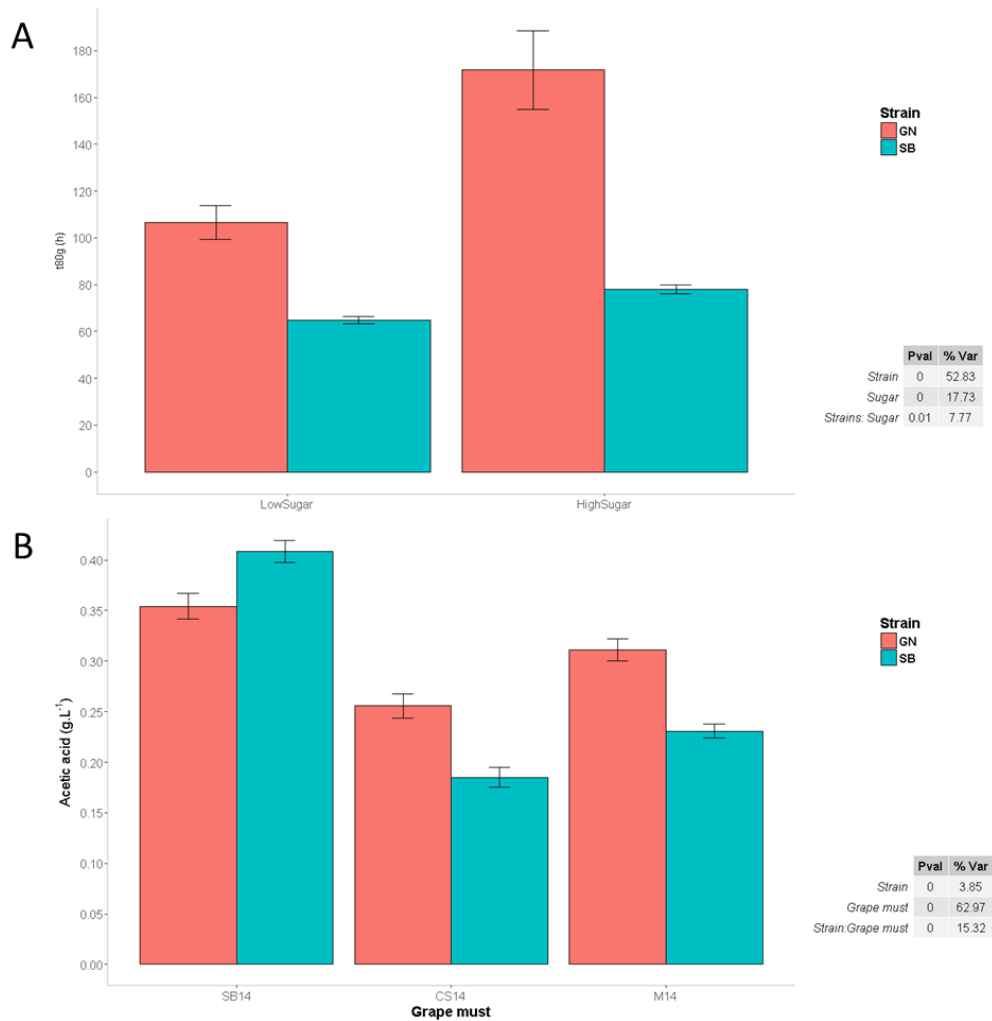


Fig 17 Interactions identifiées

Panel A. Interaction entre le t80 et la concentration en sucre en SB14. Chaque valeur représente la moyenne des valeurs de t80 mesurées en SB14 pour toutes les conditions d'azote testée. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type. LowSugar et HighSugar correspondent respectivement à 194 g.L⁻¹ et 240 g.L⁻¹ de sucre. Le tableau indique les pourcentages de variance expliquées par chaque facteur selon le modèle : $t80 \sim \text{Strain} + \text{Sugar} + \text{Strain} * \text{Sugar}$. **Panel B.** Interaction entre la production d'acide acétique et le moût. Chaque valeur représente la moyenne des valeurs mesurées dans chaque moût pour toutes les conditions de sucre et d'azote testées. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type. Le tableau indique les pourcentages de variance expliquées par chaque facteur selon le modèle : $\text{Acetic acid} \sim \text{Strain} + \text{Grape must} + \text{Strain} * \text{Grape must}$.

1.3.3 Influence des paramètres physiques.

L'ensemble des fermentations s'est déroulé dans une étuve à 24 °C. Aucun test sur la température n'a été réalisé afin d'éviter le potentiel débordement de fermenteurs en cas de température plus élevée. En revanche, l'impact du niveau d'oxygénation durant la fermentation a été testé. Bien que le contrôle de transfert actif d'oxygène soit délicat à mettre en place en fermentation, nous avons pu trouver des conditions expérimentales permettant de mimer de manière reproductible une micro-oxygénation du

milieu fermentaire. Pour cela nous avons fait varier le diamètre de l'aiguille servant au dégagement du CO₂. Soit nous avons utilisé une aiguille G26 d'un diamètre de 0,40 mm soit un cône de pipette d'un diamètre d'environ 1 mm. L'effet du diamètre sur l'oxygénation du milieu a été vérifié. Pour cela des pastilles NomaSense O₂ P300 sensor (Nomacorc, Narbonne, France) qui permettent de mesurer la concentration en oxygène d'un milieu de manière non intrusive ont été collées à l'intérieur des fermenteurs. L'oxygène du milieu a été chassé par bullage d'azote et la cinétique de ré-oxygénation du milieu a été suivie dans un milieu non inoculé (et agité à 175 rpm). Les cinétiques obtenues confirment qu'un diamètre plus important permet un transfert supérieur d'oxygène Fig 18, panel A. Un résultat similaire est obtenu avec des aiguilles G26 dans un milieu agité et non agité (cf. Fig 3 Article 1). Un fort effet d'interaction a été identifié dans la réponse phénotypique des deux souches SB et GN (Fig 18, panel B). En effet, alors que dans la condition G26, les cinétiques de fermentation entre SB et GN en Merlot 2015 (M15) sont très différentes (126 h contre 186 h pour consommer les 80 premiers % de sucre) cet écart a été fortement réduit dans la condition P10 (90 h contre 103 h pour consommer les 80 premiers % de sucre). Cet exemple illustre que la souche GN a un besoin plus élevé en oxygène que la souche SB pour maintenir une vitesse de fermentation soutenue. Des expérimentations supplémentaires ont montré que l'utilisation du cône de P10 pendant seulement les 24 premières heures de la fermentation (remplacé par l'aiguille G26 pour le reste de la fermentation) permet d'obtenir les mêmes effets que lorsqu'il est utilisé tout au long de la fermentation (Fig 18, panel B). L'effet de l'oxygène sur les cinétiques a donc lieu au cours des 24 premières heures qui suivent l'inoculation. Au-delà de ce délai, le dégagement de CO₂ lié à la fermentation alcoolique empêche très certainement une entrée efficace de l'oxygène dans le fermenteur.

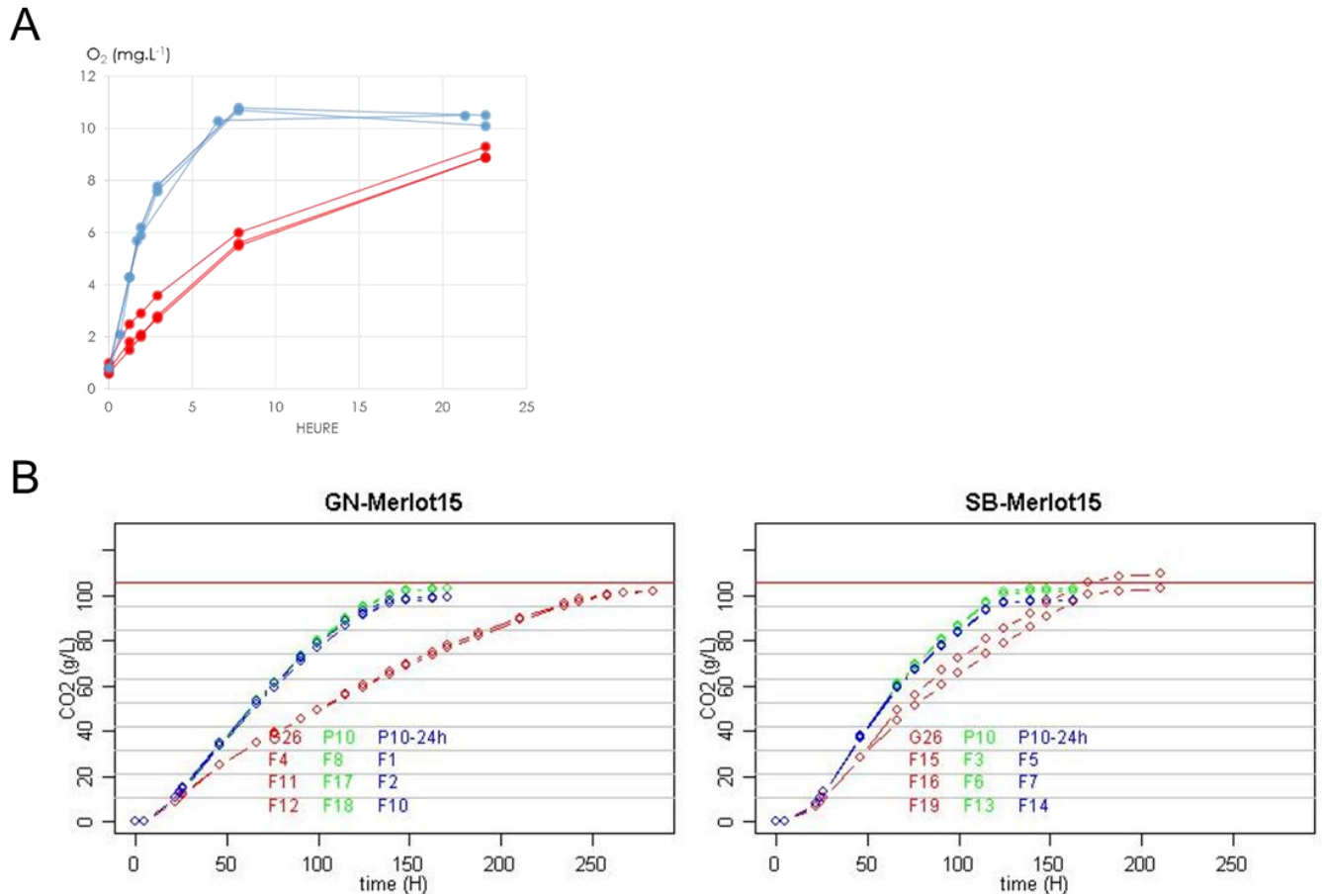


Fig 18 Effet du diamètre de l'aiguille sur l'oxygénation du milieu et la cinétique de fermentation.

Panel A. Cinétique d'oxygénation du milieu en condition G26 (rouge) et P10 (bleu). **Panel B.** Cinétique de fermentation de SB et GN en Merlot 2015 avec une aiguille G26 (rouge), P10 (vert) ou P10 pendant 24 h puis G26 (bleu).

Les vins obtenus avec un cône P10 possèdent des concentrations en acide acétique bien au-delà des valeurs classiquement observées dans le vin ($>1 \text{ g.L}^{-1}$) (Fig 19). L'apport en oxygène fourni par la modalité P10 est donc trop important par rapport à la pratique œnologique où les apports recommandés sont de l'ordre de 5 à 7.5 mg.L^{-1} . Afin de moduler le niveau d'oxygénation nous avons donc cherché une condition plus stringente en oxygène que celle de G26. Ne pouvant pas disposer d'aiguilles plus fines, nous avons employé une autre stratégie en modifiant le niveau d'agitation du milieu. La condition initiale est agitée de manière homogène sur un agitateur orbital à 175 rpm. Une condition non agitée a été comparé à cette condition initiale. Une plus faible oxygénation du milieu a été confirmée et l'effet d'interaction conservé puisque l'absence d'agitation exacerbe la différence de cinétique entre SB et GN. C'est une condition agitée et non agitée qui a donc été retenue pour évaluer

l'effet du niveau d'oxygénation sur les traits mesurés et dont les effets sont décrits plus en détail dans l'Article de ce chapitre.

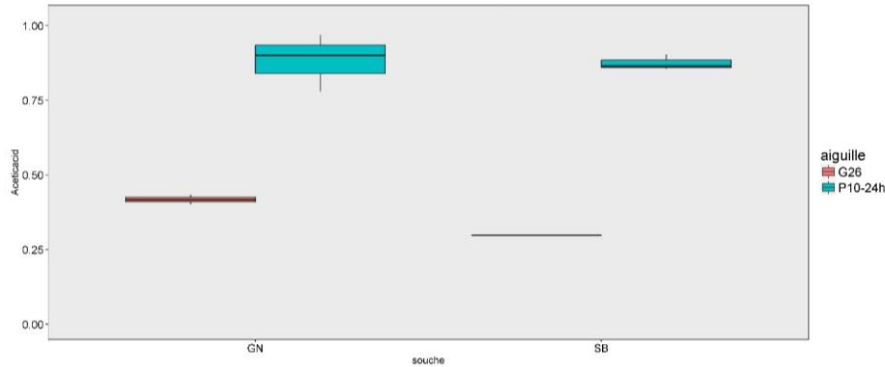


Fig 19 Surproduction d'acide acétique en condition P10
Production d'acide acétique en fonction de la souche et de l'aiguille (3 répétitions).

1.4 Conclusion

Ces travaux préliminaires ont permis de mettre au point une méthode de phénotypage pour la gestion de centaines de fermentations simultanément avec un suivi de la cinétique fermentaire et la mesure de la concentration de huit composés en fin de fermentation. Des paramètres environnementaux qui ont un effet divergent sur la réponse phénotypique des souches ont été identifiés. C'est le cas du niveau de micro-oxygénation au cours de la fermentation ainsi que de l'effet global de la composition initiale du moût. L'article qui suit illustre l'utilité de cette méthode. Elle permet de situer le comportement des quatre souches parentales (M2, F15, SB, GN) au sein d'un panel de 31 souches commerciales dans cinq moûts différents. Ce travail a été soumis à la revue PLOS ONE et fait l'objet de la partie suivante.

2 Principaux résultats (Article 1)

Ce sous-chapitre a fait l'objet d'un article scientifique soumis à PLOS ONE et en cours de révision

Wine yeast phenomics: a standardized fermentation method for assessing quantitative traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains in enological conditions

Emilien Peltier^{1,2*}, Margaux Bernard^{1,2}, Marine Trujillo^{1,3}, Duyen Prodhomme⁴, Jean-Christophe Barbe¹, Yves Gibon⁴, Philippe Marullo^{1,2}

¹ Univ. Bordeaux, ISVV, Unité de recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRA, Bordeaux INP, Villenave d'Ornon, France.

² Biolaffort, Bordeaux, France.

³ Pernod Ricard, Creteil, France

⁴ INRA, University of Bordeaux, UMR 1332 Fruit Biology and Pathology, F-33883 Villenave d'Ornon, France

*Corresponding author

E-mail:emilien.peltier@u-bordeaux.fr (EP)

Abstract

This work describes the set up of a small scale fermentation methodology for measuring quantitative traits of hundreds of samples in an enological context. By using standardized screw cap vessels, the alcoholic fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* strains were measured by following their weight loss over the time. This dispositive was coupled with robotized enzymatic assays for measuring metabolites of enological interest in natural grape juices. Despite the small volume used, kinetic parameters and fermentation end products measured are similar with those observed in larger scale vats. The vessel used also offers the possibility to assay 32 volatiles compounds using a headspace solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography and mass spectrometry. The vessel shaking applied strongly impacted the most of the phenotypes investigated due to oxygen transfer occurring in the first hours of the alcoholic fermentation. The impact of grape must and micro-oxygenation was investigated illustrating some relevant genetic x environmental interactions. By phenotyping a wide panel of commercial wine starters in five grape juices broad phenotypic correlations between kinetics and metabolic end products were evidenced. Moreover, a multivariate analysis illustrates that some grape musts are more able than others to discriminate commercial strains since some are less robust to environmental changes.

Introduction

In the last decade, the emergence of Next Generation Sequencing (NGS) has opened perspectives for studying the genetic adaptation of microbial species in their specific environments (Gibbons and Rinker, 2015). This is the case for the wine related microbes found in ecological niches that continuously change from grape must to wine (Bokulich et al., 2014; Pinto et al., 2014). Thanks to the reduction in the genome sequencing costs, large comparative genomic studies were carried out at the intraspecific level for lactic bacteria (*Oenococcus oeni*) (Campbell-Sills et al., 2015) and various yeast species, including *Saccharomyces uvarum* (Bokulich et al., 2014; Pinto et al., 2014), *Bretanomyces bruxellensis* (Almeida et al., 2014; Borneman et al., 2014) and *Saccharomyces cerevisiae* (Borneman et al., 2016). The bioinformatics analysis of such genomes shed light on genomic adaptation mechanisms such as chromosomal introgression (Almeida et al., 2014), chromosomal translocations (Pérez-Ortín et al., 2002; Zimmer et al., 2014), horizontal transfer (Marsit et al., 2015; Novo et al., 2009), polyploidy (Albertin and Marullo, 2012; Borneman et al., 2014); for an extensive review see (Marsit et al., 2017). Population genetics studies clearly demonstrates that the wine microbes show domestication signatures compared to other strains isolated in different biotopes (Albertin et al., 2014; Almeida et al., 2014; Campbell-Sills et al., 2015; Gallone et al., 2016; Liti et al., 2009).

To bridge the gap existing between this overall diversity and the specific molecular mechanisms of phenotypic adaptation, quantitative genetics approaches such Quantitative Trait Loci (QTL) mapping or Genome Wide Association Studies (GWAS) are usually used (Liti and Louis, 2012). QTL mapping turns out to be particularly efficient for identifying natural genetic variations controlling relevant traits of yeast in an enological context (Cubillos et al., 2017; García-Ríos et al., 2017; Huang et al., 2014; Martí-raga et al., 2017; Marullo et al., 2007a, 2007b; Noble et al., 2015; Salinas et al., 2012; Zimmer et al., 2014).

One of the main limitations of this approach is the requirement of intensive genotyping and phenotyping work. While the genotyping task can be easily achieved with NGS strategies (Bloom et al., 2013; Wilkening et al., 2014), the measurement of complex phenotypes for several hundred individuals is not yet an easy task. Recently, various methods for measuring yeast phenotypes in a high throughput way has been reviewed and referred to *phenomics* (Warringer and Blomberg, 2014). Although very efficient and standardized, these methods are mostly used for measuring yeast fitness (growth) by monitoring optical density (OD) or measuring colony size in various laboratory conditions. However, in food-related industry such as winemaking, many traits of interest are not related to yeast growth but are expressed during the stationary phase. Indeed, relevant phenotypic differences can be measured among strains having quite similar growth parameters (Marullo et al., 2009). Moreover, individuals showing the best growth are not always those having the highest CO₂ production rate (Marsit et al., 2015; Marti-Raga et al., 2016). Beyond the fermentation rate, yeast also produces many metabolic compounds that affect the organoleptic qualities of the fermented beverage (Dufour et al., 2013; Noble et al., 2015; Torrens et al., 2008). Therefore, an accurate assessment of fermentation-related traits remains a critical step for achieving large-scale studies including GWAS and QTL mapping.

In this study, a reliable method was set up for measuring several yeast fermentation traits in standardized 10 mL-vials. This method was useful for measuring genetics x environmental interactions between strains and fermentation parameters. We study here the impact of grape juice and micro-oxygenation conditions that affect most of the traits investigated. We shed light on phenotypic correlations existing between fermentation kinetics and metabolic end products by analyzing 35 commercial wine strains in five grape juices. Multivariate analyses were used for characterizing the phenotypic response of this panel. Several patterns with distinct metabolic specificities were observed and some strains are found to be more robust than others to environmental changes.

Materials and Methods

Yeast strains and culture media used

All the yeast strains used belong to the *Saccharomyces cerevisiae* species. Four strains are monosporic clones derived from industrial wine starters that have been previously described (Huang et al., 2014; Marullo et al., 2007a). The strains SB, GN and F15 are derived from Zymaflore VL1, Actiflore BO213, Zymaflore F15 (Laffort, Bordeaux, France), respectively, while M2 is derived from Oenoferm M2 (Lallemand, Blagnac, France). The remaining 31 strains used are commercial starters obtained from different companies. All these strains are genetically different and encompass the genetic diversity of wine yeast starters (Peltier *et al.* in prep). To avoid any conflict of interest there were encoded C1 to C31 and are available and deposited on the CRB collection of ISVV, S1Table. Yeasts were propagated on YPD (Yeast extract 1 % Peptone 1 % Dextrose 2 %) supplemented with agar (2 %) when required. The strains were long-term stored in YPD with 50 % of glycerol at -80 °C.

Grape musts and vessels used and fermentation monitoring

The five grape musts used, *i.e.* Merlot 2014 (M14), Merlot 2015 (M15), Cabernet Sauvignon 2014 (CS14), Sauvignon Blanc 2014 (SB14) and Sauvignon Blanc 2015 (SB15), were provided by *Vignobles Ducourt* (Ladaux, France) and stored at -20 °C. Before fermentation, grape musts were sterilized by membrane filtration (cellulose acetate 0.45 µm Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, France). Their main enological characteristics were determined by the wine analysis laboratory (SARCO, Floirac, France) and are given in Table 1. Sugar content was measured by infrared reflectance using an Infra-Analyzer 450 (Technicon, Plaisir, France), assimilable nitrogen as well as malic acid were assayed by enzymatic assay, total SO₂ and free SO₂ were assayed by Pararosaniline titration. The initial active SO₂ concentration was estimated using the protocol given at <http://www.vignevin-sudouest.com/services-professionnels/formulaires-calcul/so2-actif.php>. Input parameters used: pH and free SO₂ concentration of the grape must, fermentation temperature (24 °C), and 0.1 % of alcohol by volume to simulate the beginning of the fermentation.

Grape must	Code	Sugar content (g.L ⁻¹)	Assimilable Nitrogen (mg N.L ⁻¹)	Malic acid (g.L ⁻¹)	pH	total SO ₂ (mg.L ⁻¹)	free SO ₂ (mg.L ⁻¹)	active SO ₂ (mg.L ⁻¹)
Sauvignon Blanc 2014	SB14	194	157	5.6	3.19	34	7	0.32
Sauvignon Blanc 2015	SB15	203	158	2.9	3.25	67	23	0.91
Merlot 2014	M14	207	111	2.1	3.58	37	29	0.54
Merlot 2015	M15	219	99	1.9	3.53	46	33	0.68
Cabernet Sauvignon 2015	CS15	220	132	2.4	3.57	35	25	0.47

Table 1 - Grape musts composition

To carry out the fermentations, 10 mL screwed vials (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA ref: 11981523) were used to ferment 3 mL or 5 mL of grape must. The Screwed Vials (here after named SV) were tightly closed with 18mm screw cap-magnetic-3mm HT silicone/PTFE (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA). Hypodermic needles (G26 – 0.45 x 13 mm, Terumo, Shibuya, Tokyo, Japan) were inserted into the septum for CO₂ release.

Fermentations were run by inoculating 2.10⁶ viable cell.mL⁻¹ of 24h-liquid culture (YPD) carried out in 1 mL deepwell microplates (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA). The concentration of viable cells was estimated by flow cytometry using a Cell Lab Quanta apparatus (Beckman Coulter, Brea, California, USA) according to the method described by Zimmer *et al.* (2014).

The fermentation temperature was maintained at 24°C by an incubator (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany). When specified, the SV were shaken at 175 rpm during the overall fermentation using an orbital shaker (SSL1, Stuart, Vernon Hills, Illinois, USA). In order to compare this new vessel type with already published conditions, 125 mL-glass bioreactors (GB) were also used according to the specification described by da Silva *et al.* (2015).

The fermentation kinetics was estimated by monitoring manually (2-3 times per day) the weight loss caused by CO₂ release using a precision balance (AB104, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). Theoretical maximum CO₂ release (tCO_2max) was calculated according to the formula: $0.482 * [Sugar]$ (da Silva *et al.*, 2015), where [Sugar] is the sugar concentration (g.L⁻¹) of the must. The amount of CO₂ released according to time was modeled by local polynomial regression fitting with the R-loess function setting the span parameter to 0.45. Six kinetic parameters were extracted from the model:

lp (h): lag phase time observed before to release the first 2 g.L⁻¹ of CO₂ ;

$t35$, $t50$ and $t80$ (h): time to release 35, 50 and 80 % of the tCO_2max after subtracting lp ;

$V50_{-80}$ (g.L⁻¹.h⁻¹): average hexose consumption rate between 50 % and 80 % of tCO_2max ;

CO_2max : maximal amount of CO₂ released (g.L⁻¹).

Enzymatic assays

At the end of the alcoholic fermentation, a sample volume of 800 μL was manually transferred in Micronics tubes (Novazine, Lyon, France, ref: MP32033L) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The concentrations of the following organic metabolites were measured: acetic acid, glycerol, malic acid, pyruvate, acetaldehyde and total SO_2 using the respective enzymatic kits: K-ACETGK, K-GCROLGK, K-LMAL-116A, K-PYRUV, K-ACHYD, K-TSULPH (Megazyme, Bray, Ireland) following the instructions of the manufacturer. Dilution level and volume of sample used are described in S2 Table. Glucose and fructose were assayed by using the enzymatic method described by Stitt et al. (Stitt et al., 1989), however in the presented data, all the fermentations were completed containing less than $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of residual sugars. All the enzymatic assays were performed by a robotic platform using the Bordeaux metabolomics facilities (<http://metabolome.cgfb.u-bordeaux.fr/>).

Apolar esters analysis

Samples were analyzed after thawing. Concentration of 32 esters (ethyl fatty acid esters, acetates of higher alcohol, ethyl branched acid esters, isoamyl esters of fatty acid, methyl fatty acid esters, cinnamates and minor esters) (S3 Table). Concentration was determined using a head space solid phase microextraction (HS-SPME) followed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) as described by Antalick *et al.* (2010).

Dissolved oxygen measurement

To control the initial oxygen concentration, oxygen was removed by bubbling nitrogen inside SV for 20 min. Non-intrusive measurement of the concentration of dissolved oxygen in the grape juice was done by using NomaSense O_2 P300 sensor (Nomacorc, Narbonne, France) bonded on the inner surface of the SV.

Statistical analyses

All the statistical and graphical analyses were carried out using R software (R Development Core Team, 2011). The variation of each trait was estimated by the analysis of variance (ANOVA) using the *avop* function of the *ImPerm* package in which significance of the results was evaluated by permutation tests instead of normal theory tests. Tukey's honest significant difference test was used on *avop* results to determine which group of means differ significantly using the *HSD.test* function (*agricolae* package) (de Mendiburu, 2014).

The LM1 model estimated the effect of strain, of grape must of micro-oxygenation of the strain-by-must interaction and of the strain-by-micro-oxygenation interaction on fermentation traits according to the following formula:

$$y_{ijk} = m + S_i + GM_j + MOX_k + (S * GM)_{ij} + (S * MOX)_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

where y_{ijk} was the value of the trait for strain i ($i = 1, \dots, 4$) in grape must j ($j = 1, 2$) and with micro-oxygenation level k ($k = 1, 2$), m was the overall mean, S_i was the strain effect, GM_j the grape must effect, MOX_k the micro-oxygenation effect, $(S * GM)_{ij}$ was the interaction effect between strain and grape must, $(S * MOX)_{jk}$ was the interaction effect between strain and micro-oxygenation level and ϵ_{ijk} the residual error.

Correlations between traits were computed with the Spearman method using the *cor* function and the significance of the results was assessed by the *cor.test* function at 0.95 of confidence level. Results were displayed with the *corrplot* function (*corrplot* package).

Principal Component Analysis (PCA) was calculated using the *ade4* package and heatmaps were generated with the *heatmap.2* function. When necessary non-parametric comparison of samples were carried out using the Wilcoxon-Mann-Whitney test ($\alpha = 0.05$).

Results

Optimization of the fermentation protocol in screw capped vials

The first aim of this study was to develop a fermentation method for measuring in a reliable manner numerous strains in a small volume. We used 10 mL-screwed vials (SV) filled with 3 or 5 mL of grape must. Their small and standard size can be conveniently exploited to run in parallel more than 300 fermentations at the same time in a small space (S1 Fig). In preliminary experiments (not shown), we observed that the volume of grape juice used influences the success of the fermentation. To evaluate this effect on enological parameters, the fermentation behavior of four yeast strains (M2, F15, SB, GN) was evaluated in the SB14 grape must in six replicates. Three conditions were tested: 3 mL with shaking (Sk.3_SV), 5 mL with shaking (Sk.5_SV) and 5 mL without shaking (noSk.5_SV). In order to validate the SV, the same juice was also fermented in 125 mL glass-bioreactors (Sk.125_GB) that had been previously used for measuring the fermentation behavior of numerous *Saccharomyces* strains and hybrids (da Silva et al., 2015). For all assays, fermentations were completed (no residual sugars

detected); the overall results are given in the S4 Table for the 12 parameters measured for each strain in the four assays.

Strikingly, the shaking conditions impacted the fermentation kinetics for all the strains. This is illustrated for example with the CO₂ kinetics of the GN strain, Fig 1, panel A. The CO₂ production rate was dramatically increased by shaking since the *t*₅₀ and *t*₈₀ significantly decreased (Wilcoxon test $\alpha = 0.01$). In contrast, the fermentation volume (3, 5 and 125 mL) did not affect the fermentation kinetics in shaken conditions, suggesting that scaling down in SV did not influence the fermentation behavior of yeast cell. The metabolic end-products were also affected by the shaking conditions, as shown in Fig 1, panel B for glycerol. As observed for kinetic parameters, the fermentation volume had a minor impact on the primary metabolites composition (such as glycerol) whereas shaking appeared as the main source of phenotypic variation. This result, observed for all strains, could be due to the higher oxidative conditions met in shaken cultures.

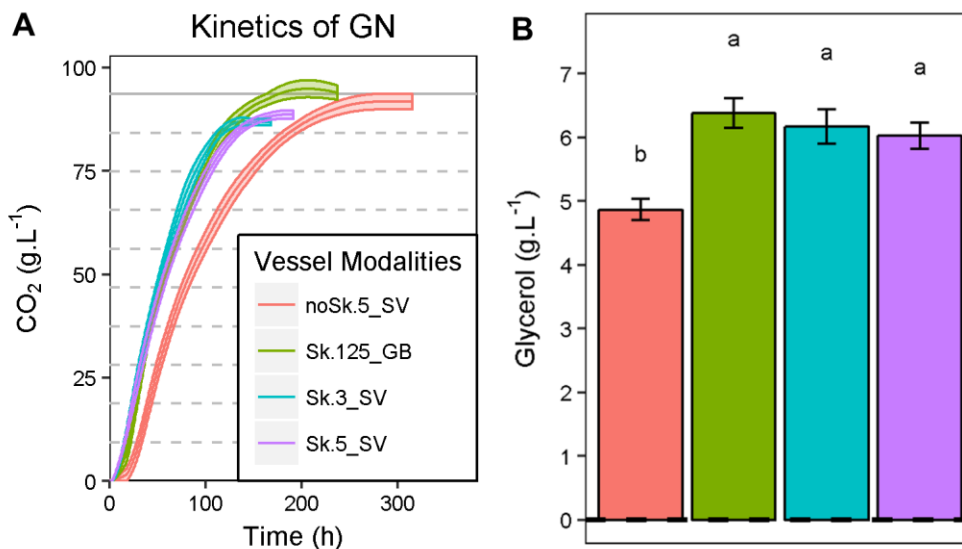


Fig 1 Impact of agitation on fermentation kinetics and metabolic compounds according to the fermented volume.

Panel A. CO₂ production kinetics of the GN strain fermenting SB14 grape must in four vessel modalities (Sk.3_SV, Sk.5_SV, noSk.5_SV, Sk.125_GB). The lines are the average CO₂ produced for 6 replicates; the shaded areas represent the standard error. **Panel B.** Glycerol production of GN strain according the vessel modalities. The values shown are the means of 6 replicates and the error bars represent standard error.

To compare the reliability of the measure, the coefficient of variation (CV %) was computed for each strain and the average CV was shown in S5 Table. Each fermentation, including the Sk.125_GB, was repeated 6 times. The assessment of fermentation kinetic traits is very reliable and confirms the efficiency alcoholic fermentation monitoring by weight loss measurement (Bely et al., 1990), even in

very small volumes (Fig 2, panel A). For some metabolic traits, high CVs (>25 %) were measured showing that some conditions are not reliable enough. This is the case for acetaldehyde, pyruvate or acetic acid for which the CVs are particularly high in shaken conditions. The Sk.3_SV trial was the less reliable and the cumulated CV for metabolic compounds is much higher than for the other three conditions (Fig 2, panel B). In this condition, the kinetics parameters are also less reproducible (CV>10 %). Moreover, for this condition, the concentrations of metabolites such as acetaldehyde and acetic acid are much higher than values found in enological practice (S4 Table). In contrast, noSk.5_SV offers the most reliable condition for both metabolic compounds and kinetic parameters. Except for the lag phase, the Sk.5_SV condition had an intermediate reliability level, similar to the 125 mL glass-bioreactors used here as a control.

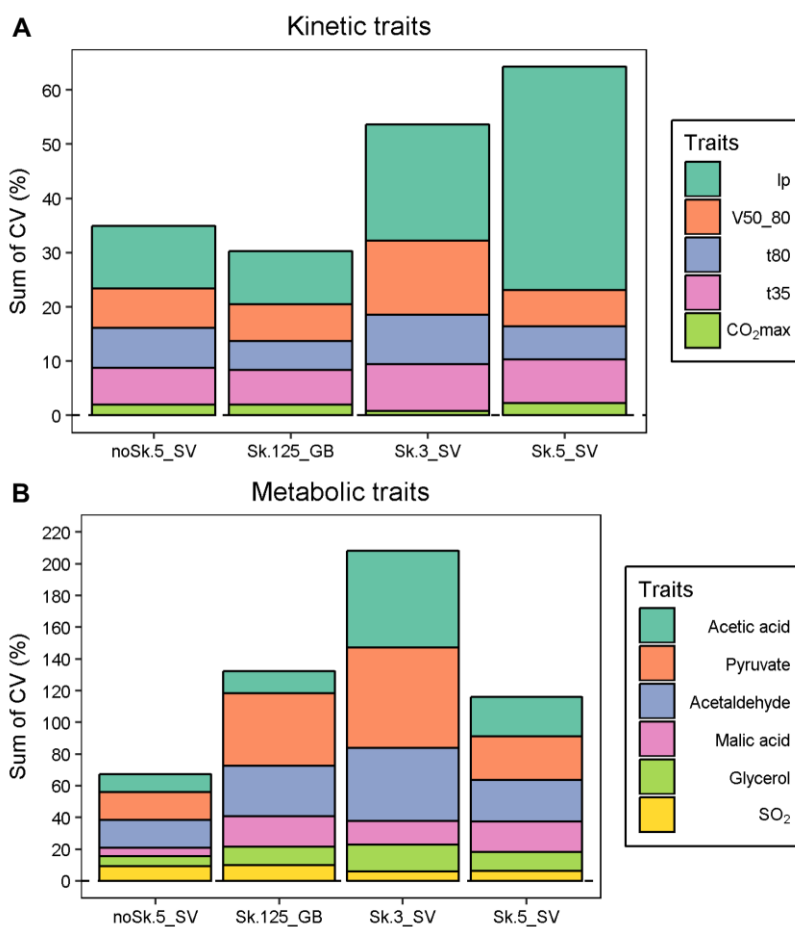


Fig 2 Trait measurement reliability for both kinetics and metabolite concentrations according to vessel modalities

The average CV for each trait was calculated from the CV values obtained for each strain (M2, F15, SB, GN) with 6 replicates. **Panel A.** The bar chart presents the cumulated CV for each kinetic parameter, the stacking is ordered from the least variable (*CO₂max*) to the most variable (*Ip*) trait. **Panel B.** The bar chart presents the cumulated CV for each metabolic end-product, the stacking is ordered from the least variable (*SO₂*) to the most variable (*Acetic acid*).

A second experiment was performed in 5mL-SV that enable reproducible conditions for most of the traits investigated. The 5ml-SV was preferred to 3ml-SV modality because of the outlier values and CV observed for some metabolic compounds. The micro-oxygenation effect was estimated by comparing modalities with or without shaking during the fermentation. The O₂ concentration was monitored during 20 hours in non-inoculated SB14 grape juice degassed by nitrogen bubbling. During this period, corresponding to the fermentation lag phase, oxygen can be efficiently transferred since CO₂ stripping is not active. Although this measurement did not correspond to real conditions because no yeast cells were present, the effect of agitation on the oxygen transfer could be estimated. Indeed, when yeast cells are present, all the dissolved oxygen is consumed in less than 20 hours due to the strong reductive conditions generated by yeast biomass (data not shown). In the shaken condition, the grape juice was immediately enriched with dissolved oxygen that reached a concentration of 3.7 mg.L⁻¹ after 20 h (Fig 3, panel A). In contrast, without shaking, there was only 2.4 mg.L⁻¹ of dissolved oxygen after 20 h. A maximum difference in oxygenation rate was found after three hours of incubation (Fig 3, panel B). Although the total amount of oxygen transferred during the overall fermentation cannot be measured, these data suggest that agitation in 5mL-SV significantly impacts the micro-oxygenation level. These small, but significant differences could explain the kinetic and metabolic differences described in Fig 1.

In order to have a broader idea of the impact of micro-oxygenation on secondary metabolism, we next measured the production of volatile compounds. At the end of the alcoholic fermentation, the headspace volume of SV was analyzed using a targeted GC-MS analysis. Up to 32 esters were quantified for the four strains in shaken or not conditions (S6 Table). A Principal Component Analysis (PCA) (75.5 % of total variance for axes 1 and 2) was carried out for exploring this multivariate dataset (Fig 3, panel C). The first component clearly discriminates shaken from non-shaken conditions while the second axis mainly discriminates strains. Indeed, the production of esters was greatly impacted by shaking. Up to 27 of the 32 esters were significantly affected (ANOVA, $p_{val} < 0.05$), 14 with a decreased and 13 with an increased production in the shaken condition (S6 Table). The compounds, for which shaking decreased their production, were mainly acetates of higher alcohols, methyl and ethyl fatty acid esters while those for which the production was increased were mainly ethyl branched acid esters, ethyl acid esters with odd carbon numbers, cinnamates and minor esters. The proportion of PhC₂C₂ to C₂PhC₂ was six-fold decreased in shaken condition (S2 Fig). This could be caused by a higher oxygenation of the media.

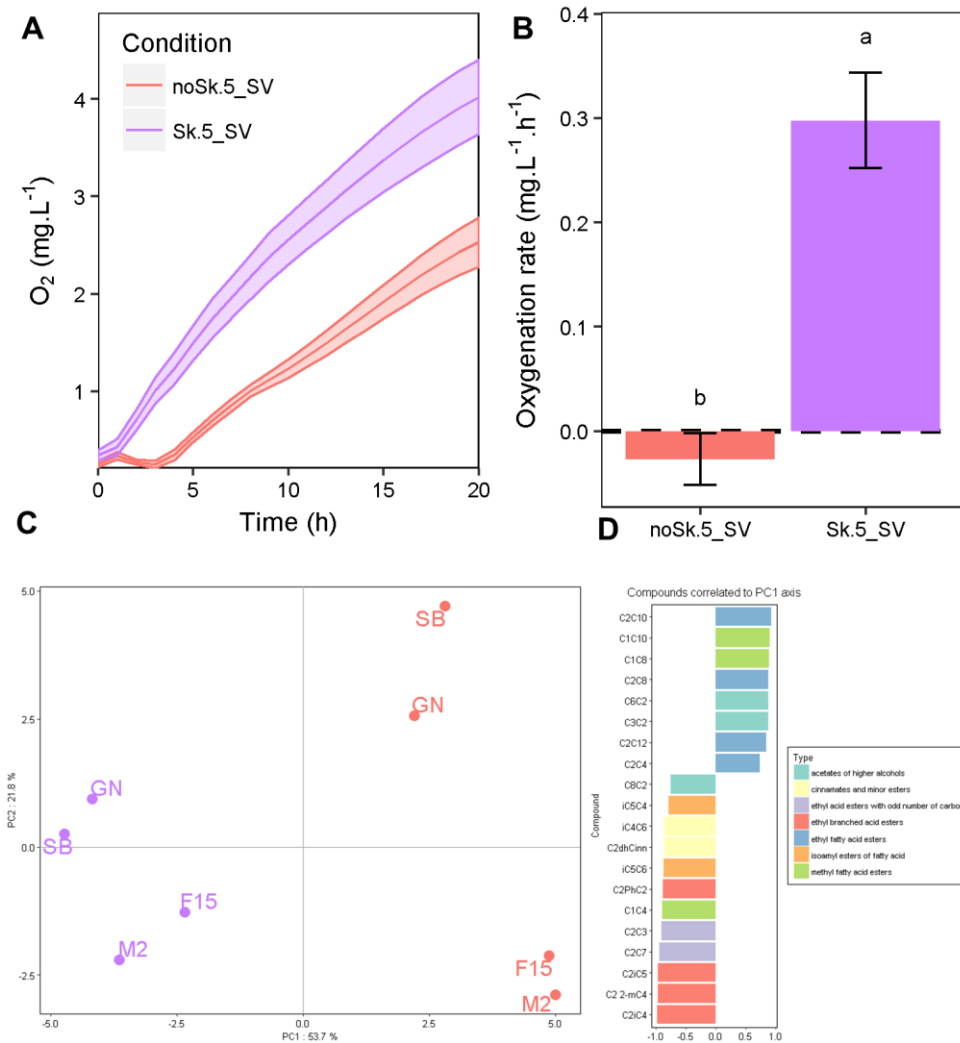


Fig 3 Measure and effect of micro-oxygenation in 5 mL SV

Panel A. Kinetics of dissolved oxygen concentration in SB14 grape must. The kinetic curves represent the mean of 6 replicates and the shadows around the lines illustrated the standard errors. **Panel B.** Concentration of the dissolved oxygen in SB14 after four hours. The data shown are the means of 6 replicates and the error bars represent the standard deviations. Different letters indicate significant differences between groups (Tukey's honest significant difference test, significance level, $\alpha = 0.05$). **Panel C.** PCA performed for the 32 esters measured. Each point represents one of the four the strains in noSk.5_SV or in Sk.5_SV. **Panel D.** Correlation of the variables to the PCA1 axis. The variables that were significantly correlated to the first axis of the PCA were shown ($\alpha = 0.05$), the bar plot indicated the Pearson's correlation coefficient.

Assessment of genetics x environmental effects

In order to demonstrate the efficiency of our SV fermentation setup, we explored phenotypic response of strains to relevant parameters for enology. On the basis of the results shown in Fig 2-3, shaken fermentations could be considered as micro-oxygenated modalities transferring moderate amounts (2-4 mg.L⁻¹ per day) of oxygen in a reproducible way. The possibility to control oxygenation in small

volumes is an opportunity to study the reaction of yeast strains against this technological parameter which has a significant impact on winemaking (Blateyron and Sablayrolles, 2001; Julien et al., 2000; du Toit et al., 2006). Assuming this statement, a second experiment was carried out in 5mL-SV, by fermenting the two grape juices SB14 and M15 with four strains (M2, GN, F15 and SB) and with or without shaking. This set of 160 fermentations (S7 Table) ran at the same time allowed to estimate the effects of three main factors: (i) strain, (ii) micro-oxygenation, and (iii) grape must. The proposed model for the analysis of variance also estimated the primary interaction within strain and grape must or micro-oxygenation (model LM1 described in material and methods). Thanks to the small volume used, 10 biological replicates were carried out for each strain and condition, thus increasing the statistical power of the analysis. For most of the traits, the phenotypic variance was first explained by the grape juice nature, then by the yeast strain used (Table 2).

The effect of micro-oxygenation mainly influenced kinetic parameters (t_{50} , t_{80}) and metabolic end-product such as SO_2 and *Glycerol*. For this last trait, the micro-oxygenation increased the production by 15 % (Fig 4, panel A) for all the strain, as previously reported by others (Alfenore et al., 2004; Reddy and Reddy, 2011; Remize et al., 2000). Few strain x environment interactions were detected and accounted only for a small part of the total variance explained (less than 10%). The most striking interaction effects were found for the lag phase duration (l_p). Indeed, for this trait, the yeast strain phenotype is differentially affected by both the micro-oxygenation and the grape must. The panel B of Fig 4 shows that the strains SB and M2 had a longer lag phase in the SB14 grape must than in M15 (+ 6 h). Moreover, shaking resulted in a reduced lag phase for M2 in the SB14 grape must. In contrast, F15 and GN were affected neither by the grape must nor by the agitation. In the same way, the *acetic acid* production of GN showed a complex GxE interaction (Fig 4, panel C). Globally, as previously described (Delfini and Cervetti, 1991), micro-oxygenated conditions tends to reduce the production of this compound, which is undesirable in enology. Interestingly, in the M15 grape must, GN showed the lowest acetic acid production even in a non-agitated fermentation, suggesting that it is an interesting low producer whatever the conditions. This second experiment confirms the reliability of SV for assessing wine fermentation traits in various environmental conditions and paves the way for larger phenotypic investigations.

	CO ₂ max	Ip	t35	t50	t80	V50_80	SO ₂	Acetic acid	Malic acid	Pyruvate	Glycerol
Must	37.9 ***	15.8 ***	38.6 ***	36.8 ***	35.2 ***	21.5 ***	15.4 ***	10.7 ***	81.2 ***	4.9 **	0.3
Strain	2.3 .	41.5 ***	10.3 ***	16.7 ***	27.3 ***	43.8 ***	4.3 ***	3.7 *	8.1 ***	9.0 ***	17.2 ***
Micro-Oxygenation	7.4 ***	2.8 ***	37.2 ***	32.1 ***	22 ***	20.2 ***	40.3 ***	39.1 ***	0	5.2 ***	49.4 ***
Strain:Must	0.3	10 ***	2.1 ***	2.5 ***	2.7 ***	0.5	2.8 **	0.4	0.2	6.8 ***	0.1
Strain:Micro-Oxygenation	0.6	3.7 ***	0.7 *	0.3	1.6 ***	0.1	1.8 .	2.6 *	1.1 ***	4.0	1.8 *
Residuals	51.4	26.2	11.1	11.6	11.3	13.9	35.5	43.5	9.4	70	31.3

Table 2 Analysis of variance for the 11 phenotypes with 4 strains, 2 musts and 2 micro-oxygenation conditions

Percentage of variance explained by the LM1 model. Significance codes: pval < 0.001 = ***, pval < 0.01 = **, pval < 0.05 = *, pval < 0.1 = .

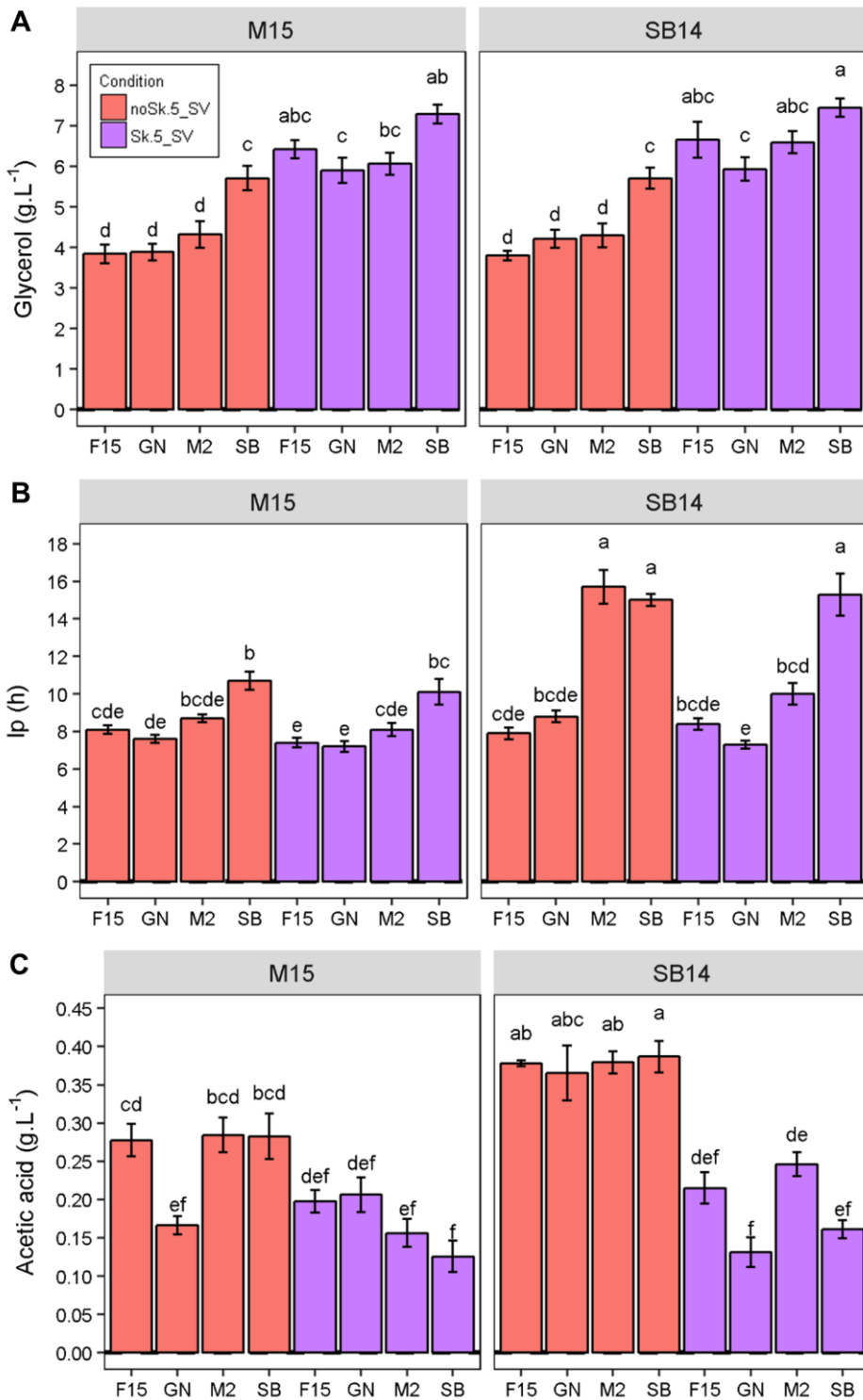


Fig 4 Effect of micro-oxygenation level and grape must on technological properties of wine yeast strains

The data shown are the mean of 10 replicates, the error bars representing the standard error. Different letters indicate significant differences between groups (Tukey's honest significant difference test, significance level, $\alpha = 0.05$). **Panel A.** *Glycerol* (g.L⁻¹) according to strain and fermentation conditions. **Panel B.** *Ip* (h) according to strain and fermentation conditions. **Panel C.** *Acetic acid* (g.L⁻¹) according to strain and fermentation conditions.

Evaluation of technological properties of 35 wine yeast strains in 5 grape juices.

The SV fermentation setup coupled with robotic assisted enzymatic assays offers the opportunity to measure in parallel the fermentation behavior of numerous strains in various conditions. As a matter of proof, we evaluated in a unique experiment the fermentation properties (kinetics and end by-products) of 35 strains in five grape juices and two repetitions (350 SV) without shaking. No shaken conditions were preferred in this experiment because they emphasize the phenotypic differences between strains due to the hypoxic conditions generated (Fig 1, S4 Table). In this experiment, we used three red grape musts (M14, M15 and CS14) and two white grape musts (SB14 and SB15) from the Bordeaux area. As all the fermentations were completed (less than 1.5 g.L⁻¹ of residual sugars), the final concentrations of glucose and fructose were very low and thus removed from the data (not shown). Acetaldehyde concentrations were also removed, as they were very low in red wines and thus impacted data normality (not shown). The measurement of the 11 quantitative variables for 175 modalities is given in S8 Table.

This large dataset offer the possibility to address several questions. First, we explored the impact of the grape juice nature by performing a multivariate analysis. The first two axis of the Principal Component Analysis (PCA) carried out explained 58 % of total variance. The first component (42 % of total variance) clearly discriminates red and white juices and was correlated with *Malic acid*, *SO₂*, *Acetic acid* concentrations and kinetic parameters (*t₅₀*, *t₈₀*, *V_{50_80}*) (Fig 5, panel A). Indeed the white grape juices used were more acidic and more sulphited than red ones. The second axis (16 % of total variance); mainly discriminates the CS15 must from the others by its higher production of *glycerol* and *CO₂max*. These results are consistent with the biochemical composition of grape juices since the CS15 juice contained 20 g.L⁻¹ more sugar than the other grape musts.

The PCA also illustrates the phenotypic variability of the 35 industrial strains tested. Globally, the analysis showed that some grape musts are more suitable than others for differentiating the strains. Indeed, the projected cloud of the 35 strains in SB14 is more compact than in M15. In order to evaluate this property, we computed the average Euclidian distance within all the strains for both kinetic and metabolic parameters and according to the grape must. The panel B of Fig 5 summarizes the phenotypic distance observed within each grape must and each parameter class. For example, SB15 emphasized strain discrepancy for kinetic traits and metabolic end-products. To better visualize particular strain properties, the positions of the four strains SB, GN, M2 and F15 were labeled on the projection. These strains have some phenotypic specificities; for example SB and GN are often more distant from the remaining set of commercial strains than M2 and F15. This is in particular due to the

high *glycerol* production of SB and the slow fermentation rate (*V50_80*) of GN in all the conditions tested (Fig 5, panel C).

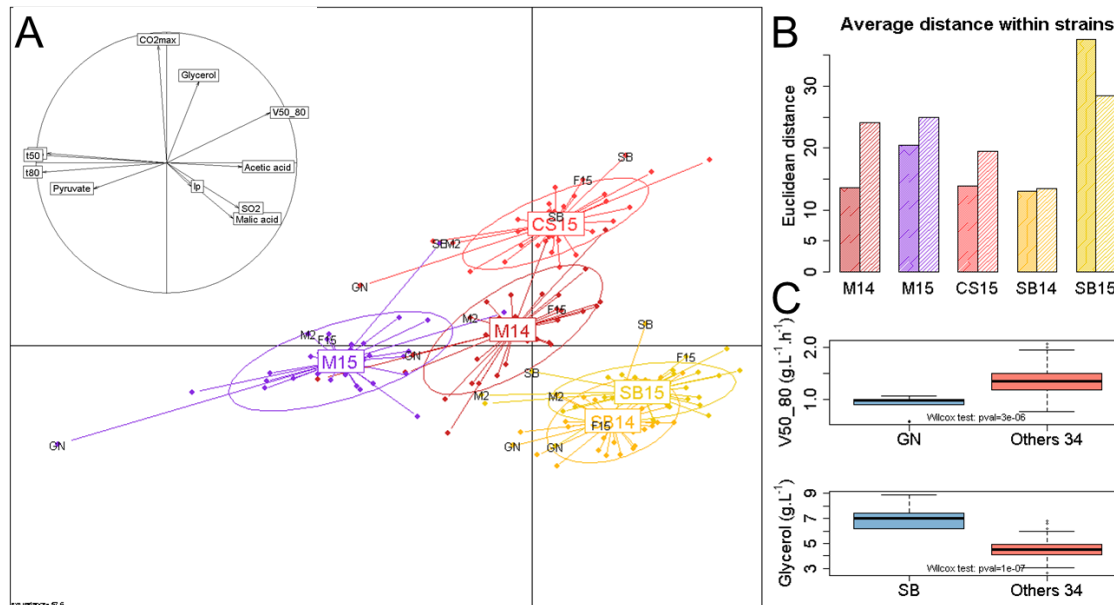


Fig 5 PCA of winemaking properties of 35 strains in 5 grape juices

Panel A. The first two axes of the PCA performed from the average of two replicates for 11 phenotypes measured in the five grape juices and 35 strains. Axes 1 and 2 explain 41.8 % and 15.8 % of total variation, respectively. Each point represents the fermentation of one strain and is colored according to the grape juice used. Points are connected to their group gravity centers that are labeled with the grape juice name M14, M15, SB14, SB15, CS14. Ellipses diameter corresponds to the standard deviations of the projection coordinates on the axes. The correlation circle indicates the correlation of the variables for axes 1 and 2. **Panel B.** Euclidian distances within all the strains for each grape must. The bar plot represents the Euclidian distances within the 35 strains according to kinetics (high density colored bar) and metabolic parameters (low density colored bar) for each grape juice. **Panel C.** Comparison of the trait value of GN and SB respect to the 34 others strains for V50_80 and the glycerol produced, respectively. A boxplot was generated from the 10 phenotypic values measured in the five grape juices with two replicates for GN and SB, and from the 340 values of the 34 other strains. Significant differences were estimated by applying the Wilcoxon-Mann-Whitney test ($\alpha = 0.05$).

In a second time, we analyzed the phenotypic correlations existing between the eleven quantitative traits investigated. As shown on the PCA, the nature of the juice strongly impacted the phenotypic values. In order to overcome this effect, we normalized the response of each strain according to the grape juice (S9 Table). This normalization confers a stronger robustness to the analysis since the phenotypic properties of the strains are considered across five conditions. However, using this transformed dataset, all the strain x environment interactions are hidden. The relations between the 11 traits were investigated by using the average of normalized values of each strain for the five conditions. The Spearman's correlation matrix computed was shown in the Fig. 6, panel A. Obvious correlations between kinetic traits were found confirming that the fast-fermenting strains have the

lowest t_{35} and t_{80} values (S3 Fig). Interestingly, we detected less trivial correlations suggesting some possible connections between metabolic end products and kinetics parameters. For example, a correlation between t_{80} and *Malic acid* was found (Fig 6, panel B). Indeed, fast fermenting strains are those that consume the most part of malic acid. This link has already been reported (Husnik et al., 2007) and could be explained by a greater de-acidification capacity for strains that consume more malic acid, resulting in easier fermentation. Positive correlations were found between kinetic parameters (t_{35} , t_{50} , t_{80}) and SO_2 . They could be explained by the toxic effect of SO_2 that reduces yeast growth (Nardi et al., 2010; Park and Bakalinsky, 2000) and may indirectly impact the fermentation activity. Other correlations were found for Ip with V_{50_80} (Fig 6, panel C) and *glycerol* and will be discussed further.

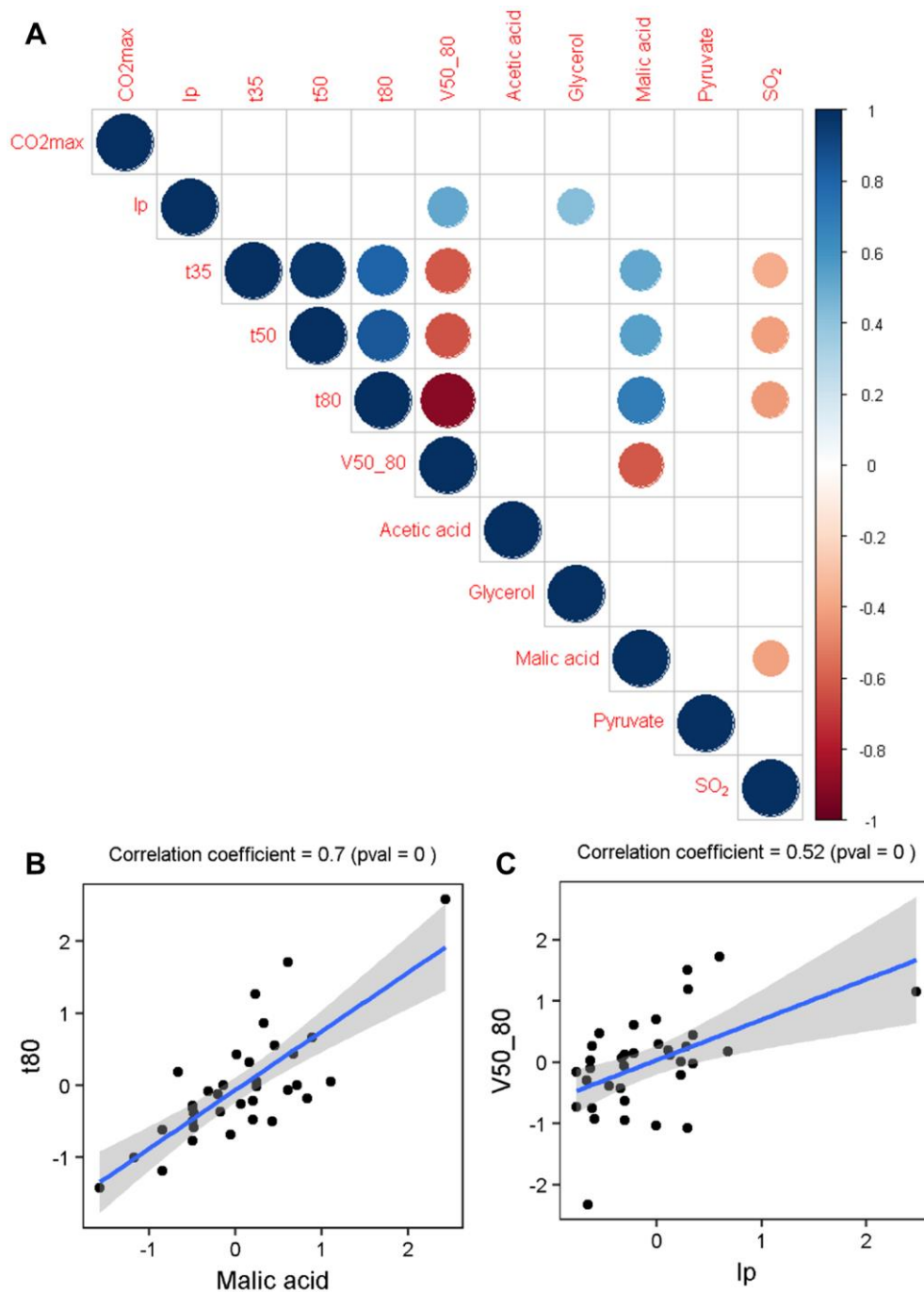


Fig 6 Correlation between traits

Panel A. A correlation matrix is shown. The size and the colour of the circles correspond to the correlation coefficients calculated by the Spearman method. Only significant correlations are shown (confidence = 0.95). **Panel B and C.** Two examples of scatter plots showing correlation of *t80* with *Malic acid* and *V50_80* with *lp*. Each dot represents the average phenotypic values of a strain across the 5 grape musts from the normalized dataset. The blue line represents the linear regression line and the shaded area represents the confidence interval of the regression (0.95).

The normalized dataset was also used for evaluating the technological properties of the 35 strains in a multi environment context. As for the phenotype-phenotype relation study, the use of normalized data

confers more robustness to this analysis. The rank of each strain with respect to the others was calculated and can be visualized on a heatmap plot (Fig 7). As each column of the heatmap plot represents a rank value (1 to 35), each trait has the same weight in the clustering. Because most of the kinetic parameters are strongly correlated (Fig 6, panel A), only three of them (poorly correlated) were included in the analysis (CO_2max , lp and $V50_{80}$). The intensive green tones indicate lowest ranks while intensive red tones indicated the highest ranks for each parameter. For example, the commercial strains C11, C4, and C18 were among the fastest strains and consumed more malic acid than the others. Rapid identification of strains having outlier levels compared to a representative commercial set can be made with this figure. For example, the strains C6, C17 and C20 produced high quantities of acetic acid while the strains C5, C8, and C16 released an important quantity of SO_2 at the end of the alcoholic fermentation.

As displayed by the dendrogram on the left of the heatmap, a hierarchical clustering ordered the strains according to their overall profiles. Four main groups were computed. The group A contained slow fermenting strains, which leave high amounts of *malic acid* at the end of the fermentation and produce low SO_2 . Group B contained strains with the shortest lp . Moreover, most of the strains of this group had a slow fermentation rate, produced low amounts of *glycerol* and released high level of SO_2 . The strains of group C were the fastest fermenting ones, produced more *glycerol* and SO_2 than the average. This group also consumed more *malic acid*. Finally, the strains of group D fermented rapidly but in contrast with those of group C they produced low amounts of *glycerol* and SO_2 .

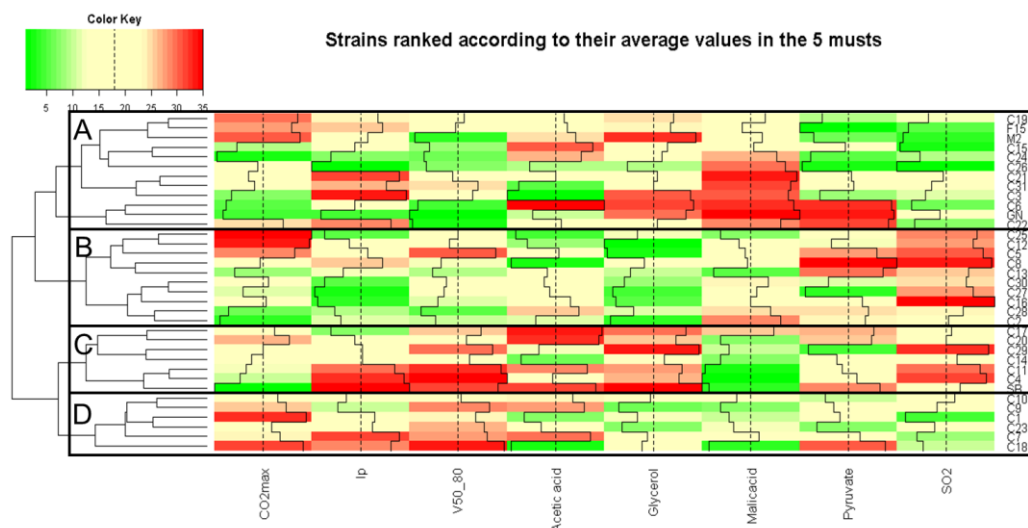


Fig 7 Relative ranking of 35 strains in 5 grape juices

Ascending order ranked of the average phenotypic values of each strain across the 5 grape juices. Only a subset of the representative phenotypes is represented here. A color palette shows each rank from red (lowest ranks) to green (highest rank) as displayed by the color key. The rank of each cell is also displayed by a black bar plot and the vertical dashed black line represents the average rank. The dendrogram on the left represents strain ordered by hierarchical clustering.

Finally, we investigated the strain phenotypic variability according to the environmental conditions. This characteristic is very important in enology since industrial strains might be used in different grape musts with contrasted physicochemical properties. Therefore, the assessment of phenotypic robustness of industrial starters is crucial for optimizing their use in a wine making process. We computed the phenotypic variance of the 35 strains by using the non-normalized dataset, which allows capturing the GxE interactions. The overall results are shown on Fig 8, panel A. Strains showing a low variance value (green tones) had similar phenotypic behavior in the five grape musts and can be considered as robust. On the contrary, high variance values (red tones) indicated a fluctuating phenotypic response according to the must. Some industrial strains such as C23, C10 or C12 are quite strong robustness to environmental change. In contrast, the monosporic clones SB, GN and M2, as well as some commercial strains (C22, C7, C18) appeared to be quite sensitive to the grape must nature (red tones). This excess of sensitivity was investigated by splitting the 35 strains in two groups according to their phenotypic variance. The more fluctuating quartile was compared to the 75 % more robust strains in the five grape juices. By this way, the conditions that generate a fluctuating response could be identified. For example, *lp* was only significantly different for the two groups only in SB15 (3.2 time shorter for the robust group) (Fig 8, panel B). In this case, the identified grape must had the strongest initial SO_2 concentration ($67 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), which is known to strongly affect the lag phase (Zimmer et al., 2014). All the strains having a fluctuating response (C1, C11, F15, C15, M2, C22, SB, C31) are therefore not suitable for running fermentations in highly sulfited grape musts. In the same way, another group of strains (C4, C7, C17, GN, C18, C21, C24, C25, C27) produced high concentrations of SO_2 at the end of the fermentation only in the SB15 must (Fig 8, panel B). Others significant fluctuation have been observed. Indeed, Merlot (M14 and M15) and Sauvignon Blanc (SB14 and SB15) musts increased the variance of fluctuating strains for *pyruvate* and *acetic acid*, respectively (S4 Fig). Similarly, the strains C18 and C24 produced high levels of *acetic acid* in white grape musts but they showed a moderate production in the three red grape musts, suggesting that are more suitable for red wine fermentation.

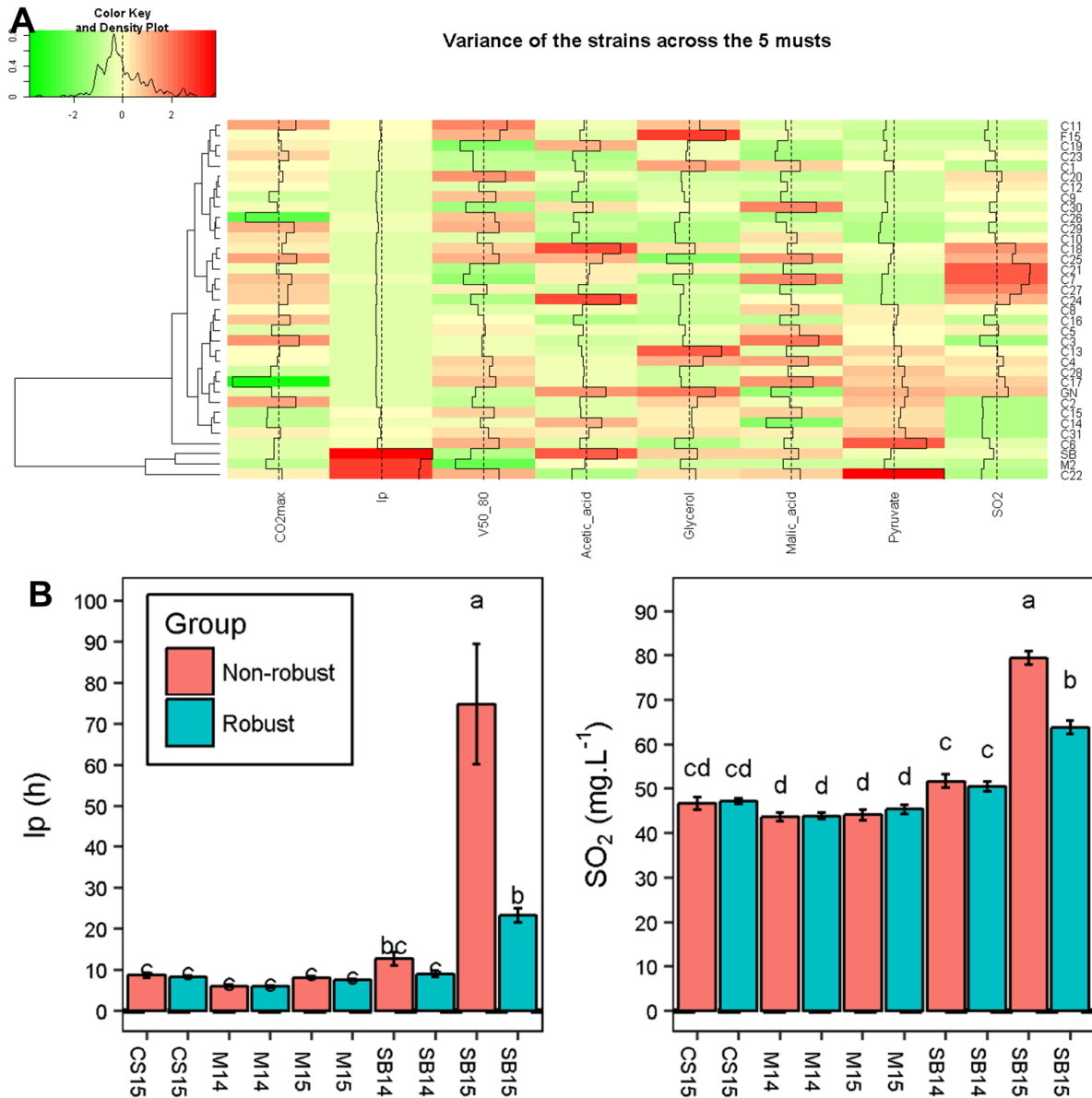


Fig 8 Phenotypic variance of 35 strains in five grape juices

Panel A. For each strain, the variance was computed for the five average phenotypic values in the five grape musts. Variance is scaled by column and its level is represented by a color palette from green (lowest variance) to red (highest variance) as displayed by the color key. The value of each cell is also displayed by black bar plots and the vertical dashed black lines represents the average variance. Strains are ordered by hierarchical clustering that is represented by the dendrogram on the left. **Panel B.** Comparison of lp and SO_2 between robust and non-robust strains according to grape musts. The data shown are the mean of eight strains (non-robust group) or 27 strains (robust group), the error bars represent the standard error. Different letters indicate significant differences between groups (Tukey's honest significant difference test, significance level, $\alpha = 0.05$).

Discussion

A new platform for measuring quantitative traits related to wine fermentation

The wide development of NGS technologies gives the opportunity to collect large sets of genomic data that could be used for dissecting the genetic architecture of complex traits using both QTL mapping and GWAS approaches (Liti and Louis, 2012). In order to implement genetic studies efficiently, this genomic data must be completed with massive sets of phenotypic data. The high throughput measurement of phenotypes is therefore a crucial point for finding out new genetic determinisms. The term of “phenomics” has been used for describing methods aiming at measuring phenotype at a large-scale (Warringer and Blomberg, 2014). Mostly based on the measurement of OD (Warringer and Blomberg, 2003) or plate growth (Bean et al., 2014), the parallel measurement of basic growth parameters in numerous media can be performed. Although this approach is very useful for screening growth-related phenotypes, other complex traits of industrial interest, such as fermentation kinetics and end-product metabolites can neither be measured in micro-plates nor in agar plates.

In this study, we set up a standardized method for assessing alcoholic fermentation experiments at a relatively large scale (>300 samples per batch). By reducing the fermentation volume to 5 mL in standard Screwed Vials (SV), we conserved a very accurate estimation of fermentation kinetics that matches well with the methods previously used (da Silva et al., 2015). Here, the fermentation time course was followed manually by weighing each SV few times per day with a precision balance. However, robotic solutions for an automatic handling of the SV could easily be implemented thanks to the standardized format of the vials used. In order to face the large sample analysis set required, we successfully coupled our fermentation setup with a robotized enzymatic platform for measuring eight enological metabolites in 1 mL samples. Unfortunately, we failed to efficiently measure ethanol, since the enzymatic kit used was not sufficiently accurate for high ethanol concentrations. Alternatively, the estimation of total CO₂ loss was very precise (average CV<3 %) and perfectly matched with the production of ethanol during the alcoholic fermentation (Bely et al., 1990). In this study, we also demonstrated that many volatile compounds produced by yeast metabolism could be readily analyzed by GC-MS after an automated solid-phase micro-extraction (Antalick et al., 2010). Coupling analytical facilities and developing robotic handling of SV will be the next steps for developing large screening programs.

Assessment of some GxE interactions relevant in enology

Although the SV volumes are far away from those of vats used during industrial wine production, our setup comes close to meeting the enological conditions. The effects of some parameters that are relevant for enology (grape must, strain, micro-oxygenation level) have been tested. First of all, we used natural grape musts rather than synthetic media that might be less pertinent for assessing quantitative traits due to their incomplete composition (Ambroset et al., 2011; Marullo et al., 2007b). As previously demonstrated, frozen grape juices conserved their fermentation properties and can be kept for long periods (da Silva et al., 2015). Moreover, in this work, we only tested a panel of commercial starters that are used in various geographic areas for the production of red, white, *rosé* and sparkling wines. This contrasts with previous studies that also included *S. cerevisiae* strains from other origins (Albertin et al., 2011; Camarasa et al., 2011). By using only commercial starters, we captured here a phenotypic variability having an industrial relevance and reflecting those proposed to the winemaker. Finally, the shaking of SV was able to mimic micro-oxygenation in a reproducible manner. The amount of oxygen transferred during the 20 first hours ($2\text{-}4\text{ mg/L}^{-1}$ of O_2) is close to that can be applied during red wine winemaking (du Toit et al., 2006). Although the micro-oxygenation is provided by several pumping-over operations in the cellar, we were able to reproduce this effect in our small design vessels with similar scale values. This was confirmed by observing effects that are similar to those already known in enological practices. Indeed, a higher level of micro-oxygenation accelerates the fermentation rate (Fornairon-Bonnefond et al., 2003; du Toit et al., 2006; Varela et al., 2012), decreases the production of acetic acid (Delfini and Cervetti, 1991; Varela et al., 2012), and increases the production of glycerol (Gardner et al., 1993; Reddy and Reddy, 2011; Remize et al., 2000; Varela et al., 2012).

Although the micro-oxygenation enhances the basic technological properties of yeast, it also impacts drastically the production of 32 volatile compounds. By using a GC-MS approach we demonstrated that shaken conditions do not impact all the volatile molecules in the same way suggesting that the oxygen transfer could influence the production of aromatic compounds and in particular esters. The change in proportion of 2-phenylethyl acetate (2-PhC2C2) to ethyl-phenylacetate (C2PhC2) could be a signature of micro-oxygenation, as the proportion of the most oxidized ester (ethyl-phenylacetate) is greater with agitation (S2 Fig). Moreover unusual esters such as ethyl dihydrocinnamate (C2dhCinn) or methyl butyrate (C1C4) are much more present in shaken fermentation (Fig 3 C and S6 Table). This results indicated that shaken conditions could lead to an over oxidation at least in white grape juice matrixes. This result justify our choice to phenotype the 35 strains in unshaken conditions.

Unravelling the impact of oxygen on esters production during the alcoholic fermentation is not trivial. First, it is difficult to conclude here if the oxygen has a direct effect on ester metabolism. Indeed oxygen could simply enhance yeast growth and/or accelerates the fermentation rate which in turn may have an effect on ester production. Second, shaking might increase the liquid to gas transfer and therefore enhance the volatile compounds stripping. According to the quantity and the addition moment, the oxygen effect may indeed be drastically different. The oxygen supplementation of grape must in winemaking conditions resulted in an increase of the concentration of higher alcohol acetates and branched chain ethyl esters, and in a decrease of fatty acid ethyl esters (Valero et al., 2002; Varela et al., 2012). Aside higher alcohol acetates that were two times higher in non-shaken conditions, our findings are broadly in agreement with previous data measured in a cellar (Valero et al., 2002; Varela et al., 2012). The similar response between 5mL-SV and vats of several liters is very encouraging and demonstrates that our setup could be relevant for assessing the aromatic production of a large set of strains/conditions. Moreover, the relative higher production of acetate of higher alcohols in non-shaken conditions could be explained by the fact that the moment of oxygen addition and metabolizing is drastically different between the yeast growth and stationary phase (Anderson and Kirsop, 1975; Blateyron and Sablayrolles, 2001). For example, in a brewing context, when oxygen is added during the fermentation, a decreased production of higher alcohol acetates can be observed (Anderson and Kirsop, 1975; Malcorps et al., 1991), thus supporting our observations (S6 Table). Conversely, oxygen addition has been reported to increase the concentration of ethyl esters and to reduce the concentration of acetate esters and higher alcohols (Bertrand and Torres-Alegre, 1984). These seemingly contradictory results can be also due to strain-by-oxygenation interactions. Indeed 16 of the 32 compounds assayed showed *strain x environment* interactions. This method could be therefore useful in the future to better investigate the physiological and enological consequences of micro-oxygenation for up to very large panels of yeast strains.

Thanks to this setup, we gained insight on other GxE interactions between wine strains and environmental conditions. For example, GN maintained a constant level of *acetic acid* in M15, regardless of the level of micro-oxygenation. This particular feature, which is a relevant trait in enology, suggests that acetic acid metabolism is poorly impacted by hypoxia in this strain. Another interaction was observed for the strain M2, for which the long lag phase observed in sulphited grape must (SB14) is reduced by the micro-oxygenation. Those preliminary observations open perspectives for studying the phenotypic response of yeast strains to micro-oxygenation at a large scale.

Survey of the fermentation properties of 35 enological strains in five grape musts

As a matter of proof, we measured the technological properties of 35 strains including 31 industrial starters. After three weeks of fermentation, we measured in the same batch 11 traits in five different grape juices (350 fermentations), supporting the efficiency of the method for high throughput phenotyping. We have observed an important grape must effect on the phenotypes (Table 2). This effect was generated by the basic physicochemical characteristics of the grape musts (concentration of sugar, malic acid, and SO_2 etc.). In order to go beyond this effect, the response of each strain was normalized according to the grape juice eliminating the media effect but also the possible GxE interactions. The correlation analysis of traits measured in five conditions reinforces the robustness of these links and ensures the generalization of the conclusions that can be drawn. Interestingly two relevant correlations were found. A strong relation was identified between *malic acid* and kinetic parameters (T_{35} , T_{50} and T_{80}). Thus, fast fermenting strains were also those consuming more malic acid. This had already been reported in an isogenic context for the ML01 strain, which has been genetically modified to carry out the malolactic fermentation (Husnik et al., 2007). ML01 has a higher fermentation rate than the parental strain due to the deacidification of the media caused by the malic acid consumption. However, this effect was reported only in low pH conditions. Because the pH of the grape musts used in our study range from 3.19 to 3.58, other mechanisms might be involved. For example it is known that malic acid plays an important role in carbon metabolism. During fermentation, its decarboxylation provides pyruvate which could play an anaplerotic effect on biomass and/or on ethanol synthesis (Saayman and Viljoen-Bloom, 2006; Volschenk et al., 2003). A second positive correlation was found between the duration of the lag phase (lp) and the glycerol production, suggesting that strains with long lag phase produce more glycerol. At the beginning of fermentation, the glycerol production is critical for restoring the redox balance by regenerating the NAD^+ consumed by the glycolysis (Ansell et al., 1997). Indeed, at that stage, the regeneration of NAD^+ by alcohol dehydrogenase is inhibited by the formation of acetaldehyde- SO_2 complexes. Thus, strains unable to initiate rapidly the alcoholic fermentation have to cope with NAD^+ depletion and may have been selected for their high glycerol production level.

The dataset generated was also useful for evaluating the technological performance of the strains. This comparison revealed groups of strains with distinct phenotypic profiles. For example, all the strains of the groups C and D (Fig 7) have the highest fermentation rate but are mainly discriminated by their *glycerol* and SO_2 production levels. This might suggest that commercial strains well adapted to winemaking conditions have undergone different adaptive routes that have modelled their central

metabolism. The phenotypic robustness of strains fermenting in various grape juices has been also evaluated. Although this characteristic has been poorly investigated in the past, robustness is a critical factor to take into account in yeast selection. Surprisingly, only few strains are robust to environmental changes and are able to ensure stable phenotypes in a wide range of grape musts. Indeed, most of the strains showed fluctuating phenotypes according to the grape must. This result demonstrates that the use of grape musts of different origin are useful for detect industrial strain weakness to particular conditions such as high SO_2 or low nitrogen content. Thanks to our dispositive, additional fermentations carried out with more characterized matrixes will be helpful for identifying biochemical factors (amino acids, vitamins, cofactors or polyphenols) triggering inappropriate phenotypic responses of commercial strains.

Acknowledgments

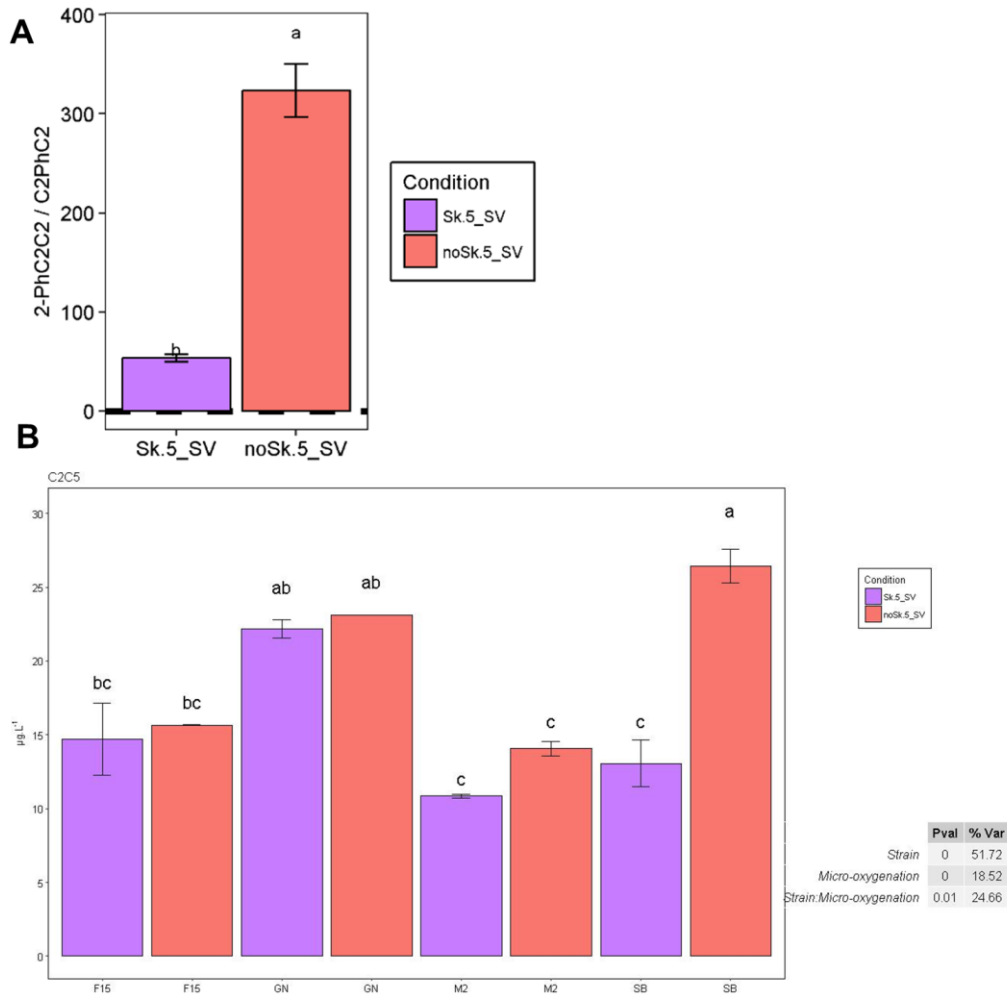
The authors want to thank Pr Vladimir Jiranek for kindly giving some strains used in this work. We also thank Warren Albertin, Brendan Smith, Marina Bely and Joana Coulon for their correction that helped improving the manuscript. And finally, we thank Elodie Kaminski that helped managing fermentations.

Supporting information



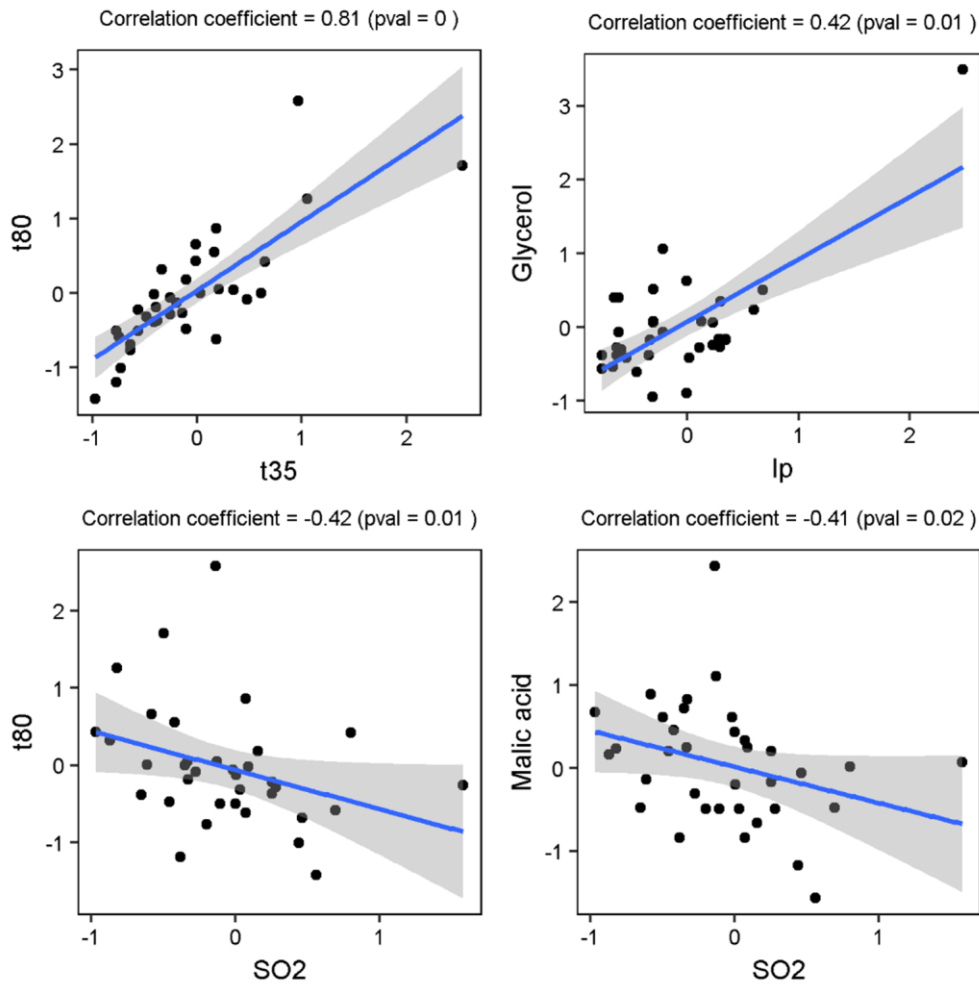
S1 Fig SV setup

On the left, a SV filled with 5 mL of grape juice (SB14) and with a hypodermic needle to allow the CO_2 release. On the right 70 vials on a rack illustrating the possibility of managing hundreds of fermentations in parallel.



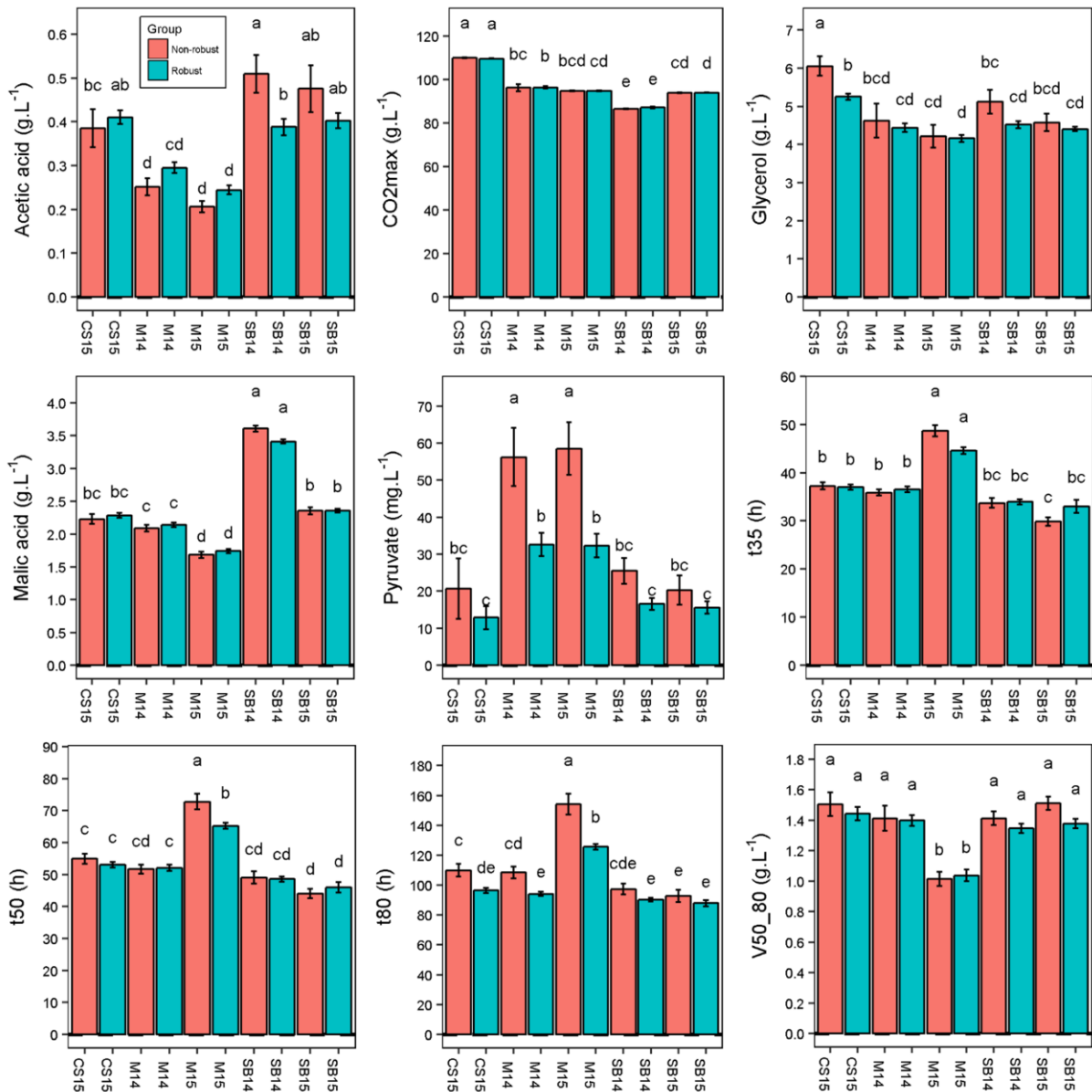
S2 Fig Oxygen impact on ester production

Panel A. The data shown are the mean proportion of PhC2C2 to C2PhC2 of the 4 strains in 2 replicates, the error bars represent the standard error. Different letters indicate significant differences between groups (Tukey's honest significant difference test, significance level, $\alpha = 0.05$). **Panel B.** The data shown are mean of 2 replicates, the error bars represent the standard error. Different letters indicate significant differences between groups (Tukey's honest significant difference test, significance level, $\alpha = 0.05$). Table represents ANOVA results (pval, and % of variance explained).



S3 Fig Correlations between traits

Scatter plots of correlated traits. Each dot represent the average phenotypic values of a strain across the 5 grape must from the normalized dataset. The blue line represents the linear regression line and the shaded area represents the confidence interval of the regression (0.95).



S4 Fig Comparison of the phenotypic values between robust and non-robust strains according to grape musts.

The data shown are the mean of 8 strains (non-robust group) or 27 strains (robust group), the error bars represent the standard error. Different letters indicate significant differences between groups (Tukey's honest significant difference test, significance level, $\alpha = 0.05$).

S1 Table yeast strains used

Metabolite	Sample (μL)	Dilution level	Assay mix (μL)	Enzyme (μL)
acetaldehyde	50	1	160	5
acetic acid	10 or 5*	1	200	20
glycerol	10	1/40	192	2
malic acid	10	1/10	222	2
SO ₂	10	1	200	50
pyruvate	30 or 10*	1	250 or 270*	2

* respectively for white and red wine

S2 Table Dilution and volume of sample used for robotic enzymatic assay

S3 Table List of the 32 esters analyzed

S4 Table SB14 dataset

Data presented are the mean of six fermentation replicates of SB 14 grape must. The residual sugars (glucose + fructose) at the end of the fermentation was not shown and was always lower than 1.5 g.L⁻¹. Statistical differences within strains and modalities was assayed by Tukey's honest significant difference test, significance level, $\alpha = 0.05$, the different groups were shown by a letter code: groups sharing the same letter are non-significantly different.

S5 Table - Average coefficient of variation for the different traits

The data presented are the average coefficients of variation (CV in %) calculated from the CV values obtained for each strain with 6 replicates

S6 Table Esters dataset

S7 Table Micro-oxygenation and grape must interaction dataset

S8 Table phenotypic data of 35 commercial strains in 5 grape juices (raw data)

S9 Table phenotypic data of 35 commercial strains in 5 grape juices (centered reduced data)

3 Réflexions sur l'étude de phénotypes œnologiques à large échelle (éléments de de discussion)

3.1 Des fermentations à large échelle pour mieux étudier les facteurs physicochimiques pertinents en œnologie.

La méthode mise en place permet de multiplier le nombre de conditions de fermentations et de souches testées. Cela peut être avantageusement exploité afin d'acquérir une meilleure compréhension des facteurs qui affectent les caractéristiques des vins produits. Le processus d'élaboration du vin se caractérise en effet par l'utilisation d'une matière première dont la composition physico-chimique est très variable. Elle dépend du millésime, du cépage, du terroir, des opérations pré-fermentaires, du traitement de la vendange, de la température de fermentation, *etc.* Il a déjà été montré que le pH (Charoenchai et al., 1998; Gao and Fleet, 1988; Heard and Fleet, 1988; Morata et al., 2006), la température (Charoenchai et al., 1998; Cottrell and Lellan, 1986; Gao and Fleet, 1988; Gardner et al., 1993; Heard and Fleet, 1988; Marullo et al., 2009; Morata et al., 2006; Torija et al., 2003), la composition initiale du moût en sucre (Berthels et al., 2004; Blateyron and Sablayrolles, 2001; Charoenchai et al., 1998), en azote assimilable (Bell and Henschke, 2005; Monk, 1982), lipide (Fornairon-Bonnefond et al., 2003; Luparia et al., 2004; Varela et al., 2012) ou en vitamine (Monk, 1982; Ough et al., 1989) affectait des traits fermentaires. De façon encore plus marquante, la composition chimique et les propriétés aromatiques des vins varient fortement avec la matrice de jus de raisin et les procédés vinicoles utilisés (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Bien que de larges connaissances aient été acquises dans le passé, les expériences conduites ne comportent qu'un nombre relativement faibles de conditions, ce qui empêche d'avoir une vision intégrative et globale permettant d'étudier les interactions entre les différents facteurs technologiques et physico-chimiques connus ou encore non identifiés. Notre méthode offre la possibilité de mieux caractériser ces facteurs et leur degré d'interactions.

Nous proposons dans cette thèse d'étudier des phénotypes fermentaires mesurés dans des moûts naturels plutôt que synthétiques. L'utilisation de matrices naturelles permet en effet de se rapprocher des conditions œnologiques. Grâce au faible volume nécessaire, 30 litres de moût peuvent servir à réaliser le nombre conséquent de 6000 fermentations. Ce volume permet de garantir des stocks afin d'assurer une étude répétable dans le temps. Une des limites de notre méthode reste l'utilisation de moût de thermovinification pour la fermentation de vins rouges. Ainsi traités les jus de raisins sont enrichis en composés d'intérêts comme les polyphénols et il devient possible d'éliminer la phase solide constituée des pellicules. Ce type de matrice est adapté aux fermentations en petit fermenteurs

permettant une répartition homogène du liquide. En revanche il n'est pas connu dans quelle mesure cette phase homogène affecte la cinétique et la composition en composés volatiles du vin. Des systèmes de micro vinification en phase solide ont été développés à l'ISVV (Thèse Marine Trujillo + Hall de technologie), il serait intéressant de comparer les cinétiques, les teneurs en oxygène dissous et les composés volatiles produits afin d'estimer la fidélité de notre méthode vis à vis de conditions plus proches de la pratique.

3.2 Avantages de l'étude des conditions environnementales chez une large population

Dans la littérature, l'étude des facteurs environnementaux influençant la fermentation est relatée sur une ou quelques souches. Les résultats rapportés dans ce chapitre montrent que certains caractères, sont sujets à de fortes interactions avec le facteur moût. Ainsi dans la Fig 17 (p 43), le facteur moûts affecte particulièrement la production d'acide acétique alors que les principaux paramètres physicochimiques sont équivalents (sucre, azote) ne sont pas directement impliqués. Il semble donc que ces paramètres ne soient pas les seuls facteurs clés de cette variation. Ceci suggère que les facteurs qui impactent la production d'acide acétique des souches sont complexes et encore mal compris. Par exemple, toutes les souches sauf GN augmentent leur production d'acide acétique en réponse à une plus faible micro-oxygénation (Fig 4 de l'Article 1, p 61). Dans ce travail nous avons pu comparer en une seule expérience le comportement de 35 des souches commercialisées. Identifier leurs points faibles dans certains moûts/conditions offre des pistes pour positionner ces souches sur le marché notamment par rapport à la concurrence. Par exemple, les souches (C1, C11, C31) ont une phase de latence longue dans les moûts dont la concentration en sulfite initiale est élevée et ne paraissent pas adaptées à ce type de matrice (Zimmer et al., 2014).

L'analyse d'un nombre important de souches permet d'étudier des relations intéressantes entre des traits. La corrélation la plus frappante concerne la vitesse de fermentation et la consommation d'acide malique (Fig 6, panel B, de l'Article 1, p 65). Bien que des causes physiologiques telles que la diminution de pH ou le rôle anaplérotique de l'acide malique puissent expliquer cette corrélation, il est difficile de savoir s'il existe une véritable causalité entre ces traits. En effet certains individus échappent à la règle générale de la corrélation observée. Cette dernière pourrait donc être le fruit d'une population structurée ayant suivi le même chemin évolutif. Beaucoup des souches commercialisées en œnologie proviennent de croisements entre souches déjà utilisées ce qui pourrait expliquer la présence d'un profil phénotypique similaire. C'est ce degré de parenté élevé entre les souches étudiés qui pourrait générer l'apparition de corrélations de l'ordre de celles qui ont été obtenues dans cette étude.

3.3 Discussion sur la pertinence des vials

Il est naïf de penser que des fermentations de 5 mL puissent correspondre à celles menées au niveau industriel dans des volumes de plusieurs hectolitres. Cependant les valeurs relatives de plusieurs traits observés entre des souches industrielles dans des plus gros volumes ont été confirmée ce qui montre que des caractères tels que la cinétique de fermentation, la consommation d'acide malique et la production de glycérol sont robustes au changement d'échelle. Le principal écueil de notre système est sa sensibilité au niveau d'oxygénation. En effet, au cours des étapes de mise au point, nous avons identifiés de nombreux paramètres techniques pouvant affecter la fermentation dans les vials. Ainsi, un vial insuffisamment hermétique à cause du serrage trop lâche du bouchon, un filetage ébréché, un septum mal fixé *etc.*, peut générer d'importantes variations entre les réplicats techniques. En maîtrisant ces variations, nous avons développé une méthode originale permettant de mimer à grande échelle l'effet de la micro-oxygénation sur la fermentation.

Bien que nous ayons tenté d'approcher les conditions œnologiques, Il est difficile d'estimer le transfert réel d'oxygène au cours de la fermentation. Notre dispositif ne permet pas de contrôler un ajout d'oxygène précis, mais fourni une agitation homogène qui assure une oxygénation du milieu avant la fermentation alcoolique. Une fois la fermentation démarrée la levure consomme entièrement l'oxygène dissous dans le milieu et sa valeur reste nulle tout au long de la fermentation. C'est pourquoi nous avons estimé un transfert « à vide » sans levure (Fig 3, panel A, de l'Article 1, p 58). Par conséquence, nos estimations de transfert d'oxygène ne concernent que le début de la fermentation au moment où le CO₂ n'est pas encore dégagé.

L'utilisation de petits volumes peut être un handicap pour réaliser des prélèvements réguliers en cours de fermentations afin d'effectuer des études cinétiques de composés ou de biomasse. Ce handicap peut être dépassé en sacrifiant un vial à chaque temps voulu. Le petit volume convient parfaitement aux analyses par dosage enzymatiques qui ne nécessitent que des quantités d'échantillons de l'ordre de la dizaine de microlitres. Cela s'avère en revanche plus compliqué pour d'autres types d'analyses qui requièrent des volumes plus importants. Cela a été le cas par exemple pour le dosage des esters apolaires qui nécessitent un volume de 10 mL et pour lequel le volume de deux réplicats a dû être utilisé.

Chapitre 2: Dissection des bases moléculaires qui contrôlent la plasticité phénotypique de *Saccharomyces cerevisiae* dans des jus de raisins naturels

« Il me semble que la nature, moins libre que les vieux poètes, devait se servir à peu près exclusivement des éléments communs à la famille et je ne pouvais lui attribuer tel pouvoir qu'elle fit avec des matériaux analogues à ceux qui composaient un sot et un rustre, un grand esprit sans aucune tare de sottise, une sainte sans aucune souillure de brutalité. »

Marcel Proust, incrédule devant le pouvoir combinatoire de la méiose, dans *À la recherche du temps perdu*, Le Côté de Guermantes.

1 Problématique

Dans ce chapitre nous répondons à deux questions principales. i- De quelle manière les conditions environnementales affectent le déterminisme génétique des caractères quantitatifs des levures œnologiques ? ii- Quelle est la répercussion du choix des parents sur la détection des QTLs ? Des éléments de réponse sont présentés dans l'Article 2 présenté dans la deuxième partie de ce chapitre : *“Dissection of the molecular bases of genetic x environment interactions in Saccharomyces cerevisiae according to wine making practices”*.

Notre dispositif expérimental nous a également permis de réaliser une cartographie de QTL dans des descendances issues de deux hybrides quasiment isogéniques. Nous montrons ici que des phénomènes génétiques non mendéliens tels que la ploïdie, la nature du génome mitochondrial et des réarrangements chromosomiques ponctuels façonnent un microenvironnement génétique qui influence fortement la détection de QTLs. La présentation de ces résultats originaux n'a pas pu être organisée sous forme d'article scientifique. Les principaux résultats obtenus seront présentés après l'Article 2. Ils soulignent l'existence probable d'interactions nucléo-cytoplasmiques liées à l'hérédité mitochondriale, à la modification possible de l'environnement cellulaire liée à la ploïdie et l'impact fort de phénomènes de recombinaison mitotiques. Ces trois phénomènes rajoutent un niveau de complexité inattendu dans le déterminisme génétique déjà complexe des traits étudiés.

2 L'impact du matériel génétique

2.1 Le choix des souches parentales

Afin de cartographier avec une bonne précision des QTLs, il est important de disposer d'un nombre suffisant de marqueurs en ségrégation. C'est sans doute pour cette raison que les premiers travaux de cartographie de QTL initiés chez la levure ont été réalisés à partir de souches très distantes sur le plan génétique et provenant de niches écologiques différentes (Brem et al., 2002; Steinmetz et al., 2002; Winzeler et al., 1998). Dans une recherche à caractère appliquée comme la nôtre, le choix des parents est souvent imposé par la problématique posée. Au laboratoire, l'objectif est d'identifier des variations génétiques qui contrôlent la performance de levures industrielles de vinification. Pour cette raison, le choix des souches parentales s'est dirigé vers des clones monosporiges dérivés de souches commerciales. Les variations génétiques rencontrées chez de telles souches sont en effet susceptibles de contenir un *pool* d'allèles adaptés aux conditions de vinification.

Au sein de l'espèce *S. cerevisiae*, les levures œnologiques industrielles forment un groupe relativement homogène, ayant subi une histoire évolutive convergente façonnée par leur domestication par l'homme (Borneman et al., 2011; Legras et al., 2007; Liti et al., 2009; Schacherer et al., 2009). Le choix de souches génétiquement peu variables peut donc s'avérer risqué. Plusieurs travaux ont cependant démontrés que des descendances obtenues à partir de croisements entre souches œnologiques permettent la détection de QTLs (Brice et al., 2014; Huang et al., 2014; Martí-Raga et al., 2017; Marullo et al., 2007; Zimmer et al., 2014). Toutefois, les auteurs ont systématiquement privilégié des souches parentales ayant des profils opposés pour les phénotypes considérés. Entre autres, le travail présenté au cours de ce second chapitre évalue quelle est l'influence des relations génétiques et phénotypiques des souches parentales sur la détection de QTLs.

2.2 Présentation des deux croisements utilisés

Dans le but d'élargir la variabilité génétique considérée, quatre souches parentales ont été utilisées dans ce travail. Les souches M2, F15, SB, et GN sont des clones monosporiges issus de souches commercialisées respectivement par les sociétés Lallemand (Enoferm M2) et Laffort (Zymaflore F15, Actiflore BO213 et Zymaflore VL1). Les couples SB vs GN et M2 vs F15 présentent des relations génétiques et phénotypiques différentes. Dans le précédent chapitre, nous avons montré que les profils phénotypiques de ces quatre souches sont distincts dans cinq jus de raisins (Fig 7, Article 1, p 66). Dans une condition particulière (M15), les souches SB et GN ont des profils phénotypiques opposés tandis que les souches M2 et F15 sont modérément distantes. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus pour un panel de 31 souches commerciales (Fig 5, Article 1, p 63). Les distances

phénotypiques relatives entre les deux couples varient du simple au triple (Fig 2, Article 2, p 96). Cette divergence se retrouve également sur le plan génétique. L'utilisation de marqueurs neutres et polymorphes a établi que les souches SB et GN sont génétiquement éloignées tandis que les souches M2 et F15 présentent une distance génétique modérée comparée à la distance moyenne mesurée entre 96 souches industrielles du vin (Fig 2, Article 2, p 96). Grâce à ces deux populations nous avons pu évaluer si des distances génétiques et phénotypiques relativement faibles (cas de M2xF15) sont suffisantes pour identifier des QTLs et si leur nombre et leur effet sont comparables à ceux obtenus avec une population plus divergente sur le plan génétique (cas de SBxGN).

2.2.1 Construction des descendance

Dans l'Article 2 les populations de descendants utilisées sont équivalentes en taille : 95 et 94 individus respectivement pour les croisements M2xF15 et SBxGN. Ces descendants ont été respectivement obtenus par Miguel Roncoroni et Maria Marti Raga (au cours de leur thèse de doctorat respectives (Raga, 2015; Roncoroni, 2014)). La population M2xF15 a déjà été utilisée dans un programme QTL visant à expliquer la production de Sulfure d'hydrogène (H₂S) en œnologie (Huang et al., 2014). C'est grâce aux professeurs Vladimir Jiranek (Université Adélaïde) et Richard Gardner (Université Auckland) que nous avons pu bénéficier de cette population ainsi que des données génomiques relatives à cette population. Ces deux populations ont été obtenues en utilisant la même stratégie. Les quatre souches parentales sont des clones monosporiques diploïdes entièrement homozygotes obtenues par la sporulation des souches industrielles correspondantes. Pour cela, les asques obtenues après sporulation ont été disséqués et les spores isolées à l'aide d'un micro-manipulateur. Les hybrides M2xF15 et SBxGN ont été également obtenus par micromanipulation en appariant les spores de chaque souche parentale sur gélose. Après sporulation, les tétrades de ces hybrides ont été disséquées et les spores isolées afin d'obtenir les ségrégants analysés dans ce travail. Leur mode d'obtention fait de ces clones des souches non OGM qui sont donc directement utilisables dans des programmes de croisement.

2.2.2 Cartes génétiques utilisées

Chaque clone monosporique des populations M2xF15 et SBxGN a été génotypé par une approche de séquençage à haut débit (Huang et al., 2014; Martí-Raga et al., 2017). Cette stratégie délivre des cartes génétiques saturées permettant la détection de QTLs avec une précision élevée (Bloom et al., 2013; Huang et al., 2014; Martí-Raga et al., 2017; Wilkening et al., 2014). Ces cartes bi alléliques sont présentées dans la Fig 20. Les marqueurs sont répartis de manière homogène le long du génome sauf pour la carte génétique SBxGN pour laquelle le chromosome IX n'est que faiblement couvert (11 marqueurs pour une longueur totale de 437 kb). Ce manque de couverture est lié à une aneuploïdie

de SB pour ce chromosome. La présence de cette aneuploïdie a été détectée par puce à ADN (Marullo et al., 2007a) et confirmée par séquençage (Martí Raga, communication personnelle). La présence de cette copie surnuméraire fausse la détection de marqueurs pour une grande partie du chromosome. De plus, la détection de l'aneuploïdie du chromosome IX au sein de la descendance est difficile à cause du faible taux de couverture utilisé pour construire la carte. Les deux cartes possèdent respectivement 3433 et 8378 marqueurs en ségrégation pour les croisements SBxGN et M2xF15 (0,3x et 0,6x marqueur/kb).

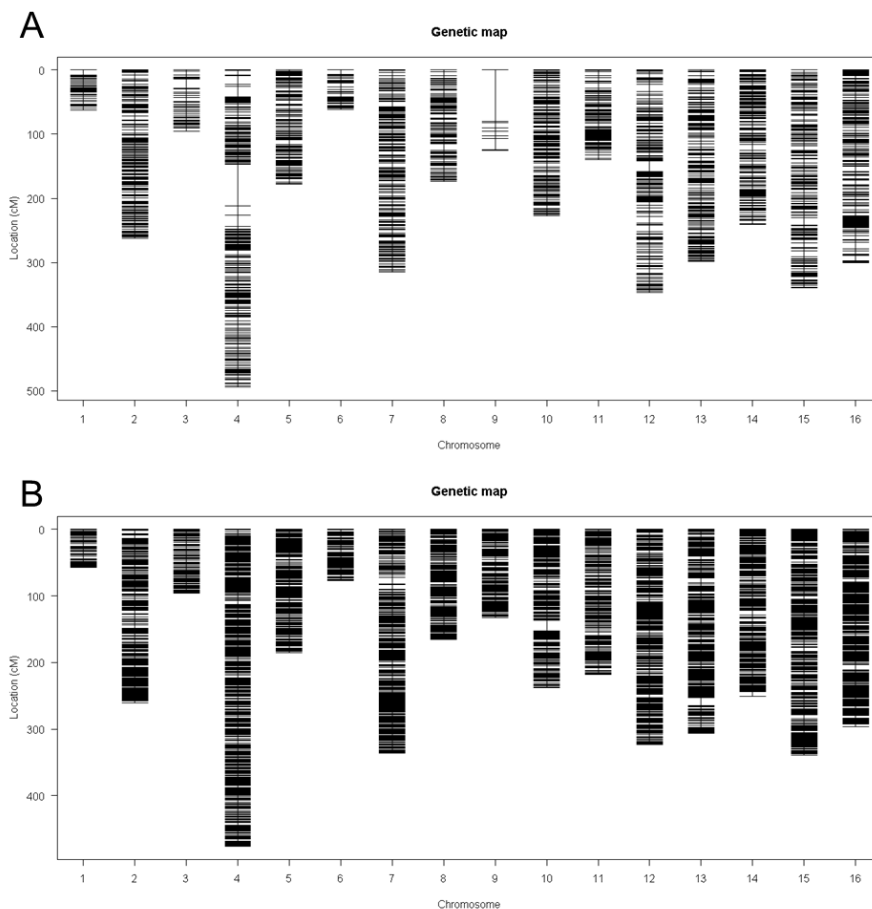


Fig 20 Les cartes génétiques utilisées pour la détection de QTL.

Panel A. Carte génétique utilisée pour les descendants de SBxGN qui contient 3433 marqueurs.

Panel B. La carte génétique utilisée pour les descendants de M2xF15 qui contient 8378 marqueurs. Chaque trait vertical le long des chromosomes représente un marqueur.

3 L'impact des conditions environnementales

3.1 Pourquoi étudier les interactions entre gène et environnement ?

L'effet d'un allèle peut varier en fonction de l'environnement. Cette interaction est abrégée en GxE pour (*gene-environment interaction*). Au sein d'une population, la ségrégation d'allèles dont les effets varient en fonction de l'environnement est à l'origine de réponses phénotypiques différenciées entre les souches. Une distinction très schématique d'un QTL interagissant ou non avec l'environnement est représentée dans la Fig 21.

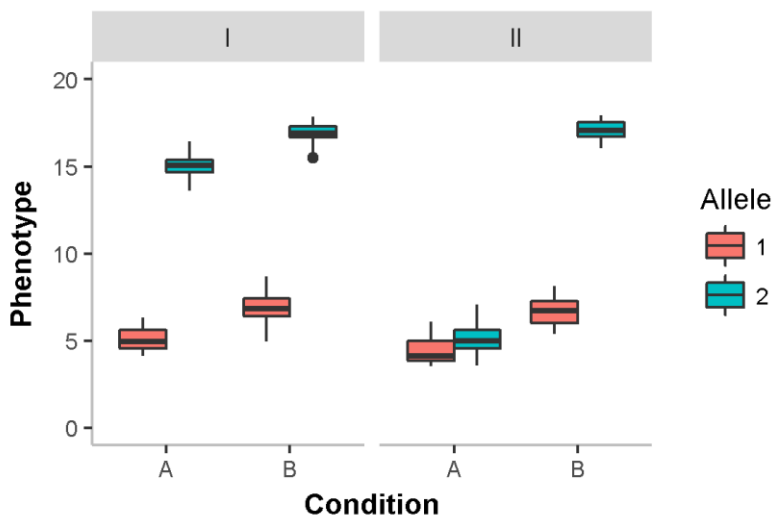


Fig 21 Effet d'un QTL sans GxE et d'un QTL avec GxE

Pour le QTL I, la comparaison des souches qui possèdent l'allèle 1 avec celles qui possèdent l'allèle 2 montre que le QTL a le même effet peu importe la condition A ou B. Dans ce cas les souches ont la même réponse phénotypique d'une condition à l'autre (normes de réaction parallèles). Pour le QTL II, la comparaison des souches qui possèdent l'allèle 1 avec celles qui possèdent l'allèle 2 montre que le QTL n'a pas d'effet dans la condition A et a un effet dans la condition B. Cette interaction génère une réponse phénotypique différenciée des souches (normes de réaction divergentes). Celles qui possèdent l'allèle 1 ont une valeur phénotypique qui augmente légèrement dans la condition A par rapport à la condition B tandis que celles qui possèdent le génotype 2 ont une valeur phénotypique qui augmente fortement en condition B par rapport à la condition A.

L'identification des facteurs génétiques qui expliquent les réponses phénotypiques différenciées entre les souches revêt une importance particulière en œnologie où les conditions de vinifications sont très changeantes (millésimes, cépages, terroirs, itinéraires de vinification...). En effet, le vinificateur souhaite utiliser des souches robustes aux variations environnementales afin d'assurer le bon déroulement de la fermentation alcoolique dans une large gamme de conditions. La détection de QTLs

dans plusieurs conditions permet d'évaluer et de quantifier leur niveau d'interaction avec les environnements testés (Pigliucci, 2005). Cette estimation des effets d'interaction catégorise les QTLs et permet leur exploitation de manière adaptée. Ainsi, un marqueur ayant un effet robuste à travers plusieurs conditions est un bon candidat pour l'amélioration globale de la performance d'une souche pour le trait concerné (QTL I, Fig 21). De son côté, un marqueur dont l'effet varie en fonction de l'environnement permettra d'expliquer une partie de la réponse phénotypique différenciée des souches qui le porte. Il peut être alors un bon candidat pour corriger un caractère non optimal qui survient dans une condition spécifique (QTL II, Fig 21). Dans un travail précédant réalisé au cours de la thèse de Maria Marti Raga, nous avons étudié l'effet des gènes *PMA1* et *VMA13* associés à deux QTLs dont les effets varient face aux variations du pH (Martí-Raga et al., 2017). Cependant, l'évaluation de l'effet GxE a été réalisée *a posteriori*, une fois les deux QTLs détectés dans un unique environnement. La démarche de cette thèse permet l'identification systématique de ce type d'interaction GxE. La recherche de conditions produisant des réponses phénotypiques différenciées a été décrite dans le chapitre 1. A la lumière des résultats obtenus, deux conditions environnementales spécifiques ont été retenues pour réaliser la détection de QTLs.

3.2 Dispositif expérimental proposé

La cartographie des QTL a été réalisée dans trois conditions de fermentations contrastées en faisant varier la nature du cépage Merlot/Sauvignon Blanc et les conditions de micro-oxygénation. Les trois conditions de phénotypage effectuées sont M15 avec agitation, (M15_Sk), SB14 avec agitation (SB14_SK) et M15 sans agitation (M15) (Fig 1, Article 2, p 94). Le premier chapitre montre l'étude de différents paramètres œnologiques sur la réponse phénotypique des souches œnologiques. L'étude menée sur plus de 30 souches industrielles montre que la réponse phénotypique est différemment affectée. Après avoir testé différents facteurs pertinents en œnologie (SO₂, sucre, azote, micro-oxygénation et jus de raisin) notre choix s'est arrêté sur deux d'entre eux. Le premier paramètre retenu est la nature du cépage. Le second est l'effet de la micro-oxygénation en conditions vin rouge.

3.2.1 Effet cépage (GM)

Le paramètre ayant visiblement le plus d'effet sur la réponse phénotypique des souches est la nature du moût. En effet la réponse des quatre souches parentales dans cinq moûts différents est particulièrement contrastée. Pour cela le phénotypage a été effectué dans deux moûts (SB14 et M15) qui généraient les réponses phénotypiques les plus différenciées. Le choix d'utiliser deux jus de raisin provenant de matrices différentes (blanc et rouge) peut être critiqué sur le plan méthodologique. En effet, comparée à des milieux synthétiques définis ou à des moûts dont un seul paramètre serait modifié (azote, SO₂, pH...), ces matrices s'opposent sur de nombreux points (cf. Table 1, Article 1, p 52).

Cependant ce choix nous ancre dans la réalité œnologique et permet d'appréhender pour la première fois les causes génétiques assurant une fermentation réussie d'un vin blanc ou d'un vin rouge. Cette démarche permettra de savoir si ces déterminants sont les mêmes ou si au contraire ils présentent une interaction forte avec le type de matrice. L'utilisation de matrices distinctes pour de nombreux paramètres garantie également l'identification potentielle de QTLs plus robustes que ceux identifiés dans un même moût mais modifié pour un seul paramètre.

3.2.2 L'effet micro-oxygénation (μ -Ox)

L'autre paramètre choisi est la micro-oxygénation. Bien que les volumes utilisés soient très éloignés de la pratique des chais, le premier chapitre a permis de montrer que les quantités d'oxygène transférées dans les vials étaient comparables à celles de la pratique œnologique. L'apport d'oxygène ayant à la fois un effet important et différencié sur de nombreux paramètres, nous avons considéré qu'il était pertinent d'un point de vue œnologique. Pour cela le phénotypage a été effectué en M15 avec ou sans agitation. De la même manière que le paramètre moût, la variation du paramètre micro-oxygénation permet de caractériser la robustesse des QTLs identifiés ainsi que leur implication dans les réponses phénotypiques différenciées des souches.

4 Principaux résultats

Ce sous-chapitre a fait l'objet d'un article scientifique

Dissection of the molecular bases of genetics x environmental interactions: a study of phenotypic plasticity of *Saccharomyces cerevisiae* in natural grape juices.

Emilien Peltier^{1,2*}, Vikas Sharma¹, Maria Marti Raga^{1,3}, Miguel Roncoroni⁴, Margaux Bernard^{1,2}, Vladimir Jiranek⁵, Yves Gibon⁶, and Philippe Marullo^{1,2}

¹ Univ. Bordeaux, ISVV, Unité de recherche OEnologie EA 4577, USC 1366 INRA, Bordeaux INP, Villenave d'Ornon, France.

² Biolaffort, Bordeaux, France.

³ Universitat Rovira i Virgili

⁴ Wine Science Programme, University of Auckland, Private Bag 92019, Auckland, New Zealand

⁵ School of Agriculture, Food and Wine, Waite Campus, University of Adelaide, Adelaide, South Australia, Australia

⁶ INRA, University of Bordeaux, UMR 1332 Fruit Biology and Pathology, F-33883 Villenave d'Ornon, France

*Corresponding author

E-mail: emilien.peltier@u-bordeaux.fr

Abstract

The ability of a genotype to express different phenotypes according to its surrounding environment is known as phenotypic plasticity. Within different individuals of the same species, the phenotypic plasticity can vary greatly. This contrasted response is due to allelic variations and is called gene-by-environment (GxE) interaction. Understanding GxE has also particular importance in agronomy where selected breeds and varieties may have divergent phenotypes according to their growing environment. Industrial microbes such as *Saccharomyces cerevisiae* are also faced to a large fluctuation of fermentation conditions that affects their technological properties. Finding the molecular determinism of such variations is a critical task in order to better improve breeding methods but also to understand the genetic bases of phenotypic plasticity. In this study we applied a QTL mapping program using two independent offspring (~100 progenies) in order to investigate the phenotypic response of yeast to wine fermentation. Thanks to high throughput sequencing approaches, both populations were genotyped providing saturated genetic maps of thousands markers. Linkage analyses allow the detection of 76 QTLs including 21 with significant interaction with environment. Molecular dissection of a major QTL showed that the sulfite pump *Ssu1p* had a pleiotropic effect and impact phenotypic plasticity of wine fermentation traits. All together these results pave the way for exploiting and deciphering the genetic determinism of phenotypic plasticity.

Introduction

Phenotypic plasticity is the ability of a genotype to produce distinct phenotypes in different environmental conditions and has been widely reviewed (Nussey et al., 2007; Pigliucci, 2005; West-Eberhard, 1989). This changing phenotypic expression encompasses various aspects of the organism's life including ontogeny (Sultan, 2000), lifespan (Panowski et al., 2007; Whitfield et al., 2003), response to biotic (Agrawal, 2001; Leal et al., 2017) or abiotic factors (Nicotra et al., 2010; Shao et al., 2007), pathogen or disease susceptibility (Feinberg, 2007; Roux et al., 2010; Shields and Harris, 2000), and animal behavior (Feinberg, 2007; Sambandan et al., 2008). As a universal mechanism, phenotypic plasticity was reported in human (Feinberg, 2007), animals (Dixon, 1977; Panowski et al., 2007; Spitze, 1992), plants (Sultan, 2000), and fungi (Rai et al., 2017; Slepecky and Starmer, 2009). At the population level, phenotypic plasticity can be considered as the average differences among different environments, across genotypes. This phenomenon is mainly explained by transcriptional (Aubin-Horth and Renn, 2009; Schlichting and Pigliucci, 1993), post-transcriptional (Albertin et al., 2013), and/or epigenetics (Feinberg, 2007; Rai et al., 2017) regulations.

Phenotypic plasticity can be also considered at the individual level (NUSSEY et al., 2007; Pigliucci, 2005). In such case, this phenomenon is estimated by measuring the difference of trait values observed in various conditions for each single genotype. The phenotypic response pattern observed is called reaction norm. Among individuals of the same species, non-parallel norms of reaction are often observed in animals (Sae-Lim et al., 2015; Veerkamp et al., 1994), plants (Pigliucci and Kolodynska, 2002; Rashwan, 2016) and fungi (Marullo et al., 2009). This genotype-specific response is due to genetic-by-environment interaction (GxE) of allelic variations having different effects according to external conditions. The genetic causes of GxE can be investigated at a genomic level by QTL mapping programs carried out in various environmental conditions. This strategy is commonly used for animals (Gutteling et al., 2007; Vieira et al., 2000), plants (Ungerer et al., 2003; Yang et al., 2016) and fungi (Bhatia et al., 2014; Smith and Kruglyak, 2008; Wei and Zhang, 2017; Yadav et al., 2016). Although, many QTL interacting with environment are often detected, the identification of the molecular bases of GxE at the gene level is far to be trivial and few molecular evidence has been reported in plants (Campitelli et al., 2016; Chiang et al., 2011) and yeast (Gerke et al., 2010; Martí-Raga et al., 2017).

In agronomy, this concept has been integrated as a long time for ensuring the stability of domesticated plants and animal race across diverse uncontrollable macro environments (Ceccarelli et al., 1994; Kang, 1997; O'Neill et al., 2010; Sae-Lim et al., 2015). Aside the species of agronomical interest, fungi and in particular yeast are eukaryotic organisms having an important economical impact. The baker yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is by far the most relevant industrial microorganism since it is involved in

numerous fermented food products including bakery, winemaking and brewery (Sicard and Legras, 2011). These processes can be better controlled, by using industrial starters that are subjected to genetic selection using breeding programs (Steensels et al., 2014). According to the composition of matrix to ferment, yeast are faced to various stress and conditions impacting their physiological responses. This is the case in winemaking where the initial composition of the grape must strongly impact the alcoholic fermentation ongoing. Indeed, grape cultivars, enological practices, *terroir*, and climate modulate biotic (sugar, nitrogen, lipids, vitamins concentration) and abiotic parameters (oxygen, temperature, turbidity) strongly shape the phenotypic plasticity of wine yeasts (Bell and Henschke, 2005; Berthels et al., 2004; Cottrell and Lellan, 1986; Fornairon-Bonnefond et al., 2003; Gardner et al., 1993; Luparia et al., 2004; Monk, 1982; Remize et al., 2000; Torija et al., 2003; Varela et al., 2012). Understanding how and why industrial starters have non-parallel norms of reaction is a critical challenge for industrial yeast selection. Therefore phenotypic robustness (also named canalization or homeostasis) is of great importance for selecting more robust individuals able to ensure successful fermentations in a wide range of conditions. Recently the QTL dissection of fermentation kinetics demonstrated that two genes involved in pH homeostasis showed *GxE* interaction according to wine pH (Martí-Raga et al., 2017). In the present work, we applied a QTL mapping program aiming to extensively identify QTLs interacting environmental conditions. Eleven quantitative traits related to alcoholic fermentation were measured for two distinct populations of ~100 progenies in three distinct conditions simulating diverse winemaking practices. The use of two independent backgrounds allows estimating the impact of the parental divergence on QTL dissection. High-density genetic maps generated by genome sequencing provide QTL detection at a gene level precision. Although most of QTLs are robust to environmental changes, striking *GxE* interactions were identified. One of them was explained at the molecular level revealing that the sulfite pump *Ssu1p* has a strong pleiotropic and plasticity role in wine fermentation.

Results

Experimental design

This study proposes to find out at a large scale Quantitative Trait Loci interacting with the environment by using the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. As QTLs can be readily used in yeast breeding for strain improvement, this work was carried out in an enological context by measuring the phenotypic plasticity of wine yeast in three contrasted conditions met in winemaking. Two particular effects were investigated. (i) The phenotypic plasticity of yeast fermenting red or white grape musts (GM) was estimated by comparing M15_Sk (red) vs SB14_Sk (white) conditions, reflecting common types of

grape juice fermented in the world. (ii) The phenotypic response to micro-oxygenation (μ -Ox) in accordance with enological practices (Peltier et al. 2017) was estimated by comparing M15_Sk (shaken) vs M15 (unshaken) conditions. In order to have the broadest landscape of phenotypic plasticity, we performed QTL mapping in two distinct genetic backgrounds derived from commercial starters widely used in industry. The full experimental design is summarized in the Fig 1. Two main questions were then addressed. First, we evaluated if the genetic and/or phenotypic characteristics of parental strains impact the architecture of quantitative traits determinism. Second, we investigated if and how yeast strains display different norm of reaction according to the grape juice and the fermentation conditions used.

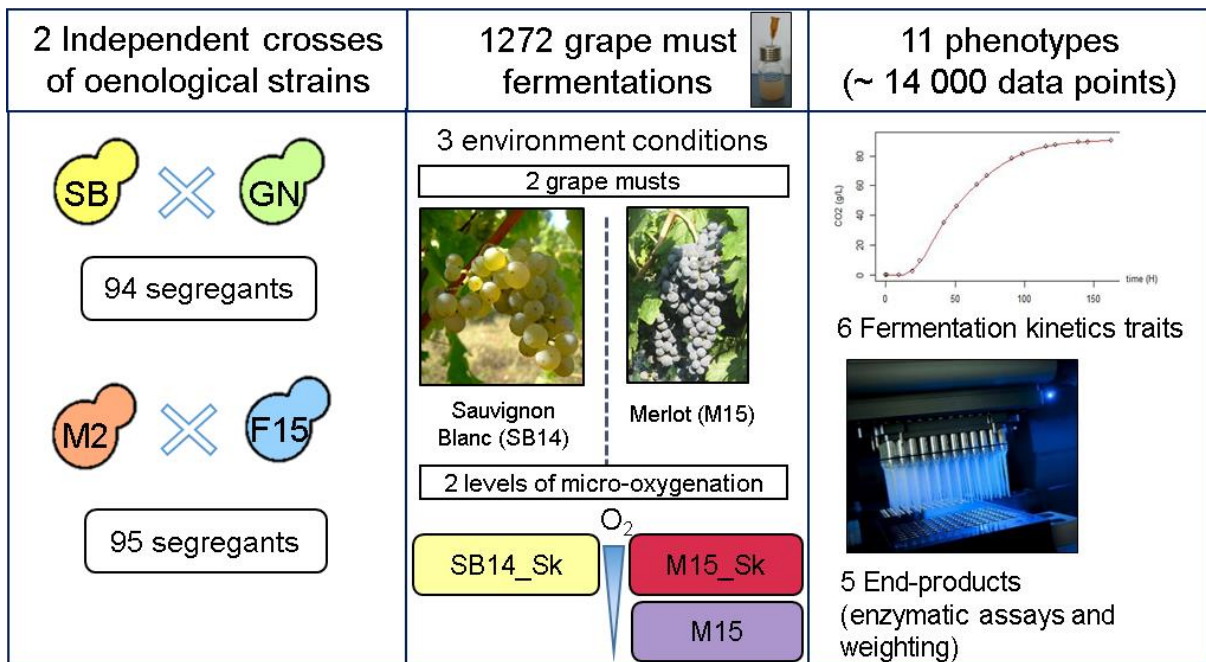


Fig 1 Experimental design.

Four diploid homozygous strains (SB, GN, F15, M2) were used to generate two independent hybrids (SBxGN and M2xF15) and their 94 and 95 segregants, respectively. The whole genome sequence of each parental strain and each progeny was obtained by high throughput sequencing and analyzed to get saturated genetic map (3433 and 8378 markers, respectively). The phenotypic characterization of the strains was carried out in three conditions (SB14_Sk, M15_SK and M15) in small volume vessels. Fermentation kinetics was monitored and six traits were computed: lag phase (l_p), time required to produce 35, 50 and 80 g.L⁻¹ of CO₂ (t_{35g} , t_{50g} and t_{80g} , respectively); glucose consumption rate in the first and the second part of the fermentation (V_{15_50} and V_{50_80} , respectively). The concentrations of five end-point metabolites were also assayed by enzymatic methods (*acetic acid*, *glycerol*, *pyruvate* and *SO₂*) or by weighting (*CO₂max*). Grape pictures were reprinted from CC-BY licences, the copyright holders being Lebowskyclone (Merlot) and User:VI (Sauvignon Blanc).

Genetic and phenotypic relationships of the parental strains

In order to estimate the genetic relationships between the four parental strains, 15 polymorphic microsatellite markers were used (Legras et al., 2007). The codominant allele set of each parental strain

was compared to those of 96 Wine Commercial Starters (WCS) figuring the overall diversity of *S. cerevisiae* wine group (S1 Table). This dataset was used to build a tree using the Bruvo's distance (Fig 2, panel A). The pairwise Bruvo's genetic distance between all the strains range from 0 (identical strains) to 0.924, with an average of 0.552. According to previous studies, the wine strain population is poorly structured. Four groups of strains (nodes with a bootstrap values higher than 85 %) were found. One of this group correspond to the Champagne-like strains that shows specific genetics features (Borneman et al., 2011; Legras et al., 2007). A second encompasses the strain Actiflore Bo213 and the parental strains SB. As expected, the parental monosporic clones are closely related to their commercial ancestors (Actiflore BO213, Zymaflore VL1, Enoferm M2 and Zymaflore F15). Considering the overall genetic diversity of the *S. cerevisiae* species, the wine yeast cluster constitutes a quite homogenous group (Borneman et al., 2011; Legras et al., 2007). However, within this group the genetic relationships between parental pairs are different. The strains GN and SB are more divergent than the strains M2 and F15 (Bruvo's genetic distance= 0.611 and 0.216, respectively) (Fig 2, panel B). Similar results were obtained by calculating the % of identity of a subset of 5281 polymorphic SNPs extracted from parental genomes (Sharma, personal communication). The relative phenotypic distances between parental strains was estimated using the phenotypic values of eight fermentation traits measured in five grape musts for 35 strains previously obtained (Peltier et al. 2017). In order to represent the genetic diversity of commercial starters, the sampled strains belong to the different branches of the tree shown in Fig 2, panel A. The pairwise Euclidian's phenotypic distance between all the strains range from 0.73 (similar strains) to 9, with an average of 3.7. The strains SB and GN are phenotypically very different (9) while F15 and M2 have more similar phenotypes (3). All together, these results demonstrate that the hybrids used for QTL mapping (M2xF15 and SBxGN) were obtained from independent strains showing either moderate or high genetic and phenotypic distances.

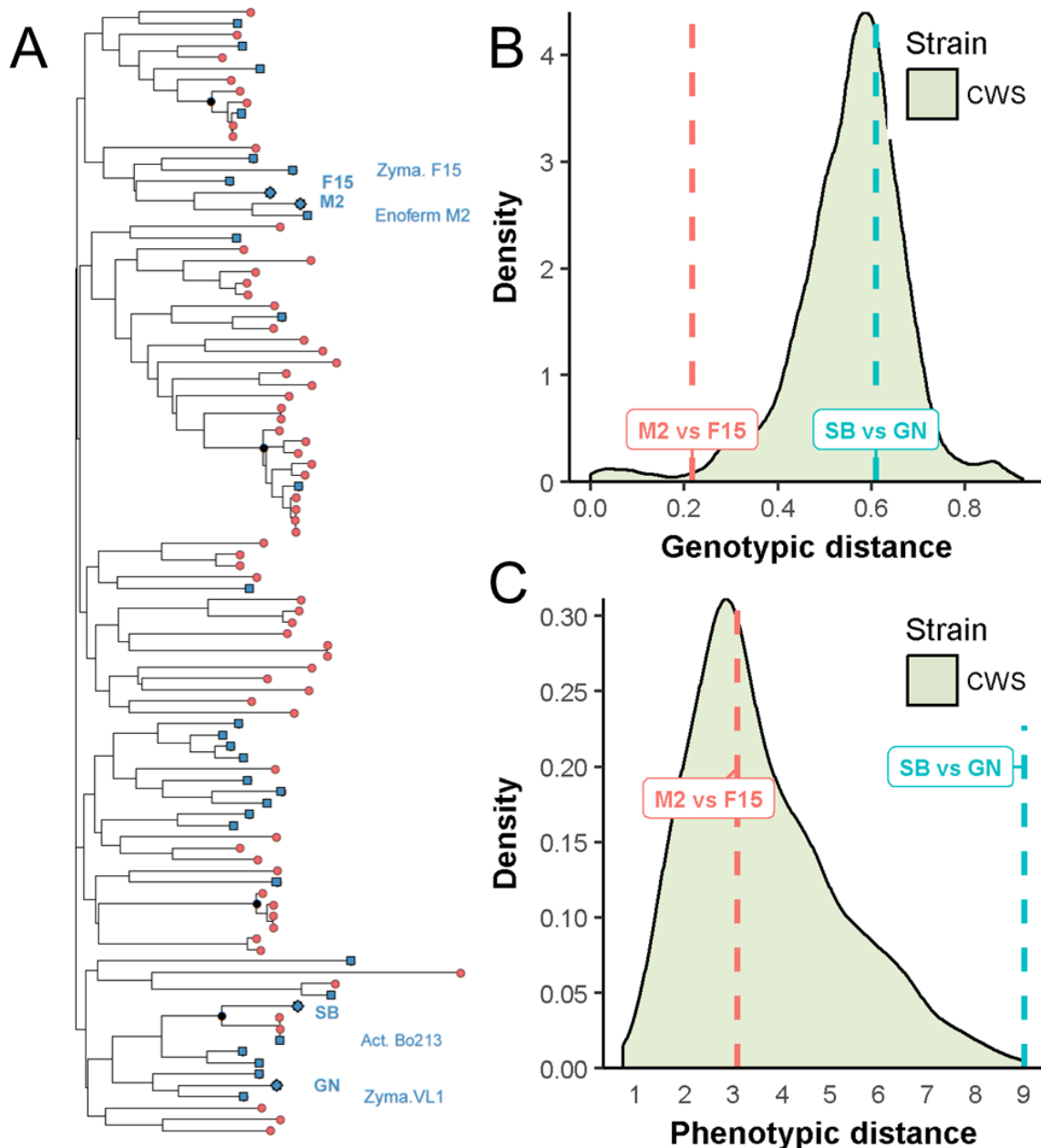


Fig 2 Genetic distance between parental strains

Panel A. Genetic relationships between 96 commercial wine yeast strains and the four parental monosporic clones GN, M2, F15 and SB used in this work (diamonds). The dendrogram tree was built using Bruvo's distance and Neighbor-Joining's clustering strains from the inheritance of 15 polymorphic microsatellites described by Legras et al (Legras et al., 2007). Black dots represents nodes encompassing group of strains highly similar (bootstrap values >85). Among the strains genotyped, 31 Commercial Wine Strains (CWS) have been previously phenotyped and covered all the branches of the tree (blue squares). Panel B. The distribution of the Bruvo's distance for all genotyped strains. The relative distances between SB vs GN and M2 vs F15 are 0.61 and 0.22, respectively. Panel C. The distribution of the phenotypic distance computed for 35 strains (31 CWS and the 4 parental strains). The data used eight traits in five grape musts and were obtained from (Peltier et al.). Dashed lines shows the relative distance between parental pairs SB vs GN and M2 vs F15.

Meiotic recombination emphasizes phenotypic novelty whatever the cross tested

By implementing alcoholic fermentations in small volume, eleven heritable traits were measured in three grape must/conditions for 195 strains in duplicate constituting a data set of 14000 data points (S2 Table). From fermentation kinetics, six representative traits were extracted: the lag phase duration (lp), the time to produce various amount of CO_2 ($t35g$, $t50g$ and $t80g$), fermentation rate during the first ($V15_50$) and the second part of the fermentation ($V50_80$). Moreover four metabolites present at the end of the fermentation were measured by enzymatic assay: *acetic acid*, *glycerol*, *pyruvate* and SO_2 . All the fermentations were completely achieved since the residual sugars at the end of the reaction was less than $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The main product of alcoholic fermentation was measured by estimating the $CO2max$ produced, which is stoichiometric to ethanol. The inheritance of those eleven quantitative traits was calculated for each cross and condition (Fig. 3, panel A). Except for lp in M15_Sk, $CO2max$ in M15 and *Glycerol* in SB14_Sk that generated less than 0.3 of heritability for both crosses, most of the traits are highly heritable since 75 % of them has h^2 values upper than 0.5. Considering all the traits, each cross-by-environment combination have distinct heritability profile. Hierarchical clustering grouped them by environment rather than by cross (Fig. 3, panel A).

The overall level of phenotypic segregation of both offspring was estimated by computing the Euclidean distances within each progeny clones. The trait values for each condition were normalized (center-reduced) for preventing scale effects and only one kinetics trait ($t80g$) was used since most of them are strongly correlated (see method) (Fig 3, panel B). The parental pairwise distances confirmed that SB vs GN are phenotypically more divergent than M2 vs F15 (Euclidian distance = 7.6 and 2, respectively). These contrasted relationships do not impair a wide segregation in both progeny populations. Indeed, the distributions of phenotypic distances are similar between the M2xF15 and SBxGN progenies illustrating that meiotic segregation generated a burst of phenotypic novelty (Fig 3, panel B). Strikingly, the phenotypic magnitude generated was higher than those observed for the panel of 31 representative commercial starters phenotyped in the same conditions (S1 Fig). As a direct consequence, the percentage of transgressive progenies is much higher in the M2xF15 background except for the $CO2max$ and *pyruvate* (Fig 3, panel C). The percentage of transgression in both offspring is illustrated for the $t80g$ measured in M15_Sk Fig 3, panel D. All together, these biometric analyses indicated that meiotic segregation generated an important and similar phenotypic diversity despite the contrasted relationships of parental pairs. In contrast, the relative phenotypic distance of parental strains has a strong effect on the transgression level observed. In both cases, the phenotypic variability

generated significantly overpasses that found in a wide panel of commercial starters underlining the power of meiotic segregation to generate phenotypic novelty.

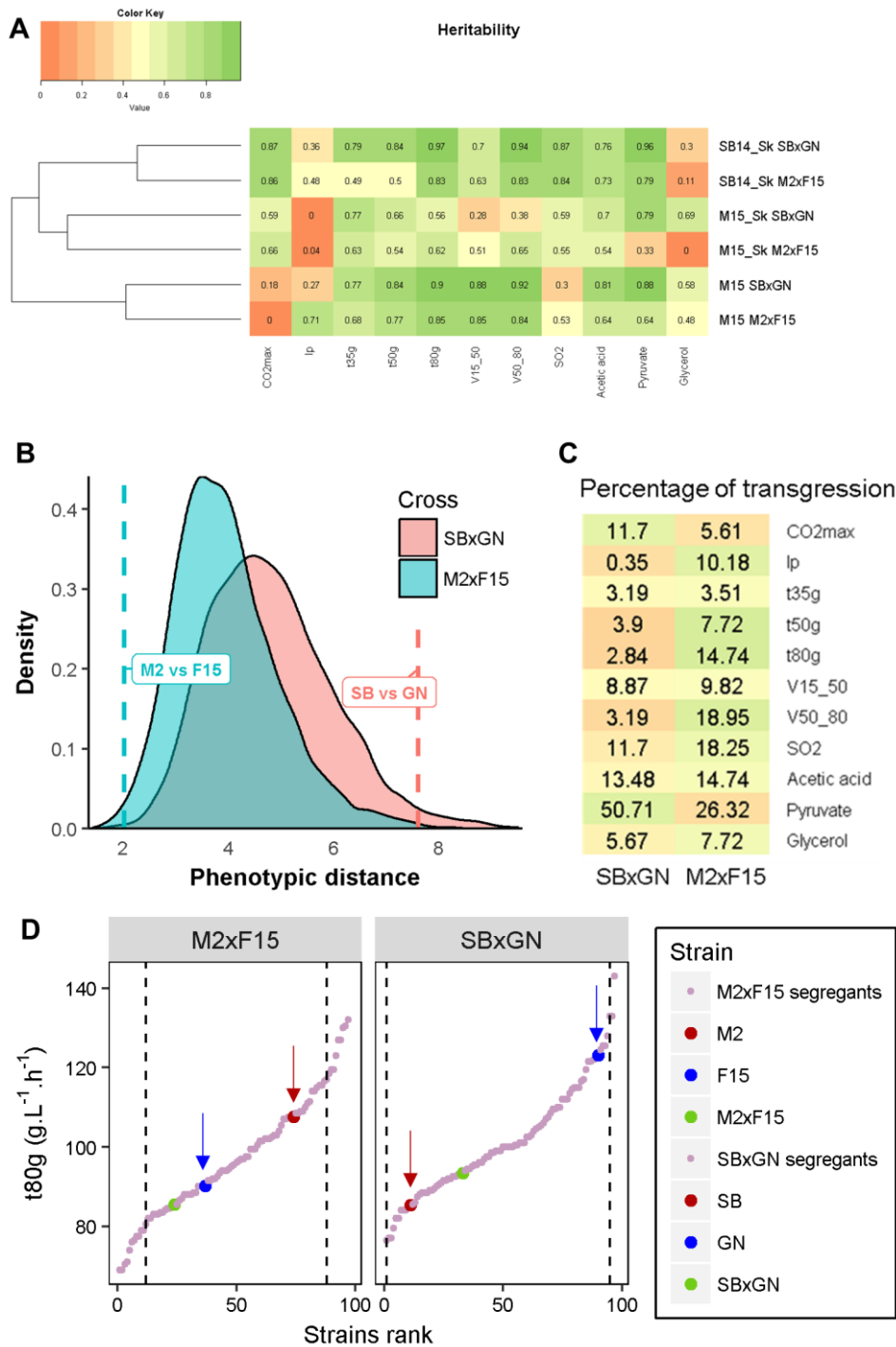


Fig 3 Phenotypic distribution patterns differs in the two progeny population.

Panel A. Heritability calculated for each trait according to cross and condition. Panel B. Dashed lines shows the phenotypic distance between parental strains. Shaded areas show the distribution of the phenotypic distance within progenies. Panel C. Average percentage of transgression per trait in the three conditions according to the cross. Color key is scaled by traits, dark green means high transgression level and dark red low transgression level. Panel D. The distributions of *V50_80* (M15_Sk condition) illustrate the transgression discrepancy observed between the two crosses. Each dot represents a strain value ordered according to the rank, parental phenotypes are indicated by arrows. Dashed vertical lines represent the upper and lower limits set for considering transgressive progeny clones.

Distribution of individual reaction norms in segregating populations

The phenotypic plasticity was then analyzed for both progeny population. First, the impact of the cross was tested using the linear model LM1 that estimates the effects of *cross* (C) and *environment* (E) as well as their primary interaction (C*E) (S3 Table). Analysis of variance shows that the sum of C and C*E have very low effects (below 3.4 % in average) for all phenotypes. This result means that both crosses have the same phenotypic response to environmental changes. The environmental conditions (μ -Ox and GM) affected the traits in different manners. Three representative patterns of phenotypic response were shown Fig 4; the full details are given in the S4 Table. As the two grape musts (SB15 and M14) used have different composition for SO₂ (34 mg.L⁻¹ vs 46 mg.L⁻¹) and initial sugars (194 g.L⁻¹ vs 219 g.L⁻¹), the SO₂ and CO₂ (Fig 4, panel A) produced were directly impacted by the grape juice matrix. In contrast, other traits such as *glycerol* (Fig 4, panel B) and *acetic acid* are only mainly impacted by μ -Ox. Indeed, in accordance with previous reports, an increased μ -Ox level increase glycerol production and decrease acetic acid production (Gardner et al., 1993; Peltier et al.; Remize et al., 2000; Valero et al., 2002). Some traits are influenced by both parameters (GM and μ -Ox) including the kinetic parameters like *V50_80* (Fig 4, panel C). The influence of sugar content and μ -Ox on kinetic parameters has been also described (Fornairon-Bonnefond et al., 2003; Varela et al., 2012). Finally, *pyruvate* production was slightly impacted by the environmental conditions.

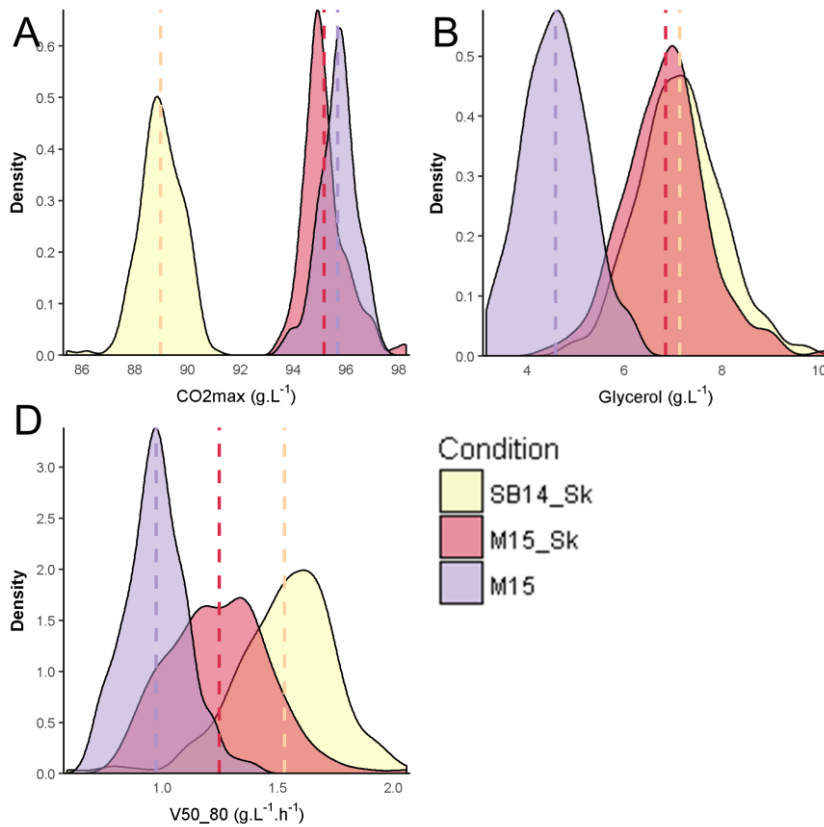


Fig 4 Environmental impact on quantitative traits

Distribution of the phenotypic values according to fermentation conditions. Vertical dashed lines indicate the average value in each condition. CO_2max is mainly impacted by grape must (Panel A), *glycerol* mainly by micro-oxygenation (Panel B) and V_{50_80} by both (Panel C).

In order to estimate the reaction norm at the strain level, the variation of each trait was decomposed by a second linear model (LM2 see methods). In this model, the overall genetic impact is decomposed into S and S*E components. S represents the constant strain effect across the three conditions (*i.e.* parallel norm of reaction) whereas S*E represents the phenotypic plasticity among strains (*i.e.* non-parallel norm of reaction). The analysis of variance estimated the effect of *strain* (S) and *environment* (E) factors as well as the *strain x environment* (S*E) interaction (Table 1). The models explained a great part of phenotypic variation (between 62.8 and 96.5 % according to the trait). For the majority of traits, environment accounts for most of the variation. However, the constant strain effect S (parallel norm of reaction) also explained an important part of phenotypic variability (up to 52.4 % for *pyruvate*). For some traits, an important phenotypic plasticity was observed. This is the case for *Ip* (26.1 %) and *acetic acid* (20.6 %) where non-parallel norm of reaction (S*E) have a non-negligible contribution. Interestingly, the genetics weight for the CO₂ production kinetics increased with the fermentation ongoing. Indeed, the sum of S + S*E explained 17.1 % of the variance for *t35g* and linearly increased until 37.6 % for *t80g*.

	CO2max	lp	t35g	t50g	t80g	V15_50	V50_80	SO ₂	Acetic acid	Pyruvate	Glycerol
E	90.6 ***	12.8 ***	77.2 ***	71.2 ***	53.3 ***	59.4 ***	53.3 ***	54 ***	22.1 ***	9.2 ***	55.3 ***
S	2.7 ***	23.9 ***	10.8 ***	13.9 ***	21.4 ***	17.8 ***	19.6 ***	18.3 ***	36.1 ***	52.4 ***	13.6 ***
S*E	3.2 ***	26.1	6.3 ***	8.4 ***	16.2 ***	11.7 ***	17.8 ***	12.6 ***	20.6 ***	17.9 **	13.2
Residuals	3.5	37.2	5.6	6.5	9.2	11.2	9.4	15.1	21.2	20.5	17.9

Table 1 LM2 model for the 11 phenotypes with 189 strains and 3 conditions of fermentation.

Percentage of variance explained by the LM2 model. Significance codes: pval < 0.001 = ***, pval < 0.01 = **, pval < 0.05 = *, pval < 0.1 = .

In order to better figure out the parallel (S) and non-parallel (S*E) norms of reactions, the phenotypic plasticity of the 189 strains were arranged by k-means clustering on the basis of a matrix of correlation distance (see methods). Divergent norm of reaction patterns were identified for each trait (S2 Fig). This procedure clustered each progeny clone according to its phenotypic response against environment. For *acetic acid*, the four clusters represent the plastic responses to micro-oxygenation (μ -Ox: 101 strains), to grape juice (GM: 44 strains), and to the combined effect of GM and μ -Ox (40 strains). Strikingly only seven strains (3.7%) are quite robust to the environmental conditions (Robust cluster) (Fig 5). In the four clusters, a similar number of progeny clones were found for the two crosses (chi-squared test, $\alpha = 0.05$) indicating that the plastic response pattern is no cross specific. From an enological point of view, the magnitude observed are quite relevant since difference of 0.1 g.L⁻¹ of acetic acid may impact the wine quality (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). For example, micro-oxygenation has a positive impact for the strains of the cluster μ -Ox and the cluster GM + μ -Ox by significantly decreasing the *acetic acid* production (Kruskal-Wallis rank sum test, pval<0.05). In contrast the strains of cluster GM should be preferred for fermenting white grape juice rather than red matrices (Kruskal-Wallis rank sum test, pval<0.05).

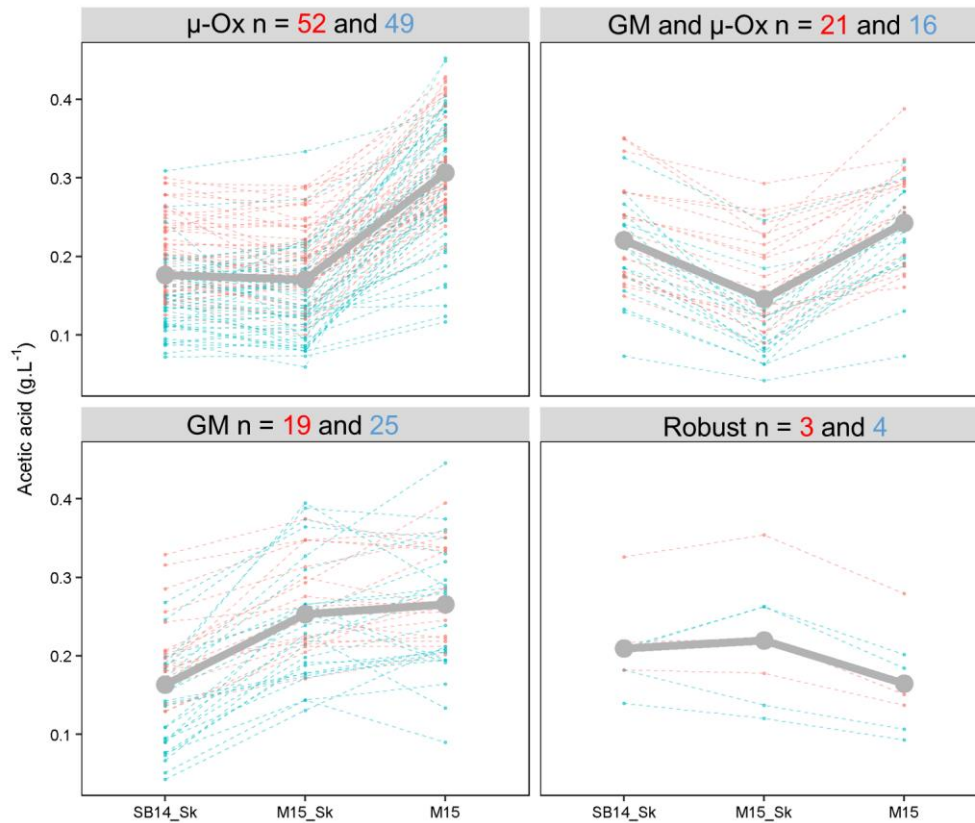


Fig 5 Divergent norm of reaction for acetic acid

Norm of reaction of each individual is shown by dotted line and cluster. They are colored according to the cross (blue for SBxGN offspring and red for M2xF15 offspring). A grey solid line shows the average norm of reaction of each cluster. Number of strains within each cluster is indicated and colored according to the offspring (red for M2xF15 offspring and blue for SBxGN offspring).

Genetic architecture of complex traits is explained by a similar number of QTLs

The genetic determinism of the eleven traits was elucidated by a QTL mapping in both crosses. Phenotypes were linked to segregating genetic markers identified by whole genome sequencing (Roncoroni *et al.* and this work). The high marker density (0.3 and 0.6 marker/kb for M2xF15 and SBxGN, respectively) ensures a precise localization of QTL as previously demonstrated (Bloom *et al.*, 2013; Martí-Raga *et al.*, 2017; Wilkening *et al.*, 2014). Interval mapping was carried out applying a Haley-Knott regression model. This model estimates the effects of each QTL detected, the effect of each *Environment* (SB14_Sk, M15, M15-Sk) and the interaction effect between QTL and *Environment* (Figure 6, panel A). Statistical thresholds (FDR=5%) were estimated by 1000 permutation tests (Churchill and Doerge, 1994). Since the fermentation kinetics traits are partially correlated (*t35g*, *t50g*, *t80g*, *V15_50* and *V50_80*), we found numerous QTLs corresponding to closely related markers. In such

cases, a unique QTL was considered in a window of 10 kb and was assigned to the kinetic trait showing the lowest p value (see methods). For an easiest discussion, all the QTLs of fermentation kinetics traits were then grouped into the “Kinetics” category. We mapped 77 unique QTLs in the two offspring (S5 Table). The efficiency of the multi-environment model was compared to simplest models in which only one environmental condition was used. The multi-environment model strongly increases the detection power since 45 QTLs were detected only by this method (Fig 6, panel B). Five QTLs are not detected with the multi-environment model, but rather than additional QTLs, they are miss localized QTLs as discussed below. The number of QTLs detected ranged from 3 (for CO₂max) to 28 (for Kinetics) illustrating the complex genetic determinism of the traits investigated. The number of QTLs identified is correlated with heritability (Spearman’s correlation coefficient = 0.7, $\alpha = 0.05$) (S3 Fig).

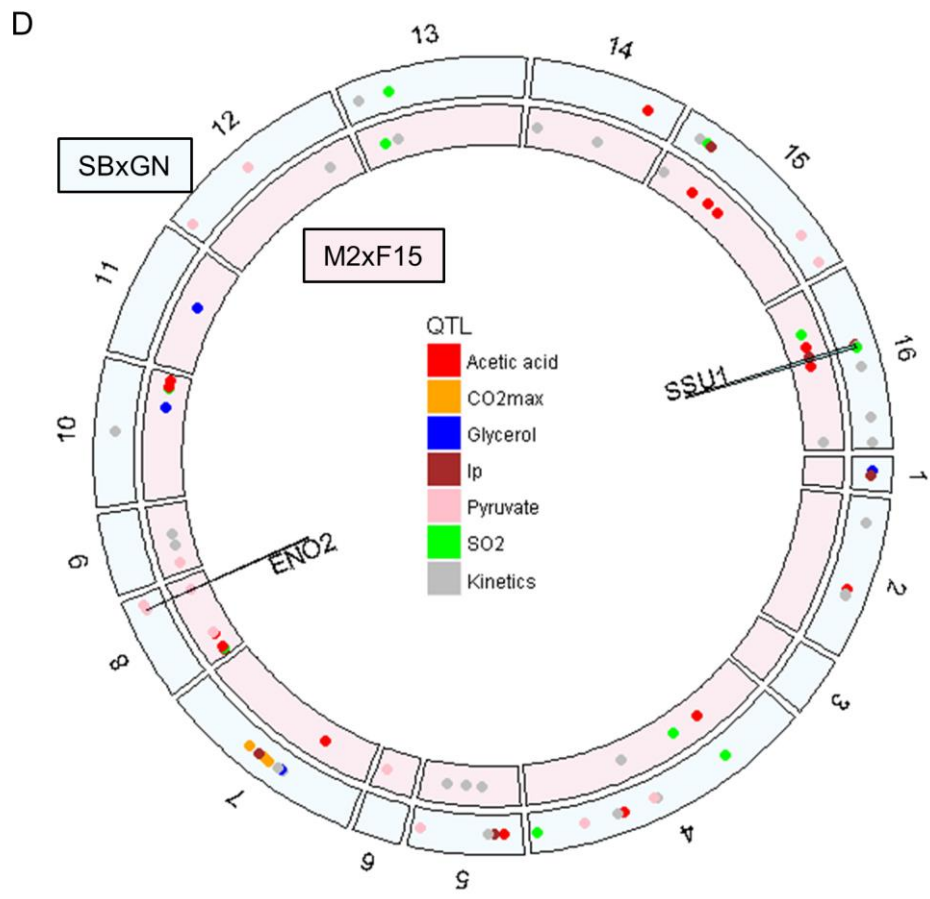
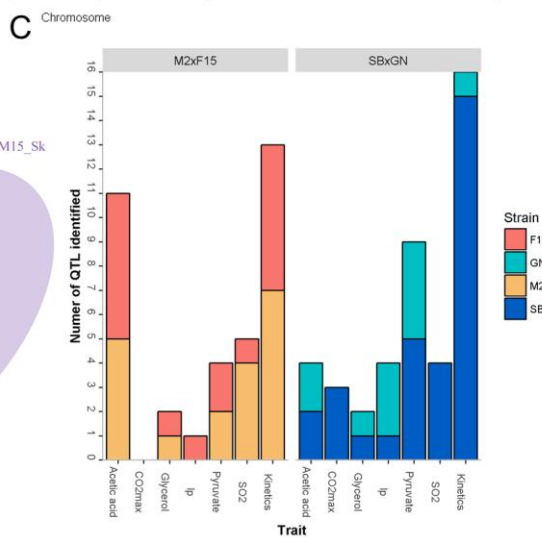
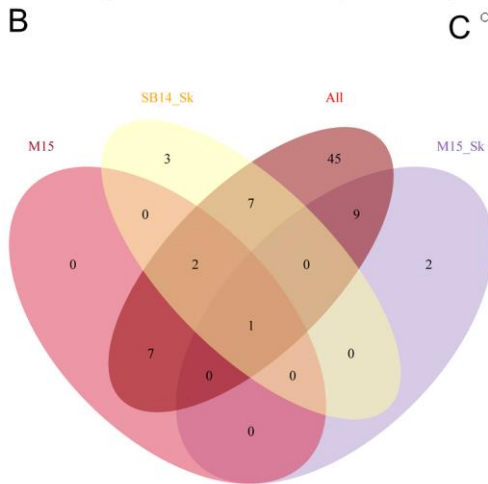
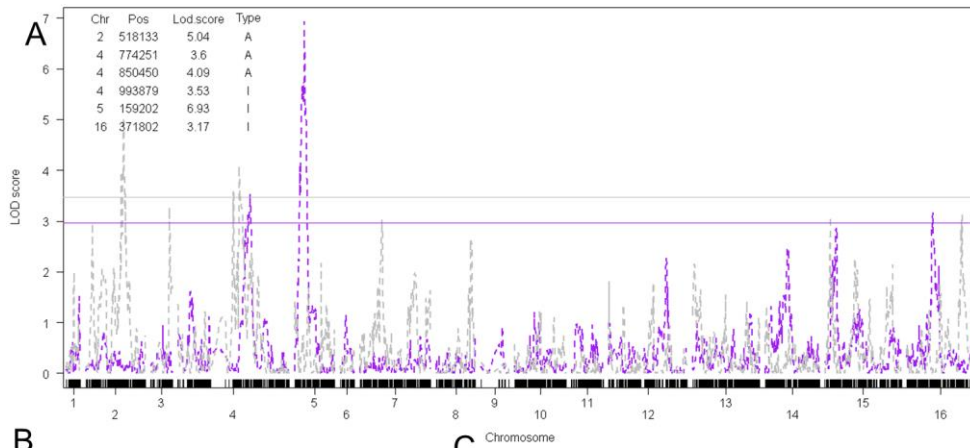


Fig 6 Number of QTL identified according to cross or environment condition

Panel A. LOD score obtained for SBxGN offspring with *V50_80*. In grey, LOD score for the model with environment as additive variable, in pink, LOD score for the model with environment as interactive variable. The corresponding horizontal colored lines represent the 5% FDR threshold. The table details the QTLs identified by indicating their chromosome (Chr), the position of the marker with the highest LOD score within the QTL peak (Pos), the maximum LOD score within the QTL peak (Lod.score) and the model that detected the QTL (Type, A = additive, I = interactive). Panel B. The Venn diagram presents the number of QTLs identified according to the model used. The *All* ellipse corresponds to the multi-environmental model while M15, SB14_Sk and M15_Sk ellipses counts QTLs detected only using a single condition. Panel C. The bar chart presents QTLs identified according to cross and trait. Common QTLs identified for *t35g*, *t50g*, *t80g*, *V15_50* and *V50_80* are pooled in Kinetics category and are counted only as one QTL. QTLs are colored according to the parental strains that possess the favorable allele in an oenological context. Panel D. Distribution of the QTLs identified along the genome according to the cross (M2xF15 inner track, SBxGN outer track). Each point indicates a QTL and is colored according to the trait. The two QTLs that colocalize in the two crosses and linked to the *SSU1* and *ENO2* genes are indicated.

Despite the contrasted F1-hybrids used (Fig 2 and 3), a similar number of QTLs was mapped in both progeny populations, with 36 and 42 QTLs for M2xF15 and SBxGN, respectively (Fig 6, panel C). The positive contribution of each parental strain was evaluated considering the suitable trait value expected according to enological practices. The numbers of positive alleles inherited from M2, F15, SB and GN are 19, 17, 31 and 11, respectively. According to the trait and the cross, the positive alleles were inherited from both or mostly one parent. A noteworthy unbalance was found for kinetics traits since 15/16 of the positive alleles were inherited from the fastest parental strain (SB) in the SBxGN cross whereas only 6/13 were inherited from the fastest parental strain (F15) in the M2xF15 cross (Figure 6, panel C). In order to find out common QTLs between progeny populations, we seek for QTLs impacting the same trait in a 20-kb window (Figure 6, panel D). Only two QTLs were shared by the two progeny populations. The first locus was detected for *SO₂*, *lp* and *V50_80* and is closely linked to the gene *SSU1* (markers: XVI_SBXGN_371802 and XVI_M2xF15_355235). In the SBxGN progeny, this QTL peak is strongly linked with the marker XV_SBXGN_172951 due to a reciprocal translocation event previously described for impacting the lag phase (Zimmer et al., 2014). The linkage between *SSU1* and the *SO₂* content at the end of the alcoholic fermentation is consistent with its molecular function. Indeed this gene encodes for a sulfite transporter (*Ssu1p*) able to pump out the *SO₂* accumulated in the cytoplasm (Park and Bakalinsky, 2000). The GN inheritance, which reduces the lag phase duration by increasing the *SSU1* expression (Zimmer et al., 2014) also increases the final *SO₂* concentration (this study). Interestingly, in the M2xF15 hybrid the marker XVI_M2xF15_355235 was strongly linked to the marker VIII_M2xF15_6499. These two loci correspond to another translocation event (VIII-t-XVI) involving the gene *SSU1* previously described by Perez Ortin *et al.* (Pérez-Ortín et al., 2002) and present in M2xF15 hybrid (Roncoroni, 2014).

The second common QTL mapped concerns the production of pyruvate and is located on chromosome VIII. This QTL has an important effect explaining 19.6 and 30 % of the total variance of pyruvate production in M2xF15 and SBxGN offspring, respectively. Interestingly, the markers VIII_{SBxGN}_446336 and VIII_{M2xF15}_449469 were located at less than 5 kb of the gene *ENO2* that is directly involved in the pyruvate biosynthesis. Until now, the sequence analysis of the four parental strains do not reveal relevant candidate SNP close to this gene. All together these results suggest that most of the mapped QTLs are background dependent. Moreover, the similar number of QTLs in both progenies demonstrates that the mapping efficiency is no related, neither to the genetic, nor to the phenotypic distances between parental strains. However, balanced contribution are more frequent when the strains are phenotypically similar.

QTLxEnvironment interactions shape the phenotypic variability

The genetic determinism of phenotypic plasticity was then investigated at a genomic scale using the linear model LM3 (see method). For each QTL mapped, the constant genetic effect across environment (G), the GM interaction effect with grape must (GM), as well as the interaction effect with micro-oxygenation (μ -Ox), were estimated by analysis of variance. From this analysis QTLs can be sorted as robust (no interaction) or interactive (significant interactions with GM and/or μ -Ox). The overall *GxE* pattern was shown for both crosses (Fig 7). The less the QTLs interact with GM and μ -Ox, the closer they are from the bottom left corner of the ternary plot. Most of the QTLs (55/77) are quite robust to environmental changes (S6 Table). This is the case of the QTL V_{M2F15}_311505 that is one of the most robust. Indeed, progeny clones with both M2 and F15 inheritance showed parallel norms of reaction for *V50_80*. In contrast, 21 *GxE* interactions were detected and most of them (17) are due to the grape must composition. Interaction are mostly a “scale effect” or specific effect as shown for the inheritance of the marker XVI_{SBxGN}_879639, which has an impact on *t35g* only in unshaken conditions (Fig 7). Few loci have antagonistic effects alike the QTL V_{SBxGN}_161933 that influences the fermentation kinetics *V50_80* according to the grape must. The supplementary file S6 Fig provides a complete overview of *GxE* for the 77 QTL detected in this work.

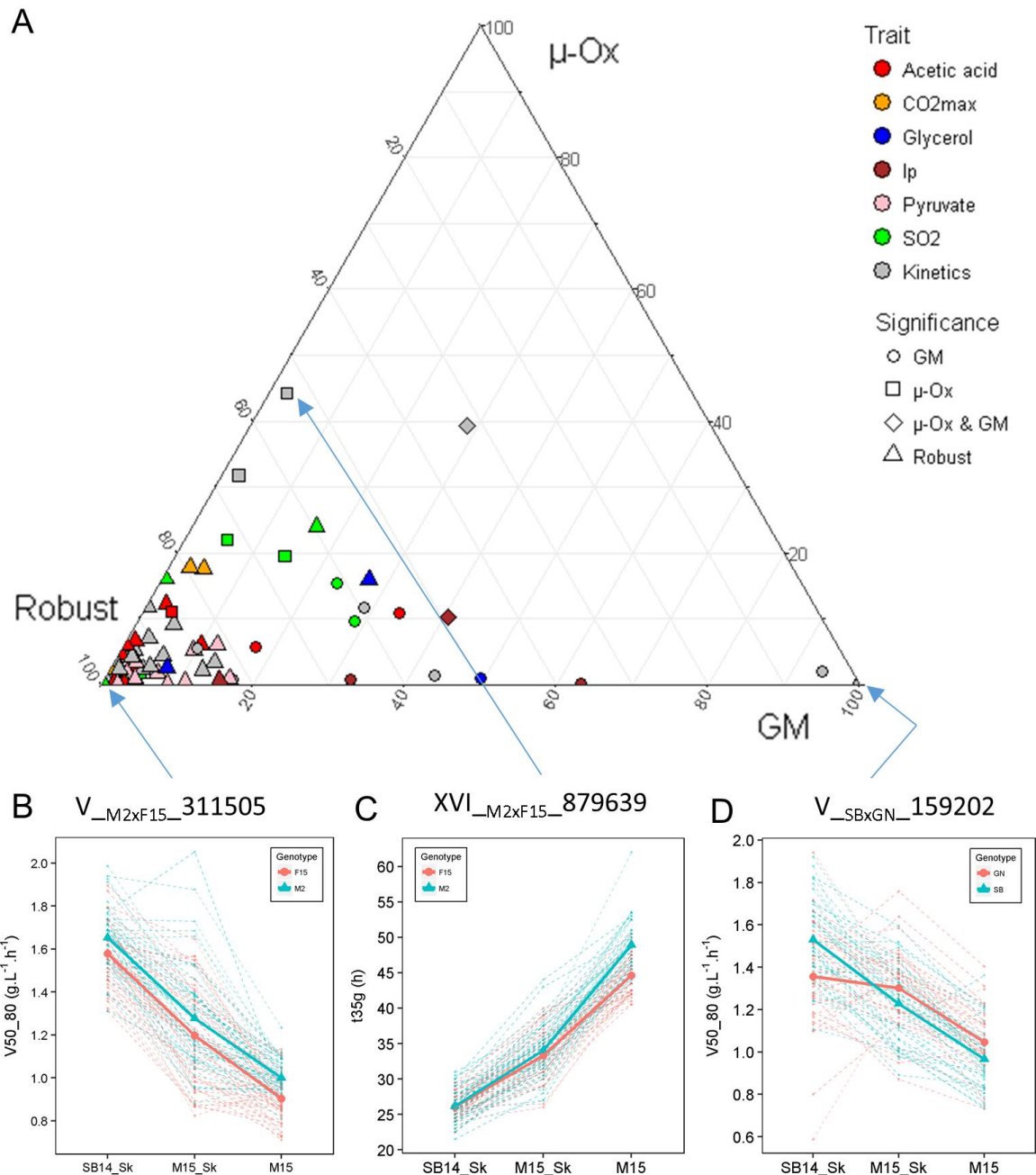


Fig 7 Level of interaction of QTL

Panel A. The ternary plot shows the proportion between genetic effect (G), interaction with grape must (GM) and interaction with micro-oxygenation (μ -Ox) for each QTL. Significance levels were assessed by ANOVA ($\alpha = 0.05$). Panel B. 3 examples of QTL for which extreme levels of interaction were identified (i.e. the less interacting QTL, the most interacting QTL with micro-oxygenation and the most interacting QTL with grape must). Dashed lines show the reaction norm of each segregant according to their allele inheritance. Full lines show average value of the all the segregant according to marker inheritance.

Molecular dissection of GxE interactions

The accuracy of the QTL mapping and the powerful molecular genetics of *Saccharomyces cerevisiae* offer the possibility to bridge the gap existing between QTL and the causative nucleotide variations. Two particular GxE interactions were discussed in this last section. Among the QTLs with environment

interaction, the locus XV_{M2xF15}_26284 interacts with both GM and μ -Ox impacting the fermentation kinetics (S5 Fig, panel A). The inheritance of the F15 allele increases V50_80 only in M15_Sk condition (S5 Fig, panel B). This GxE effect is strong enough to shape a great part of the norm of reaction of M2xF15 offspring. Indeed, k-mean clustering applied to M2xF15 progeny clones defined two non-parallel reaction norms groups. The first one was significantly enriched in strains that inherited the F15 allele and the second one in strains that inherited the M2 allele (CHI2 test, $\alpha < 0.05$) (S5 Fig, panel C). Although the marker was localized in the gene named *HXT11*, an accurate analysis of the parental sequences reveals that the strain F15 doesn't have this gene. Interestingly, many industrial strains have been described to show a deletion of this region (Dunn et al., 2005). A copy number variation (CNV) analysis of this region demonstrates that F15 lacks 5 ORFs (*CSS3*, *ENB1*, *IMA2*, *HXT11*) which are present in the other parent M2 (S5 Fig, panel D). The absence of one of these genes should affect the phenotype.

The second marker was XVI_{SBxGN}_373847 located in the gene *SSU1* that strongly linked three traits (*lp*, *SO₂*, and *V50_80*). Since this QTL was physically linked to the marker XV_{SBxGN}_172951 we concluded that the XV-t-VXI translocation should play a pleiotropic role during the alcoholic fermentation. In addition, this QTL shows important GxE interactions with GM likely due to the difference in *SO₂* effect between red and white grape juices. In order to test if the *SSU1* inheritance has both pleiotropic and GxE effects, we compared the phenotypic response of hemizygous hybrids previously obtained. Those hybrids are isogenic to SBxGN but have only one functional copy of *SSU1*. The allele *SSU1^{SB}* is located in a wild type chromosomal environment (XVI-wt), while the allele *SSU1^{GN}* has a translocated environment that increases its expression due to the *ADH1* promoter vicinity (Zimmer et al., 2014). The phenotypic responses of hemizygous hybrids were measured in the three conditions (S7 Table) and compared to the two groups of SBxGN according to their inheritance for the *SSU1* locus (Fig 8). For each of the traits investigated, the progenies reaction norms and hemizygous hybrid responses are very similar. Both interact significantly with GM and the slope on variation are oriented the same direction. This result demonstrates that the *SSU1* alleles inheritance account for the main part of the non-parallel reaction norm of the SBxGN progeny. Moreover this result demonstrates the pleiotropic effect of the *SSU1* gene that impact the lag phase duration but also unrelated phenotypes such the end-product concentration of *SO₂* and the fermentation kinetics.

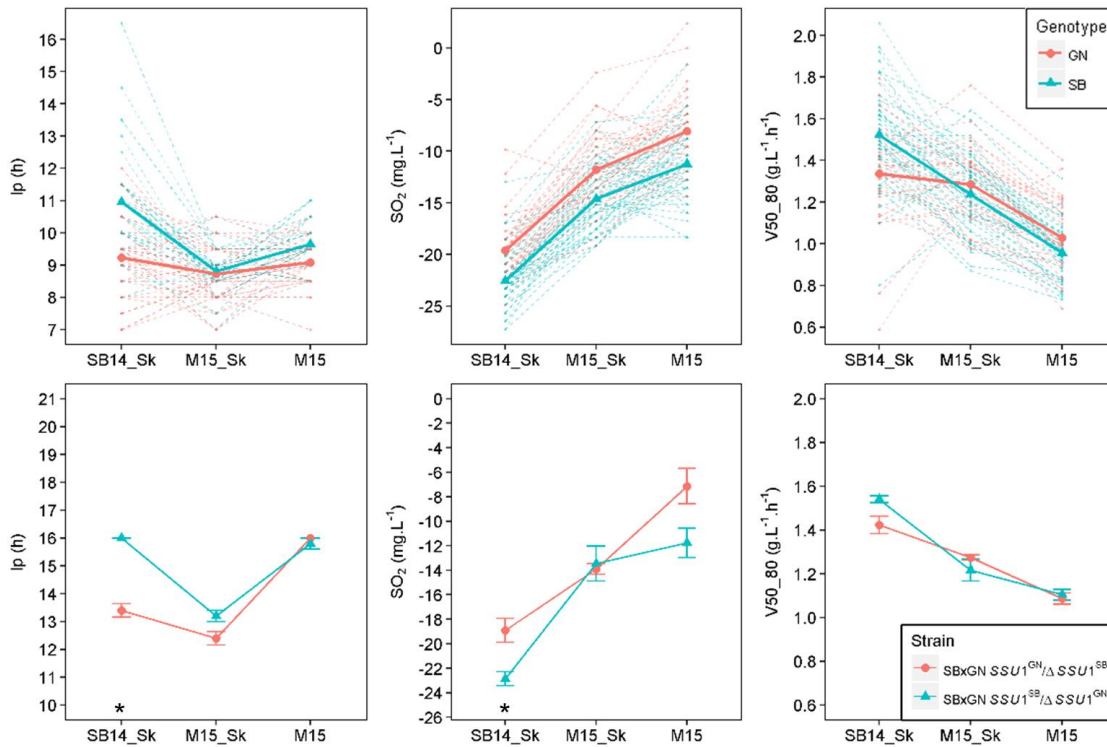


Fig 8 Effect of the XV-t-VXI translocation on phenotypic plasticity

Panel A. The norm of reaction of the segregants that inherited from SB or GN for QTL XVI_{SBxGN}_373847. Dashed lines show the reaction norm of each segregant according to their allele inheritance. Full lines show average value of the all the segregant according to marker inheritance. Panel B. The norm of reaction of the hemizygotes. A star mean significant difference (Wilcoxon, $\alpha = 0.05$).

Discussion

This work aimed to estimate and identify the genetic determinism of phenotypic plasticity. In the last decades, this universal phenomenon move from a marginal interest to a new paradigm shaping the evolution of living species in their biotopes (Nussey et al., 2007; Pigluicci, 2005; West-Eberhard, 1989). Although of great interest, molecular examples of natural genetic variations having a relevant GxE effect are quite scarce (Campitelli et al., 2016; Gerke et al., 2010; Martí-Raga et al., 2017). To challenge this task, we used the species *Saccharomyces cerevisiae* that is a powerful tool for achieving quantitative genetics (Liti and Louis, 2012). In order to find out relevant alleles conferring phenotypic plasticity, this study was carried out in the winemaking context. Therefore, the genetic material used was derived from commercial wine starters and the culture conditions were natural grape juices in order to match as close as possible with enological practices. This choice was also motivated by the possibility to use the QTLs detected in further selection programs using molecular markers as previously described (Dufour et al., 2013; Marullo et al., 2007b; Noble et al., 2015).

Lesson from QTL mapping with divergent wine parental pairs

Before achieving the QTL analysis, we compared the two population progenies demonstrating that the parental pairs are quite divergent. Indeed, in the SBxGN cross the genetic and phenotypic distance of parental strains are much more important than in the M2xF15 one. In yeast breeding, the selection of parents is mostly based on their phenotypic values. Indeed for optimizing numerous traits, the common strategy consists to select parental strains having extreme and opposite phenotypes in order to combine their allelic set in a unique strain (Marullo et al., 2006). This rationale was also adopted by many authors for achieving QTL mapping programs (Ambroset et al., 2011; Brice et al., 2014; Jara et al., 2014; Martí-raga et al., 2017). For the first time, this work compares the efficiency of QTL mapping performed with hybrids resulting from akin and distant yeast strains. Surprisingly, QTL mapping efficiency was similar in both populations since the number of QTL detected as well the part of variance they explained were very similar (Fig 6). Another striking result is the nearly absence of QTL co-localization (only two locus for 77 QTL detected). This result has been previously reported in *S. cerevisiae* where all of the QTL found are context specific (Cubillos et al., 2011). However, in that study the four parental strains used were widely divergent (African or Malaysian forest, sake fermentation (Japan) and European wine). In this present work, we observed similar results with strains derived from the same biotope (wine fermentation) that have been subjected to intensive human selection (commercial starters). This means that most of yeast strains underwent numerous mutations in different loci affecting the same phenotype as previously proposed (Liti and Louis, 2012). This observation was supported by the fact that the phenotypic segregation in both offspring generates phenotypic variabilities overpassing those found in a wide panel of commercial starters. This offers the possibility of improving strains performance by tapping into the natural mutation pool present within the wine strains population. However, they each have a reduced effect, less than 10% of the explained variance which is consistent with the infinitesimal model (Lynch and Walsh, 1998). The use of two divergent populations was then useful for capturing more genetic variability multiplying by two the potential number of natural variation to explore. This also underlines the wide number of mutations in yeast genome that can affect a phenotype. The expressivity (penetrance) of such mutations in different backgrounds should be very low due to underlining epistasis. However, two common QTLs were found suggesting that they could be due to positive selection ongoing as discussed below.

Phenotypic plasticity is the rule and QTL mapping allows capturing its genetic determinism.

In order to detect QTLs that interacts with environment, eleven quantitative traits were measured in three environments. The conditions applied were chosen for reflecting two relevant enological parameters, the nature of grape must (GM) and the micro-oxygenation (μ -Ox) (Peltier et al.). We first characterized the reaction norm of all the strains demonstrating that an important part of variance observed is due to strain x environment interactions (up to 26 %, Table 1). The acetic acid patterns measured for 189 strains (Fig 5) reveal that non-parallel reaction norm are the rule and not the exception. By changing the oxygen input (from 2 mg.L⁻¹.h⁻¹ to 4 mg.L⁻¹.h⁻¹) or by changing the *cépage*, a variability was observed for 96.3 % of the strains with amplitudes that are relevant for wine industry. As for QTL detection efficiency, the hybrid genetic background does not seem to govern those patterns. This original result demonstrates that GxE are important in wine fermentation and required to be better investigated.

The Multi-environment QTL analysis drastically increases the statistical power of QTL detection since most of the QTL (45) were only identified by the multi-environment model confirming the efficiency of this strategy as previously described (Chen et al., 2010; El-Soda et al., 2014; Jiang and Zeng, 1995). Five QTLs were only identified in single-environment model. Rather than original QTLs, these peaks seem to have ambiguous positions that varies greatly between the analyses and cannot be attributed to the same locus with confidence. Indeed, in an extended window of 100 kb, a QTL identified with the Multi-environmental model was found for the same trait. The use of environments makes it possible to evaluate QTL robustness. Here, 72 % of the QTLs are statistically robust against environment. Since the applied conditions are very different from an enological point of view (white vs red grape must, hypoxic vs micro-oxygenation), most of these QTLs should be robust for most of the fermentations and are suitable for achieving selection program assisted by molecular markers. The 28 % remaining QTLs have a significant interaction with the environment. Except two QTLs showing antagonistic effects the interactions detected are due to “scale effect”. This contrasts with the conclusions done by Bhatia et al. (2014) where GxE QTLs detected were antagonistic or specific to one condition. However the various media tested in that work were quite divergent since the yeast growth was measured in either fermentable or non-fermentable carbon sources creating drastic physiological switches. In our study, the conditions applied remain restricted to the fermentation creating fine-grained interactions.

This study allows bridging the gap between non-parallel reaction norms observed and their underlying genetic causes. Some QTLs with significant GxE effects are matching with the strain reaction norms. Among the nine QTLs with significant GxE effects for kinetic traits, two of them (XV_M2xF15_26284 and

XVI_{SBxGN}_371802) have high interaction levels explaining 3.7 % and 5 % of the variance, respectively. Their inheritance shaped a large part of the phenotypic plasticity of the V50_80 in both populations (Fig 8, panel C and S5 Fig, panel B) separating the strains in the distinct reaction norms predicted by the k mean clustering (S2 Fig). When non-parallel reaction norms are more complex like *acetic acid* and *pyruvate*, the few QTLs with significant GxE interactions were not sufficient for explaining the overall phenotypic response observed (Fig 5). However those loci could be helpful for developing breeding programs focusing on specific applications. For example, some strains do not have the appropriate phenotypic response in the presence of micro-oxygenation by not decreasing their acetic acid production (Fig 5). By interacting with μ -Ox, the QTLs V_{SBxGN}_70702 and XIV_{SBxGN}_623501 explain a part of this phenotypic response. The incorporation of their favorable alleles by cross-breeding strategy in commercial strains which show inappropriate response to micro-oxygenation could remedy them. Their additive effect would reduce 66 % of this compounds in micro-oxygenated conditions. However not all the phenotypic response are explained. Indeed, none of the QTL identified for *acetic acid* explains the phenotypic response of strains of cluster GM and μ -Ox that have an increased production of acetic acid in SB14_Sk compared to M15_Sk (Fig 4). Similarly for *pyruvate*, no QTL with interaction has been identified while highly divergent norm of reaction were obtained for this trait. This large number of type of reaction norm should reflect a complex genetic determinism with a high number of interacting loci. The segregation of these factors in less than a hundred individuals would not allow their identification. Therefore, the characterization of the genetic determinism of complex traits such as that of *acetic acid* or *pyruvate* seems to require the study of a larger population

The Ssu1p sulfite pump a protein under balanced selection has pleiotropic effects

Within an evolving population subject to selection, the genetic variations are a mix of three types: (i) rare and deleterious alleles resulting from recent mutational events not yet eliminated by selection; (ii) neutral alleles whose frequencies follow the rules of genetic drift; (iii) alleles with intermediate frequencies that are subjected to different counterbalanced selection pressures (Mackay, 2010; Robertson, 1956; Turelli and Barton, 2004). For this late type of allelic variation, the selection pressure can be balanced because one allele may have favorable or unfavorable effect according to the environments in which it is expressed, meeting the QTLs described by Bhatia et al. (2014) (Bhatia et al., 2014). Otherwise, the selection pressure can be balanced because one allele can have a pleiotropic effect on fitness parameters, affecting positively some traits but negatively other ones creating phenotypic trade-offs. Mutations with balanced effects have already been identified in *Arabidopsis thaliana* for water use efficiency (Campitelli et al., 2016) or delay of germination (Chiang et al., 2011).

They are useful for understanding why particular accessions are better adapted to specific environment. In yeast, pleiotropic genes (*MKT1* or *IRA2*) that affect unrelated traits like temperature resistance (Parts et al., 2011; Steinmetz et al., 2002) or sporulation efficiency (Ben-Ari et al., 2006) were previously described. The effect of the gene *SSU1* in the context of the translocation XV-t-XVI is an interesting case where a single gene can have pleiotropic effects on several phenotypes and different environments.

In *S. cerevisiae*, the sulfite pump *Ssu1p* is required for efficient sulfite efflux (Park and Bakalinsky, 2000). The expression of this transporter can be strongly enhanced by chromosomal translocations that modify the promoter environment of *SSU1*. This enhanced expression confers a higher resistance to the inhibitory effect of SO_2 added to the grape must. Two independent translocations (VIII-t-XVI and XV-t-XVI) have been reported in the literature (Pérez-Ortín et al., 2002; Zimmer et al., 2014), and are hallmarks of adaptation to winemaking practices (Marsit et al., 2017). Both translocations confers an important adaptive advantage respect to indigenous flora by reducing the lag phase duration. However, they are not present in all wine strains and are often present at the heterozygous state (Nardi et al., 2010; Zimmer et al., 2014). In this work, we demonstrated that both translocations impact the final amount of SO_2 and the late fermentation rate. Using hemizygous hybrids previously constructed, we validated the pleiotropic effect of *SSU1* in the SBxGN background (Fig 8). The phenotype of the translocated form is in agreement the expected increase in *SSU1* expression. Therefore, translocated progeny clones leave more SO_2 at the end of fermentation. More startling is the translocation effect on the late fermentation rate (*t80g*, *V80_80*). Indeed, in the SB14_Sk conditions (containing more active sulfite), the translocated strain has a slower end-fermentation rate due to a relative lower viability (data not shown) due by the highest SO_2 concentration still present in the media. This opposed effect of yeast fitness (short lag phase but lower fermentation rate and viability) constitutes a phenotypic trade-off and suggests that *SSU1* is undergone a balanced selection. Despite the great advantage conferred by a short lag phase (more than 20 hours in high sulfite conditions) non-translocated forms of *SSU1* also confers adaptive advantages. Indeed, due to their low SO_2 efflux, the non-translocated allele reduced the toxic effect of SO_2 in the late stage of the fermentation which improve yeast viability. Moreover the effect of translocation on lag phase is much lower in red grape juice (Merlot must) creating environmental conditions that preserve this allele from selective pressure. Pleiotropic genes are likely important levers of the complex architecture of quantitative traits and they have been reported in other living organisms. The gene *SSU1*, with its translocated forms is a good example of pleiotropic gene promoting phenotypic trade-offs conditioned by environmental conditions.

Acknowledgments

The authors thank Justine Pape, Dylan Dos Reis and Elodie Kaminski that helped managing fermentations. We also thank Warren Albertin for kindly giving the R script used for microsatellite analyses.

Materials and methods

Yeast strains and culture media

Strains used in this study belong to the yeast species *Saccharomyces cerevisiae*. The four parental strains (SB, GN, M2, F15) are diploid homothallic monosporic clones derived from wine commercial starters. The strains SB, GN and F15 are derived from VL1, Actiflore BO213, Zymaflore F15 (Laffort, Bordeaux, France), respectively, while M2 is derived from Oenoferm M2 (Lallemand, Blagnac, France). The two populations used to perform QTL mapping were obtained from two F1-hybrids (M2xF15 and SBxGN). The first offspring (95 individuals) was derived from the F1-hybrid M2xF15 generated by Huang *et al.* (2014). The second progeny (94 individuals) was obtained by tetrad dissection of the F1-hybrid SBxGN (formerly named HO-BN by Marullo *et al.* (2007b)). Both progeny clones are homozygous and diploid due to the homothallic nature of all the parental strains. All the strains were grown at 28 °C on YPD medium (1 % yeast extract, 1 % peptone, 2 % glucose), solidified with 2 % agar when required. Sporulation was triggered by plating fresh cell on ACK medium after 3 days at 24 °C. The strains were long term stored in YPD with 50 % of glycerol at -80 °C. Construction of the hemizygotes SBxGN_SSU1^{SB} / ΔSSU1^{GN} and SBxGN_SSU1^{GN} / ΔSSU1^{GB} (formerly named G092G and S092S) has been described by Zimmer *et al.* (2014).

Fermentations

The two grape juices used, Merlot of vintage 2015 (M15) and Sauvignon Blanc of vintage 2014 (SB14), were provided by *Vignobles Ducourt* (Ladaux, France) and stored at -20°C. Before fermentation, grape must were sterilized by membrane filtration (cellulose acetate 0.45 μm Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, France). Their main oenological characteristics are given in Table 1. Sugar content, assimilable nitrogen, pH, total and free SO₂ have been assayed by the enological analysis laboratory (SARCO, Floirac, France). Malic acid have been assayed by enzymatic essay as described by Peltier *et al.* (Peltier et al., 2017).

Grape must	Code	Sugar content (g.L ⁻¹)	Assimilable Nitrogen (mg N.L ⁻¹)	Malic acid (g.L ⁻¹)	pH	total SO ₂ (mg.L ⁻¹)	free SO ₂ (mg.L ⁻¹)	active SO ₂ (mg.L ⁻¹)
Sauvignon Blanc 2014	SB14	194	157	5.6	3.19	34	7	0.32
Merlot 2015	M15	219	99	1.9	3.53	46	33	0.68

Table 2 Grape juice used

Fermentations were carried out as previously described by Peltier *et al.* (Peltier *et al.*, 2017). Briefly, fermentations were run in 10 mL screw vials (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA) with 5 mL of grape must. Hypodermic needles (G 26 – 0.45 x 13 mm, Terumo, Shibuya, Tokyo, Japan) were stuck into the septum for CO₂ release. The fermentation temperature was maintained at 24 °C by an incubator (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany). Two micro-oxygenation conditions were used by applying or not a constant shaking at 175 rpm with an orbital shaker (SSL1, Stuart, Vernon Hills, Illinois, USA) during the overall fermentation. During this study, three fermentation conditions were used: *SB14* with shaking (*SB14_Sk*), *M15* with shaking (*M15_Sk*) and *M15* without shaking (*M15*).

The fermentation time course was estimated by monitoring regularly the weight loss caused by CO₂ release using a precision balance (AB104, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). The amount of CO₂ released according to time was modeled by local polynomial regression fitting with the R-loess function setting the span parameter to 0.45. Seven kinetic parameters were extracted from the model:

lp (h): lag phase time observed before to release the first 2 g.L⁻¹ of CO₂;

t35g, *t50g* and *t80g* (h): time to release the first 35, 50 and 80 g.L⁻¹ of CO₂ with *lp* subtracted;

V50_80 (g.L⁻¹.h⁻¹): average sugar consumption between 50 % and 80 % of *tCO2max*;

CO2max: maximal amount of CO₂ released (g.L⁻¹).

Metabolic compounds

At the end of the fermentation the concentration of four compounds were measured thanks to the metabolomics platform of Bordeaux (<http://metabolome.cgfb.u-bordeaux.fr>) by semi-automatized enzymatic assays (Peltier *et al.*, 2017). Four phenotypes were measured: *acetic acid* (g.L⁻¹), *glycerol* (g.L⁻¹), *pyruvate* (mg.L⁻¹) (that correspond to the final concentration measured in the produced wines) and *SO₂ Yield* (mg.L⁻¹) ($[SO_2]_{final} - [SO_2]_{initial}$).

Each fermentation was carried out two times for the progeny clones and their respective hybrids and 10 times for each parental strain (M2, F15, SB, GN). The entire data set is given in the S2 Table.

Genotyping and marker map construction by high throughput sequencing

The procedure used for genotyping the 94 SBxGN progenies was the same than those published by Marti-Raga *et al.* (2017). Briefly, all the 94 diploids progeny clones were genotyped by whole-genome sequencing at a low coverage (3–6 X). DNA libraries were pooled and sequenced with a MiSeq apparatus using the standard kit v2 (Illumina) generating paired-end reads of 2 x 250 bp. All sequencing data (filtering and mapping) was performed using the available tools at the public Galaxy server (<https://usegalaxy.org>). Sequencing data were treated as single reads. The main parameters of filtering and mapping are: reads trimming (-39 bases), Phred quality cut-off (Q=20), reads mapping (BWA software with default parameters). Once the reads had been mapped, BAM files were extracted and a *pileup* dataset was generated using SAMTools' (Li *et al.*, 2009) for every segregant. The *pileup* dataset was opened in R and SNP between the parental strains was evaluated using an R script (Marti-Raga *et al.*, 2017). To construct the marker map, we retained the markers having a 1:1 segregation among the progeny (Chi-x test, $\alpha > 0.05$) and evenly distributed along the genome (1 marker/15 kb). The final map generated has 3433 markers and was shown in S2 Table. The procedure used for genotyping the 95 M2xF15 progenies is described by Roncoroni (2014).

Microsatellite genotyping

The DNA of *S. cerevisiae* strains to genotype were quickly extracted in 96-wells microplate format using a customized LiAc-SDS protocol (Albertin *et al.*, 2017). Fifteen polymorphic microsatellite loci SCAAT3 (C3, C5, SCYOR267C, C8, C11, SCAAT2, YKL172, SCAAT6, C9, C4, SCAAT5, SCAAT1, C6, YPL009, YKL172W) were used for estimating de genetic relationships within 96 commercial starters and the four monosporic parental strains (GN, SB, M2, F15) used in this work (S3 Table). The genotyping conditions used were broadly those described by Börlin *et al.* (2016). Briefly, two multiplex PCRs allows typing 7 loci were carried out in a final volume of 12.5 μ L containing 6.25 μ L of the Qiagen Multiplex PCR master mix and 1 μ L of DNA template, 1.94 μ L of each mix was added in the mixture using the concentrations indicated in the S9 Table. Both reactions were run with the following program: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 57 °C for 2 min, 72 °C for 1 min, and a final extension at 60 °C for 30 min. The size of PCR products was analyzed by the MWG company (Ebersberg, Germany) using 0.2 μ L of 600 LIZ (GeneScan) as a standard marker. Chromatograms were analyzed with the GeneMarker (V2.4.0, Demo) program.

Data analyses

All the statistical and graphical analyses were carried out using R software (R Development Core Team, 2011).

Estimation of environment, cross and strain effect.

The variation of each trait was estimated by the analysis of variance (ANOVA) using the *aovp* function of the *ImPerm* package in which significance of the results was evaluated by permutation tests instead of normal theory tests.

The *LM1* model estimated the effects of the cross, of the environment and of the cross-by-environment interaction of fermentation traits according to the following formula:

$$y_{ij} = m + C_i + E_j + (C * E)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

where y_{ij} was the value of the trait for cross i ($i = 1, 2$) in environment j ($j = 1, 2, 3$), m was the overall mean, C_i was the cross effect, E_j the environment effect, $(C * E)_{ij}$ was the interaction effect between cross and environment and ϵ_{ijk} the residual error.

The *LM2* model estimated the effects of the strain, of the environment and of the strain-by-environment interaction on fermentation traits according to the following formula:

$$y_{ij} = m + S_i + E_j + (S * E)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

where y_{ij} was the value of the trait for strain i ($i = 1, \dots, 189$) in environment j ($j = 1, 2, 3$), m was the overall mean, S_i was the strain effect, E_j the environment effect, $(S * E)_{ij}$ was the interaction effect between strain and environment and ϵ_{ijk} the residual error.

Estimation of the genetic distances within strains.

The microsatellite dataset was manipulated using the *adegenet* package (Jombart, 2008) implemented on R. The percentage of missing data was 1.6 %. The genetic distance within the strains was estimated using the Bruvo's distance using the *poppr* package (Kamvar et al., 2014). The unrooted dendrogram was built by Neighbor Joining (*ape* package) (Paradis et al., 2004). Since the bootstraps estimated did not allow the resolution of clear groups, the genetic structure was estimated by a k mean clustering using the function *find.cluster* allowing the detection of three main groups. The minimal goodness of fit was selected using comparing AIC, BIC and WSS criteria using default parameters.

Norm of reaction clustering

For each trait the distance between norms of reaction were calculated according to the formula:

$$D_{ij} = \left| 1 - \text{corr} \left(\begin{pmatrix} P1_i \\ P2_i \\ P3_i \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} P1_j \\ P2_j \\ P3_j \end{pmatrix} \right) \right|$$

where D_{ij} was the distance between strains i and j , $P1_i$ and $P1_j$ the phenotypic values measured in *SB14_Sk*, $P2_i$ and $P2_j$ the phenotypic values measured in *M15_Sk* and $P3_i$ and $P3_j$ the phenotypic values measured in *M15* for strains i and j , respectively. The minimal distance (0) was set between norm of reactions with null variances and the maximal distance (1) was set between norm of reaction with a null variance and all the other norm of reactions with a non-null variance. K-means clustering was performed on distance matrix with the *pam* function of the *cluster* package of the R program. Appropriate number of cluster was determined by the best silhouette value between 1 and 10 clusters with the silhouette function of the *cluster* package of the R program.

Estimation of heritability, transgression level and phenotypic distance within segregating population

The *lato sensu* heritability h^2 was estimated for each phenotype according to Marullo *et al.* (Marullo *et al.*, 2006) as follow

$$h^2 = \frac{\sigma P^2 - \sigma E^2}{\sigma P^2}$$

where σP^2 is the variance of progeny population in each environmental conditions, explaining both the genetic and environmental variance of the phenotype measured, whereas σE^2 is the median of the variance of replicates in each environmental conditions, explaining only the environmental fraction of phenotypic variance.

Percentage of transgression was calculated as described in Marullo *et al.* (Marullo *et al.*, 2006). Results were displayed on a heatmap (*heatmap.2* function of the *gplots* package (Warnes, G, 2009)).

QTL mapping

Before linkage analysis phenotypes were normalized by Rank-transformation using the *GenABEL* package (Aulchenko *et al.*, 2007). The QTL mapping analysis was performed with the *R/qtl* package (Broman *et al.*, 2003) on the data collected in the three environmental conditions by using the Haley-Knott regression model and adding the effect of the environment as additive and interactive covariates. For each phenotype, a permutation test of 1000 permutations tested the significance of

the LOD score obtained, and a 5% FDR threshold was fixed for determined the presence of QTL. QTLs identified for the fermentation rate parameters: *t35g t50g t80g V15_50* and *V50_80* being in the same 10 kb windows were considered as unique locus. The QTL position was estimated as the marker position with the highest LOD score among all marker above the threshold in a 30 kb window.

Principal component analysis.

The phenotypic variability of M2xF15 and SBxGN progenies measured in M15 was visualized by a Principal Component Analysis (PCA) using the *ade4*. An additional dataset was added to the projection corresponding to the phenotypic values of 31 commercial strains. This dataset was recently obtained by Peltier *et al.* (Peltier et al.). M15 condition was compared with the only similar condition described in that work (noSk.5_SV). The contribution of each phenotypes to the PCA dimensions and the correlation circle were obtained by the *fviz_contrib* and the *fviz_pca_var* functions of the *factoextra* package (Kassambara A and Mundt F, 2015).

Phenotypic distances were computed by calculating the Euclidian distances within the strains of the same group in each environmental condition and for each trait. For comparing the overall phenotypic distance between the commercial starters (n=31) and each progeny population (n=~100), 1000 random pools of 31 spore clones of each progenies were compared to the commercial dataset by a one way analysis of variance *avovp* function of *ImPerm* package. Tukey's honest significant difference *post hoc* test was used to confirm differences between groups ($\alpha = 0.05$).

Estimation of the level of QTL interaction

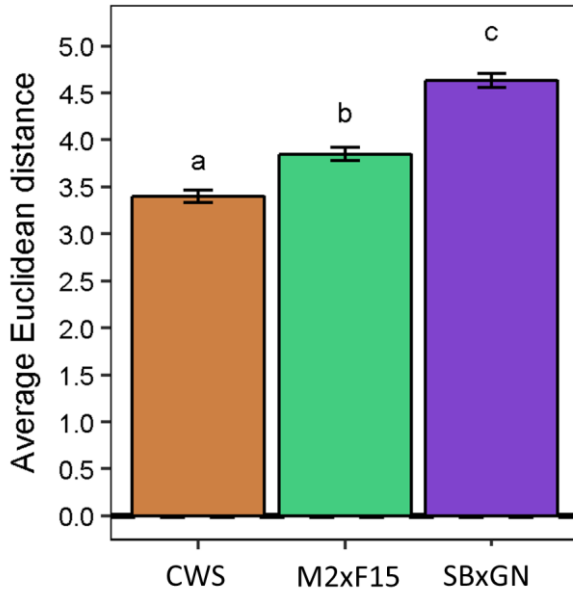
The interaction level of each QTL was estimated by ANOVA using the *avovp* function of the *ImPerm* package. The LM3 model estimated the effects of the cross, of the environment and of the QTL-by-environment interaction on traits according to the following formula:

$$y_{ij} = m + Q_i + E_j + (Q * E)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

where y_{ij} was the value of the trait for allele i ($i = 1, 2$) in environment j ($j = 1, 2$ or $j = 1, 2, 3$), (three combinations of environments were considered: a) SB14_Sk and M15_SK to assess the grape must effect (GM), b) M15_Sk and M15 to assess the micro-oxygenation effect (μ -Ox), c) SB14_Sk, M15_SK and M15 to assess the overall genetic effect), m was the overall mean, Q_i was the QTL effect, E_j the environment effect, $(Q * E)_{ij}$ was the interaction effect between QTL and environment and ϵ_{ijk} the residual error. In order to compare the level of interaction across traits and environment, their % of variation explained was calculated by omitting the total sum square of environment. The ratio between grape must interaction, micro-oxygenation interaction and genetic effect was calculated as the ratio

of the percentage of variation explained by QxE by considering SB14_Sk and M15_SK for grape must interaction, M15_Sk and M15 for micro-oxygenation interaction and the percentage of variation explained by Q in all conditions for the overall genetic effect.

Supporting information

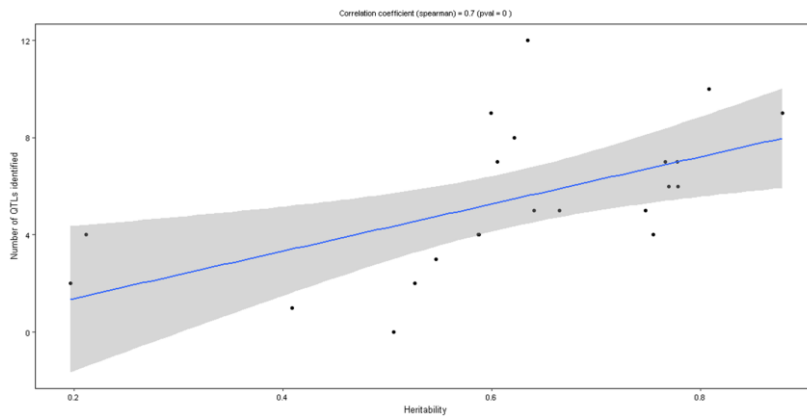


S1 Fig Meiosis emphasizes phenotypic novelty

Average phenotypic distance computed from M15 condition for commercial wine strains (CWS), and the two M2xF15 and SBxGN offspring.

S2 Fig Clustering of Norm of reaction for each trait

Norm of reaction of each individual is shown in dotted line and are colored and faceted according their cluster. Solid line shown the average norm of reaction of each cluster. Number of strains within each cluster is indicated by n.

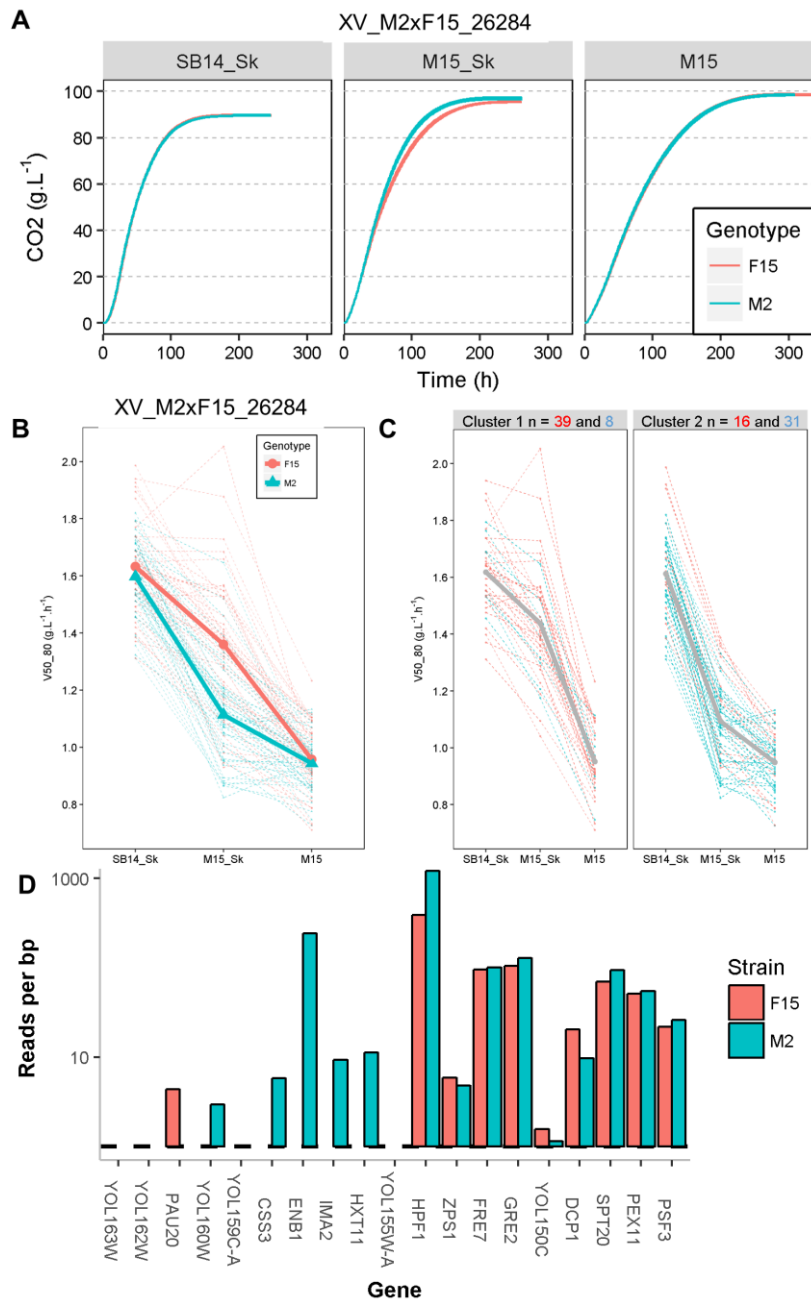


S3 Fig Heritability is correlated to the number of QTLs detected

The data represented are the number of QTLs identified according by cross and by trait according to the average heritability by cross and by trait among the 3 conditions.

S4 Fig Variation of QTL effect according to condition

For each QTL, the values shown are the difference between the phenotypic values measured for all the segregant that inherited the allele of SB or M2 minus those that inherited from GN or F15. A star means a significant difference (Wilcoxon, $\alpha = 0.05$).



S5 Fig Impact of QTL XV_M2xF15_26284 on V50_80

Panel A. The fermentation kinetics of the segregants that inherited the allele of M2 or F15 according to the condition. The thickness of the lines represents the standard error. Panel B. The norm of reaction of the segregants that inherited from M2 or F15 for QTL XV_M2xF15_26284. Dashed lines show the reaction norm of each segregant according to their allele inheritance. Full lines show average value of the all the segregant according to marker inheritance. Panel C. Enrichment of strains having inherited the F15 allele in cluster 2. Norm of reaction of each individual is shown in dotted line and faceted according to their cluster. M2xF15 progeny clones are colored according to their allele inheritance at XV_M2xF15_26284 (red for F15 and blue for M2). A grey solid line shown the average norm of reaction of each cluster. Number of M2xF15 progeny clones within each cluster is indicated by n=; the first number indicate the number of strains from that inherit from M2 and the second one from strain that inherit from F15. A star means a disequilibrium in the theoretical homogeneous distribution 0.5 / 0.5 chis square test, $\alpha = 0.05$). Panel D. Coverage difference between M2 and F15 strains within genomic region of QTL XV_M2xF15_26284.

S1 Table 97 commercial strains used

S2 Table Phenotypic dataset

	CO2max	lp	t35g	t50g	t80g	V50_80	V15_50	SO ₂	Acetic acid	Pyruvate	Glycerol
E	90.7 ***	13.2 ***	77.3 ***	71.2 ***	53.2 ***	53.5 ***	59.4 ***	54 ***	22.2 ***	9.4 ***	55.3 ***
C	0	3.4 ***	0.7 ***	1.2 ***	0.5 ***	0.2 *	3.5 ***	0.1 .	4.2 ***	4.4 ***	0.7 ***
C*E	0	1.2 ***	0.6 ***	0.7 ***	1.3 ***	2.6 ***	2 ***	0.2	0.4 *	0.7 ***	0.2 *
Residuals	9.3	82.3	21.4	26.9	45	43.7	35	45.7	73.2	85.5	43.8

S3 Table LM1 model for the 11 phenotypes with 189 strains and 3 conditions of fermentation

	CO2max (g.L ⁻¹)	lp (h)	t35g (h)	t50g (h)	t80g (h)	V15_50 (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	V50_80 (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	SO ₂ (mg.L ⁻¹)	Acetic acid (g.L ⁻¹)	Pyruvate (mg.L ⁻¹)	Glycerol (g.L ⁻¹)
M15_Sk	95.2	8.2	35.1	51.9	99.2	1.67	1.25	-14	0.19	56	6.85
M15_Sk - SB14_Sk	-6.2 *	+1.7 *	-7.8 *	-10.5 *	-10.2 *	+0.25 *	+0.28 *	-7.5 *	0	-27 *	+0.29 *
M15_Sk - M15	+0.5 *	+0.7 *	+11.5 *	+16.3 *	+28.6 *	-0.36 *	-0.27 *	+4.4 *	+0.09 *	-5	-2.26 *

S4 Table Phenotypic plasticity at the population level

The first line indicates M15_Sk average phenotypic values and the two other indicate the effect of each environmental parameter: difference between M15_Sk and SB14_Sk (grape must effect), difference between M15_Sk and M15 (micro-oxygenation effect). Significant differences are indicated by * (Wilcoxon test pval >0.05).

QTLid	Chr	Pos	Lod.score	Cross	Trait
Chr-1-Pos74327	1	74327	3.59	SBxGN	Glycerol
Chr1-Pos110361	1	110361	4.23	SBxGN	lp
Chr2-Pos103652	2	103652	6.2	SBxGN	t35g
Chr2-Pos103652	2	103652	5.85	SBxGN	t50g
Chr2-Pos103652	2	103652	4.77	SBxGN	t80g
Chr2-Pos103652	2	103652	5.45	SBxGN	V15_50
Chr2-Pos479536	2	479536	4.25	SBxGN	Acetic acid
Chr2-Pos506488	2	506488	8.3	SBxGN	t35g
Chr2-Pos520292	2	518133	5.11	SBxGN	V50_80
Chr2-Pos520292	2	519338	7.43	SBxGN	t80g
Chr2-Pos520292	2	520292	9.59	SBxGN	t50g
Chr2-Pos520292	2	520292	8.97	SBxGN	V15_50
Chr4-Pos349733	4	349733	4.95	M2xF15	Acetic acid
Chr4-Pos360451	4	360451	3.86	SBxGN	SO ₂
Chr4-Pos517957	4	517957	3.71	M2xF15	SO ₂
Chr4-Pos774251	4	774251	3.85	SBxGN	t80g
Chr4-Pos774251	4	774251	3.6	SBxGN	V50_80
Chr4-Pos788058	4	788058	3.86	SBxGN	Pyruvate
Chr4-Pos870274	4	869889	5.98	M2xF15	V50_80
Chr4-Pos870274	4	870274	4.97	M2xF15	t35g
Chr4-Pos870274	4	870274	6.15	M2xF15	t80g
Chr4-Pos870274	4	870274	3.75	M2xF15	V15_50
Chr4-Pos870274	4	871957	6.54	M2xF15	t50g
Chr4-Pos960879	4	960879	4.64	SBxGN	Acetic acid
Chr4-Pos993879	4	993763	5.81	SBxGN	V50_80
Chr4-Pos993879	4	993879	13.19	SBxGN	t35g
Chr4-Pos993879	4	993879	12.07	SBxGN	t50g
Chr4-Pos993879	4	993879	7.29	SBxGN	t80g
Chr4-Pos993879	4	993879	10.39	SBxGN	V15_50
Chr4-Pos1172576	4	1172576	3.74	SBxGN	Pyruvate
Chr4-Pos1426756	4	1426756	3.95	SBxGN	SO ₂
Chr5-Pos72202	5	72202	5.56	SBxGN	Acetic acid
Chr5-Pos129518	5	129518	8.9	SBxGN	lp
Chr5-Pos159202	5	159202	4.93	SBxGN	t80g
Chr5-Pos159202	5	159202	7.01	SBxGN	V50_80
Chr5-Pos203774	5	202961	4.47	M2xF15	t35g
Chr5-Pos203774	5	203774	5.9	M2xF15	t50g
Chr5-Pos203774	5	203774	7.73	M2xF15	t80g
Chr5-Pos203774	5	203774	NA	M2xF15	V50_80
Chr5-Pos203774	5	242505	5.7	M2xF15	V15_50
Chr5-Pos309786	5	309786	6.19	M2xF15	Acetic acid
Chr5-Pos311505	5	310893	8.83	M2xF15	V50_80
Chr5-Pos311505	5	311505	8.33	M2xF15	t50g
Chr5-Pos311505	5	311505	8.19	M2xF15	t80g

QTLid	Chr	Pos	Lod.score	Cross	Trait
Chr5-Pos311505	5	314505	8.17	M2xF15	t35g
Chr5-Pos311505	5	331589	5.23	M2xF15	V15_50
Chr5-Pos434306	5	426900	6.79	M2xF15	t35g
Chr5-Pos434306	5	426900	6.64	M2xF15	t50g
Chr5-Pos434306	5	434306	7.21	M2xF15	t80g
Chr5-Pos434306	5	434306	7.73	M2xF15	V50_80
Chr5-Pos546202	5	546202	4.6	SBxGN	Pyruvate
Chr6-Pos196354	6	196354	3.68	M2xF15	Pyruvate
Chr7-Pos284698	7	284698	6.18	M2xF15	Acetic acid
Chr7-Pos399414	7	399414	4.99	SBxGN	t35g
Chr7-Pos399414	7	399414	5.93	SBxGN	t50g
Chr7-Pos399414	7	399414	5.89	SBxGN	V15_50
Chr-7-Pos406719	7	406719	10.97	SBxGN	Glycerol
Chr7-Pos424652	7	424652	4.52	SBxGN	t80g
Chr7-Pos482446	7	482446	3.92	SBxGN	CO2max
Chr7-Pos522374	7	522374	3.51	SBxGN	CO2max
Chr7-Pos550234	7	550234	3.56	SBxGN	lp
Chr7-Pos613719	7	613719	4.05	SBxGN	CO2max
VIII-T-XVI	8	6499	10.74	M2xF15	lp
VIII-T-XVI	8	13791	13.85	M2xF15	SO ₂
VIII-T-XVI	8	20956	5.24	M2xF15	V15_50
VIII-T-XVI	8	27499	3.92	M2xF15	Acetic acid
Chr8-Pos129499	8	129499	3.72	M2xF15	Acetic acid
Chr8-Pos133739	8	133739	6.88	M2xF15	Pyruvate
Chr8-Pos446336	8	446336	30.39	SBxGN	Pyruvate
Chr8-Pos449469	8	449469	18.45	M2xF15	Pyruvate
Chr8-Pos481335	8	481335	8	SBxGN	Pyruvate
Chr9-Pos33897	9	33897	5.45	M2xF15	Pyruvate
Chr9-Pos153623	9	153623	NA	M2xF15	t35g
Chr9-Pos231897	9	231897	4.21	M2xF15	t35g
Chr10-Pos369220	10	369220	5.37	SBxGN	V15_50
Chr-10-Pos542091	10	542091	5.95	M2xF15	Glycerol
Chr10-Pos664874	10	662321	3.98	M2xF15	SO ₂
Chr10-Pos706779	10	706779	6.52	M2xF15	Acetic acid
Chr-11-Pos377761	11	377761	4.12	M2xF15	Glycerol
Chr12-Pos18491	12	18491	4.43	SBxGN	Pyruvate
Chr12-Pos443030	12	443030	3.88	SBxGN	Pyruvate
Chr12-Pos827756	12	827756	3.69	M2xF15	t80g
Chr13-Pos47304	13	47304	4.01	SBxGN	V15_50
Chr13-Pos115181	13	115181	4.14	M2xF15	SO ₂
Chr13-Pos199880	13	199880	4.07	M2xF15	t35g
Chr13-Pos199880	13	199880	3.86	M2xF15	t50g

QTLid	Chr	Pos	Lod.score	Cross	Trait
Chr13-Pos217882	13	217882	5.78	SBxGN	SO ₂
Chr14-Pos27762	14	27762	3.61	M2xF15	t80g
Chr14-Pos417606	14	417606	5.39	M2xF15	t35g
Chr14-Pos417606	14	417606	7.36	M2xF15	t50g
Chr14-Pos417606	14	417606	7.75	M2xF15	t80g
Chr14-Pos417606	14	417606	4.53	M2xF15	V15_50
Chr14-Pos417606	14	417606	8.14	M2xF15	V50_80
Chr14-Pos623501	14	623501	8.24	SBxGN	Acetic acid
Chr15-Pos26284	15	26284	5.84	M2xF15	V50_80
Chr15-Pos105071	15	105071	3.59	SBxGN	t80g
XV-T-XVI	15	150503	18.1	SBxGN	SO ₂
XV-T-XVI	15	172951	15.63	SBxGN	lp
Chr15-Pos237465	15	237465	7.39	M2xF15	Acetic acid
Chr15-Pos355526	15	355526	4.62	M2xF15	Acetic acid
Chr15-Pos443620	15	443620	9.83	M2xF15	Acetic acid
Chr15-Pos843952	15	843952	3.87	SBxGN	Pyruvate
Chr15-Pos1018951	15	1018951	13.26	SBxGN	Pyruvate
Chr16-Pos203401	16	203401	4.16	M2xF15	SO ₂
Chr16-Pos289235	16	289235	8.26	M2xF15	Acetic acid
VIII-T-XVI	16	350727	13.69	M2xF15	SO ₂
VIII-T-XVI	16	355235	11.49	M2xF15	lp
XV-T-XVI	16	360803	12.04	SBxGN	lp
XV-T-XVI	16	371802	2.67	SBxGN	t80g
XV-T-XVI	16	371802	3.17	SBxGN	V50_80
XV-T-XVI	16	380802	18.85	SBxGN	SO ₂
VIII-T-XVI	16	409256	4.25	M2xF15	Acetic acid
Chr16-Pos482802	16	482802	3.83	SBxGN	t50g
Chr16-Pos756995	16	755802	8	SBxGN	t35g
Chr16-Pos756995	16	756995	9.06	SBxGN	t50g
Chr16-Pos756995	16	756995	9.34	SBxGN	V15_50
Chr16-Pos756995	16	761802	6.24	SBxGN	t80g
Chr16-Pos879639	16	879639	13.07	M2xF15	t35g
Chr16-Pos879639	16	879639	10.18	M2xF15	t50g
Chr16-Pos911802	16	911802	10.55	SBxGN	t35g
Chr16-Pos911802	16	911802	8.19	SBxGN	V15_50
Chr16-Pos911802	16	914802	9.56	SBxGN	t50g
Chr16-Pos911802	16	917802	5.7	SBxGN	t80g

S5 Table List of QTL identified

	Acetic acid	CO2max	Glycerol	Ip	Pyruvate	SO ₂	Kinetics
Robust	12	3	3	1	13	5	19
GM	2	0	1	3	0	2	6
μ-Ox	1	0	0	0	0	2	2
μ-Ox & GM	0	0	0	1	0	0	1

S6 Table Number of QTL and their interaction level

S7 Table Hemizygote dataset

S8 Table Genetic map of SBxGN progeny

5 Résultats complémentaires : Impact de variations génétiques non mendéliennes sur la détection de QTL.

5.1 Présentation du matériel génétique utilisé

Les premiers travaux de cartographie de QTLs au laboratoire ont été réalisés sur un hybride issu des souches SB et GN (Marullo et al., 2007b, 2007a). Cependant la population de descendants utilisés dans ces premières études était issue d'un hybride différent de celui présenté dans l'article 2. Cet hybride isogénique à SBxGN a été construit à partir de la souche GN croisée avec un dérivé haploïde de SB (hoSB). Cet hybride initialement nommé BN sera dénommé hoSBxGN tout au long de cet ouvrage. Dans la souche hoSB, le gène *HO* a été remplacé par la cassette *kanMx4* conférant à la levure un statut hétérothallique, un signe sexuel stable (mat alpha) et une résistance à la drogue G418 (Marullo et al., 2006). Cette résistance associée à une nature haploïde a permis la réalisation de plusieurs cycles de croisement/sporulation générant une population panmictique fortement recombiniée (Marullo, 2005). Après cinq cycles, une dernière sporulation a permis d'isoler 117 clones monosporiques résistants à la G418 et par définition haploïdes. Cette population a été utile à la détection de plusieurs QTLs impliqués dans la production d'acide acétique (Marullo et al., 2007a), la production d'H₂S (Marullo et al., 2007b), la durée de la phase de latence (Zimmer et al., 2014) et plus récemment l'adaptation des souches aux conditions de prise de mousse (Martí-Raga et al., 2017). Les descendants de hoSBxGN et SBxGN ont été génotypés par la même méthode de séquençage à haut débit et possèdent la même carte génétique.

Si les deux descendance partagent le même jeu d'allèles en ségrégation, elles présentent quatre différences non mendéliennes au sens où celles-ci ne ségrégent pas dans les deux sous populations. Les deux premières différences sont le niveau de ploïdie et la présence de la cassette *kanMx4*. Elles sont liées à la stratégie de construction des hybrides. La descendance de SBxGN est diploïde (2n) et homothallique (HO) tandis que celle de hoSBxGN est haploïde (n) et sexuée (ho::*kanMx4*). Deux autres différences plus inattendues ont pu être mises en évidence. En effet, les deux hybrides se distinguent par la nature de leur ADN mitochondrial et par la présence d'évènements de recombinaison mitotiques indépendants qui ont été transmis à l'intégralité de leurs descendance respectives. L'ensemble de ces évènements génétiques non mendéliens a des répercussions importantes sur la détection des QTLs bien que les cartes génétiques des populations soient parfaitement identiques. Cette question ne faisant pas partie des priorités de la thèse nous n'avons pu étudier que 68 individus du croisement hoSBxGN (2 répétitions). Cependant la mesure des phénotypes a été réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'Article 2 ce qui permet une comparaison fiable des deux sous populations.

5.2 La mitochondrie a-t-elle un effet sur la cinétique fermentaire ?

5.2.1 Rappel de la transmission de l'hérédité mitochondriale de *S. cerevisiae*

L'ADN mitochondrial (ADN-mt) est une molécule circulaire d'environ 85 kb codant plusieurs gènes indispensables à la respiration. Chez *S. cerevisiae*, entre 30 et 100 copies du génome mitochondrial sont présentes par cellule (Dujon, 1981). Lors d'un croisement, chacune des souches parentales apporte au zygote ses mitochondries contenant les génomes mitochondriaux respectifs (on parle de mitotypes). Le génome mitochondrial est très polymorphe (Burton et al., 2007; Johnson et al., 2003) ; lorsque deux souches ayant des mitotypes différents se croisent le génome mitochondrial de l'hybride devient homogène après plusieurs mitoses successives (moins d'une vingtaine de générations) (Dujon, 1981; Solieri, 2010). Cette séquence d'homogénéisation conduit à des hybrides dits homoplasmiques qui possèdent le mitotype d'un des deux parents. Cependant, avant l'homogénéisation complète, des événements de recombinaison et de conversion génique entre les deux mitotypes parentaux peuvent avoir lieu (Nunnari et al., 1997). Dans ce cas, le génome mitochondrial issu de la séquence d'homogénéisation peut être différents des génomes mitochondriaux parentaux.

5.2.2 Cas des hybrides hoSBxGN et SBxGN

De récents travaux de séquençage ont démontrés que hoSBxGN et SBxGN ont hérité de génomes mitochondriaux différents. L'hybride hoSBxGN possède un ADN-mt très proche de la souche GN (noté [rho^{GN}]) tandis que l'hybride SBxGN possède un ADN-mt recombiné [rho^{rec}]. Récemment, la purification de la molécule d'ADN-mt de l'hybride SBxGN a permis son séquençage par la technologie MinION (Oxford nanopore). Les premières analyses délivrent des *reads* de 85 kb permettant de reconstituer la séquence complète du génome [rho^{rec}] (Sharma *et al.* en préparation). L'hybride SBxGN a principalement hérité du mitotype GN mais présente au moins deux fragments provenant du mitotype SB. L'un deux contient l'intégralité du gène *COB1* (Fig 22). Notons que des variations génétiques potentiellement délétères sont retrouvées dans l'allèle SB de ce gène (résultats non montrés). Ces deux mitotypes différents possédés par les hybrides ont été transmis aux descendance respectives. La population hoSBxGN a donc le mitotype [rho^{GN}] tandis que celle SBxGN a le mitotype [rho^{rec}]. Ils se distinguent principalement pour leur séquence du gène *COB1*.

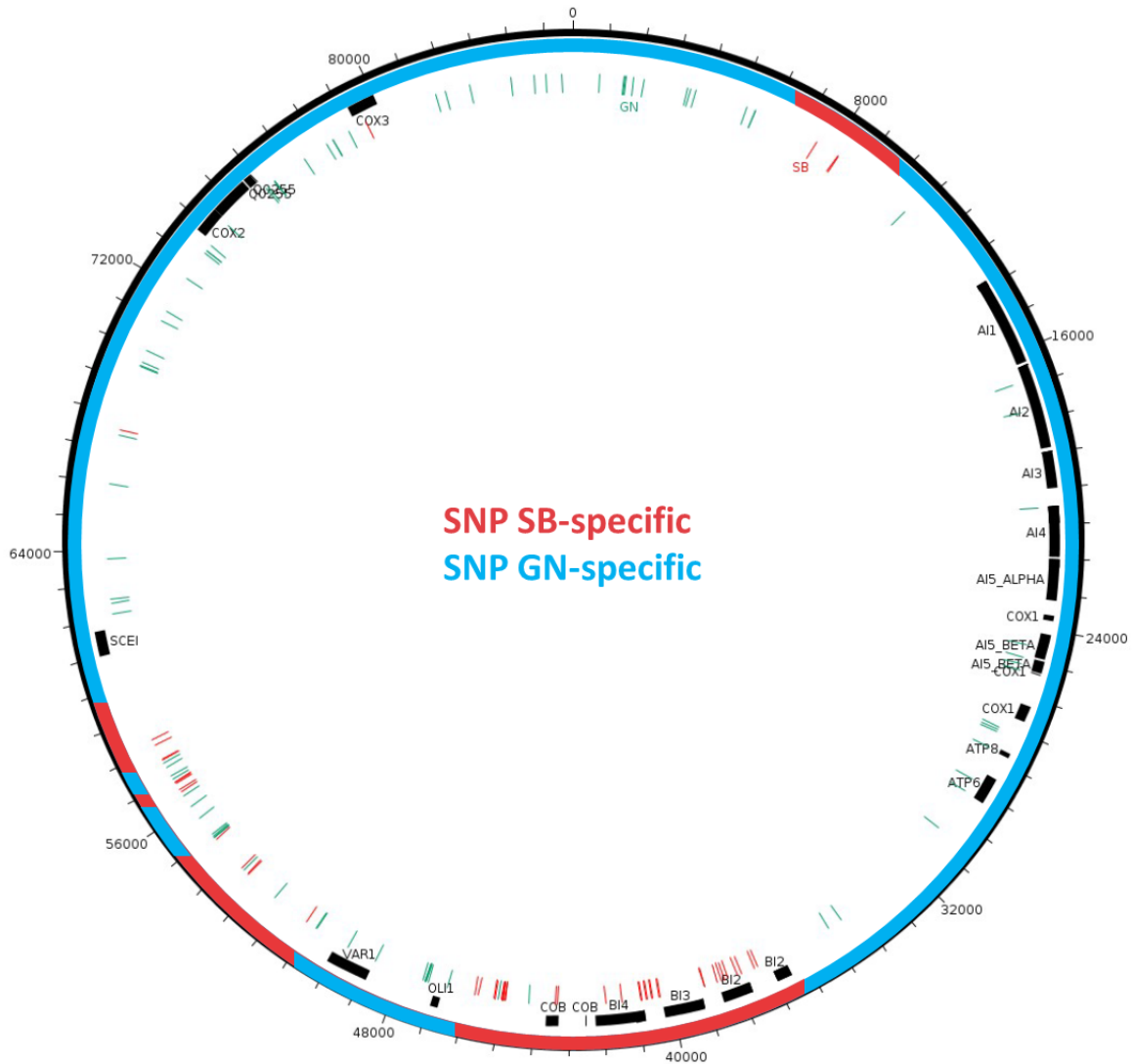


Fig 22 Carte génétique de la mitochondrie de SBxGN

Carte génétique de la mitochondrie de l'hybride SBxGN. Le génome présenté a été reconstruit par assemblage *de novo* en utilisant des *reads* longs obtenu par la technologie Oxford Minion. Les SNPs spécifiques aux génomes mitochondriaux des souches SB et GN sont indiqués le long du génome ils ont été obtenus par séquençage Illumina (Sharma *et al.* en préparation).

5.2.3 Effet de la mitochondrie sur les performances fermentaires de *S. cerevisiae*

Au sein du genre *Saccharomyces*, le génome mitochondrial a un effet fort sur les performances technologiques des souches pour des traits liés au métabolisme respiratoire (Albertin *et al.*, 2013; Picazo *et al.*, 2015). En revanche, jusqu'ici aucun effet de l'ADN-mt sur les traits fermentaires n'a été

établi. Dans ce travail nous montrons que l'hérédité mitochondriale peut avoir un effet conséquent sur des phénotypes fermentaires.

5.3 Impact du génome mitochondrial sur la cinétique fermentaire

La nature recombinée de SBxGN a été précédemment identifiée et son hérédité suggère un impact possible sur des phénotypes fermentaires (Marullo et al., 2007b). Pour valider cette hypothèse plusieurs hybrides entre SB et GN ont été générés afin de tester la transmission des mitotypes parentaux (Philippe Marullo, communication personnelle). Après plus de 80 générations permettant une restauration de l'homoplasme, l'hérédité mitochondriale de 48 hybrides indépendants a été testée par qPCR en utilisant deux marqueurs génétiques qui discriminent les allèles parentaux de *COB1* et de *COX2*. Ces résultats obtenus montrent que pour ce fonds génétique, la recombinaison mitochondriale n'est pas un évènement rare (Tableau 2). En effet, le mitotype recombiné [rho^{rec}] ($\text{COB1}^{\text{SB}}, \text{COX2}^{\text{GN}}$) a une fréquence d'apparition de 23 % sur 4 mitotypes possibles. Le mitotype inverse [rho^{rec1}] ($\text{COB1}^{\text{GN}}, \text{COX2}^{\text{SB}}$) est également détecté mais aucun hybride ne conserve cette combinaison après 80 générations ce qui suggère une possible incompatibilité génétique.

Mitotype	génotype	All hybrids (nb)	Homogenous (nb)	Stable (%)	Petites
[rho^{GN}]	$\text{COB1}^{\text{GN}}, \text{COX2}^{\text{GN}}$	19	12	63,2	1/19
[rho^{SB}]	$\text{COB1}^{\text{SB}}, \text{COX2}^{\text{SB}}$	8	7	87,5	0/8
[rho^{rec}]	$\text{COB1}^{\text{SB}}, \text{COX2}^{\text{GN}}$	11	4	36,3	0/11
[rho^{rec1}]	$\text{COB1}^{\text{GN}}, \text{COX2}^{\text{SB}}$	5	0	0	1/5
[rho^{GN}] + [rho^{SB}]	heteroplasmic	3	0	0	3/3

Tableau 2 Évaluation des recombinaisons mitochondriales sur 48 hybrides isogéniques

Grâce à ce nouveau matériel génétique, nous avons testé l'impact de l'ADN-mt sur des paramètres fermentaires dans un contexte isogénique. Les deux mitotypes parentaux [rho^{GN}] et [rho^{SB}] sont comparés à deux autres hybrides présentant le mitotype recombiné [rho^{rec}]. L'un d'eux est le clone SBxGN utilisé pour la cartographie QTL.

Les fermentations ont été réalisées dans du moût SB14 en faisant varier les conditions de micro-oxygénation selon les codes décrit dans l'Article 1 (p 54) : Sk.3_SV, Sk.5_SV et noSk.5_SV. Aucun effet significatif sur la concentration des composés métaboliques n'a été identifié. En revanche, un effet net du mitotype est observé sur la cinétique fermentaire notamment sur le *t80g* (Fig 23). Les hybrides porteurs des mitotypes [rho^{rec}] sont plus lents que ceux porteurs des mitotypes parentaux [rho^{GN}] et [rho^{SB}]. Ces résultats montrent pour la première fois l'impact de la mitochondrie sur la cinétique fermentaire d'une souche. Cette observation n'ayant jamais été faite dans le passé il est possible que

ce phénotype soit causé par une ou plusieurs combinaisons délétères se retrouvant dans l'ADN-mt recombiné. Cette hypothèse est renforcée par l'absence de différences entre les hybrides portant les mitotypes parentaux. Cette différence génétique non mendélienne majeure sera utile pour éclairer les résultats surprenants que nous allons présenter par la suite.

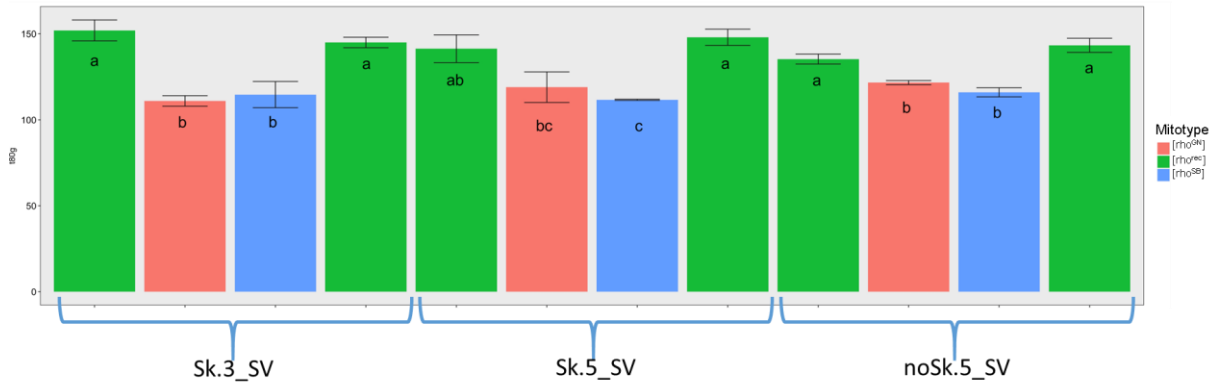


Fig 23 Les souches avec le mitotype $[\rho^{rec}]$ ont une vitesse de fermentation plus lente. Les valeurs représentées sont la moyenne de 3 répétitions. Les barres d'erreur représentent l'erreur type et des lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey HSD, $\alpha = 0.05$).

5.4 Evènements de recombinaison indépendants entre les 2 hybrides

Mise à part l'hérédité mitochondriale, deux hybrides indépendants peuvent présenter des réarrangements chromosomiques tels que des conversions géniques, des translocations, des duplications segmentielles, ou des aneuploïdies. Les génomes de hoSBxGN et SBxGN sont très similaires et ne présentent pas après analyse détaillées de réarrangements chromosomiques majeurs (Sharma *et al.* communication personnelle). En revanche, les cartes génétiques des deux descendances portent la marque d'évènements de recombinaisons mitotiques ayant eu lieu chez l'hybride SBxGN. La Fig 24 montre le pourcentage de recombinaison entre les paires adjacentes de marqueurs le long de la carte génétique pour les descendants de hoSBxGN et de SBxGN. Le pourcentage de recombinaison moyen est significativement différent entre les deux croisements : 12,2 % pour hoSBxGN et 8,3 % pour SBxGN (wilcoxon, $pval < 0.05$). Ce résultat est dû aux cycles de croisements panmixtiques mis en œuvre lors de la construction de hoSBxGN. Mise à part cette différence, les cartes génétiques diffèrent au niveau de cinq paires de marqueurs indiquées par des flèches sur la Fig 24. Pour ces positions, la descendance de SBxGN présente un pourcentage de recombinaison très élevé, autour de 80 %, alors

que la descendance de hoSBxGN possède les valeurs moyennes attendues pour ces distances physiques, autour de 15 % (Tableau 3).

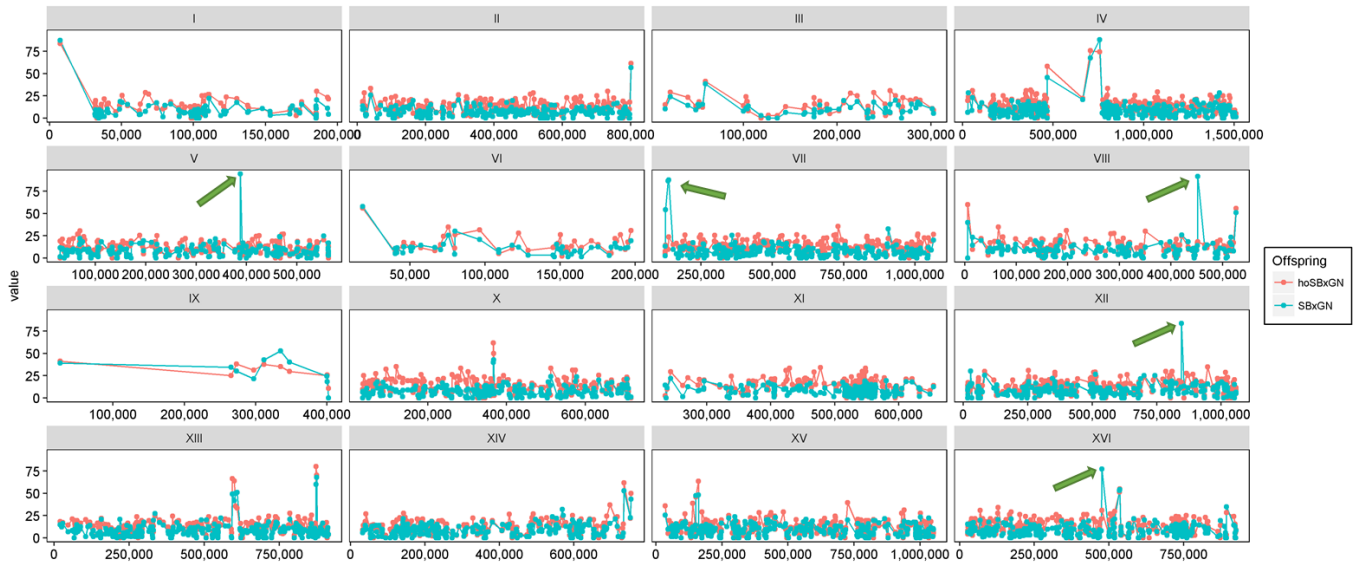


Fig 24 L'hybride SBxGN a subi des évènements de recombinaison
 Pourcentage de recombinaison entre chaque paire de marqueurs adjacents le long du génome.

Marqueur 1	Marqueur 2	Rec_hoSBxGN	Rec_SBxGN	%rec/kb	%rec/kb
V_388012	V_391256	8,3	94,4	2,6	29,1
VII_134419	VII_136768	9,8	86,5	4,2	36,8
VIII_452058	VIII_465492	18,4	91,8	1,4	6,8
XII_845346	XII_855661	17,5	83,6	1,7	8,1
XVI_476932	XVI_500069	30,8	77,3	1,3	3,3

Tableau 3 Différences entre hoSBxGN et SBxGN

Par définition le pourcentage de recombinaison de deux marqueurs non liés génétiquement doit être de 50 %. Une valeur largement supérieure signifie que la configuration recombinée est majoritaire dans la descendance. Cela peut être expliqué par un événement de translocation réciproque entre les deux brins d'un même chromosome. Si ce type d'événement survient au cours de la mitose, il modifie les haplotypes parentaux. Ces inversions d'haplotypes sont transmises à l'ensemble de la descendance et peuvent être détectée au sein de la descendance (Fig 25). Les raisons expliquant pourquoi ce type de réarrangement n'est détecté que dans l'hybride hoSBxGN sont difficiles à établir. Ces cinq inversions constituent néanmoins des différences génétiques non mendéliennes entre les deux croisements.

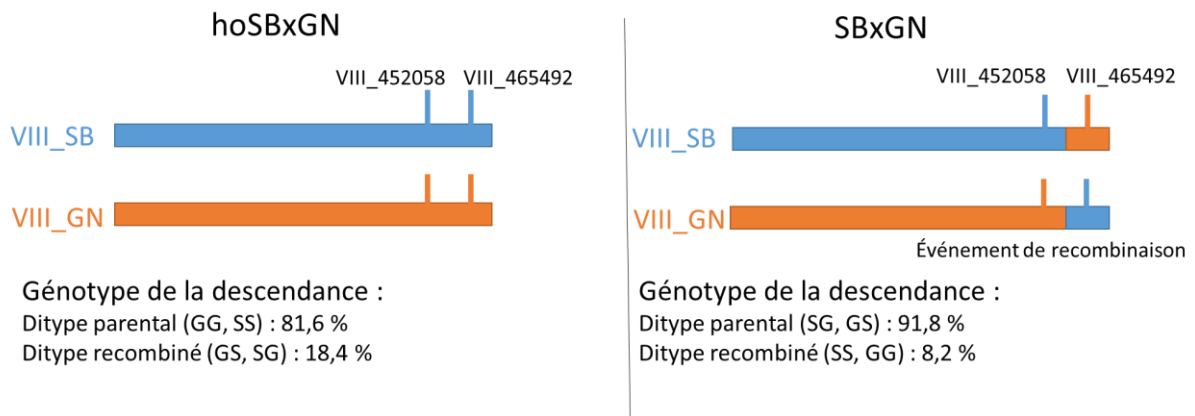


Fig 25 Représentation schématique de l'évènement de recombinaison entre les marqueurs VIII_452058 et VIII_465492.

5.5 Impact de facteurs non mendéliens sur l'héritabilité de caractères complexes

5.5.1 Différences phénotypiques entre les deux descendance

La comparaison des valeurs phénotypiques moyennes des deux descendance montre des différences significatives sur l'ensemble des traits mesurés (Tableau 4). Les différences les plus importantes concernent la production de pyruvate et de glycérol. La Fig 26 montre en exemple la différence de production de pyruvate entre les deux populations. Une différence est notamment obtenue pour la cinétique de fermentation. En effet, le paramètre *t80g* (temps pour produire 80 % du CO₂ attendu) est plus faible chez la descendance hoSBxGN que chez celle de SBxGN. Ce dernier résultat peut-être expliqué par la différence de mitotypes entre les deux sous-populations. Cependant il peut aussi être expliqué par la différence de ploïdie des ségrégants. En effet, plusieurs études ont montrés que la taille des cellules (en lien directe avec la ploïdie) influence la cinétique de la fermentation alcoolique pour des souches isogéniques (Marullo et al., 2006; Salmon, 1997) ou pour des souches non apparentées (Albertin et al., 2011). De son côté, la comparaison de souches ayant la même ploïdie avec des mitotypes différents suggère que l'hérédité mitochondriale doit avoir un impact non négligeable (Fig 23, p 133).

Croisement	Milieu	Acetic acid	CO2max	Glycerol	Ip	Pyruvate	SO ₂	t35g	t50g	t80g	V15_50	V50_80
SBxGN	SB14_SK	0,16 c	89,3 d	7,36 a	10,05 b	34 c	-21,3 d	28,5 e	43,7 d	93,8 d	1,82 b	1,44 b
hoSBxGN	SB14_SK	0,19 bc	88 e	6,73 b	11,03 a	21 d	-19,1 c	26,5 f	39,9 e	84,6 e	1,92 a	1,65 a
SBxGN	M15_Sk	0,17 c	95,2 a	6,97 b	8,82 d	68 a	-13,4 b	36,6 c	54,2 c	101,2 c	1,57 d	1,26 c
hoSBxGN	M15_Sk	0,2 b	93,6 c	5,87 c	8,24 d	28 cd	-12,8 b	34,6 d	51,9 c	98 cd	1,63 c	1,27 c
SBxGN	M15	0,27 a	94,4 b	4,65 d	9,37 c	57 b	-9,8 a	46,5 b	68 b	126,2 b	1,32 e	1 d
hoSBxGN	M15	0,29 a	93,4 c	4,43 d	9,47 bc	28 cd	-9 a	48,3 a	71,1 a	135,7 a	1,25 f	0,89 e

Tableau 4 Différence phénotypique entre les deux descendance

Comparaison entre la moyenne phénotypique des descendants de SBxGN et hoSBxGN (respectivement 68 et 94 descendants). Des lettres différentes indiquent une différence significative (Tukey, $\alpha = 0.05$).

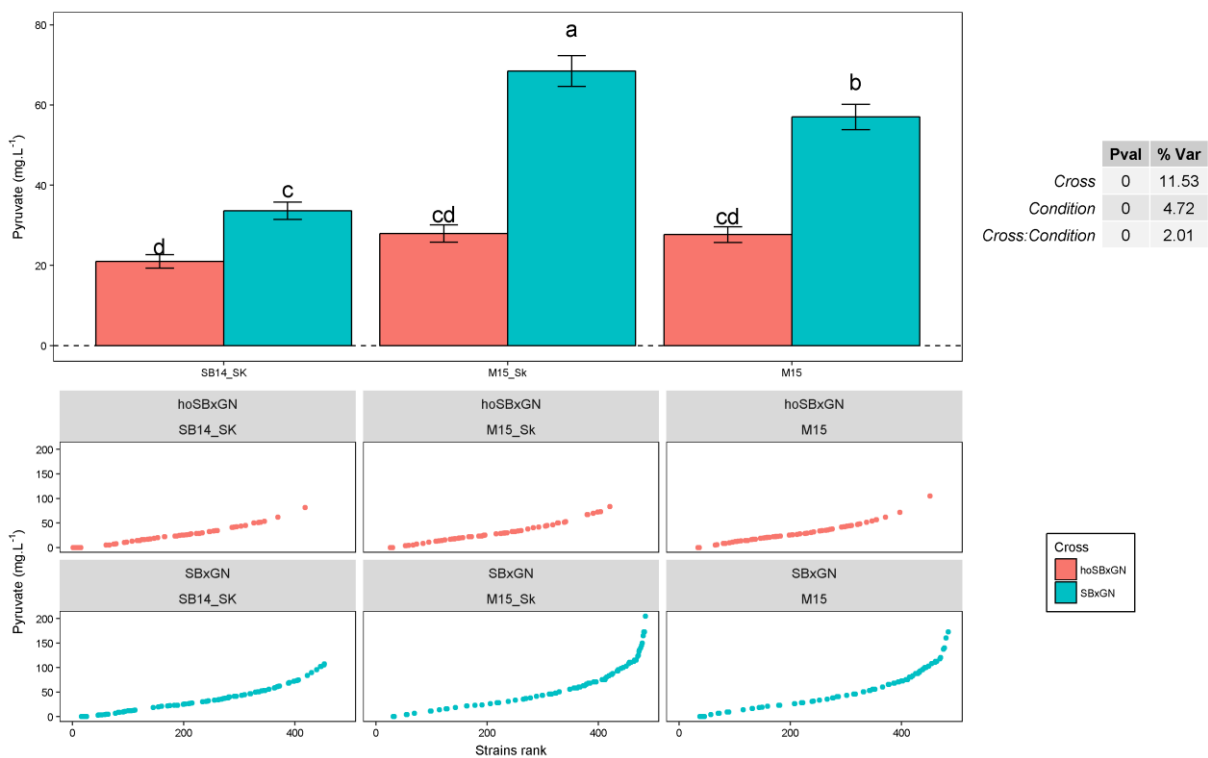


Fig 26 Différence de production de pyruvate entre les deux descendance

Le diagramme en barre montre les valeurs phénotypiques moyennes obtenues pour les 68 et 94 ségréants de hoSBxGN et de SBxGN dans chaque environnement. La barre d'erreur indique l'erreur type. Des lettres différentes indiquent une différence significative (test de tukey HSD, $\alpha = 0.05$). Les figures en-dessous illustrent la distribution de la production de pyruvate en fonction du croisement et de l'environnement. Chaque point représente une souche et elles sont classées sur l'axe des abscisses en fonction du rang de leur valeur phénotypique.

5.6 Le paramètre « croisement », un microenvironnement génétique qui influence la détection de QTL.

Une cartographie de QTL a été réalisée en utilisant les données des 162 individus partageant exactement la même carte génétique. Elle a été conduite en suivant la même méthode que celle détaillée dans le matériel et méthode de l'Article 2. Dans ce cas précis, nous avons deux paramètres environnementaux. Un paramètre « Environnement » regroupant les trois conditions utilisées (SB14_Sk, M15_Sk, et M15) et un « croisement » défini par le fonds génétique (SBxGN ou hoSBxGN).

Les niveaux d'interaction des QTLs avec ces deux facteurs sont évalués avec le modèle ci-dessous :

$$y_{ijk} = m + G_i + C_j + E_k + (G * C)_{ij} + (G * E)_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

où y_{ijk} est la valeur moyenne mesurée pour le génotype i ($i = \text{GN}$ ou SB) dans le croisement j ($j = \text{hoSBxGN}$ ou SBxGN) dans l'environnement k ($k = \text{SB14_Sk}$, M15_Sk ou M15), m la valeur moyenne mesurée pour ce trait, G_i l'effet génotype, C_j l'effet croisement, E_k l'effet environnement, $(G * C)_{ij}$ l'effet de l'interaction entre le génotype et le croisement et $(G * E)_{ik}$ l'effet de l'interaction entre le génotype et l'environnement.

L'intégration du facteur croisement permet d'estimer la variation de l'effet des QTLs en fonction des quatre événements non mendéliens qui distinguent les deux populations : le mitotype, la ploïdie, les cinq réarrangements chromosomiques, et le *kanMx4*. Malheureusement le modèle ne permet pas de distinguer si des effets d'interactions détectés sont liés à l'action simple ou combinée de ces 4 facteurs.

Ce jeu de donnée permet la détection de 96 QTLs (Fig 27). Ce nombre plus important que celui rapporté dans l'Article 2 pour la seule population SBxGN (41 QTLs) est lié à la taille plus importante de la population qui augmente le pouvoir de détection (Lander and Botstein, 1989).

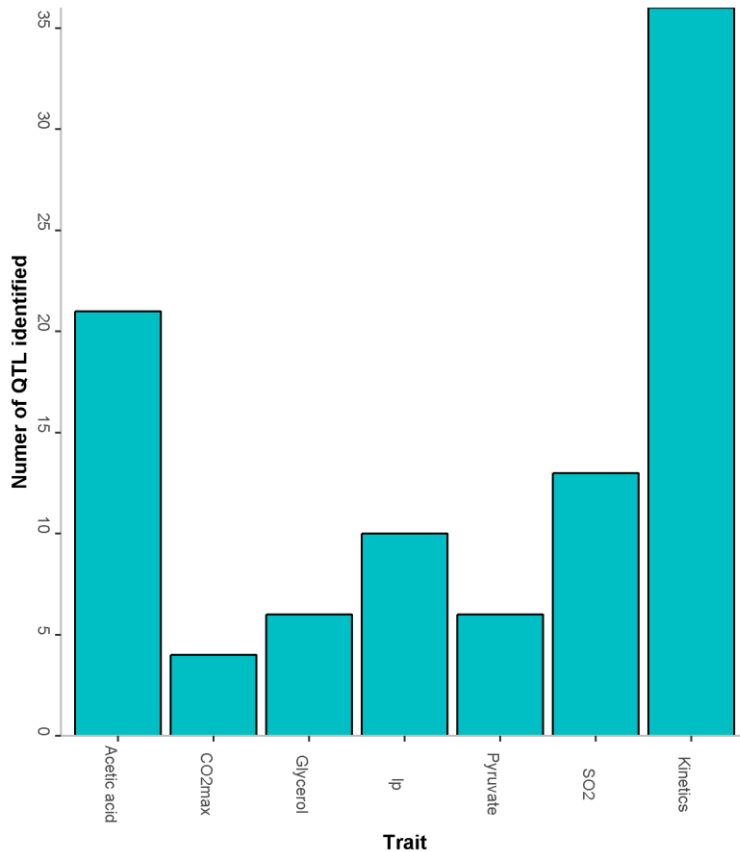


Fig 27 Nombre de QTLs identifiés

Nombre de QTLs identifiés avec les données des descendance de hoSBxGN et SBxGN dans les trois conditions SB14_Sk, M15_Sk et M15.

Le profil d'interaction de chaque QTLs est représenté sur la Fig 28. Les QTLs qui interagissent peu sont situés à gauche du diagramme ternaire. Ceux qui interagissent avec l'environnement (tous milieux confondus) sont situés à droite du diagramme et ceux qui interagissent avec le croisement se situent dans le coin supérieur. Cette première analyse indique que seulement 36 % des QTLs n'ont aucune interaction significative avec le croisement ou l'environnement. De manière surprenante la part de QTLs qui interagissent significativement avec l'environnement est réduite à 6 % alors qu'elle est de 58 % pour ceux qui interagissent avec le croisement. Les QTLs qui conservent une interaction stable avec l'environnement dans les deux croisements sont rares. Le niveau important d'interaction GxC masque les autres interactions GxE précédemment détectée. C'est le cas par exemple pour le QTL V_143683 (Fig 28) dont l'effet a une forte interaction avec le moût dans la descendance de SBxGN mais aucune interaction dans la descendance de hoSBxGN. Les QTLs avec un niveau d'interaction stable en fonction de la descendance sont principalement identifiés pour la phase de latence (4/6). Ces derniers ont le même profil avec un effet fort en Sauvignon Blanc et peu d'effet dans les deux autres conditions. C'est le cas du QTL de la translocation XV-t-XVI lié à *SSU1* dont la dissection moléculaire est rapportée dans

l'Article 2. Ce résultat surprenant souligne que de très nombreux QTL identifiés n'ont pas exactement la même expressivité en fonction du fonds génétique. C'est le cas du QTL XVI_794802 (Fig 28). Le ratio des trois effets G, GxC et GxE par trait montre que l'effet G explique en moyenne 50 % de l'effet des QTLs, le GxC 40 % et le GxE 10 % (Fig 29).

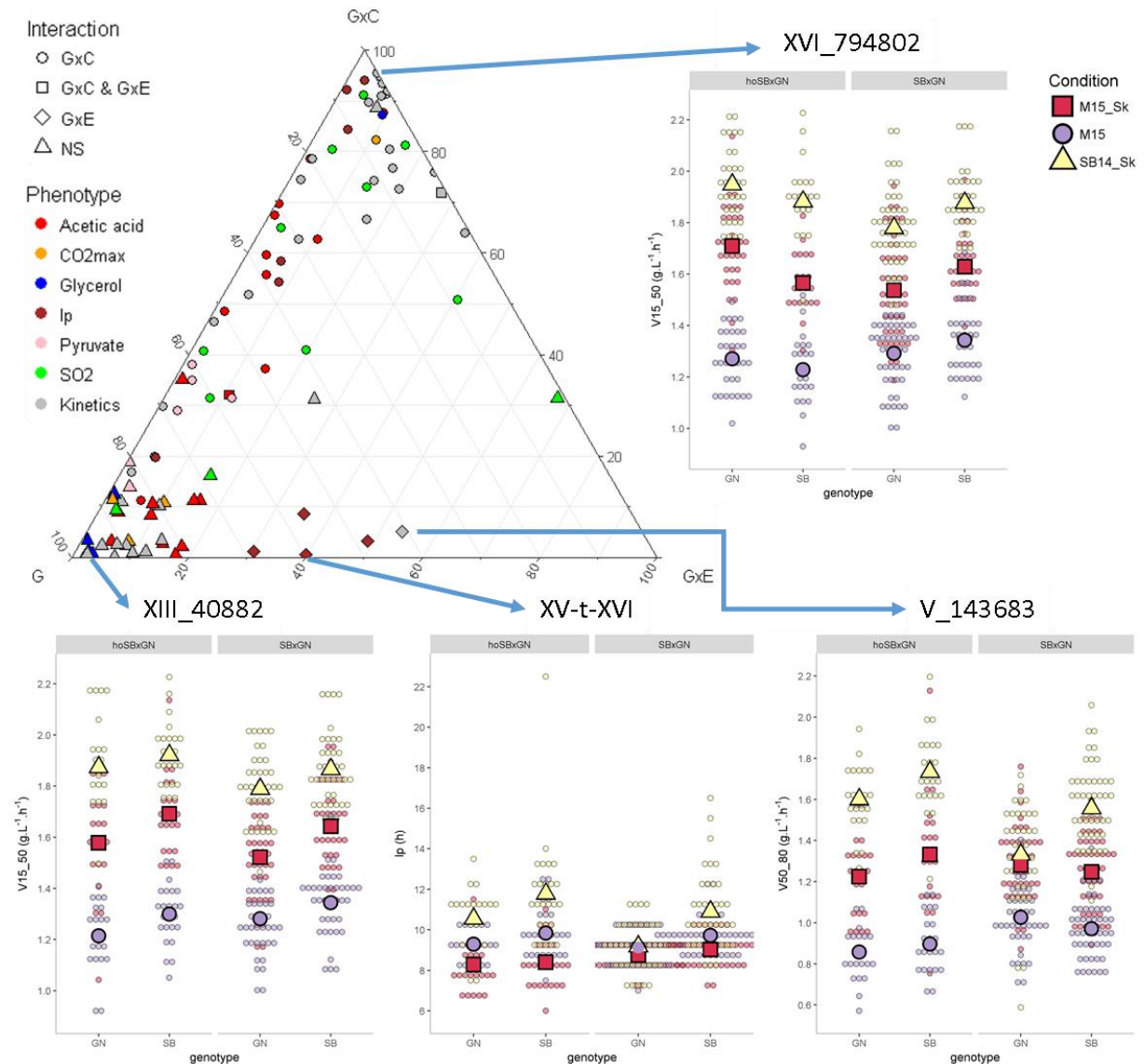


Fig 28 Profil d'interaction des QTLs

Chaque point dans le diagramme ternaire représente un QTL. Il est situé en fonction du ratio entre son effet génétique simple (G), son interaction avec l'environnement (GxE) et son interaction avec le croisement (GxC). Chaque point est coloré en fonction du phénotype pour lequel il a été identifié et a une forme en fonction de la significativité de ses interactions. Des exemples de QTLs aux profils extrêmes sont indiqués. Pour cela les effets des QTLs en fonction du croisement et en fonction de la condition sont représentés. Chaque point correspond à la valeur phénotypique d'un individu et la moyenne des individus par catégorie est indiquée par une forme plus grande.

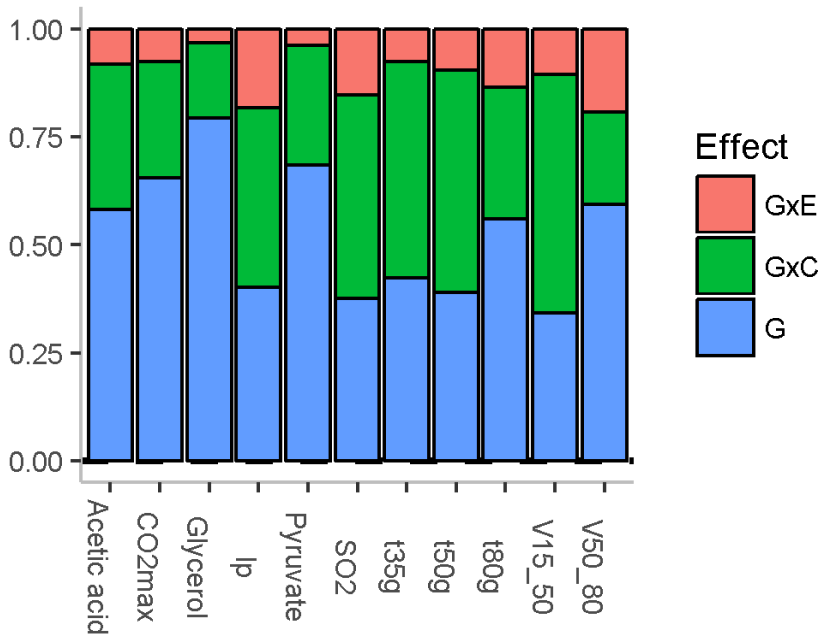


Fig 29 Profil d'interaction par trait

Les valeurs représentées sont les ratios moyens par traits entre les effets G, GxC et GxE estimés à partir du modèle présenté dans le paragraphe précédent.

5.6.1 Mise en évidence de l'impact d'un événement de recombinaison sur la production de pyruvate

L'un des QTLs identifiés pour la production de pyruvate est localisé au niveau du chromosome VIII. Deux pics avec le même LOD score correspondent aux marqueurs VIII_452058 et VIII_465492 (Fig 30). Comme nous l'avons montré sur les Fig 24 et 25 (p 134-135) ce locus a subi chez l'hybride SBxGN un événement de recombinaison avec une inversion des haplotypes parentaux. L'obtention de deux pics est un artefact de l'analyse de liaison qui ne considère pas l'événement de recombinaison survenu chez l'hybride SBxGN.

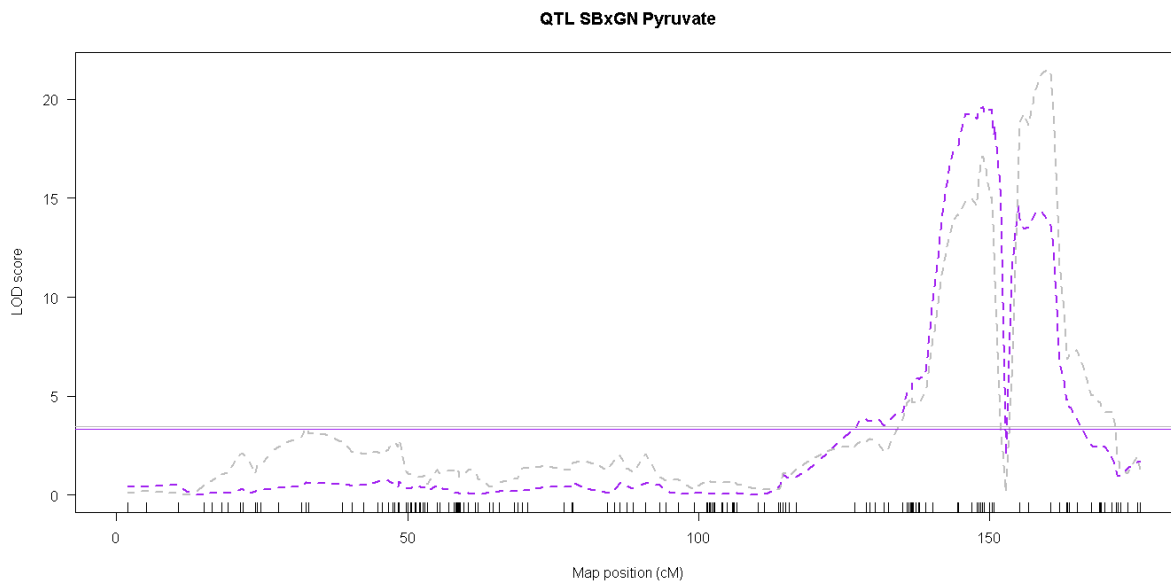


Fig 30 Double pic identifié pour le pyruvate

LOD score le long du chromosome 9 pour le pyruvate. Deux pics aux marqueurs VIII_446336 et VIII_481335 sont identifiés.

De façon intéressante, ce QTL interagit fortement avec la nature du croisement (Fig 31). En effet, ce *locus* n'a aucun effet dans la descendance de hoSBxGN alors qu'il a un effet fort dans la descendance de SBxGN. Avec 24 % de la variance totale expliquée pour la production de pyruvate, c'est le QTL détecté ayant l'effet le plus fort. Il explique en partie la différence importante de production de pyruvate entre les deux descendance décrite dans la partie 5.5 de ce chapitre (Fig 26, p 136). Le gène *ENO2* (chrVIII :451327..452640) se trouve à cet emplacement du génome. Il code pour l'énolase II, une phospho-pyruvate hydratase qui catalyse la conversion du 2-phosphoglycérate en phospho-énol-pyruvate pendant la glycolyse (McAlister and Holland, 1982). Cette protéine catalyse l'étape située en amont de celle produisant le pyruvate. A cause de cette fonction, le gène *ENO2* constitue donc un gène candidat particulièrement pertinent pour expliquer l'effet de ce QTL. Cependant, l'analyse des séquences parentales ne révèle aucune variation génétique susceptible de modifier l'activité ou l'expression de cette protéine. En revanche les deux descendance se distinguent par l'évènement de recombinaison qui a eu lieu à ce locus dans l'hybride SBxGN. Des analyses de séquences complémentaires doivent donc être réalisées pour confirmer la nature des variations génétiques mise en jeu. Nous devons confirmer l'inversion des haplotypes chez l'hybride par séquençage et comprendre si un évènement de recombinaison avec une perte d'homologie a pu produire un allèle délétère dans la séquence codante ou sur le promoteur du gène *ENO2*.

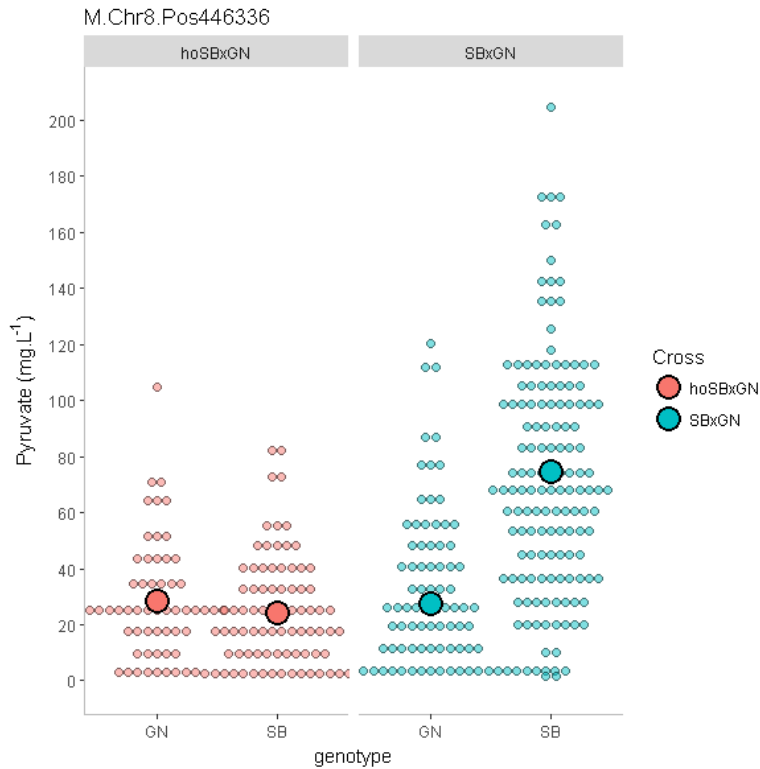


Fig 31 L'effet du QTL VIII_446336 varie fortement en fonction du croisement. Chaque point représente la valeur phénotypique moyenne d'un ségrégant par condition de phénotypage. Ils sont classés en fonction de leur génotype au marqueur VIII_446336 et de l'hybride duquel ils sont issus. Les plus gros points indiquent la moyenne de chaque sous-population.

5.6.2 Impact de l'ADN-mt sur la vitesse de fermentation

Le QTL XVI_794802 identifié pour le *V15_50* est celui pour lequel le niveau d'interaction le plus fort avec le croisement a été identifié (6,5 % de la variance totale expliquée). L'effet de ce QTL est totalement inversé en fonction du croisement (Fig 28, p 139). A cet emplacement du génome, on retrouve le gène *MSS18* (Chromosome XVI, 798051..798857) qui code pour une protéine nécessaire à l'épissage efficace d'un intron de *COX1* présent sur le génome mitochondrial (Séraphin et al., 1988). Même si les ADN-mt des deux descendances se distinguent seulement pour l'allèle de *COB1*, le lien direct de *MSS18* avec l'épissage d'un transcrit codée par l'ADN-mt le désigne comme un gène candidat particulièrement pertinent.

5.7 Discussion sur l'impact d'événements génétiques non mendéliens impactant l'expressivité de QTLs dans un contexte quasi-isogénique.

Les données obtenues révèlent un effet fort du croisement sur l'effet des QTLs identifiés, bien que les deux sous populations étudiées partagent exactement les mêmes cartes génétiques. Ces effets parviennent à masquer une part importante des interactions GxE décrites dans l'article 2 apportant un degré de complexité supplémentaire presque alarmant.

Ces résultats soulignent que des événements génétiques non mendéliens (qui ne ségrègent pas) modulent fortement l'expressivité de nombreux QTLs dans un contexte quasi-isogénique. L'exemple étudié ici est sans doute extrême. En effet, les deux descendance présentent de nombreuses différences. (1) le niveau de ploïdie, (2) l'hérédité mitochondriale, (3) des événements de recombinaison, (4) l'expression d'un gène hétérologue bien que celui-ci soit supposé neutre sur les traits étudiés (*kanMx4*). L'ensemble de ces différences constitue une sorte de microenvironnement dans lequel les mêmes allèles en ségrégation peuvent agir sur le phénotype de manière différente.

Parmi les 4 facteurs différenciant les hybrides SBxGN et hoSBxGN, tous n'ont pas le même poids.

En comparant les cartes génétiques des hybrides nous mettons en évidence cinq événements de recombinaison dont un, situé sur le chromosome VIII, impacte la variabilité phénotypique du pyruvate pour la descendance de SBxGN. Ce résultat démontre que des souches isogéniques sont susceptibles d'être porteuses de différences génétiques ponctuelles pouvant avoir des effets significatifs sur un phénotype. Cependant, les 4 autres événements n'ont pas d'effet et les profils de recombinaison de l'ensemble des autres marqueurs (Fig 24, p 134) sont parfaitement parallèles. Ces résultats suggèrent que les deux hybrides ont généré des descendance similaires et que le QTL VIII_446336 qui a un effet fort sur le pyruvate a un rôle modeste sur les autres interactions GxC observées.

Un autre phénomène non-mendélien peut distinguer les deux hybrides et n'a pas été étudié avec les données dont nous disposons. Il s'agit d'évènements de conversion génique (Szostak et al., 1983). Ce phénomène décrit le remplacement d'un allèle parental à un locus donné par celui de l'autre parent. Il correspond donc à une perte d'hétérozygotie. Ce type d'évènement pourrait arriver de manière indépendante dans les deux hybrides. Dans le cas où le locus affecté aurait un impact sur l'un des phénotypes étudiés, sa ségrégation dans seulement l'une des descendance expliquerait pourquoi les effets de certains QTLs sont spécifiques au croisement. Les marqueurs utilisés dans cette analyse ont été filtrés pour leur ségrégation mendélienne dans les deux populations (hoSBxGN et SBxGN). Une

analyse supplémentaire cherchant les marqueurs qui ségrégent dans une seule descendance pourrait identifier l'existence de tels évènements et déterminer s'ils colocalisent avec des QTLs dont l'effet n'est détecté que dans une descendance.

Concernant la cassette *kanMx4*, elle est supposément neutre par rapport aux phénotypes étudiés. Cela se vérifie notamment lors du test d'hybrides hémizygotés réciproques sur un gène qui n'a pas d'effet où les deux souches ayant intégré la cassette ont le même phénotype que l'hybride (Martí-Raga et al., 2017).

Les deux principales différences entre les deux sous population sont le niveau de ploïdie et l'hérédité mitochondriale. Ces deux paramètres qui ne ségrégent pas dans les sous-populations respectives expliquent certainement une grande partie des interactions GxC mesurées dans cette expérience. Il est malheureusement difficile de discriminer ces deux effets avec le jeu de données dont nous disposons à l'heure actuelle. La solution la plus simple est l'étude de l'impact du génome mitochondrial en utilisant la stratégie proposée dans la partie 5.3 de ce chapitre (p 132). En effet en comparant le phénotype des hybrides (par définitions $2n$). L'effet de la ploïdie peut être alors éliminé et les différences observées doivent être en grande partie liées au mitotype. Au cours de cette thèse nous n'avons pas pu différencier de manière significative les phénotypes hoSBxGN et SBxGN au cause du faible nombre de répétitions effectuée (seulement 2 répétitions). Une analyse plus poussée devrait permettre d'évaluer pour chacun des caractères l'effet mitochondrie et de déduire celui de la ploïdie. Bien évidemment cette estimation sera réalisée uniquement dans le fonds génétique de l'hybride, ce qui risque de masquer de nombreuses relations d'épistasie. Bien que cette distinction n'ait pas pu être effectuée, nous discuterons de l'effet de la ploïdie et de l'ADN-mt de façon séparée.

Le niveau de ploïdie a de nombreuses répercussions sur la morphologie et la physiologie de la levure. L'expression de certains gènes est différemment affectée et la proportion relative de certaines protéines varie en fonction du niveau de ploïdie (Galitski et al., 1999; M F de Godoy et al., 2008). C'est surtout le cas des protéines liées à la voie de signalisation des phéromones qui sont présentes chez les cellules haploïdes mais absentes des diploïdes (Dohlman and Slessareva, 2006). Les cellules haploïdes et diploïdes ont des modes de bourgeonnement bien distincts générés par des différences majeures dans l'organisation du cytosquelette (Chant and Pringle, 1995). Tandis que le bourgeon des cellules diploïdes émerge successivement de chaque côté de la cellule (bourgeonnement bipolaire), il est axial chez les cellules haploïdes en émergeant systématiquement du même côté. Ces changements pourraient également modifier le microenvironnement cellulaire.

Par ailleurs les cellules diploïdes sont en moyenne deux fois plus grandes que les cellules haploïdes (Galitski et al., 1999). D'un point de vu géométrique une sphère qui double de volume augmente sa

surface par 1,59. Ce constat géométrique change le rapport surface/volume entre les cellules haploïdes et diploïdes. Dans le contexte de la fermentation, il a été démontré sur des séries isogéniques que les cellules haploïdes fermentent plus rapidement que celles diploïdes ou tétraploïdes (Salmon, 1997). Cet effet a été observé sur la souche hoSB qui fermente plus vite que son homologue diploïde SB (Marullo et al., 2006). De manière plus générale, la taille de la cellule semble inversement corrélée au flux spécifique maximal dans différentes conditions fermentaires (Albertin et al., 2011). Cette relation avec la taille peut être notamment expliquée par un changement du rapport surface/nombre de copie du génome qui ne varie pas de la même façon. L'effet de certains QTLs pourrait être dépendant de la concentration relative en protéines dans le cytoplasme et varier d'une descendance à l'autre.

Le quatrième facteur susceptible d'influencer les interactions GxC est l'ADN mitochondrial. Comme le niveau de ploïdie, l'ADN-mt a de nombreux effets sur la physiologie de la levure. La mitochondrie a un rôle dans la phosphorylation oxydative (Utter et al., 1958), l'homéostasie (Li et al., 2001), la maturation et l'assemblage des protéines (Lill and Kispal, 2000). Les protéines codées par le génome mitochondrial interagissent directement avec des protéines codées par le génome nucléaire pour la formation de complexes mitochondriaux qui assurent le bon fonctionnement de la mitochondrie (cytochrome c, cytochrome bc, ATPase) (Borst and Grivell, 1978). Des incompatibilités entre un génome nucléaire et un génome mitochondrial sont possibles et peuvent être la cause d'une stérilité entre *S. cerevisiae* et *S. bayanus* (Lee et al., 2008).

Il est donc possible que des variations présentes au niveau du génome nucléaire s'expriment différemment en fonction de l'ADN-mt présent dans la cellule. Des effets de cette nature ont déjà été observés dans l'espèce *A. thaliana* (Campbell and Waser, 2001) pour laquelle la transmission des génomes mitochondriaux et plastidiaux est maternelle. Des cartographies de QTLs réalisées sur des croisements réciproques ont permis de mettre en lumière des niveaux d'interaction nucléocytoplasmique très importants sur l'utilisation de l'eau en condition de sécheresse ainsi qu'au niveau métabolique (Campbell and Waser, 2001; Joseph et al., 2013; McKay et al., 2008). Dans notre expérimentation, le QTL qui possède la plus forte interaction avec le facteur croisement se situe au niveau d'un gène qui interagit directement avec la mitochondrie en contrôlant l'épissage d'un gène codé par l'ADN-mt. L'identification de ce type de gène renforce l'hypothèse d'une implication forte de l'ADN-mt dans l'effet GxC observé. Le test d'hybrides isogéniques se distinguant uniquement par leur ADN-mt a montré que le génome mitochondrial pouvait avoir un impact sur la vitesse de fermentation et a confirmé la possibilité d'un effet mitochondrial sur des caractères technologiques en condition de fermentation.

5.7.1 Conclusion et perspectives sur la partie variations génétiques non mendéliennes

Le facteur précis à l'origine de la variation importante de l'effet des QTLs en fonction de la descendance n'a pas formellement été identifié au cours de cette thèse. La discussion ci-dessus montre que ces facteurs pourraient être multiples. Des expérimentations supplémentaires permettraient de mieux discriminer l'origine de ces interactions. Un effet mitochondrie pourrait être déterminé en effectuant le remplacement allélique des QTLs à tester dans les deux hybrides (hoSBxGN et SBxGN). Il faut cependant noter qu'ils se distingueraient quand même encore par les événements de recombinaison indépendants. Un effet de la ploïdie pourrait être déterminé en observant l'effet du remplacement allélique d'un QTL dans les souches parentales SB et GN (diploïdes homozygotes) et leur clone monosporique correspondant (haploïdes). De manière plus générale, le test de ces hypothèses pourrait être réalisé avec la construction de nouvelles descendances qui se distingueraient chacune seulement pour l'un des facteurs suspectés.

Un effet aussi fort de l'hybride sur l'effet des QTLs n'était pas attendu. La cartographie de QTLs est souvent réalisée dans des population haploïdes (Bloom et al., 2013; Brice et al., 2014; Cubillos et al., 2011; Marullo et al., 2007a; Noble et al., 2015; Romano et al., 2010; Steinmetz et al., 2002). L'hérédité mitochondriale n'est quant à elle jamais questionnée. Avec l'objectif d'identifier des QTLs dont l'effet reflète leur impact réel au sein des souches de vins, il est important de pouvoir déterminer la source exacte de cette variation afin de pouvoir en tenir compte dans les futures expérimentations.

Chapitre 3 : Validation moléculaire de QTLs pléiotropiques liés au métabolisme du SO₂

“Si yo fuera Maradona...”

Manu Chao, jaloux devant la ségrégation des caractères, dans *La vida es una tombola*.

1 Validation moléculaire de QTLs impliqués dans la production de SO₂

1.1 Choix des gènes étudiés et stratégie générale

Cette dernière partie présente la dissection moléculaire de gènes localisés dans certains des QTLs identifiés dans l'Article 2. Pour différentes raisons stratégiques, nous avons focalisé nos efforts sur les régions génétiques contrôlant la production de deux métabolites encore peu étudiés afin de répondre aux besoins du producteur et du consommateur. D'une part, nous nous sommes intéressés à la teneur en SO₂ retrouvée en fin de fermentation qu'il convient de limiter le plus possible à cause de son effet toxique pour la santé humaine. D'autre part, nous avons étudié la production ou la consommation d'acide malique en fin de fermentation alcoolique, paramètre assez variable qui a des conséquences technologiques importantes sur le pH des vins et leur acidité.

Les résultats liés à l'acide malique ne sont pas présentés dans cette thèse. Ils ont volontairement été omis car un brevet visant à protéger le droit d'utiliser les marqueurs identifiés est en cours de rédaction. Pour ce caractère, 17 QTLs ont été identifiés dans les deux croisements. Une analyse fonctionnelle de sept gènes a été réalisée et l'effet de quatre d'entre eux a été validé. Une proposition de projet postdoctoral visant à consolider nos connaissances sur ce caractère est également à l'étude. Ce chapitre sera donc consacré à l'étude de deux nouveaux gènes qui contrôlent la production de SO₂ en fin de fermentation alcoolique. Nous avons également élargi les investigations sur les translocations en validant l'effet de la translocation VIII-t-XVI sur ce phénotype. A terme nous souhaitons publier ces résultats et d'autres à venir afin d'augmenter les connaissances sur la production de ce composé qu'il convient de limiter.

Afin de faciliter la dissection des QTLs, les variations alléliques les plus pertinentes ont été recherchées à l'aide d'un script R dans les régions cartographiées. Ce programme permet de lister l'ensemble des gènes dans lesquels au moins une mutation non synonyme entre les souches parentales est présente. Ce type de mutations est celui qui a le plus de chance d'affecter le fonctionnement d'une protéine et d'avoir des répercussions phénotypiques (voir revue bibliographique p 30). Au cours de cette partie, nous avons utilisé la stratégie de *reciprocal hemizyosity analysis* (RHA) dont le principe a été présenté dans la partie bibliographique de cet ouvrage (p 29). Cette analyse a l'avantage de pouvoir rapidement tester l'effet d'une variation allélique dans le fonds génétique de l'hybride. Le détail des méthodes de construction des souches est donné dans la partie méthodologique à la fin de ce chapitre (p 167).

1.2 QTLs identifiés pour la production de SO₂

Le modèle multi-environnemental présenté dans l'Article 2 a permis d'identifier neuf QTLs liés à la concentration en SO₂ finale mesurée en fin de fermentation alcoolique. Tout au long de ce chapitre nous utiliserons le terme production de SO₂ bien qu'en réalité la levure ne fait que restituer une partie du SO₂ qu'elle a absorbé. Nous avons conscience que ce terme est un raccourci sémantique qu'il faudra parvenir à corriger. Des tests statistiques *post hoc* valident l'implication de ces neuf régions dans au moins un des trois milieux testés. La localisation du pic de chaque QTL ainsi que le croisement concerné est présentée dans le Tableau 5

QTLid	Chr	Pos	LOD score	Cross	Candidate Gene	Allelic variation
VIII-t-XVI	8	13791	13.85	M2xF15	<i>SSU1</i>	F15 : Translocation XIII-t-VXI
XIII_M2xF15_115181	13	115181	4.14	M2xF15		
XVI_M2xF15_203401	16	203401	4.16	M2xF15		
IV_M2xF15_517957	4	517957	3.71	M2xF15		
X_M2xF15_662321	10	664874	3.98	M2xF15	<i>STR2</i>	F15: N372K and S531G
XV-t-XVI	15	150503	18.1	SBxGN	<i>SSU1</i>	GN : Translocation XV-t-XVI
XIII_SBxGN_217882	13	217882	5.78	SBxGN		
IV_SBxGN_360451	4	360451	3.86	SBxGN	<i>MCH1</i>	GN: T42S, S63L, A473T ; SB: P279S
IV_SBxGN_1426756	4	1426756	3.95	SBxGN		

Tableau 5 Liste des QTLs identifiés pour le SO₂

Afin d'évaluer l'impact individuel des QTLs sur la variation phénotypique totale, leur effet a été estimé par une ANOVA en utilisant un modèle complet permettant d'estimer les interactions entre QTLs ainsi que celles avec l'environnement (Tableau 6). Sur ce tableau figure en plus de l'impact de chaque QTL, les quelques interactions significatives ($p_{val} < 0,01$) retenues par l'analyse. L'environnement a un effet important (65 % et 68 % de la variance expliquée respectivement chez les descendances M2xF15 et SBxGN). Cet effet est dû à l'action conjointe de la micro-oxygénation et de la nature du moût en accord avec les résultats montrés dans l'Article 2 (Fig 7, p 108). Afin de s'affranchir visuellement de cet effet majeur, la Fig 32, panel A ne montre que la part de variance génétique expliquée par chaque QTL dans un contexte mono-environnemental. Pour les deux croisements, la distribution des effets des QTLs a le même profil : un QTL majeur dont l'effet est supérieur à 10 % lié à l'effet des translocations (VIII_t_XVI pour M2xF15 et XV_t_XVI pour SBxGN) et plusieurs QTLs mineurs dont les effets sont inférieurs à 5 %. En plus des effets simples, deux interactions ont été identifiées dans le croisement M2xF15 (Fig 32, panel B). La première est de nature GxE et a lieu entre la translocation VIII_t_XVI et l'environnement. Cet effet est visible sur la Fig 32, panel C et montre que l'effet de la translocation

VIII_t_XVI est plus faible dans le moût M15_Sk. L'autre interaction est de type GxG, c'est une épistasie négative entre le marqueur IV_M2xF15_517957 et la translocation VIII_t_XVI. L'effet du marqueur IV_M2xF15_514957 s'exprime seulement dans une configuration génomique transloquée (Fig 32, panel D).

Nous avons entrepris l'étude de certains gènes en relation avec le métabolisme du SO₂. En plus des deux translocations évoquées plus haut, deux autres QTLs présentant des gènes candidats intéressants ont été disséqués. L'impact des variations alléliques de *MCH1* et *STR2* sur la production de SO₂ a pu être démontré.

M2xF15	Pval	PrctVar
Environment	0	64.93
IV_517957	0	0.63
VIII_t_XVI	0	4.41
X_662321	0	1.18
XIII_115181	0	1.2
XVI_203401	0.01	0.54
Environment:VIII_t_XVI	0	1.53

SBxGN	Pval	PrctVar
Environment	0	68.1
IV_360451	0.03	0.67
IV_1426756	0.12	0.34
XIII_217882	0.01	0.86
XV_t_XVI	0	5.09
Residuals	NA	24.93

Tableau 6 Résultats de l'ANOVA pour les deux descendance.

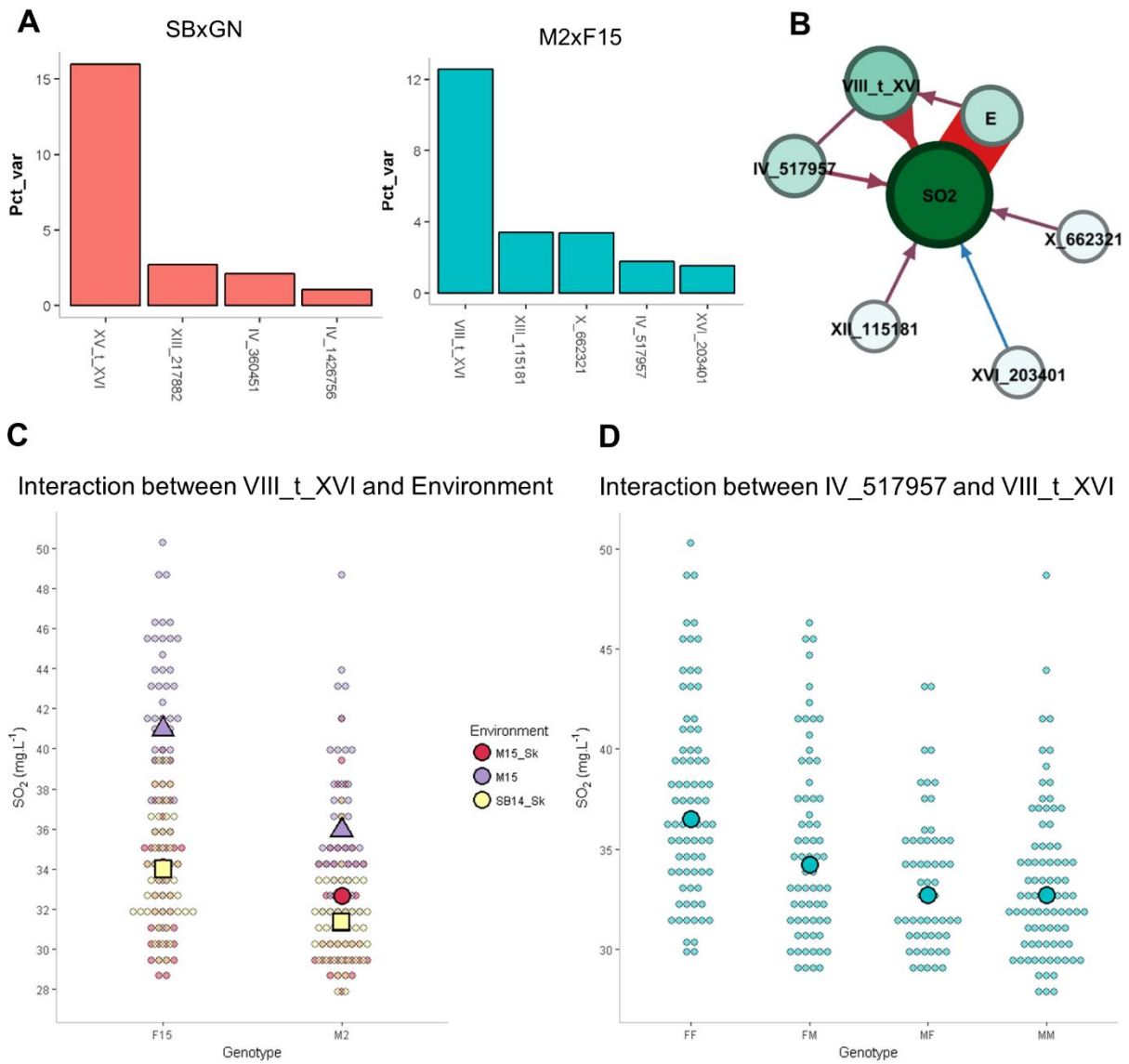


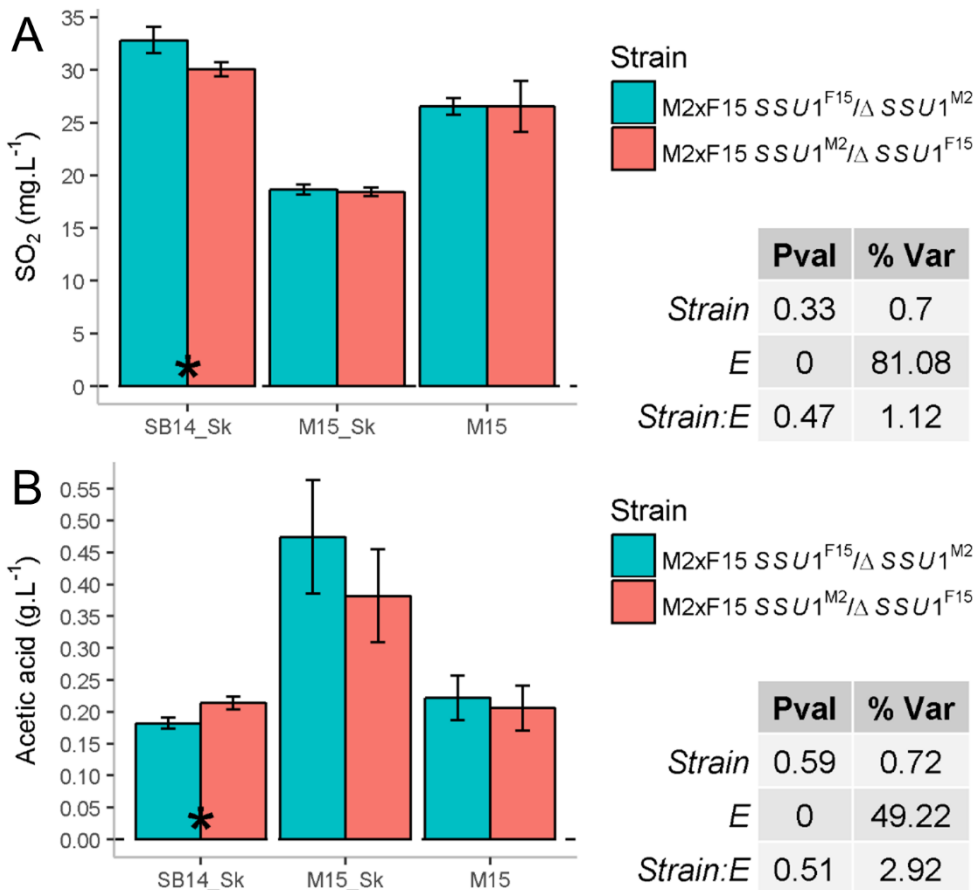
Fig 32 Effets des QTLs du SO₂

Panel A. Variance expliquée par chaque QTL par croisement. **Panel B.** Représentation schématique de l'effet des QTLs et de leur interaction dans le croisement M2xF15. Les nœuds correspondent à un QTL, le trait ou l'environnement. Les flèches qui relient les cercles indiquent l'effet d'une composante du modèle sur une autre composante du modèle. Leur épaisseur et couleur (du bleu au rouge) est proportionnelle à l'intensité de leur effet. La couleur des cercles (du blanc au vert) et leur taille dépend du nombre de relations qu'ils ont avec les autres composants du modèle. **Panel C.** Interaction entre VIII_t_XVI et Environnement. Chaque point représente la valeur phénotypique d'un descendant dans une condition. L'axe des x les sépare en fonction de leur génotype pour le marqueur VIII_t_XVI et ils sont colorés en fonction de la condition de phénotypage. Les plus grands points indiquent la moyenne de la population par environnement et génotype. **Panneau D.** Interaction entre IV_517957 et VIII_t_XVI. Chaque point représente la valeur phénotypique d'un descendant dans une condition. L'axe des x les sépare en fonction de leur génotype pour les marqueurs VIII-t-XVI et IV_517957. Les génotypes sont indiqués par une combinaison de deux lettres, la première désigne l'allèle du marqueur VIII_t_XVI et la seconde l'allèle du marqueur IV_517957. F = F15 et M = M2. Les plus grands point indiquent la valeur phénotypique moyenne de chaque génotype.

1.3 Validation de l'effet de la translocation VIII-t-XVI dans le contexte M2xF15

L'étude de la translocation XV-t-XVI a été détaillée dans l'Article du chapitre 2 (p 110). La comparaison des hybrides hémizygotes du fonds génétique SBxGN montre que le gène *SSU1* selon son environnement chromosomique impacte de nombreux paramètres (phase de latence, vitesse de fermentation, production de SO₂). Ce résultat peut être expliqué par la présence plus ou moins abondante de SO₂ dans le milieu. La cartographie détecte un pic pour le même gène dans l'hybride M2xF15 laissant supposer l'existence d'un mécanisme similaire. En effet, il existe un effet connu de cette forme de translocation sur l'efflux de SO₂ (Goto-Yamamoto et al., 1998). Cependant, il était nécessaire de valider son effet en réalisant des hybrides hémizygotes dans l'hybride M2xF15.

En plus d'être liée au SO₂, au *V50_80* et à la *lp*, la translocation VIII-t-XVI affecte également la production d'*acide acétique*. La souche transloquée produit moins d'acide acétique que les souches non transloquées. Cette relation est néanmoins complexe. L'effet de *SSU1* sur le SO₂ et l'acide acétique a été validé en SB14 (Fig 33). Cependant, lors de la vinification du moût rouge (M15) il semble que l'effet de la translocation soit inverse (bien que non significatif), c'est à dire que l'hybride portant l'allèle de *SSU1*^{sb} (non transloqué) produit moins d'acide acétique. Ces observations corroborent celle faites par Adrien Zimmer au cours de sa thèse (Zimmer, 2013). Ce résultat souligne une fois de plus les importantes interactions GxE observée en condition œnologique. Un autre résultat intéressant concerne l'interaction GxG. Si l'épistasie négative identifiée lors de l'analyse de liaison entre la translocation et le marqueur IV_M2xF15_517957 est dominante, l'effet de surproduction de SO₂ par la translocation est atténué par l'allèle M2 du marqueur IV_M2xF15_517957 qui est présent dans l'hybride (Fig 32, panel D). L'ensemble de ces résultats soulignent aussi qu'à l'instar de la translocation dans le fonds génétique SBxGN, l'impact de la translocation VIII-t-XVI a un effet pléiotropique dépendant de l'environnement (voir discussion Article 2 page 110) Le lien possible entre translocation, SO₂ et d'autres caractères sera évoqué ci-dessous.

Fig 33 Effet de *SSU1*

Panels A-B. Résultats de la RHA de *SSU1* pour le SO₂ et l'acide acétique. La valeur indiquée est la moyenne de 5 répétitions ; les barres d'erreurs montrent l'erreur standard. Le niveau de significativité entre hémizygotes est indiqué comme suit: * pvalue≤0.1 ; ** pvalue≤0,05 ; *** pvalues≤0.01. Les tableaux indiquent le résultat d'une la différence phénotypique entre les hémizygotes dans les environnements.

1.4 Le gène *MCH1* un nouveau transporteur de sulfites ?

Notre attention s'est ensuite reportée sur le gène *MCH1* qui explique environ 5 % de la variance observée dans la descendance de SBxGN. Le pic du QTL (IV_{SBxGN}_360451) est situé dans la séquence de *MCH1* (359825..361285) ce qui illustre la précision de la cartographie. La fonction de la protéine codée par ce gène est inconnue. La séquence de Mch1p présente néanmoins une homologie avec les perméases d'acides monocarboxyliques (notamment acide lactique, acide pyruvique et acide acétique). Cependant aucune fonction associée n'a pu être démontrée dans des conditions de laboratoire (Makuc et al., 2001). Cette protéine pourrait cependant jouer un rôle lors de la fermentation alcoolique puisque son expression est fortement induite (Marks et al., 2008). L'analyse comparative des séquences protéiques des souches parentales montre des différences intéressantes. Par rapport à la souche de référence S288c, l'allèle GN (*MCH1*^{GN}) présente trois changements d'acides

aminés (T42S, S63L et A473T). L'allèle de SB (*MCH1*^{SB}) est comparable à la souche de laboratoire pour ces trois positions, mais présente une autre mutation (P279S), portant à quatre le nombre de polymorphismes non synonymes entre ces souches.

Nous avons validé l'effet de ce gène sur le phénotype étudié en réalisant une *RHA* (voir méthode p 167). Les conditions de fermentation appliquées sont les mêmes que celles de la cartographie QTL. Une différence significative est trouvée pour le SO₂ confirmant que *MCH1* est responsable de l'effet détecté par l'analyse de liaison (Fig 34, panel A). Comme pour le gène *SSU1*, les deux versions alléliques de *MCH1* ont un effet sur d'autres paramètres (*acide acétique*, *V50_80* et *CO2max*) (Fig 34, panels B-D). Ce résultat était en partie inattendu car contrairement à ce qui avait été montré pour le gène *SSU1*, l'analyse de liaison ne prédit pas cet effet. La Fig 35 montre le score de *LOD* obtenu pour ces caractères et seul le paramètre SO₂ franchit le seuil statistique défini par les 1000 permutations. Bien qu'il ne franchisse pas ce seuil, un pic est toutefois visible pour le *CO2max*.

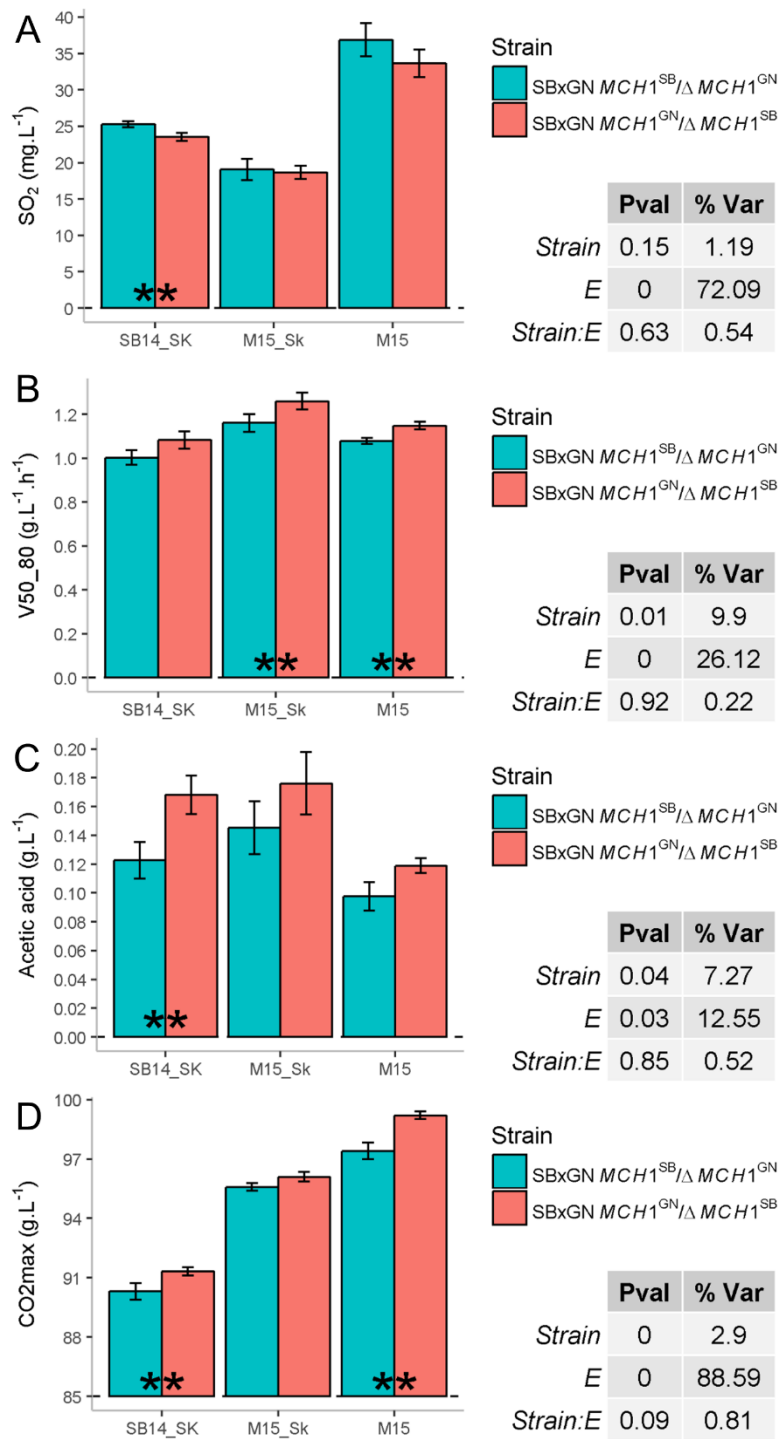


Fig 34 Effet pléiotropique de MCH1

Panels A-D. Résultats de la RHA de MCH1 pour le SO₂, le V50_80, l'acide acétique et le CO₂max. La valeur indiquée est la moyenne de 7 répétitions ; les barres d'erreurs montrent l'erreur standard. Le niveau de significativité entre hémizygotés est indiqué comme suit: * pvalue≤0.1 ; ** pvalue≤0,05 ; *** pvalue≤0.01. Les tableaux indiquent le résultat d'une la différence phénotypique entre les hémizygotés dans les environnements.

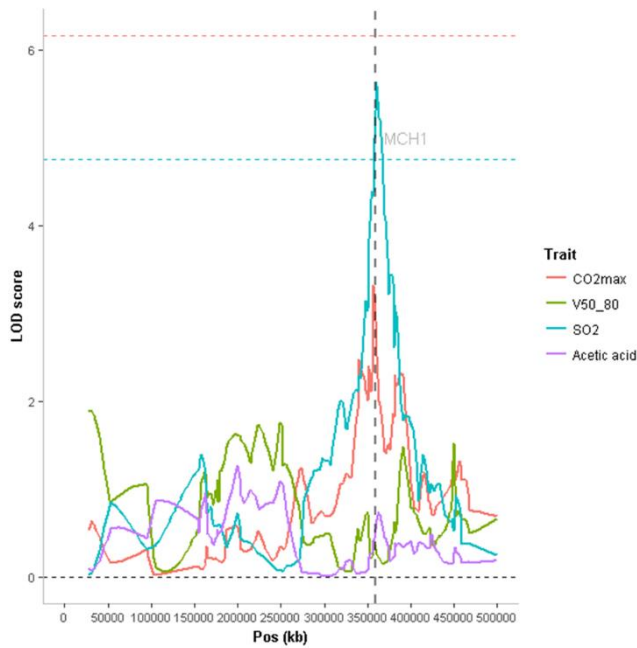


Fig 35 Lod score dans la région génomique de MCH1

Lod score par trait. Les lignes horizontales en pointillé représentent le seuil de significativité (*False discovery rate 5 %*)

Afin de prédire lequel des quatre SNPs non-synonymes est responsable de l'effet observé, l'impact de ces mutations sur la protéine a été étudié à l'aide du programme PROVEAN (Choi and Chan 2015). La mutation P279S de *MCH1*^{SB} est prédite comme pouvant avoir un effet sur la fonction de la protéine, ce qui n'est pas le cas des autres mutations (Fig 36, panel A). La conversion d'une proline est connue pour avoir de fortes répercussions sur la structure des protéines (MacArthur and Thornton 1991). Ce résidu est bien conservé parmi un sous-ensemble de 36 souches œnologiques représentatives de la diversité des souches de vin récemment séquencées (Sharma *et al.*, en préparation). Dans cette population, la fréquence de *MCH1*^{SB} est de 11,1 %, avec deux souches homozygotes et quatre souches hétérozygotes. La structure du Mch1p a été prédite avec une confiance de 100 % par l'outil de modélisation Phyre2 (Kelley et al., 2015). Sur la base de cette structure prédite, l'importance de la proline 279 sur la stabilité de la protéine a été confirmée (Fig 36, panel B). Cet acide aminé est situé au début d'une hélice transmembranaire (Fig 36, panel C). Cette modification est également prévue pour avoir un effet fort sur la liaison de la protéine avec des ligands hétérologues ce qui peut affecter sa fonction (Fig 36, panel D).

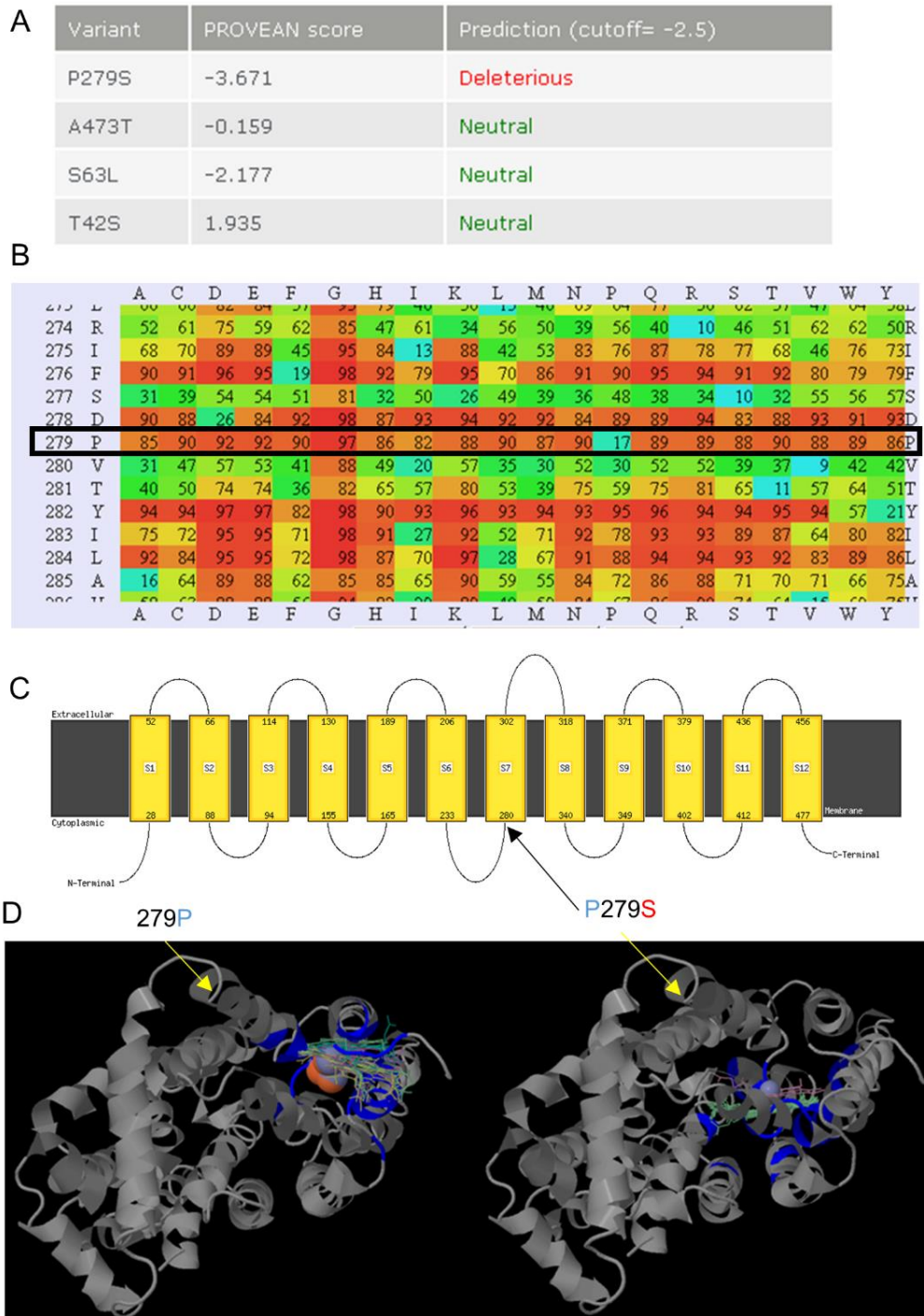


Fig 36 Effet de P279S sur la structure de *MCH1*

Panel A. La mutation P279S est prédite comme délétère (Prédiction PROVEAN). **Panel B.** *Position-specific scoring matrix* calculé sur la base de la structure prédite de la protéine. Code de couleur en fonction de l'effet délétère prévu (bleu = neutre, rouge = délétère). **Panel C.** Prédiction des hélices transmembranaires de la protéine. Les côtés extracellulaire et cytoplasmique de la membrane sont indiqués et le début et la fin de chaque hélice transmembranaire sont illustrés par un nombre indiquant l'indice de résidu. La flèche pointe vers le résidu 279. **Panel D.** Site de liaison à des ligands hétérogènes en fonction de la mutation P279S. Les résidus prédits comme faisant partie du site de liaison sont colorés en bleu.

En utilisant les données phénotypiques des 34 souches phénotypées dans cinq moûts rapportées l'Article 1, nous avons testé si l'impact de cette mutation était visible sur cette population. Une tendance inverse à l'effet attendu est observée (Fig 37). Cependant la significativité de l'effet observé est difficile à déterminer, d'une part parce que l'effectif des souches pour chaque génotype est fortement disproportionné (GN:GN : 26 souches, SB:GN : 6 souches, SB:SB : 2 souches) et que l'effet de la mutation P279S de *MCH1* est confondu avec la translocation puisque l'ensemble des souches porteuses de cette mutation sont également non transloquées.

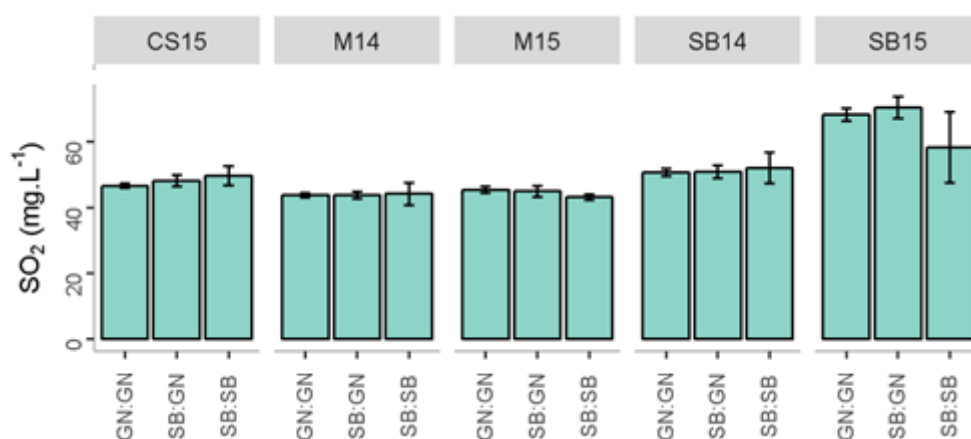


Fig 37 Valeur phénotypique moyenne des souches en fonction de leur génotype pour *MCH1*

Effet de la variation allélique de *MCH1* pour 34 souches de vins dans cinq moûts. Valeur phénotypique moyenne des souches par moût en fonction de leur état de leur génotype. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. Effectif : GN:GN : 26 souches, SB:GN : 6 souches, SB:SB : 2 souches.

L'identification d'un gène codant pour une protéine potentiellement un transporteur transmembranaire dont les variations génétiques sont capables de moduler la concentration en SO₂ évoque le mécanisme de *SSU1*. Les caractéristiques d'une telle protéine vis à vis du transport de SO₂ devront être étudiées afin de savoir si ce gène est réellement un transporteur de SO₂. Ces investigations dépassent malheureusement le cadre de ce projet. La Fig 38 schématise les répercussions possibles de cette protéine dans la physiologie des levures de vinifications.

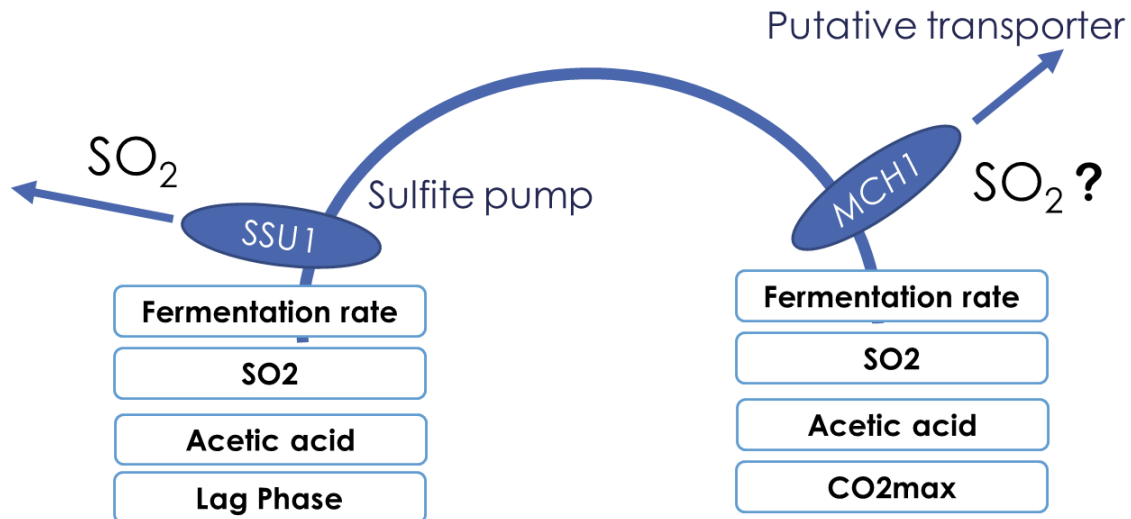


Fig 38 Schéma du mode d'action possible de *MCH1*

1.5 Etude du gène *STR2* impliqué dans le métabolisme du soufre

Un dernier gène a attiré notre attention de par sa fonction. Le gène *STR2* code pour une cystathionine gamma-synthase et est directement impliqué dans le métabolisme de la cystéine (Fig 39). L'acronyme STR pour Sulfure Transfert signifie qu'il est impliqué directement dans la voie de biosynthèse des acides aminés soufrés (Hansen and Johannesen 2000). Le pic du QTL identifié ($X_{M2 \times F15_662321}$) est situé près du gène *STR2* (665218..667137). Les résultats du test des hemizygotés réciproques est montré (Fig 40, panel A). Les deux hybrides montrent une différence significative dans leur production de SO₂ avec l'allèle *STR2*^{F15} qui augmente la production de SO₂. Cet effet est particulièrement visible dans la condition M15. Cependant, ce résultat n'est pas cohérent avec l'analyse de liaison qui prédit une production plus élevée pour l'allèle de M2. Bien que *STR2* semble avoir un effet tangible sur le SO₂, ce résultat suggère que d'autres gènes proches de ce locus pourraient également avoir un impact sur ce phénotype. Ces facteurs génétiques doivent alors avoir un effet cumulé opposé supérieur à celui de *STR2* seul. A moins de 16 kb de *STR2*, un gène décrit pour affecter la production de H₂S est présent (Cordente et al., 2009). Il s'agit du gène *MET5* qui code pour une sous unité β de la sulfite réductase qui a pour substrat direct le SO₂ et les ions sulfides comme produit (Fig 39) (Masselot and Robichon-Szulmajster, 1975). Dans un précédent article, (Huang, Roncoroni, and Gardner 2014) un QTL très proche de *MET5* affectant la production d'H₂S a été identifié. Par rapport au parent F15, la souche M2 présente la délétion d'un codon entraînant la perte de la Valine 288. L'impact de ce gène n'a pas été validé dans le fonds génétique de l'hybride M2xF15 mais l'allèle M2 de ce QTL réduit la production

d'H₂S. Ce résultat est en accord avec une activité métabolique de sulfite réductase moindre pour la protéine Met5p^{M2}. Cette diminution de la réduction de SO₂ en ions sulfides entrainerait par conséquent un relâchement plus important de SO₂ dans le milieu. Cet effet sur le SO₂ et l'H₂S a déjà constaté pour des souches mutantes ayant des mutations perte de fonction pour *MET5* (Cordente et al., 2009). Cette hypothèse devra être validée sur le plan fonctionnel.

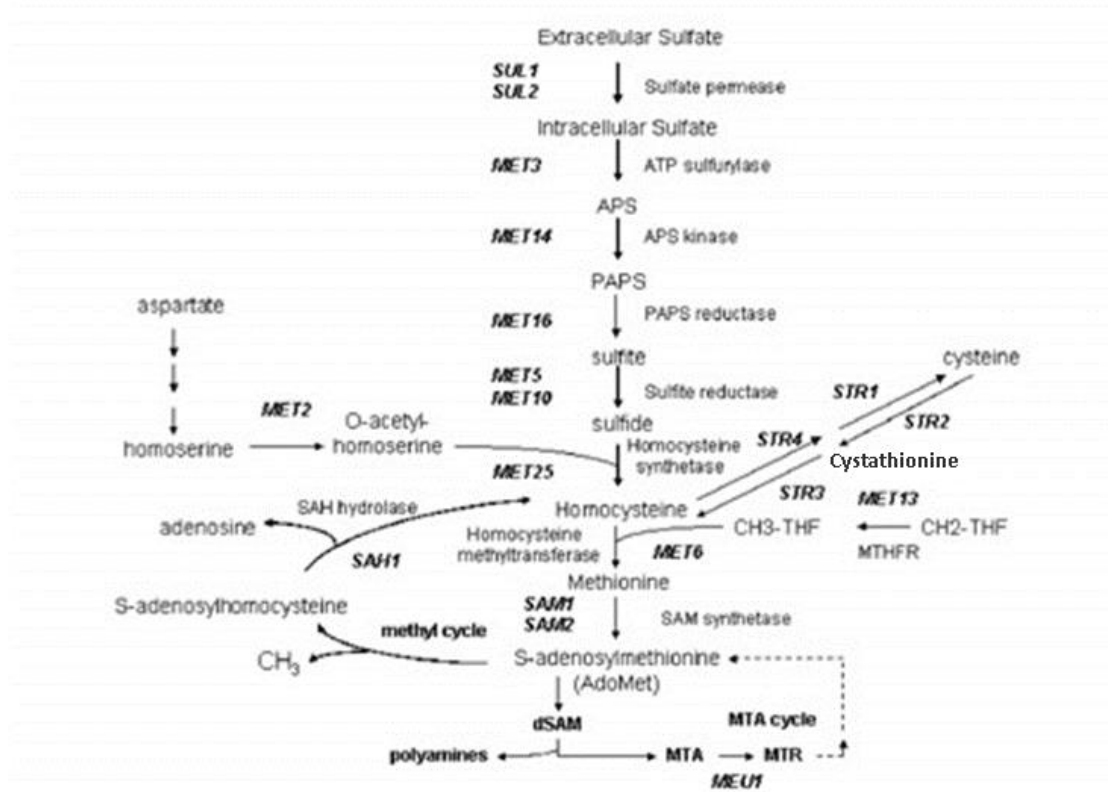


Fig 39 Voie d'assimilation du sulfate et de synthèse des acides aminés sulfurés

Ce commentaire n'enlève pas l'impact réel du gène *STR2* dont les variations alléliques pourraient affecter le niveau de cystathionine. Ce métabolite est indirectement connecté avec l'assimilation des ions sulfides (Fig 39) en lien avec le SO₂. La variation allélique de *STR2* a elle aussi un effet pléiotropique. En effet une différence significative est retrouvée encore une fois pour le *V50_80* et l'*acide acétique* (Fig 40, panels B-D). La cartographie de QTL détecte effectivement un QTL pour l'*acide acétique* à ce locus (Fig 41). L'effet prédit par la cartographie QTL et l'effet obtenu avec RHA sont cohérents. Cela signifie que les variations alléliques de *STR2* expliquent le QTL X_{M2xF15}_662321 pour l'*acide acétique*. Le pic obtenu pour l'*acide acétique* est assez large puisqu'il couvre une région de plus de 100 kb. Plusieurs pics de liaisons sont formés pour ce QTL ce qui laisse penser que plusieurs variations alléliques causatives sont présentes à ce locus.

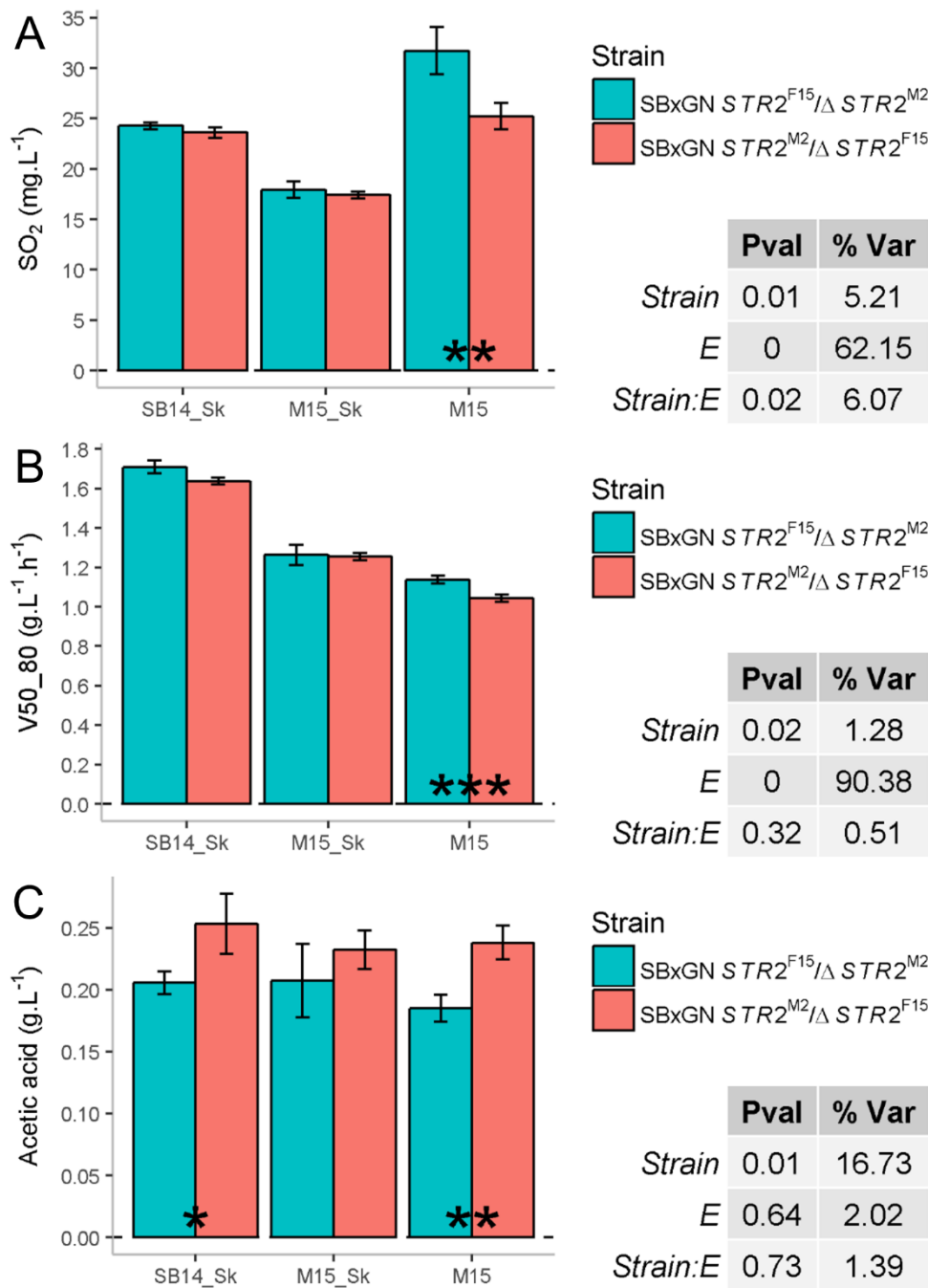


Fig 40 Effet pléiotropique de STR2

Panels A-C. Résultats de la RHA pour le SO₂, V50_80 et l'acide acétique. La valeur indiquée est la moyenne de 7 répétitions; l'erreur standard est représentée dans les barres d'erreur. Le niveau de signification entre hémizygotes est indiqué comme suit: * pvalue≤0.1; ** pvalue≤0,05; *** pvalues≤0.01. Une ANOVA a été appliquée pour évaluer l'importance de la différence phénotypique entre les hémizygotes dans les environnements.

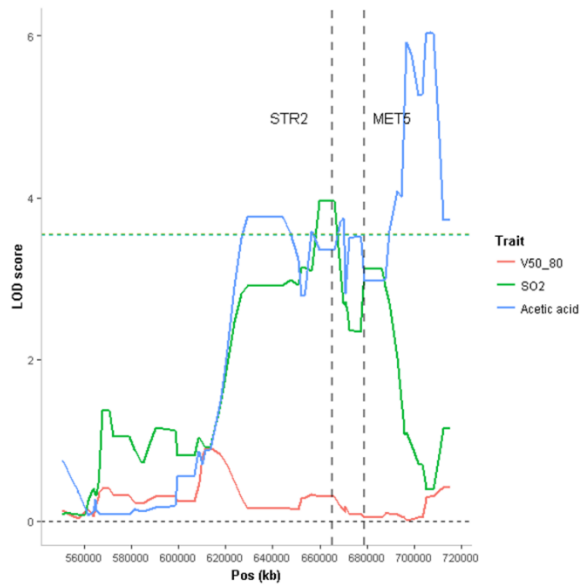


Fig 41 LOD score dans la région génomique de *STR2*

LOD score par trait. Les lignes horizontales en pointillé représentent le seuil de significativité (*False discovery rate* 5 %).

1.6 Intégrations des résultats présentés et éléments de discussion

Ce chapitre a permis l'identification de quatre variations génétiques naturelles ayant des effets sur des phénotypes quantitatifs dont la production de SO₂. L'allèle *MCH1^{SB}* et *STR2^{F15}* sont liés à une légère augmentation de la production de SO₂. De leur côté, les allèles transloqués de *SSU1* entraînent une expulsion forte de ce composé. D'un point de vue œnologique ces quatre allèles ne sont donc pas favorables pour ce phénotype.

1.6.1 Étude de des translocations sur 34 souches dans cinq moûts

Nous avons étudié l'impact de ces allèles sur les souches industrielles phénotypées dans l'Article 1. Après plusieurs tentatives de modélisations (modèle linéaires multiples) nous ne sommes pas parvenus à établir de lien entre génotype et phénotype de façon significative (Fig 42). Cela est certainement dû aux faibles fréquences alléliques de *STR2^{F15}* (14,7 %) et *MCH1^{SB}* (11,1 %) et donc leur faible ségrégation au sein de la population.

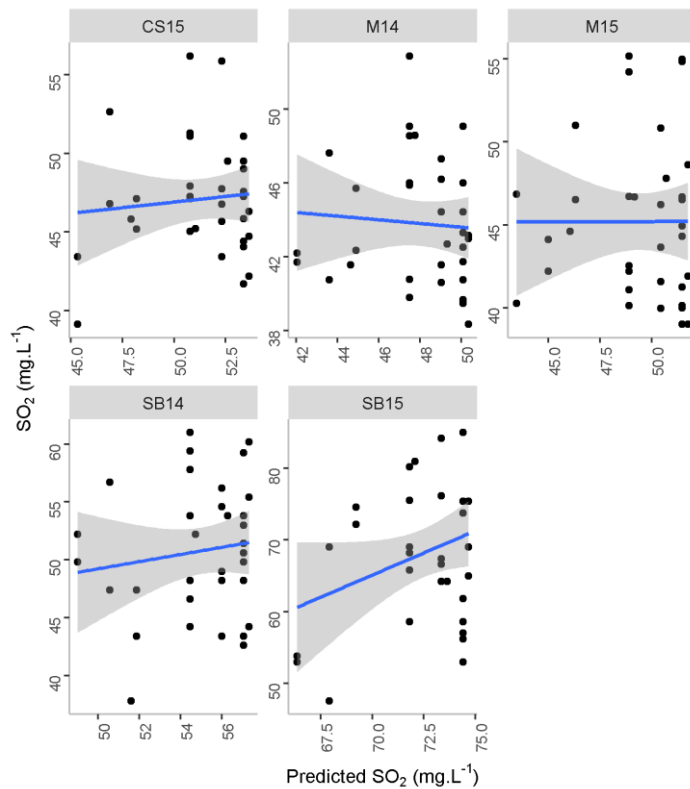


Fig 42 SO₂ produit prédit en fonction du génotype

Un modèle tenant compte du génotype des 34 souches industrielles pour *MCH1*, *STR2* et l'état de translocation prédit les quantités de SO₂ produite.

Seul l'effet des translocations sera donc ici discuté. L'état de translocation de ces souches a été déterminé à partir de PCR en accord avec Zimmer *et al.* (2014). Parmi les 34 souches, 22 possèdent la translocation VIII-t-XVI, 5 possèdent la translocation XV-t-XVI, 5 le chromosome XVI sauvage et 2 possèdent les deux translocations. Bien qu'avec un déficit en souches non transloquées au sein de la population, une comparaison a été effectuée. Les valeurs phénotypiques moyennes pour le SO₂, la *lp*, le *V15_50* et le *V50_80* obtenues pour ces souches en fonction de leur état de translocation sont représenté dans la Fig 43. Dans les trois moûts rouges testés (M14, M15, CS15), aucune différence entre les souches en fonction de leur état de translocation n'est identifiée. En revanche, dans les deux moûts blancs testés (SB14 et SB15), un effet fort de l'état de translocation sur le SO₂, la *lp* et le *V15_50* est identifié. Cette divergence entre moût rouge et moût blanc s'explique par l'absence de SO₂ actif dans les moûts rouges sans lequel l'effet des translocations ne s'exprime pas. Dans les deux moûts blancs, les souches transloquées laissent plus de SO₂ en fin de fermentation, ont une phase de latence plus courte et une vitesse en début de fermentation plus rapide. En revanche cet effet disparaît en fin de fermentation (*V50_80*) et a tendance à s'inverser en SB14 comme déjà vu dans l'Article 2. Les effets

de la translocation sont plus forts en SB15 qu'en SB14. Cela s'explique car parmi ces deux moûts, le SB15 est celui avec la plus grande quantité de SO₂ (67 mg.L⁻¹ pour le SB15 et 34 mg.L⁻¹ pour le SB14).

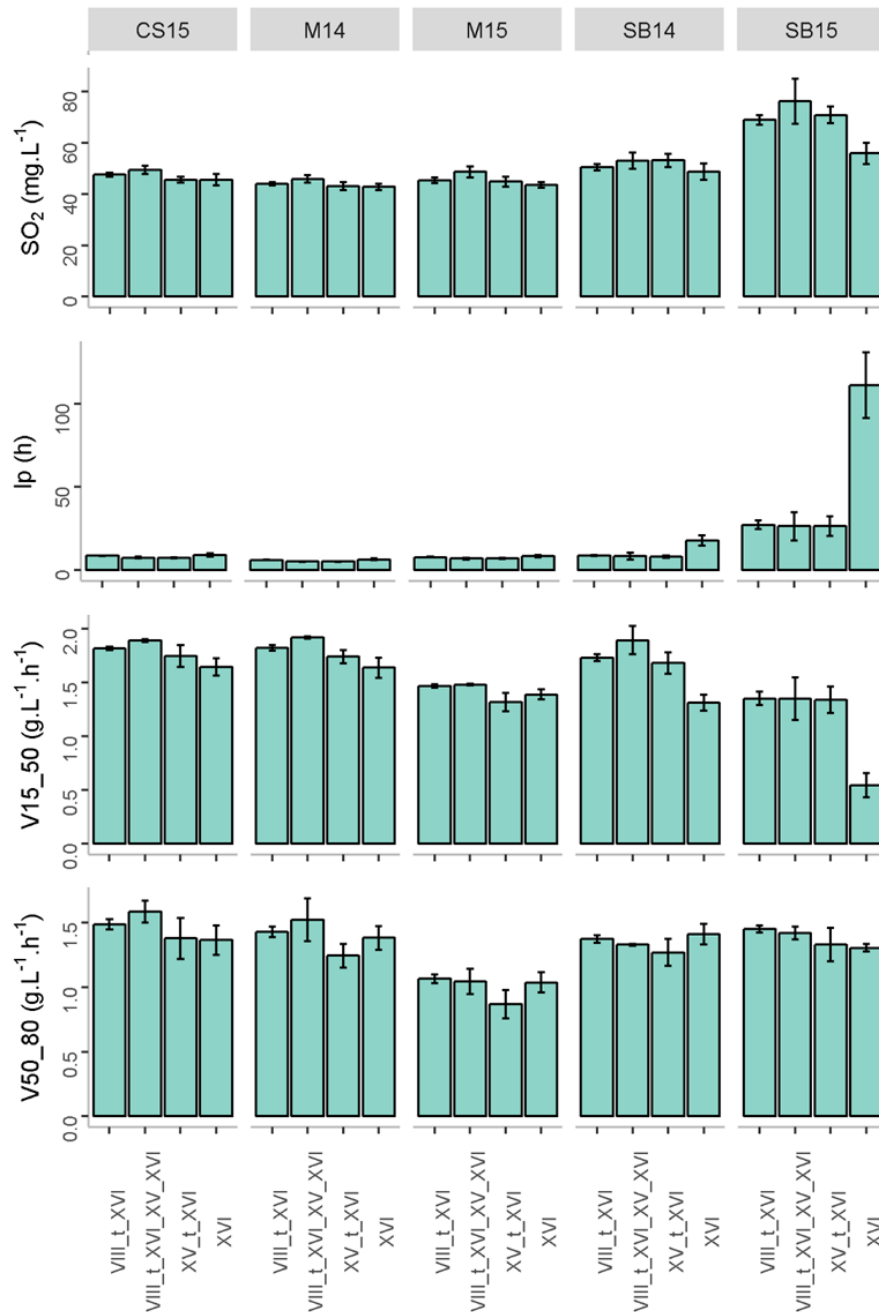


Fig 43 Effet des translocations dans cinq moûts

Effet des translocations pour 34 souches de vins dans cinq moûts. Valeur phénotypique moyenne des souches par moût en fonction de leur état de translocation. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. Effectif : VIII-t-XVI : 22 souches, VIII-t-XVI et XV-t-XVI : 5 souches, XV-t-XVI : 5 souches, XVI-wt : 5 souches.

1.6.2 L'Expulsion du SO₂ conduit-elle à une modification de l'environnement cellulaire ?

La validation moléculaire de plusieurs QTLs impliqués dans la production de SO₂ a systématiquement démontré des effets pléiotropiques avec des répercussions récurrentes notamment sur la vitesse en fin de fermentation (*V50_80*) et la production d'*acide acétique*. Pour la concentration en acide acétique la relation est systématiquement dans le même sens (en SB14) avec une variation allélique qui augmente la production de SO₂ qui diminue celle d'*acide acétique*. Cela est confirmé avec les données obtenues pour les hémizygotes des quatre gènes disséqués qui montrent une nette corrélation entre l'*acide acétique* et le SO₂ (Fig 44). Cette corrélation n'était pas identifiée avec les données phénotypiques des 34 souches (Article 1, Fig 6, p 65). Dans la discussion de ce premier chapitre, (p 78), nous nous interrogeons si les corrélations identifiées étaient la marque d'un *trade-off* métabolique réel ou seulement celle d'une population structurée ayant suivi le même chemin évolutif. Avec la validation de quatre variations alléliques impliquées dans au moins deux mécanismes moléculaires différents (transporteurs et voie de synthèse des acides aminés soufrés) ; les données des hybrides hémizygotes apportent la preuve d'un lien direct entre la concentration en SO₂ finale et celle d'*acide acétique* en fin de FA. Il s'agit ici d'un vrai *trade-off* puisque le viticulteur a la volonté de réduire la concentration de ces deux composés dans son vin. Notons encore un fois que cette relation n'est systématique qu'en Sauvignon Blanc, soulignant l'effet toujours important du jus de raisin.

Le caractère systématiquement pléiotropique des QTLs identifiés pour le SO₂ illustre le fait qu'en relâchant dans le milieu des quantités variables de SO₂ la levure impacte de manière drastique son propre environnement et change sa physiologie à plusieurs niveaux. Les concentrations intracellulaires de ces composés sont probablement elles aussi variables, bien que ce point reste à démontrer expérimentalement. Ainsi la toxicité du SO₂ diminue la vitesse de fermentation et par un mécanisme qui reste encore à élucider fait diminuer la production d'*acide acétique*. Les complexes forts entre acétaldéhyde et SO₂ pourraient être à l'origine de cette relation. Des tests supplémentaires pourraient permettre d'affiner la compréhension du lien entre la concentration en SO₂ du milieu et les autres traits. Cela pourrait notamment être réalisé en testant l'effet des variations alléliques identifiées dans un moût sans SO₂ ou avec des concentrations croissantes de SO₂.

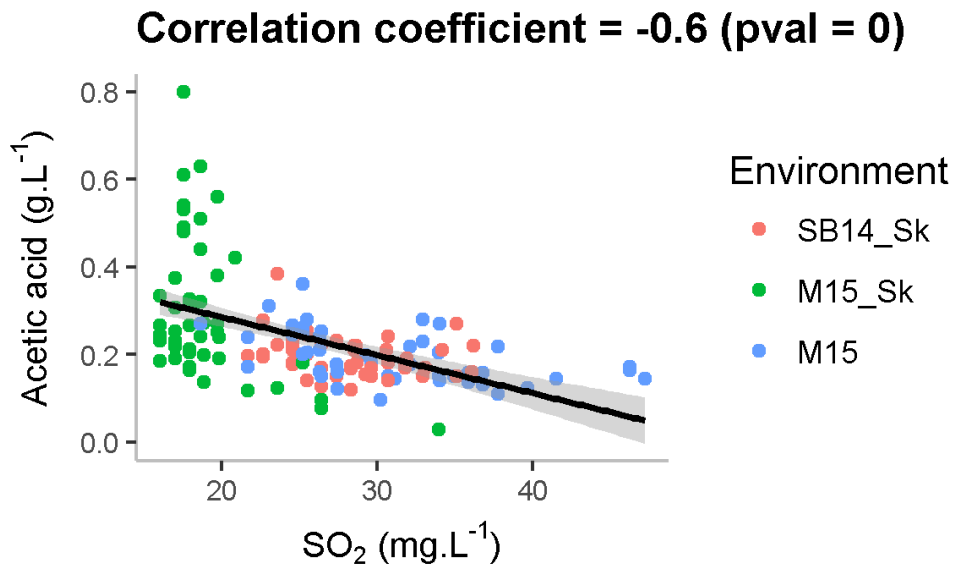


Fig 44 Corrélation entre SO₂ et *acetic acid* pour les hémizygotes réciproques
Les données utilisées sont celles des hybrides hémizygotes réciproques pour *MCH1*, *STR2* et les deux translocations VIII-t-XVI et XV-t-XVI

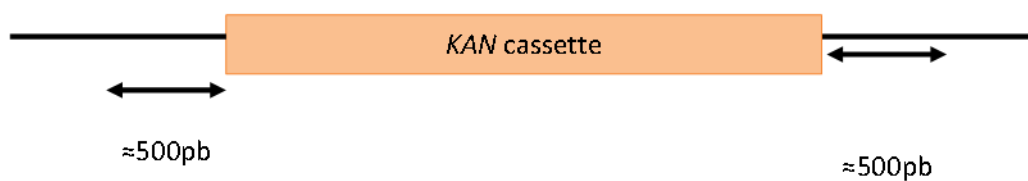
2 Matériel et méthode

2.1 QTLs dissection

L'effet des allèles a été validé par une analyse d'hémizygotie réciproque (RHA) (Steinmetz et al. 2002; Warringer, Liti, and Blomberg 2017). Pour cela, les gènes candidats ont été remplacés dans l'hybride par des cassettes de délétion Kan-Mx4 qui confèrent une résistance à la généticine (G418). Les cassettes ont été amplifiées par PCR en utilisant comme matrice l'ADN génomique des souches Y03751 et Y02608 qui contiennent les cassettes de délétion de *MCH1* et *STR2*. La souche hybride a été transformée avec une cassette de délétion en utilisant le protocole d'acétate de lithium comme décrit par Gietz et Schiestl (2007). Tous les mutants ont été vérifiés par insertion PCR. Brièvement, la vérification consiste à amplifier positivement par PCR un fragment qui commence environ 100 pb en amont de la zone d'insertion de la cassette KanMx4 et se terminant au milieu de la cassette. Avec cette stratégie, une transformation réussie remplace l'un des deux allèles de l'hybride. Une fois l'insertion de la cassette vérifiée, nous avons donc conçu une analyse RFLP afin d'évaluer le génotype de l'allèle restant dans les souches mutantes. Le but était d'obtenir un profil RFLP différent pour chaque allèle des souches parentales

2.2 Molecular methods

2.2.1 PCR to amplify deletion cassettes to transform



DNA extracted using Wizard genomic DNA purification kit (Promega).

primer identification	sequence	Tm	Gene deletion cassette
P1254	5'TGGCAGAGTTTCAACAGCCA3'	57.3	MCH1_fwd
P1255	5'TGGGATACTTGGTGAATTCCGT3'	58.4	MCH1_rev
P1259	5'TGGTTGCAATTGAAATACCGACA3'	57.1	STR2_fwd
P1260	5'TCATCATCGGGTCTGGCTTG3'	59.4	STR2_rev

Primers used to amplify each gene specific deletion cassette

PCR mix:

- 10 uL iProof buffer,
- 1 µL dntp mix (10 mM)
- 2.5 uL primer forward (20 µM),
- 2.5 uL primer reverse (20 µM),
- 31 µL uL sterile H₂O,
- 1 uL DNA template (50 – 500 mg).
- 0.5 µL iProof Polymerase

PCR program:

MCH1

98 °C 30 s	35x	72 °c 5 min	10 °c infinite
	98 °c 30 s 60 °c 30 s 72 °c 1 min 30 s		

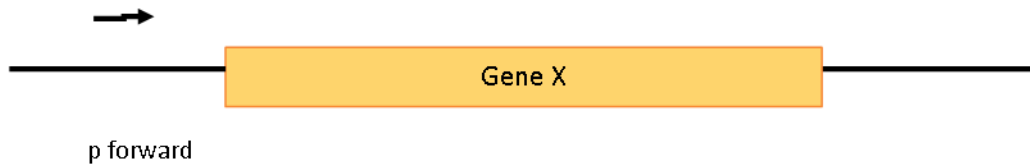
STR2

98 °C 30 s	35x	72 °c 5 min	10 °c infinite
	98 °c 30 s 62 °c 30 s 72 °c 1 min 30 s		

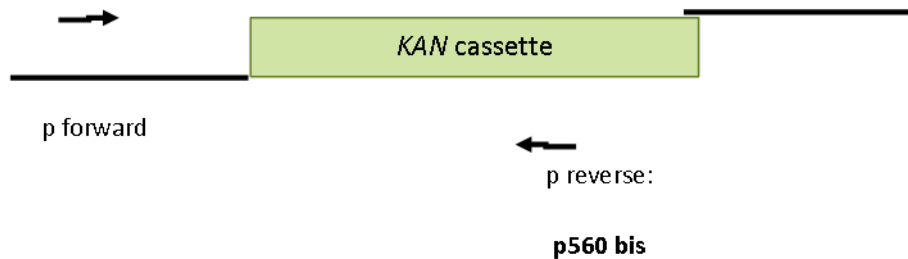
Verification correct amplification on agarose gel 1%

2.2.2 PCR to verify amplification

Before transformation:



After transformation



The PCR verification consist in using one primer at 600pb (approx.) from the deleted gene loci and one primer that will anneal inside the *KAN* cassette. Thus, we verify the correct insertion of the *KAN* cassette in the right loci.

PCR mix:

4ul Taq&GO,

0.1 primer forward (20 μ M),

0.1 primer reverse (20 μ M)

1 μ L DNA template ((50 – 500 mg)

14.8 H₂O.

PCR program (*MCH1* and *STR2*):

95 °c 10 min	35x	72 °c 5 min	10 °c infinite
	95 °c 45 s 54 °c 45 s 72 °c 2 min		

Primer id	sequence	Tm	Gene
P560bis	5'CGGCGCAGGAACACTG3'	56.9	<i>KAN</i> test insertion (Anneals at the middle of the <i>KAN</i> cassette)).
P1256	5'TAGTTCCACCGCCAATGGAT3'	57.3	<i>MCH1</i> test insertion
P1258	5'CCAGCCATGCTTGGGAATAGT3'	57.3	<i>STR2</i> test insertion

Primers used in the verification of the transformation.

Verification in agarose gel 1%.

2.3 RFLP

RFLP to check identity of the remaining allele in the transformant.

PCR to amplify fragment that will be digested.

PCR mix:

4 uL Taq&GO,

0.1 primer forward (20 μM),

0.1 primer reverse (20 μM),

1 uL genomic DNA

14.8 H₂O.

Program:

MCH1

95 °c 10 min	35x	72 °c 5 min	10 °c infinite
	95 °c 45 s 54 °c 45 s 72 °c 2 min		

STR2

95 °c 5 min	35x	72 °c 10 min	10 °c infinite
	95 °c 45 s 57 °c 30 s 72 °c 2 min		

Primers used in the RFLP

P1257	5'TCTCAACCGTGGCAGAAACA3'	57.3	RFLP <i>MCH1</i> forward
P1255	5'TGGGATACTTGGTGAATTCCGT3'	58.4	RFLP <i>MCH1</i> reverse
P1261	5'ACGGTGGTGTGGTAGACCAG3'	59.8	RFLP <i>STR2</i> forward
P1260	5'TCATCATCGGGTCTGGCTTG3'	55.9	RFLP <i>STR2</i> reverse

Digestion. 1 h. Quantities indicated for a final restriction volume of 50 uL. Restrictions conducted in PCR tubes.

Digestions enzymes, T °C, digestions mix for each gene.

Enzyme	Gene	DNA PCR product	Buffer	Enzyme (1U)	H2O	T °c
PVUII	<i>MCH1</i>	2.5	5	0.2	42.3	37 °c
BMR1	<i>STR2</i>	2.5	5	0.2	42.3	37 °c

Verify results in gel agarose 2%. Always SBxGN as controls and one negative control (without DNA).

Theoretical digestion profile:

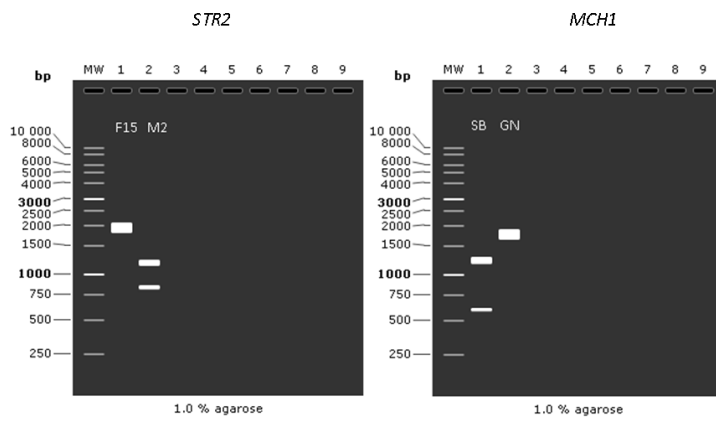


Image generated with SnapGene.

Chapitre 4 : Projets annexes

1 Projets annexes

Au cours de ma thèse j'ai eu l'occasion de participer à deux projets annexes. Ils concernent la cartographie de QTLs pour d'autres phénotypes que ceux présentés jusqu'ici. Ces travaux de cartographie ont été réalisés dans la population de hoSBxGN et sont détaillés brièvement dans cette dernière partie. Ils illustrent les possibilités offertes par la génétique quantitative pour étudier des phénotypes complexes comme l'hétérosis ou les nombreuses interactions levures-bactérie.

1.1 Identification et validation de QTLs impliqués dans l'adaptation de *S. cerevisiae* à la seconde fermentation de vins pétillants.

Ce travail a été conduit par Maria Martí Raga au cours de son travail de thèse qui a été soutenue en octobre 2015. Il a fait l'objet d'une publication scientifique « *Genetic causes of phenotypic adaptation to the second fermentation of sparkling wines in *S. cerevisiae** » publiée dans le journal *G3 : Genes, Genomes, Genetics* (située annexe de cette thèse). Dans ce travail la population hoSBxGN a été utilisée pour cartographier des QTLs liés à des phénotypes de seconde fermentation. La seconde fermentation est un procédé utilisé lors de la fabrication des vins pétillants tels que le Champagne ou le Cava. Elle est réalisée à partir d'un vin de base qui est mis en bouteille avec un ajout de sucre et de levure. Une fermentation démarre alors dans la bouteille et permet l'obtention d'un vin pétillant. Le déroulement de la seconde fermentation appelée prise de mousse se caractérise par des conditions extrêmes : un pH bas, un niveau d'éthanol élevé et une augmentation continue de la pression.

Des QTLs ayant un impact sur la vitesse de la prise de mousse ont été identifiés et l'implication de quatre gènes a été validée (*PMA1*, *MSB2*, *PDR1*, *VMA13*). Deux résultats majeurs sont présentés. Le premier est la dissection d'un QTL expliquant un effet d'hétérosis observé chez l'hybride. Cet effet est lié à la structure du QTL présentant 3 gènes physiquement liés et qui impactent différemment le phénotype. La présence d'allèles favorables chez les deux parents illustre un phénomène de pseudo super dominance. L'autre résultat frappant est l'observation d'un gain de robustesse phénotypique de la souche hybride par rapport aux souches parentales. Ce gain de robustesse est lié à deux allèles dont les effets varient fonction du pH. Il s'agit des allèles de *PMA1* et de *VMA13* qui codent pour des protéines ayant un rôle important dans la régulation du pH intracellulaire. L'allèle SB de *PMA1* est favorable à la vitesse de fermentation dans des conditions de pH bas, l'allèle GN de *VMA13* est favorable dans des conditions de pH élevé. C'est en possédant la combinaison de ces deux allèles complémentaires que l'hybride hoSBxGN possède une plus forte robustesse aux variations de pH que

les deux souches parentales SB et GN. Ma contribution dans ce travail a été l'analyse des SNPs causatifs qui différencient les allèles des quatre gènes validés. Leur polymorphisme génétique au sein de 97 souches entièrement séquencées et accessibles publiquement a été calculée et l'effet potentiel de ces SNPs sur les structures des protéines évalué (Fig 5, Article annexe). De manière intéressante, deux des gènes identifiés pour la vitesse de seconde fermentation (*PMA1* et *MSB2*) ont aussi été identifiés dans la cartographie de QTL menée durant ma thèse pour la production maximale de CO₂ (*CO2max*). Cela met en lumière un lien entre ces deux phénotypes fondamentalement assez proche.

1.2 Identification de QTLs liés à des mécanismes d'interaction levure-bactérie

Ce travail fait partie de la thèse de Louise Bartle qui est en cours de réalisation à l'Université d'Adélaïde sous la direction de Vladimir Jiranek. Dans la très grande majorité des vins rouges et certains vins blancs, les bactéries de l'espèce *Oenococcus oeni* réalisent une seconde fermentation dite malolactique qui modifie l'équilibre acide des vins. Cette fermentation a lieu après la fermentation alcoolique et peut être initiée en utilisant des levains industriels inoculés dans le vin ou dans le moût en fermentation. Cependant le succès d'implantation des bactéries dans le vin demeure incertain surtout dans des conditions extrêmes (pH faible, présence de SO₂, degré alcoolique fort). Le succès de cette fermentation dépend aussi fortement de la souche de levure qui effectue la fermentation alcoolique (Fig 45). Au cours sa thèse Louise, s'intéresse aux mécanismes d'interaction entre levure et bactéries. Dans une expérience réalisée à l'Université d'Adélaïde Elle a réalisé des fermentations avec des descendants de hoSBxGN dans laquelle une souche de bactérie a été ajoutée. Ces expériences réalisées sur du jus de raisin miment une co-inoculation. La Fig 45 indique les cinétiques de consommation de l'acide malique par une même souche d'*O. oeni* inoculée avec différents descendants. Une cartographie de QTL a pu être réalisée sur ce phénotype et a permis l'identification de QTLs qui expliquent l'impact de la levure sur le déroulement de la fermentation malolactique par *O. oeni*. Ma contribution à ce travail a été de guider Louise dans la cartographie de QTLs en mettant à disposition les scripts informatiques réalisés au cours de cette thèse.

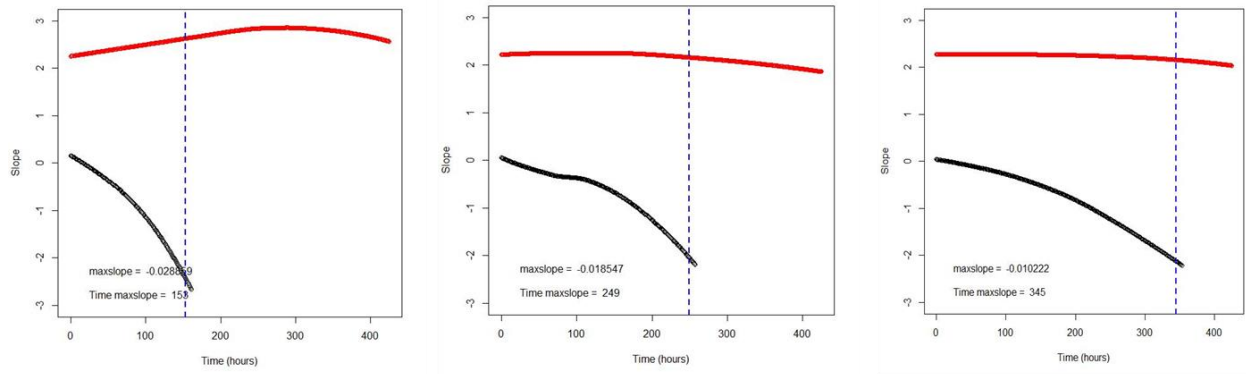


Fig 45 Effet levure sur le déroulement de la fermentation malolactique

Évolution de la vitesse de consommation de l'acide malique dans un moût après l'inoculation d'une souche de levure seule (en rouge), ou de son inoculation avec une souche d'*O. oeni* (en noir). Chaque panel montre une souche de levure différente inoculée avec la même souche d'*O. oeni*. Le déroulement de la fermentation malolactique par *O. oeni* est fortement affecté par la souche de levure avec laquelle elle est inoculée. Par exemple ici sa durée varie entre 158 et 345 h.

Conclusions et Perspectives

1 Conclusions

A la fin de ce travail de trois ans plusieurs constats peuvent être dressés sur le plan méthodologique ainsi que sur celui des connaissances acquises et sur leur diffusion dans la communauté scientifique.

Sur le plan de la méthodologie expérimentale nous retiendrons qu'une nouvelle méthode de phénotypage a été développée et validée. Elle permet de mesurer des traits liés aux performances fermentaires des levures pour plus de 250 individus simultanément. L'exploitation de cette méthode a notamment permis :

- L'étude de la réponse phénotypique des souches parentales à plusieurs paramètres environnementaux.
- La caractérisation phénotypique de 35 souches d'origine industrielle dans cinq moûts différents.
- Le phénotypage de 270 individus dans trois conditions environnementales afin d'étudier les interactions Gène x environnement par une approche de cartographie de QTLs.
- La réalisation de tests phénotypiques permettant de valider l'effet de variations génétiques chez des hybrides hémizygotes ou présentant différents mitotypes.

Sur le plan des connaissances acquises le travail présenté montre pour la première fois l'importance de l'environnement sur le déterminisme génétique des caractères œnologiques. L'objectif fixé était d'identifier des QTLs qui expliquent une part de la plasticité phénotypique, il a été pleinement atteint.

- La vaste cartographie de QTLs menée sur deux descendances dans trois conditions environnementales a permis :
 - D'identifier près de 120 nouveaux QTLs contrôlant un ou plusieurs caractères d'intérêts œnologiques. Parmi ces QTLs certains expliquent la plasticité phénotypique des individus étudiés et sont à l'origine d'une part importante de la norme de réaction observée. L'un de ces QTLs a été validé au niveau moléculaire.
 - De démontrer que les QTL sont majoritairement (~70 %) robustes aux deux variations de milieu étudié, c'est à dire la nature du moût et sa micro-oxygénation.
 - De souligner la forte influence de facteurs génétiques non-mendéliens sur le déterminisme de caractères complexes.
 - De montrer que les distances génétiques et phénotypiques entre les souches parentales impactait de manière relativement limitée la détection et le poids des régions contrôlant des caractères quantitatifs.

Cette vaste étude ouvre des champs d'investigation très importants qui permettront de mieux comprendre la fonction de certains gènes et de leurs variations alléliques dans le cadre de la fermentation alcoolique du jus de raisin. Dans cet esprit, la validation moléculaire de certains des QTLs a été entreprise.

- L'effet de quatre QTLs sur la consommation d'acide malique a été validé moléculairement. Un brevet visant à protéger le droit d'utiliser les marqueurs génétiques associé est en cours de rédaction.
- L'effet de quatre QTLs sur la production de SO₂ a été validé moléculairement (translocations XIII-t-XVI et XV-t-XVI, *MCH1* et *STR2*).
- Un *trade-off* métabolique potentiel entre la production de SO₂ et celle d'acide acétique a été identifié.

Sur le plan de la diffusion des connaissances ce travail a donné lieu à 3 articles rédigés. Le premier dans le cadre d'une participation à la thèse de Maria Marti Raga a été publié en 2017 dans la revue G3. Un second est actuellement en révision dans la revue PLOS ONE. Un troisième vient d'être soumis à la revue PLOS Genetics. Par ailleurs les bases d'un travail de revue bibliographique ont été posées visant à récapituler les SNPs d'intérêt biotechnologiques décrits dans la littérature. Les résultats partiels de cette thèse ont été diffusés dans deux oraux à des congrès internationaux LMO12 et ISSY33.

L'implémentation de toutes ces analyses a enfin permis de mettre au point de nombreux scripts informatiques qui seront utiles aux futurs étudiants et personnel du laboratoire.

2 Perspectives

2.1 Repousser les limites de la variabilité génétique du système biparental

Avec l'identification d'un nombre similaire de QTLs non redondants entre les deux croisements SBxGN et M2xF15, les résultats de cette thèse montrent qu'un réservoir important de variations alléliques naturelles ayant un effet sur des traits technologiques ségrégent au sein de la population des souches de vins. Bien que la variabilité génétique considérée ait été élargie en utilisant deux descendance, ce qui a permis de quasiment doubler le nombre de QTLs identifiés, une grande part de ce réservoir de variations alléliques est ignorée. C'est une limite imposée par les constructions de populations avec deux souches parentales.

Cette limite est importante lorsqu'on constate que la courbe qui décrit le mieux la distribution du nombre de QTLs en fonction de leur effet est une courbe exponentielle décroissante avec quelques QTLs majeurs qui ont des effets forts et un nombre important de QTLs mineurs qui expliquent le reste de la variance (Dilda and Mackay, 2002; Shrimpton and Robertson, 1988) (Fig 46, panel A). Ce type de répartition est également observé avec nos données en considérant l'effet de l'ensemble les QTLs identifiés dans l'Article 2 (Fig 46, panel B). Avec l'objectif d'identifier des QTLs pour leur exploitation dans des programmes de Sélection Assistée par Marqueurs, les QTLs les plus intéressants à identifier sont les QTLs majeurs qui ont des répercussions importantes et robustes sur le trait à améliorer. Lorsque deux souches parentales sont sélectionnées pour la construction d'un croisement, c'est seulement un échantillon pris aléatoirement dans l'ensemble des variations génétiques de la population totale qui est considéré. Les chances que les QTLs majeurs qui contrôlent ce trait soient présents parmi ce sous-ensemble de variations génétiques sont réduites puisqu'il s'agit des QTLs les plus rares.

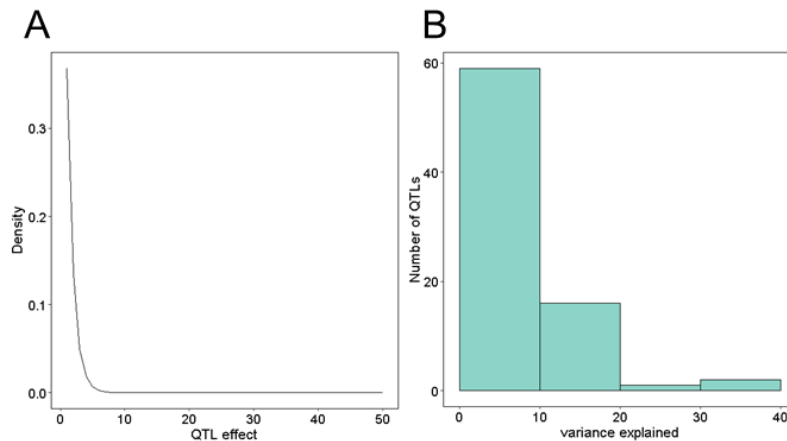


Fig 46 Distribution des QTLs en fonction de leur effet

Panel A. Représentation schématique de la distribution des QTLs en fonction de leur effet. **Panel B.** Distribution des 77 QTLs identifiés dans l'Article 2 en fonction de leur effet.

Afin de dépasser cette limite, l'objectif serait de pouvoir disposer d'une population qui possède la richesse génétique d'une population naturelle sans avoir ses défauts potentiels qui sont ceux qui limitent l'utilisation de la génétique d'association (population structurée fréquences alléliques faibles). Pour cela des stratégies de construction de croisement avec plusieurs souches parentales ont été initiés chez la drosophile (Long et al., 2014), la souris (Bogue et al., 2015; Durrant et al., 2011), les plantes (Huang et al., 2011; Kover et al., 2009), et la levure (Cubillos et al., 2013). Parmi ces organismes la levure peut tirer parti d'être un organisme facile à croiser avec la possibilité de générer une vaste descendance. Dans le travail rapporté par (Cubillos et al., 2013) une descendance a été construite à partir de quatre souches parentales. Ces souches parentales ont été sélectionnées par rapport à l'ensemble de la diversité des souches de *S. cerevisiae* et sont représentatives de quatre grands groupes génétiques identifiés chez cette espèce (Fig 47). Avec cette construction 64 % des SNPs identifiés dans la population de *S. cerevisiae* ségrégent dans la descendance (Cubillos et al., 2013). La construction d'une descendance similaire avec des souches parentales sélectionnées parmi les souches de vin permettrait d'étudier une part importante de leur variabilité et d'identifier d'autres QTLs majeurs qui expliquent leur différence technologique.

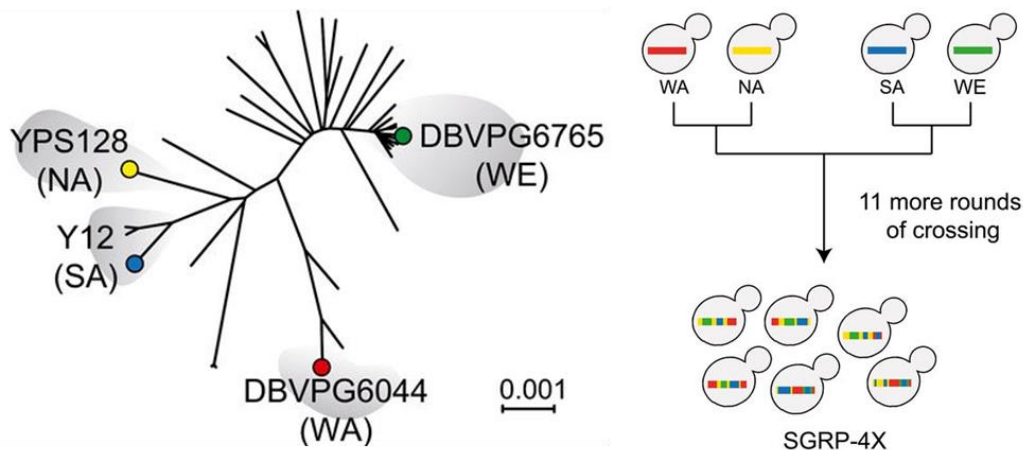


Fig 47 Croisement utilisant quatre souches parentales
D'après (Cubillos et al., 2013)

2.2 La robustesse des QTLs à l'environnement et au fonds génétique

L'écueil possible d'un QTL est que son effet soit spécifique à une condition environnementale ou à un fonds génétique particulier. Dans ce cas le QTL est difficilement exploitable dans des programmes de SAM. Au cours de cette thèse le dispositif expérimental mis en place a permis d'évaluer le niveau de robustesse de l'effet des QTLs face à deux moûts distincts et deux niveaux de micro-oxygénation.

En revanche, l'effet des QTLs en fonction du fonds génétique (expressivité) n'a pas été évalué. De manière formelle l'expressivité d'un QTL peut être évaluée avec un remplacement allélique (voir revue bibliographique, p 29) sur plusieurs souches. Par exemple, l'apport d'un allèle favorable dans un fonds génétique peut être vérifié en l'incorporant dans une souche qui possède l'allèle défavorable. Chez la levure l'expressivité des QTLs a rarement été évaluée. Cela a été fait dans un travail rapporté par (Sinha et al., 2006) dans lequel la souche S288c a été croisée avec 10 autres souches pour créer des hybrides hétérozygotes aux locus des trois QTLs qui étaient considérés. La construction d'hybrides hémizygotés réciproques a permis d'évaluer l'effet de ces QTLs dans le fonds génétique de ces dix hybrides. Cette analyse a montré que les variations d'effets des QTLs pouvaient être très fortes puisque les allèles étudiés ont des effets opposés en fonction du fonds génétique. Ainsi un allèle favorable dans un fonds génétique peut être défavorable dans un autre. Cela illustre la nécessité de tester l'expressivité des QTLs identifiés.

Même si la levure est un organisme facilement modifiable génétiquement, le remplacement allélique d'un grand nombre de souches reste un investissement lourd en temps. L'émergence des techniques

d'édition génomique basées sur l'outil CRISPR-Cas9 pourrait permettre d'effectuer ce type de test plus facilement (Bao et al., 2015). Dans cette optique, le développement de cette technique au laboratoire a été initié. Elle permettra d'évaluer l'apport des allèles favorables identifiés dans des souches non optimales.

2.2.1 Mise en place de la SAM

En parallèle de ma thèse, une stratégie de sélection assistée par marqueurs a été initiée en utilisant dix QTLs identifiés pour un trait T dans les deux croisements (SBxGN et M2xF15). Le génotype des descendants issus des deux croisements a été évalué par rapport à ces QTLs. Cela a permis de sélectionner dans chaque croisement un descendant ayant hérité de la meilleure combinaison allélique. Les deux descendants ainsi sélectionnés ont été croisés pour obtenir un hybride regroupant l'ensemble de ces allèles favorables. Afin d'obtenir des souches homozygotes à ces locus, 1000 ségrégants ont été générés depuis cet hybride. Ils ont été génotypés par une stratégie de *Kompetitive Allele Specific PCR* (KASP). En sélectionnant les clones ayant hérités de l'ensemble des QTL favorables pour ce trait T , nous avons l'intention d'obtenir des individus extrêmes. L'introgression de ces marqueurs pourra être réalisée dans d'autres fonds génétiques avec la réalisation de *backcross* successifs couplés à des étapes de génotypage. Ces premiers travaux, constituent le schéma type d'une sélection assistée par marqueur.

Références

A

- Agrawal, A.A. (2001). Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species. *Science* 294, 321–326.
- Albertin, W., and Marullo, P. (2012). Polyploidy in fungi: evolution after whole-genome duplication. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 2497–2509.
- Albertin, W., Marullo, P., Aigle, M., Dillmann, C., Vienne, D. de, Bely, M., and Sicard, D. (2011). Population Size Drives Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Alcoholic Fermentation and Is under Genetic Control. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2772–2784.
- Albertin, W., Silva, T. da, Rigoulet, M., Salin, B., Masneuf-Pomarede, I., Vienne, D. de, Sicard, D., Bely, M., and Marullo, P. (2013). The Mitochondrial Genome Impacts Respiration but Not Fermentation in Interspecific *Saccharomyces* Hybrids. *PLOS ONE* 8, e75121.
- Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., and Bely, M. (2014). Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLoS ONE* 9, e94246.
- Albertin, W., Chernova, M., Durrens, P., Guichou, E., Sherman, D., Masneuf-Pomarede, I., and Marullo, P. (2017). Many interspecific chromosomal introgressions are highly prevalent in Holarctic *Saccharomyces uvarum* strains found in human-related fermentations. *Yeast* Chichester Engl.
- Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarrea, J.-L., Goma, G., Molina-Jouve, C., and Guillouet, S.E. (2004). Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 537–542.
- Almeida, P., Gonçalves, C., Teixeira, S., Libkind, D., Bontrager, M., Masneuf-Pomarede, I., Albertin, W., Durrens, P., Sherman, D.J., Marullo, P., et al. (2014). A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum*. *Nat. Commun.* 5, 4044.
- Almeida, P., Barbosa, R., Zalar, P., Imanishi, Y., Shimizu, K., Turchetti, B., Legras, J.-L., Serra, M., Dequin, S., Couloux, A., et al. (2015). A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication. *Mol. Ecol.* 24, 5412–5427.
- Ambroset, C., Petit, M., Brion, C., Sanchez, I., Delobel, P., Guérin, C., Chiapello, H., Nicolas, P., Bigey, F., Dequin, S., et al. (2011). Deciphering the molecular basis of wine yeast fermentation traits using a combined genetic and genomic approach. *G3 Bethesda Md* 1, 263–281.
- Anderson, R.G., and Kirsop, B.H. (1975). Oxygen as a Regulator of Ester Accumulation During the Fermentation of Wort of High Specific Gravity. *J. Inst. Brew.* 81, 111–115.
- Annaluru, N., Muller, H., Mitchell, L.A., Ramalingam, S., Stracquadanio, G., Richardson, S.M., Dymond, J.S., Kuang, Z., Scheifele, L.Z., Cooper, E.M., et al. (2014). Total Synthesis of a Functional Designer Eukaryotic Chromosome. *Science* 344, 55–58.
- Ansel, J., Bottin, H., Rodriguez-Beltran, C., Damon, C., Nagarajan, M., Fehrmann, S., Francois, J., and Yvert, G. (2008). Cell-to-cell stochastic variation in gene expression is a complex genetic trait. *PLoS Genet.* 4, e1000049.

Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., and Adler, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* *16*, 2179–2187.

Antalick, G., Perello, M.-C., and de Revel, G. (2010). Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* *121*, 1236–1245.

Aubin-Horth, N., and Renn, S.C.P. (2009). Genomic reaction norms: using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. *Mol. Ecol.* *18*, 3763–3780.

Aulchenko, Y.S., Ripke, S., Isaacs, A., Duijn, V., and M, C. (2007). GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics* *23*, 1294–1296.

B

Bao, Z., Xiao, H., Liang, J., Zhang, L., Xiong, X., Sun, N., Si, T., and Zhao, H. (2015). Homology-Integrated CRISPR–Cas (HI-CRISPR) System for One-Step Multigene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.* *4*, 585–594.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* *153*, 243–259.

Barbe, J.-C., de Revel, G., Joyeux, A., Lonvaud-Funel, A., and Bertrand, A. (2000). Role of Carbonyl Compounds in SO₂ Binding Phenomena in Musts and Wines from Botrytized Grapes. *J. Agric. Food Chem.* *48*, 3413–3419.

Bean, G.J., Jaeger, P.A., Bahr, S., and Ideker, T. (2014). Development of ultra-high-density screening tools for microbial genomics. *PloS One* *9*, e85177.

Beck, T., Hastings, R.K., Gollapudi, S., Free, R.C., and Brookes, A.J. (2014). GWAS Central: a comprehensive resource for the comparison and interrogation of genome-wide association studies. *Eur. J. Hum. Genet.* *22*, 949–952.

Bell, S.-J., and Henschke, P.A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* *11*, 242–295.

Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., and Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* *25*, 287–293.

Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D., Guillamon, J.M., Mas, A., François, J., and Rozes, N. (2006). Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Res.* *6*, 1167–1183.

Bely, M., Sablayrolles, J.M., and Barre, P. (1990). Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *Am. J. Enol. Vitic.* *41*, 319–324.

Bely, M., Rinaldi, A., and Dubourdieu, D. (2003). Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* *96*, 507–512.

Ben-Ari, G., Zenvirth, D., Sherman, A., David, L., Klutstein, M., Lavi, U., Hillel, J., and Simchen, G. (2006). Four Linked Genes Participate in Controlling Sporulation Efficiency in Budding Yeast. *PLoS Genet.* *2*.

- Berthels, N.J., Cordero Otero, R.R., Bauer, F.F., Thevelein, J.M., and Pretorius, I.S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 4, 683–689.
- Bertrand, A., and Torres-Alegre, V. (1984). Influence of oxygen added to grape must on the synthesis of secondary products of the alcoholic fermentation. *Sci. Aliments.*
- Bhatia, A., Yadav, A., Zhu, C., Gagneur, J., Radhakrishnan, A., Steinmetz, L.M., Bhanot, G., and Sinha, H. (2014). Yeast Growth Plasticity Is Regulated by Environment-Specific Multi-QTL Interactions. *G3* 4, 769–777.
- Bisson, L.F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 107–119.
- Blateyron, L., and Sablayrolles, J.M. (2001). Stuck and slow fermentations in enology: Statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 184–189.
- Blomberg, A., and Adler, L. (1992). Physiology of Osmotolerance in Fungi. This review is dedicated to Professor Birgitta Norkrans who introduced us to this field of science. In *Advances in Microbial Physiology*, A.H. Rose, ed. (Academic Press), pp. 145–212.
- Blondin, B., NOBLE, J., Sanchez, I., Agronomique, I.N.D.L.R., and Supagro), C.I.D.S.E.S.A. (Montpellier (2013). Méthode de contrôle de la production de sulfites, d'hydrogène sulfuré et d'acétaldéhyde par des levures.
- Bloom, J.S., Ehrenreich, I.M., Loo, W.T., Lite, T.-L.V., and Kruglyak, L. (2013). Finding the sources of missing heritability in a yeast cross. *Nature* 494, 234–237.
- Bogue, M.A., Churchill, G.A., and Chesler, E.J. (2015). Collaborative Cross and Diversity Outbred data resources in the Mouse Phenome Database. *Mamm. Genome* 26, 511–520.
- Bohlscheid, J. c., Fellman, J. k., Wang, X. d., Ansen, D., and Edwards, C. g. (2007). The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 102, 390–400.
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., and Mills, D.A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E139–48.
- Börlin, M., Venet, P., Claisse, O., Salin, F., Legras, J.-L., and Masneuf-Pomarede, I. (2016). Cellar-Associated *Saccharomyces cerevisiae* Population Structure Revealed High-Level Diversity and Perennial Persistence at Sauternes Wine Estates. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2909–2918.
- Borneman, A.R., Desany, B.A., Riches, D., Affourtit, J.P., Forgan, A.H., Pretorius, I.S., Egholm, M., and Chambers, P.J. (2011). Whole-Genome Comparison Reveals Novel Genetic Elements That Characterize the Genome of Industrial Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 7, e1001287.
- Borneman, A.R., Zeppel, R., Chambers, P.J., Curtin, C.D., Curtin, C., Bellon, J., Henschke, P., Godden, P., Lopes, M. de B., Bokulich, N., et al. (2014). Insights into the *Dekkera bruxellensis* Genomic Landscape: Comparative Genomics Reveals Variations in Ploidy and Nutrient Utilisation Potential amongst Wine Isolates. *PLoS Genet.* 10, e1004161.
- Borneman, A.R., Forgan, A.H., Kolouchova, R., Fraser, J.A., and Schmidt, S.A. (2016). Whole Genome Comparison Reveals High Levels of Inbreeding and Strain Redundancy Across the Spectrum of Commercial Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 Bethesda Md* 6, 957–971.

- Borst, P., and Grivell, L.A. (1978). The mitochondrial genome of yeast. *Cell* 15, 705–723.
- Botstein, D., and Fink, G.R. (2011). Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Genetics* 189, 695–704.
- Botstein, D., Chervitz, S.A., and Cherry, M. (1997). Yeast as a Model Organism. *Science* 277, 1259–1260.
- Brem, R.B., Yvert, G., Clinton, R., and Kruglyak, L. (2002). Genetic Dissection of Transcriptional Regulation in Budding Yeast. *Science* 296, 752–755.
- Brice, C., Sanchez, I., Bigey, F., Legras, J.-L., and Blondin, B. (2014). A genetic approach of wine yeast fermentation capacity in nitrogen-starvation reveals the key role of nitrogen signaling. *BMC Genomics* 15, 495.
- Brion, C., Ambroset, C., Sanchez, I., Legras, J.-L., and Blondin, B. (2013). Differential adaptation to multi-stressed conditions of wine fermentation revealed by variations in yeast regulatory networks. *BMC Genomics* 14, 681.
- Broman, K.W., Wu, H., Sen, Ś., and Churchill, G.A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19, 889–890.
- Buescher, W.A., Siler, C.E., Morris, J.R., Threlfall, R.T., Main, G.L., and Cone, G.C. (2001). High Alcohol Wine Production from Grape Juice Concentrates. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 345–351.
- Burton, R.S., Byrne, R.J., and Rawson, P.D. (2007). Three divergent mitochondrial genomes from California populations of the copepod *Tigriopus californicus*. *Gene* 403, 53–59.
- Butler, G., Kenny, C., Fagan, A., Kurischko, C., Gaillardin, C., and Wolfe, K.H. (2004). Evolution of the MAT locus and its Ho endonuclease in yeast species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1632–1637.

C

- Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., and Dequin, S. (2011). Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: Evidence for origin-dependent metabolic traits. *PLoS ONE* 6.
- Campbell, D.R., and Waser, N.M. (2001). Genotype-by-environment interaction and the fitness of plant hybrids in the wild. *Evolution* 55, 669–676.
- Campbell-Sills, H., El Khoury, M., Favier, M., Romano, A., Biasioli, F., Spano, G., Sherman, D.J., Bouchez, O., Coton, E., Coton, M., et al. (2015). Phylogenomic Analysis of *Oenococcus oeni* Reveals Specific Domestication of Strains to Cider and Wines. *Genome Biol. Evol.* 7, 1506–1518.
- Campitelli, B.E., Des Marais, D.L., and Juenger, T.E. (2016). Ecological interactions and the fitness effect of water-use efficiency: Competition and drought alter the impact of natural MPK12 alleles in *Arabidopsis*. *Ecol. Lett.* 19, 424–434.
- Carrau, F.M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P. a., and Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: Effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res.* 8, 1196–1207.

- Carreté, R., Vidal, M.T., Bordons, A., and Constantí, M. (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol. Lett.* *211*, 155–159.
- Cavaliere, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R., and Polsinelli, M. (2003). Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.* *57 Suppl 1*, S226–32.
- Ceccarelli, S., Erskine, W., Hamblin, J., and Grando, S. (1994). Genotype by Environment Interaction and International Breeding Programmes. *Exp. Agric.* *30*, 177–187.
- Chant, J., and Pringle, J.R. (1995). Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *129*, 751–765.
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., and Henschke, P.A. (1998). Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* *49*, 283–288.
- Chen, X., Zhao, F., and Xu, S. (2010). Mapping environment-specific quantitative trait loci. *Genetics* *186*, 1053–1066.
- Cherry, J.M., Ball, C., Weng, S., Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwight, S., Riles, L., Mortimer, R.K., et al. (1997). Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *387*, 67–73.
- Chiang, G.C.K., Bartsch, M., Barua, D., Nakabayashi, K., Debieu, M., Kronholm, I., Koornneef, M., Soppe, W.J.J., Donohue, K., and De MEAUX, J. (2011). *DOG1* expression is predicted by the seed-maturation environment and contributes to geographical variation in germination in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Ecol.* *20*, 3336–3349.
- Choi, Y., and Chan, A.P. (2015). PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* *31*, 2745–2747.
- Churchill, G.A., and Doerge, R.W. (1994). Empirical Threshold Values for Quantitative Trait Mapping. *Genetics* *138*, 963–971.
- Coi, A.L., Bigey, F., Mallet, S., Marsit, S., Zara, G., Gladieux, P., Galeote, V., Budroni, M., Dequin, S., and Legras, J.L. (2017). Genomic signatures of adaptation to wine biological aging conditions in biofilm-forming flor yeasts. *Mol. Ecol.*
- Colombié, S., Malherbe, S., and Sablayrolles, J.M. (2005). Modeling alcoholic fermentation in enological conditions: Feasibility and interest. *Am. J. Enol. Vitic.* *56*, 238–245.
- Connelly, C.F., and Akey, J.M. (2012). On the Prospects of Whole-Genome Association Mapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *191*, 1345–1353.
- Cordente, A.G., Heinrich, A., Pretorius, I.S., and Swiegers, J.H. (2009). Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res.* *9*, 446–459.
- Cottrell, T.H.E., and Lellan, M.R.M. (1986). The Effect of Fermentation Temperature on Chemical and Sensory Characteristics of Wines from Seven White Grape Cultivars Grown in New York State. *Am. J. Enol. Vitic.* *37*, 190–194.
- Cromie, G.A., Hyma, K.E., Ludlow, C.L., Garmendia-Torres, C., Gilbert, T.L., May, P., Huang, A.A., Dudley, A.M., and Fay, J.C. (2013). Genomic Sequence Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Assessed by RAD-seq. *G3* *3*, 2163–2171.

Cubillos, F. a., Billi, E., ZÖrgÖ, E., Parts, L., Fargier, P., Omholt, S., Blomberg, A., Warringer, J., Louis, E.J., and Liti, G. (2011). Assessing the complex architecture of polygenic traits in diverged yeast populations. *Mol. Ecol.* *20*, 1401–1413.

Cubillos, F.A., Parts, L., Salinas, F., Bergström, A., Scovacricchi, E., Zia, A., Illingworth, C.J.R., Mustonen, V., Ibstedt, S., Warringer, J., et al. (2013). High-resolution mapping of complex traits with a four-parent advanced intercross yeast population. *Genetics* *195*, 1141–1155.

Cubillos, F.A., Brice, C., Molinet, J., Tisné, S., Abarca, V., Tapia, S.M., Oporto, C., García, V., Liti, G., and Martínez, C. (2017). Identification of Nitrogen Consumption Genetic Variants in Yeast Through QTL Mapping and Bulk Segregant RNA-Seq Analyses. *G3 Genes Genomes Genet.* *7*, 1693–1705.

Cuello, R.A., Flores Montero, K.J., Mercado, L.A., Combina, M., and Ciklic, I.F. (2017). Construction of low-ethanol–wine yeasts through partial deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* PDC2 gene. *AMB Express* *7*, 67.

D

Da Silva, T. (2014). Exploration du phénomène d’heterosis chez deux espèces de levure d’oenologie : *Saccharomyces cerevisiae* et *S. uvarum*.

Damerval, C., Maurice, A., Josse, J., and Vienne, D. De (1994). Quantitative Trait Loci Underlying Gene Product Variation : *Gene Expr.* *301*, 289–301.

Deak, T. (2009). Ecology and Biodiversity of Yeasts with Potential Value in Biotechnology. In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, G. E. Kunze, and T. Satyanarayana, eds. (Springer Netherlands), pp. 151–168.

Delcourt, F., Taillandier, P., Vidal, F., and Strehaiano, P. (1995). Influence of pH, malic acid and glucose concentrations on malic acid consumption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *43*, 321–324.

Delfini, C., and Cervetti, F. (1991). Metabolic and technological factors affecting acetic acid production by yeasts during alcoholic fermentation (Fraund).

Demogines, A., Smith, E., Kruglyak, L., and Alani, E. (2008). Identification and Dissection of a Complex DNA Repair Sensitivity Phenotype in Baker’s Yeast. *PLoS Genet* *4*, e1000123.

Dequin, S. (2001). The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *56*, 577–588.

Deutschbauer, A.M., and Davis, R.W. (2005). Quantitative trait loci mapped to single-nucleotide resolution in yeast. *Nat. Genet.* *37*, 1333–1340.

Deytieux, C., Mussard, L., Biron, M.-J., and Salmon, J.-M. (2005). Fine measurement of ergosterol requirements for growth of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *68*, 266–271.

Diao, L., and Chen, K.C. (2012). Local Ancestry Corrects for Population Structure in *Saccharomyces cerevisiae* Genome-Wide Association Studies. *Genetics* *192*, 1503–1511.

Diezmann, S., and Dietrich, F.S. (2011). Oxidative Stress Survival in a Clinical *Saccharomyces cerevisiae* Isolate Is Influenced by a Major Quantitative Trait Nucleotide. *Genetics* *188*, 709–722.

- Dilda, C.L., and Mackay, T.F.C. (2002). The genetic architecture of *Drosophila* sensory bristle number. *Genetics* *162*, 1655–1674.
- Dimitrov, L.N., Brem, R.B., Kruglyak, L., and Gottschling, D.E. (2009). Polymorphisms in Multiple Genes Contribute to the Spontaneous Mitochondrial Genome Instability of *Saccharomyces cerevisiae* S288C Strains. *Genetics* *183*, 365–383.
- Divol, B., Toit, M. du, and Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *95*, 601–613.
- Dixon, A.F.G. (1977). Aphid Ecology: Life Cycles, Polymorphism, and Population Regulation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* *8*, 329–353.
- Dohlman, H.G., and Slessareva, J.E. (2006). Pheromone Signaling Pathways in Yeast. *Sci STKE* *2006*, cm6-cm6.
- Dufour, M., Zimmer, A., Thibon, C., and Marullo, P. (2013). Enhancement of volatile thiol release of *Saccharomyces cerevisiae* strains using molecular breeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *97*, 5893–5905.
- Duitama, J., Sánchez-Rodríguez, A., Goovaerts, A., Pulido-Tamayo, S., Hubmann, G., Foulquié-Moreno, M.R., Thevelein, J.M., Verstrepen, K.J., and Marchal, K. (2014). Improved linkage analysis of Quantitative Trait Loci using bulk segregants unveils a novel determinant of high ethanol tolerance in yeast. *BMC Genomics* *15*, 207.
- Dujon, B. (1981). Mitochondrial Genetics and Functions. *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.* *11A*, 505–635.
- Dujon, B. (2006). Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends Genet.* *22*, 375–387.
- Dujon, B. (2010). Yeast evolutionary genomics. *Nat Rev Genet* *11*, 512–524.
- Dunn, B., Levine, R.P., and Sherlock, G. (2005). Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC Genomics* *6*, 53.
- Durrant, C., Tayem, H., Yalcin, B., Cleak, J., Goodstadt, L., Villena, F.P.-M. de, Mott, R., and Iraqi, F.A. (2011). Collaborative Cross mice and their power to map host susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infection. *Genome Res.* *21*, 1239–1248.
- Dyer, P.S., and O’Gorman, C.M. (2012). Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol. Rev.* *36*, 165–192.

E

- El-Soda, M., Malosetti, M., Zwaan, B.J., Koornneef, M., and Aarts, M.G.M. (2014). Genotype ?? environment interaction QTL mapping in plants: Lessons from *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* *19*, 390–398.
- Eschenbruch, R., Cresswell, K.J., Fisher, B.M., and Thornton, R.J. (1982). Selective hybridisation of pure culture wine yeasts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* *14*, 155–158.

Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., and Ferreira, V. (2007). Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4501–4510.

Eustace, R., and Thornton, R.J. (1987). Selective hybridization of wine yeasts for higher yields of glycerol. *Can. J. Microbiol.* 33, 112–117.

Ezov, T.K., Boger-Nadjar, E., Frenkel, Z., Katsperovski, I., Kemeny, S., Nevo, E., Korol, A., and Kashi, Y. (2006). Molecular-Genetic Biodiversity in a Natural Population of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* From “Evolution Canyon”: Microsatellite Polymorphism, Ploidy and Controversial Sexual Status. *Genetics* 174, 1455–1468.

F

Faria-Oliveira, F., Puga, S., and Ferreira, C. (2013). Yeast: World’s Finest Chef.

Fay, J.C., and Benavides, J. a. (2005). Evidence for domesticated and wild populations of *saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 1, 0066–0071.

Feinberg, A.P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447, 433–440.

Filleton, F., Chuffart, F., Nagarajan, M., Bottin-Duplus, H., and Yvert, G. (2015). The complex pattern of epigenomic variation between natural yeast strains at single-nucleosome resolution. *Epigenetics Chromatin* 8, 26.

Fogel, S., and Welch, J.W. (1982). Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 5342–5346.

Fornairon-Bonnefond, C., Demaretz, V., Rosenfeld, E., and Salmon, J.-M. (2002). Oxygen addition and sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 176–182.

Fornairon-Bonnefond, C., Aguera, E., Deytieux, C., Sablayrolles, J.-M., and Salmon, J.-M. (2003). Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. *J. Biosci. Bioeng.* 95, 496–503.

Forsberg, S.K.G., Bloom, J.S., Sadhu, M.J., Kruglyak, L., and Carlborg, Ö. (2017). Accounting for genetic interactions improves modeling of individual quantitative trait phenotypes in yeast. *Nat. Genet.* 49, ng.3800.

Foss, E.J., Radulovic, D., Shaffer, S. a, Ruderfer, D.M., Bedalov, A., Goodlett, D.R., and Kruglyak, L. (2007). Genetic basis of proteome variation in yeast. *Nat. Genet.* 39, 1369–1375.

Freedman, B.J. (1980). Sulphur dioxide in foods and beverages: Its use as a preservative and its effect on asthma. *Br. J. Dis. Chest* 74, 128–134.

G

- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S., and Fink, G.R. (1999). Ploidy Regulation of Gene Expression. *Science* 285, 251–254.
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., et al. (2016). Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell* 166, 1397–1410.e16.
- Gao, C., and Fleet, G.H. (1988). The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 405–409.
- García-Ríos, E., Morard, M., Parts, L., Liti, G., and Guillamón, J.M. (2017). The genetic architecture of low-temperature adaptation in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 18, 159.
- Gardner, N., Rodrigue, N., and Champagne, C.P. (1993). Combined effects of sulfites, temperature, and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2022–2028.
- Gawel, R., Sluyter, S.V., and Waters, E.J. (2007a). The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 13, 38–45.
- Gawel, R., Francis, L., and Waters, E.J. (2007b). Statistical Correlations between the In-Mouth Textural Characteristics and the Chemical Composition of Shiraz Wines. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2683–2687.
- Gerke, J., Lorenz, K., and Cohen, B. (2009). Genetic Interactions Between Transcription Factors Cause Natural Variation in Yeast. *Science* 323, 498–501.
- Gerke, J., Lorenz, K., Ramnarine, S., and Cohen, B. (2010). Gene–Environment Interactions at Nucleotide Resolution. *PLOS Genet.* 6, e1001144.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., et al. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, nature00935.
- Gibbons, J.G., and Rinker, D.C. (2015). The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 35, 1–8.
- Gietz, R.D., and Schiestl, R.H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2, 31–34.
- Giudici, P., and Zambonelli, C. (1992). Biometric and Genetic Study on Acetic Acid Production for Breeding of Wine Yeast. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 370–374.
- Gjermansen, C., and Sigsgaard, P. (1981). Construction of a hybrid brewing strain of *saccharomyces carlsbergensis* by mating of meiotic segregants. *Carlsberg Res. Commun.* 46, 1.
- Goddard, M.E., and Hayes, B.J. (2009). Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nat. Rev. Genet.* 10, 381–391.
- Goddard, M.R., and Greig, D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? *FEMS Yeast Res.* 15, fov009.

Goddard, M.R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R.C., and Jun, C. (2010). A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environ. Microbiol.* *12*, 63–73.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* *274*, 546, 563–567.

Goto-Yamamoto, N., Kitano, K., Shiki, K., Yoshida, Y., Suzuki, T., Iwata, T., Yamane, Y., and Hara, S. (1998). SSU1-R, a sulfite resistance gene of wine yeast, is an allele of SSU1 with a different upstream sequence. *J. Ferment. Bioeng.* *86*, 427–433.

Graf, A., Dragosits, M., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2009). Yeast systems biotechnology for the production of heterologous proteins. *FEMS Yeast Res.* *9*, 335–348.

Greetham, D., Wimalasena, T.T., Leung, K., Marvin, M.E., Chandelia, Y., Hart, A.J., Phister, T.G., Tucker, G.A., Louis, E.J., and Smart, K.A. (2014). The Genetic Basis of Variation in Clean Lineages of *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Stresses Encountered during Bioethanol Fermentations. *PLoS ONE* *9*, e103233.

Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J.M., and Blondin, B. (2007). Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 2432–2439.

Gutiérrez, A., Chiva, R., Sancho, M., Beltran, G., Arroyo-López, F.N., and Guillamon, J.M. (2012). Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiol.* *31*, 25–32.

Gutiérrez, A., Beltran, G., Warringer, J., and Guillamón, J.M. (2013). Genetic basis of variations in nitrogen source utilization in four wine commercial yeast strains. *PloS One* *8*, e67166.

Gutteling, E.W., Riksen, J. a. G., Bakker, J., and Kammenga, J.E. (2007). Mapping phenotypic plasticity and genotype-environment interactions affecting life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity* *98*, 28–37.

H

Haber, J.E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *191*, 33–64.

Hansen, J., and Johannesen, P.F. (2000). Cysteine is essential for transcriptional regulation of the sulfur assimilation genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. MGG* *263*, 535–542.

Heard, G. m., and Fleet, G. h. (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* *65*, 23–28.

Henick-Kling, T., and Park, Y.H. (1994). Considerations for the Use of Yeast and Bacterial Starter Cultures: SO₂ and Timing of Inoculation. *Am. J. Enol. Vitic.* *45*, 464–469.

Henick-Kling, Edinger, Daniel, and Monk (1998). Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol.* *84*, 865–876.

- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., et al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* *111*, 509–547.
- Higgins, V.J., Bell, P.J.L., Dawes, I.W., and Attfield, P.V. (2001). Generation of a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Strain That Exhibits Strong Maltose Utilization and Hyperosmotic Resistance Using Nonrecombinant Techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 4346–4348.
- Hittinger, C.T. (2013). *Saccharomyces* diversity and evolution: a budding model genus. *Trends Genet.* *29*, 309–317.
- Hou, J., Tyo, K.E.J., Liu, Z., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2012). Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* *12*, 491–510.
- Huang, C., Roncoroni, M., and Gardner, R.C. (2014). MET2 affects production of hydrogen sulfide during wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 7125–7135.
- Huang, X., Paulo, M.-J., Boer, M., Effgen, S., Keizer, P., Koornneef, M., and van Eeuwijk, F.A. (2011). Analysis of natural allelic variation in *Arabidopsis* using a multiparent recombinant inbred line population. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 4488–4493.
- Hubmann, G., Mathé, L., Foulquié-Moreno, M.R., Duitama, J., Nevoigt, E., and Thevelein, J.M. (2013a). Identification of multiple interacting alleles conferring low glycerol and high ethanol yield in *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. *Biotechnol. Biofuels* *6*, 87.
- Hubmann, G., Foulquié-Moreno, M.R., Nevoigt, E., Duitama, J., Meurens, N., Pais, T.M., Mathé, L., Saerens, S., Nguyen, H.T.T., Swinnen, S., et al. (2013b). Quantitative trait analysis of yeast biodiversity yields novel gene tools for metabolic engineering. *Metab. Eng.* *17*, 68–81.
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O’Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* *425*, 686–691.
- Husnik, J.I., Delaquis, P.J., Cliff, M.A., and van Vuuren, H.J. (2007). Functional analyses of the malolactic wine yeast ML01. *Am. J. Enol. Vitic.* *58*, 42–52.

I

- Ibstedt, S., Stenberg, S., Bages, S., Gjuvsland, a. B., Salinas, F., Kourtchenko, O., Samy, J.K. a., Blomberg, a., Omholt, S.W., Liti, G., et al. (2014). Concerted Evolution of Life Stage Performances Signals Recent Selection on Yeast Nitrogen Use. *Mol. Biol. Evol.* *32*, 153–161.
- Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H., and Takegawa, K. (2010). Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *86*, 403–417.

J

- Jara, M., Cubillos, F. a, García, V., Salinas, F., Aguilera, O., Liti, G., and Martínez, C. (2014). Mapping genetic variants underlying differences in the central nitrogen metabolism in fermenter yeasts. *PloS One* *9*, e86533.
- Jensen, M.K., and Keasling, J.D. (2015). Recent applications of synthetic biology tools for yeast metabolic engineering. *FEMS Yeast Res.* *15*, 1–10.
- Jiang, C., and Zeng, Z.B. (1995). Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* *140*, 1111–1127.
- Jiménez, J., and Benítez, T. (1986). Characterization of wine yeasts for ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *25*, 150–154.
- Jiranek, V., Langridge, P., and Henschke, P.A. (1995). Amino Acid and Ammonium Utilization by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts From a Chemically Defined Medium. *Am J Enol Vitic* *46*, 75–83.
- Johnson, J.A., Toepfer, J.E., and Dunn, P.O. (2003). Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite population structure in fragmented populations of greater prairie-chickens. *Mol. Ecol.* *12*, 3335–3347.
- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* *24*, 1403–1405.
- Joseph, B., Corwin, J.A., Li, B., Atwell, S., and Kliebenstein, D.J. (2013). Cytoplasmic genetic variation and extensive cytonuclear interactions influence natural variation in the metabolome. *ELife* *2*.
- Jovicevic, D., Blount, B.A., and Ellis, T. (2014). Total synthesis of a eukaryotic chromosome: Redesigning and SCRaMbLE-ing yeast. *BioEssays* *36*, 855–860.
- Julien, a., Roustan, J.L., Dulau, L., and Sablayrolles, J.M. (2000). Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological consequences. *Am. J. Enol. Vitic.* *51*, 215–222.

K

- Kamvar, Z.N., Tabima, J.F., and Grünwald, N.J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* *2*, e281.
- Kanai, M., Kawata, T., Yoshida, Y., Kita, Y., Ogawa, T., Mizunuma, M., Watanabe, D., Shimoi, H., Mizuno, A., Yamada, O., et al. (2017). Sake yeast YHR032W/ERC1 haplotype contributes to high S-adenosylmethionine accumulation in sake yeast strains. *J. Biosci. Bioeng.* *123*, 8–14.
- Kang, M.S. (1997). Using Genotype-by-Environment Interaction for Crop Cultivar Development. In *Advances in Agronomy*, D.L. Sparks, ed. (Academic Press), pp. 199–252.
- Kassambara A, and Mundt F (2015). Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses.

- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* *10*, 845–858.
- Kover, P.X., Valdar, W., Trakalo, J., Scarcelli, N., Ehrenreich, I.M., Purugganan, M.D., Durrant, C., and Mott, R. (2009). A Multiparent Advanced Generation Inter-Cross to Fine-Map Quantitative Traits in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* *5*, e1000551.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., et al. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *440*, 637–643.
- Kumar, G.R., Ramakrishnan, V., and Bisson, L.F. (2010). Survey of Hydrogen Sulfide Production in Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* *61*, 365–371.
- Kutyna, D.R., Varela, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., and Stanley, G.A. (2010). Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends Food Sci. Technol.* *21*, 293–302.
- Kwan, E.X., Foss, E., Kruglyak, L., and Bedalov, A. (2011). Natural Polymorphism in *BUL2* Links Cellular Amino Acid Availability with Chronological Aging and Telomere Maintenance in Yeast. *PLoS Genet* *7*, e1002250.

L

- Lander, E.S., and Botstein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* *121*, 185–199.
- Leal, M., Seehausen, O., and Matthews, B. (2017). The Ecology and Evolution of Stoichiometric Phenotypes. *Trends Ecol. Evol.* *32*, 108–117.
- Lee, H.-Y., Chou, J.-Y., Cheong, L., Chang, N.-H., Yang, S.-Y., and Leu, J.-Y. (2008). Incompatibility of Nuclear and Mitochondrial Genomes Causes Hybrid Sterility between Two Yeast Species. *Cell* *135*, 1065–1073.
- Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., and Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.* *16*, 2091–2102.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *25*, 2078–2079.
- Li, J., Saxena, S., Pain, D., and Dancis, A. (2001). Adrenodoxin Reductase Homolog (*Arh1p*) of Yeast Mitochondria Required for Iron Homeostasis. *J. Biol. Chem.* *276*, 1503–1509.
- Li, J., Wang, L., Wu, X., Fang, O., Wang, L., Lu, C., Yang, S., Hu, X., and Luo, Z. (2013). Polygenic Molecular Architecture Underlying Non-Sexual Cell Aggregation in Budding Yeast. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* *20*, 55–66.
- Lill, R., and Kispal, G. (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 352–356.
- Linderholm, A.L., Findleton, C.L., Kumar, G., Hong, Y., and Bisson, L.F. (2008). Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 1418–1427.

- Liti, G., and Louis, E.J. (2012). Advances in Quantitative Trait Analysis in Yeast. *PLoS Genet.* 8.
- Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Koufopanou, V., et al. (2009). Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 458, 337–341.
- Long, A.D., Macdonald, S.J., and King, E.G. (2014). Dissecting complex traits using the *Drosophila* Synthetic Population Resource. *Trends Genet.* 30, 488–495.
- Longin, C.F.H., Gowda, M., Mühleisen, J., Ebmeyer, E., Kazman, E., Schachsneider, R., Schacht, J., Kirchoff, M., Zhao, Y., and Reif, J.C. (2013). Hybrid wheat: quantitative genetic parameters and consequences for the design of breeding programs. *Theor. Appl. Genet.* 126, 2791–2801.
- Ludlow, C.L., Cromie, G.A., Garmendia-Torres, C., Sirr, A., Hays, M., Field, C., Jeffery, E.W., Fay, J.C., and Dudley, A.M. (2016). Independent Origins of Yeast Associated with Coffee and Cacao Fermentation. *Curr. Biol. CB* 26, 965–971.
- Luparia, V., Soubeyrand, V., Berges, T., Julien, A., and Salmon, J.-M. (2004). Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65.
- Lynch, M., and Walsh, B. (1998). *Genetics and analysis of quantitative traits* (Sinauer Sunderland, MA).

M

- M F de Godoy, L., Olsen, J., Cox, J., L Nielsen, M., Hubner, N., Fröhlich, F., Walther, T., and Mann, M. (2008). Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast.
- MacArthur, M.W., and Thornton, J.M. (1991). Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* 218, 397–412.
- Mackay, T.F.C. (2010). Mutations and quantitative genetic variation: lessons from *Drosophila*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 1229–1239.
- Mackay, T.F.C., Stone, E.A., and Ayroles, J.F. (2009). The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nat. Rev. Genet.* 10, nrg2612.
- Makuc, J., Paiva, S., Schauen, M., Krämer, R., André, B., Casal, M., Leão, C., and Boles, E. (2001). The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane. *Yeast* 18, 1131–1143.
- Malcorps, P., Cheval, J., Jamil, S., and Dufour, J. (1991). A new model for the regulation of ester synthesis by alcohol acetyltransferase in *saccharomyces cerevisiae* during fermentation.
- Manginot, C., Roustan, J., and Sablayrolles, J. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme Microb. Technol.* 23, 511–517.
- Marchal, A., Marullo, P., Moine, V., and Dubourdieu, D. (2011). Influence of Yeast Macromolecules on Sweetness in Dry Wines: Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Protein Hsp12. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2004–2010.

- Marks, V.D., Ho Sui, S.J., Erasmus, D., Van Der Merwe, G.K., Brumm, J., Wasserman, W.W., Bryan, J., and Van Vuuren, H.J.J. (2008). Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS Yeast Res.* 8, 35–52.
- Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F.-X., Couloux, A., Guy, J., Legras, J.-L., Barrio, E., Dequin, S., and Galeote, V. (2015). Evolutionary advantage conferred by an eukaryote-to-eukaryote gene transfer event in wine yeasts. *Mol. Biol. Evol.* msv057-.
- Marsit, S., Leducq, J.-B., Durand, É., Marchant, A., Filteau, M., and Landry, C.R. (2017). Evolutionary biology through the lens of budding yeast comparative genomics. *Nat. Rev. Genet.* *advance online publication*.
- Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Lonvaud, A., and Masneuf-Pomarède, I. (2014). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 21–28.
- Marti-Raga, M., Marullo, P., Beltran, G., and Mas, A. (2016). Nitrogen modulation of yeast fitness and viability during sparkling wine production. *Food Microbiol.* 54, 106–114.
- Martí-Raga, M., Peltier, E., Mas, A., Beltran, G., and Marullo, P. (2017). Genetic Causes of Phenotypic Adaptation to the Second Fermentation of Sparkling Wines in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 GenesGenomesGenetics* g3.116.037283.
- Martí-raga, M., Mas, A., and Beltran, G. (2017). Genetic causes of phenotypic adaptation to the second fermentation sparkling wines in. *G3 Genes Genomes Genet.* 7, 399.
- Marullo, P. (2005). Génétique quantitative des levures de vinification : cartographie de QTL et applications à la sélection des souches industrielles (Bordeaux 2).
- Marullo, P. (2009). Procédé de sélection de levures oenologiques (FRANCE: Google Patents).
- Marullo, P. (2015). Mémoire d'HDR, Les levures de vinifications, mieux les comprendre pour mieux les sélectionner. Université de Bordeaux.
- Marullo, P., and Dubourdieu, D. (2010). Yeast selection for wine flavour modulation. In *Managing Wine Quality Vol 2*, A.G. Reynolds, ed. (Cambridge: Woodhead Publishing Limited), pp. 296–320.
- Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Aigle, M., and Dubourdieu, D. (2004). Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 4, 711–719.
- Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarède, I., Pons, M., Aigle, M., and Dubourdieu, D. (2006). Breeding strategies for combining fermentative qualities and reducing off-flavor production in a wine yeast model. *FEMS Yeast Res.* 6, 268–279.
- Marullo, P., Aigle, M., Bely, M., Masneuf-Pomarède, I., Durrens, P., Dubourdieu, D., and Yvert, G. (2007a). Single QTL mapping and nucleotide-level resolution of a physiologic trait in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Res.* 7, 941–952.
- Marullo, P., Yvert, G., Bely, M., Aigle, M., and Dubourdieu, D. (2007b). Efficient use of DNA molecular markers to construct industrial yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 7, 1295–1306.
- Marullo, P., Thibon, C., Tominaga, T., and Dubourdieu, D. (2008). Utilisation de levures mutantes ure2 pour augmenter la libération de thiols volatils aromatiques par la levure pendant la fermentation (Google Patents).

- Marullo, P., Mansour, C., Dufour, M., Albertin, W., Sicard, D., Bely, M., and Dubourdieu, D. (2009). Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. *FEMS Yeast Res.* 9, 1148–1160.
- Masneuf-Pomarède, I., Mansour, C., Murat, M.L., Tominaga, T., and Dubourdieu, D. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 385–390.
- Masselot, M., and Robichon-Szulmajster, H. de (1975). Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. MGG* 139, 121–132.
- McAlister, L., and Holland, M.J. (1982). Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *J. Biol. Chem.* 257, 7181–7188.
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., and Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre-and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17593–17598.
- McKay, J.K., Richards, J.H., Nemali, K.S., Sen, S., Mitchell-Olds, T., Boles, S., Stahl, E.A., Wayne, T., and Juenger, T.E. (2008). Genetics of Drought Adaptation in *Arabidopsis Thaliana* li. Qtl Analysis of a New Mapping Population, Kas-1 × Tsu-1. *Evolution* 62, 3014–3026.
- Meijnen, J.-P., Randazzo, P., Foulquié-Moreno, M.R., van den Brink, J., Vandecruys, P., Stojiljkovic, M., Dumortier, F., Zalar, P., Boekhout, T., Gunde-Cimerman, N., et al. (2016). Polygenic analysis and targeted improvement of the complex trait of high acetic acid tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* 9, 5.
- Meiron, H., Nahon, E., and Raveh, D. (1995). Identification of the heterothallic mutation in HO-endonuclease of *S. cerevisiae* using HO/ho chimeric genes. *Curr. Genet.* 28, 367–373.
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Falco, V., Leão, C., and Mendes-Faia, A. (2009). The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 571–583.
- de Mendiburu, F. (2014). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*.
- Molina, A.M., Swiegers, J.H., Varela, C., Pretorius, I.S., and Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 675–687.
- Monk, P.R. (1982). Effect of nitrogen and vitamin supplements on yeast growth and rate of fermentation of Rhine Riesling grape juice. *Food Technol. Aust.*
- Morales, L., and Dujon, B. (2012). Evolutionary role of interspecies hybridization and genetic exchanges in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 76, 721–739.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Colomo, B., and Suárez, J.A. (2003). Pyruvic Acid and Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with Vitisin A and B Formation in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7402–7409.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Calderón, F., and Suárez, J.A. (2006). Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 123–129.
- Mortimer, R., and Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150, 199–204.

Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G., and Polsinellif, M. (1994). Genome Renewal: A New Phenomenon Revealed From a Genetic Study of 43 Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Derived From Natural Fermentation of Grape Musts. *YEAST* 10, 1543–1552.

Mukai, N., Nishimori, C., Fujishige, I.W., Mizuno, A., Takahashi, T., and Sato, K. (2001). Beer brewing using a fusant between a sake yeast and a brewer's yeast. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 482–486.

Murat, M.-L., Masneuf, I., Darriet, P., Lavigne, V., Tominaga, T., and Dubourdieu, D. (2001). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains on the Liberation of Volatile Thiols in Sauvignon blanc Wine. *Am J Enol Vitic* 52, 136–139.

N

Nagarajan, M., Veyrieras, J.B., de Dieuleveult, M., Bottin, H., Fehrmann, S., Abraham, A.L., Croze, S., Steinmetz, L.M., Gidrol, X., and Yvert, G. (2010). Natural single-nucleosome epi-polymorphisms in yeast. *PLoS Genet.* 6.

Nardi, T., Corich, V., Giacomini, A., and Blondin, B. (2010). A sulphite-inducible form of the sulphite efflux gene *SSU1* in a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *Microbiology* 156, 1686–1696.

Nicotra, A.B., Atkin, O.K., Bonser, S.P., Davidson, A.M., Finnegan, E.J., Mathesius, U., Poot, P., Purugganan, M.D., Richards, C.L., Valladares, F., et al. (2010). Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci.* 15, 684–692.

Nieduszynski, C.A., and Liti, G. (2011). From sequence to function: Insights from natural variation in budding yeasts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1810, 959–966.

Noble, A.C., and Bursick, G.F. (1984). The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 35, 110–112.

Noble, J., Sanchez, I., and Blondin, B. (2015). Identification of new *Saccharomyces cerevisiae* variants of the *MET2* and *SKP2* genes controlling the sulfur assimilation pathway and the production of undesirable sulfur compounds during alcoholic fermentation. *Microb. Cell Factories* 14, 68.

Nogami, S., Ohya, Y., and Yvert, G. (2007). Genetic Complexity and Quantitative Trait Loci Mapping of Yeast Morphological Traits. *PLoS Genet* 3, e31.

Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J.-L., Wincker, P., Casaregola, S., et al. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 16333–16338.

Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W., and Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell* 8, 1233–1242.

NUSSEY, D.H., WILSON, A.J., and BROMMER, J.E. (2007). The evolutionary ecology of individual phenotypic plasticity in wild populations. *J. Evol. Biol.* 20, 831–844.

O

O'Neill, C.J., Swain, D.L., and Kadarmideen, H.N. (2010). Evolutionary process of *Bos taurus* cattle in favourable versus unfavourable environments and its implications for genetic selection. *Evol. Appl.* *3*, 422–433.

Ough, C.S., Davenport, M., and Joseph, K. (1989). Effects of Certain Vitamins on Growth and Fermentation Rate of Several Commercial Active Dry Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* *40*, 208–213.

P

Pais, T.M., Foulquié-Moreno, M.R., Hubmann, G., Duitama, J., Swinnen, S., Goovaerts, A., Yang, Y., Dumortier, F., and Thevelein, J.M. (2013). Comparative Polygenic Analysis of Maximal Ethanol Accumulation Capacity and Tolerance to High Ethanol Levels of Cell Proliferation in Yeast. *PLoS Genet* *9*, e1003548.

Panowski, S.H., Wolff, S., Aguilaniu, H., Durieux, J., and Dillin, A. (2007). PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature* *447*, 550–555.

Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* *20*, 289–290.

Park, H., and Bakalinsky, A.T. (2000). SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* *16*, 881–888.

Parts, L., Cubillos, F.A., Warringer, J., Jain, K., Salinas, F., Bumpstead, S.J., Molin, M., Zia, A., Simpson, J.T., Quail, M.A., et al. (2011). Revealing the genetic structure of a trait by sequencing a population under selection. *Genome Res.* *21*, 1131–1138.

Patel, S., and Shibamoto, T. (2002). Effect of Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae* on Production of Volatiles in Napa Gamay Wine and Petite Sirah Wine. *J. Agric. Food Chem.* *50*, 5649–5653.

Peltier, E., Bernard, M., Trujillo, M., Prodhomme, D., Barbe, J.-C., Gibon, Y., and Marullo, P. Wine yeast phenomics: a standardized fermentation method for assessing quantitative traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains in enological conditions. [Doi.Org 191353](https://doi.org/10.1186/1475-2875-191353).

Pérez-Ortín, J.E., Querol, A., Puig, S., and Barrio, E. (2002). Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Res.* *12*, 1533–1539.

Peter, J., and Schacherer, J. (2016). Population genomics of yeasts: towards a comprehensive view across a broad evolutionary scale. *Yeast* *33*, 73–81.

Picazo, C., Gamero-Sandemetrio, E., Orozco, H., Albertin, W., Marullo, P., Matallana, E., and Aranda, A. (2015). Mitochondria inheritance is a key factor for tolerance to dehydration in wine yeast production. *Lett. Appl. Microbiol.* *60*, 217–222.

- Pigliucci, M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends Ecol. Evol.* *20*, 481–486.
- Pigliucci, M., and Kolodynska, A. (2002). Phenotypic plasticity to light intensity in *Arabidopsis thaliana*: invariance of reaction norms and phenotypic integration. *Evol. Ecol.* *16*, 27–47.
- Pigliucci, M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends Ecol. Evol.* *20*, 481–486.
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., C. Gomes, A., Schulz, B., Römmert, K., Dammann, U., Aust, H., et al. (2014). Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLoS ONE* *9*, e85622.
- Ponsuksili, S., Murani, E., Schwerin, M., Schellander, K., and Wimmers, K. (2010). Identification of expression QTL (eQTL) of genes expressed in porcine *M. longissimus dorsi* and associated with meat quality traits. *BMC Genomics* *11*, 572.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* *16*, 675–729.
- Pretorius, I.S., and Bauer, F.F. (2002). Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol.* *20*, 426–432.
- Pronk, J.T., Steensma, H.Y., and van Dijken, J.P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *12*, 1607–1633.

R

- R Development Core Team, R. (2011). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found. Stat. Comput.* *1*, 409.
- Raga, M.M. (2015). Environmental and genetic factors affecting *Saccharomyces cerevisiae* performance during second fermentation. phdthesis. Université de Bordeaux.
- Rai, L.S., Singha, R., Brahma, P., and Sanyal, K. (2017). Epigenetic determinants of phenotypic plasticity in *Candida albicans*. *Fungal Biol. Rev.*
- Rainieri, S., and Pretorius, I.I.S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.* *50*, 15–31.
- Rankine, B.C. (1966). Decomposition of L-malic acid by wine yeasts. *J. Sci. Food Agric.* *17*, 312–316.
- Rashwan, A.M.A. (2016). Comparative study in fifteen genotypes of tomato for heat tolerance under Upper Egypt conditions. *J. Am. Sci.* *12*.
- Reddy, L.V.A., and Reddy, O.V.S. (2011). Effect of fermentation conditions on yeast growth and volatile composition of wine produced from mango (*Mangifera indica* L.) fruit juice. *Food Bioprod. Process.* *89*, 487–491.
- Redzepovic, S., Orlic, S., Majdak, A., Kozina, B., Volschenk, H., and Viljoen-Bloom, M. (2003). Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* *83*, 49–61.

- Reed, S.I. (1991). Pheromone signaling pathways in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *1*, 391–396.
- Remize, F., Sablayrolles, J.M., and Dequin, S. (2000). Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *J. Appl. Microbiol.* *88*, 371–378.
- Remize, F., Cambon, B., Barnavon, L., and Dequin, S. (2003). Glycerol formation during wine fermentation is mainly linked to Gpd I p and is only partially controlled by the HOG pathway. *Yeast* *20*, 1243–1253.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., and Lonvaud, A. (2006a). *Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications* (John Wiley & Sons).
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., and Lonvaud, A. (2006b). *Handbook of Enology, Vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications* (Wiley).
- Robertson, A. (1956). The effect of selection against extreme deviants based on deviation or on homozygosity. *J. Genet.* *54*, 236.
- Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., and Mouret, J.-R. (2014). Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Romano, G.H., Gurvich, Y., Lavi, O., Ulitsky, I., Shamir, R., and Kupiec, M. (2010). Different sets of QTLs influence fitness variation in yeast. *Mol. Syst. Biol.* *6*, 346.
- Romano, P., Soli, M.G., and Suzzi, G. (1985). Improvement of a wine *Saccharomyces cerevisiae* strain by a breeding program. *Appl. Environ. Microbiol.* *50*, 1064–1067.
- Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., and Polsinelli, M. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* *118*, 213–218.
- Roncoroni, M. (2014). *Quantitative Trait Loci Mapping in Winemaking Yeast*. Thesis. ResearchSpace@Auckland.
- Roncoroni, M., Santiago, M., Hooks, D.O., Moroney, S., Harsch, M.J., Lee, S. a., Richards, K.D., Nicolau, L., and Gardner, R.C. (2011). The yeast IRC7 gene encodes a ??-lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiol.* *28*, 926–935.
- Roux, F., Gao, L., and Bergelson, J. (2010). Impact of initial pathogen density on resistance and tolerance in a polymorphic disease resistance gene system in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* *185*, 283–291.

S

- Saayman, M., and Viljoen-Bloom, M. (2006). The biochemistry of malic acid metabolism by wine yeasts – a review.
- Sae-Lim, P., Mulder, H., Gjerde, B., Koskinen, H., Lillehammer, M., and Kause, A. (2015). Genetics of Growth Reaction Norms in Farmed Rainbow Trout. *PLOS ONE* *10*, e0135133.

- Salinas, F., Cubillos, F.A., Soto, D., Garcia, V., Bergström, A., Warringer, J., Ganga, M.A., Louis, E.J., Liti, G., and Martinez, C. (2012). The genetic basis of natural variation in oenological traits in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS One* 7, e49640.
- Salmon, J.-M. (1997). Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *J. Ferment. Bioeng.* 83, 253–260.
- Salmon, J.-M., Fornairon, C., and Barre, P. (1998). Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 154–163.
- Sambandan, D., Carbone, M.A., Anholt, R.R.H., and Mackay, T.F.C. (2008). Phenotypic plasticity and genotype by environment interaction for olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 179, 1079–1088.
- Sax, K. (1923). The Association of Size Differences with Seed-Coat Pattern and Pigmentation in *PHASEOLUS VULGARIS*. *Genetics* 8, 552–560.
- Schacherer, J., Shapiro, J. a, Ruderfer, D.M., and Kruglyak, L. (2009). Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 458, 342–345.
- Schlichting, C.D., and Pigliucci, M. (1993). Control of Phenotypic Plasticity Via Regulatory Genes. *Am. Nat.* 142, 366–370.
- Schoolnik, G.K. (2001). The accelerating convergence of genomics and microbiology. *Genome Biol.* 2, reports4009.
- Schweizer, E. (1984). Chapter 3 Genetics of fatty acid biosynthesis in yeast. In *New Comprehensive Biochemistry*, S. Numa, ed. (Elsevier), pp. 59–83.
- Segrè, A. V, Murray, A.W., and Leu, J.-Y. (2006). High-Resolution Mutation Mapping Reveals Parallel Experimental Evolution in Yeast. *PLoS Biol* 4, e256.
- Séraphin, B., Simon, M., and Faye, G. (1988). MSS18, a yeast nuclear gene involved in the splicing of intron a15 beta of the mitochondrial *cox1* transcript. *EMBO J.* 7, 1455–1464.
- Shao, H.-B., Guo, Q.-J., Chu, L.-Y., Zhao, X.-N., Su, Z.-L., Hu, Y.-C., and Cheng, J.-F. (2007). Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 54, 37–45.
- Shields, P.G., and Harris, C.C. (2000). Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18, 2309–2315.
- Shrimpton, A.E., and Robertson, A. (1988). The Isolation of Polygenic Factors Controlling Bristle Score in *Drosophila Melanogaster*. II. Distribution of Third Chromosome Bristle Effects within Chromosome Sections. *Genetics* 118, 445–459.
- Sicard, D., and Legras, J.L. (2011). Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus - Biol.* 334, 229–236.
- Sigwalt, A., Caradec, C., Brion, C., Hou, J., de Montigny, J., Jung, P., Fischer, G., Llorente, B., Friedrich, A., and Schacherer, J. (2016). Dissection of quantitative traits by bulk segregant mapping in a protoploid yeast species. *FEMS Yeast Res.* 16.

- da Silva, T., Albertin, W., Dillmann, C., Bely, M., Guerche, S. la, Giraud, C., Huet, S., Sicard, D., Masneuf-Pomarede, I., Vienne, D. de, et al. (2015). Hybridization within *Saccharomyces* Genus Results in Homeostasis and Phenotypic Novelty in Winemaking Conditions. *PLOS ONE* *10*, e0123834.
- Sinha, H., Nicholson, B.P., Steinmetz, L.M., and McCusker, J.H. (2006). Complex Genetic Interactions in a Quantitative Trait Locus. *PLoS Genet* *2*, e13.
- Slepecky, R.A., and Starmer, W.T. (2009). Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia* *101*, 823–832.
- Smith, E.N., and Kruglyak, L. (2008). Gene–Environment Interaction in Yeast Gene Expression. *PLOS Biol* *6*, e83.
- Solieri, L. (2010). Mitochondrial inheritance in budding yeasts: towards an integrated understanding. *Trends Microbiol.* *18*, 521–530.
- Soubeyrand, V., Luparia, V., Williams, P., Doco, T., Vernhet, A., Ortiz-Julien, A., and Salmon, J.-M. (2005). Formation of Micella Containing Solubilized Sterols during Rehydration of Active Dry Yeasts Improves Their Fermenting Capacity. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 8025–8032.
- Spitze, K. (1992). Predator-Mediated Plasticity of Prey Life History and Morphology: *Chaoborus americanus* Predation on *Daphnia pulex*. *Am. Nat.* *139*, 229–247.
- Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M.P., Voordeckers, K., and Verstrepen, K.J. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 1–49.
- Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J.-L., Calabretta, a., Di Paola, M., De Filippo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turillazzi, S., et al. (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 13398–13403.
- Steinmetz, L.M., Sinha, H., Richards, D.R., Spiegelman, J.I., Oefner, P.J., McCusker, J.H., and Davis, R.W. (2002). Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature* *416*, 326–330.
- Steyer, D., Ambroset, C., Brion, C., Claudel, P., Delobel, P., Sanchez, I., Erny, C., Blondin, B., Karst, F., and Legras, J.-L. (2012). QTL mapping of the production of wine aroma compounds by yeast. *BMC Genomics* *13*, 573.
- Stitt, M., Lilley, R.M., Gerhardt, R., and Heldt, H.W. (1989). [32] Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol.* *174*, 518–552.
- Strope, P.K., Skelly, D.A., Kozmin, S.G., Mahadevan, G., Stone, E.A., Magwene, P.M., Dietrich, F.S., and McCusker, J.H. (2015). The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen. *Genome Res.* *25*, 762–774.
- Stumpferl, S.W., Brand, S.E., Jiang, J.C., Korona, B., Tiwari, A., Dai, J., Seo, J.-G., and Jazwinski, S.M. (2012). Natural genetic variation in yeast longevity. *Genome Res.* *22*, 1963–1973.
- Sultan, S.E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends Plant Sci.* *5*, 537–542.
- Sun, S., and Heitman, J. (2011). Is sex necessary? *BMC Biol.* *9*, 56.
- Swiegers, J.H., and Pretorius, I.S. (2007). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *74*, 954–960.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., and Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* *11*, 139–173.

Swinnen, S., Schaerlaekens, K., Pais, T., Claesen, J., Hubmann, G., Yang, Y., Demeke, M., Foulqué-Moreno, M.R., Goovaerts, A., Souvereyns, K., et al. (2012). Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. *Genome Res.* *22*, 975–984.

Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* *33*, 25–35.

T

Taillandier, P., Ramon Portugal, F., Fuster, A., and Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiol.* *24*, 95–100.

Taylor, M.B., and Ehrenreich, I.M. (2014). Genetic Interactions Involving Five or More Genes Contribute to a Complex Trait in Yeast. *PLoS Genet* *10*, e1004324.

Thibon, C., Marullo, P., Claisse, O., Cullin, C., Dubourdieu, D., and Tominaga, T. (2008). Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Res.* *8*, 1076–1086.

Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *61*, 503–532.

Thomas, C.S., Boulton, R.B., Silacci, M.W., and Gubler, W.D. (1993). The Effect of Elemental Sulfur, Yeast Strain, and Fermentation Medium on Hydrogen Sulfide Production During Fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* *44*, 211–216.

Tilloy, V., Ortiz-Julien, A., and Dequin, S. (2014). Reduction of Ethanol Yield and Improvement of Glycerol Formation by Adaptive Evolution of the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae* under Hyperosmotic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 2623–2632.

du Toit, W., Marais, J., Pretorius, I., and de Toit, M. (2006). Oxygen in Must and Wine: A review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* *27*, 76–94.

Tong, A.H.Y., Lesage, G., Bader, G.D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G.F., Brost, R.L., Chang, M., et al. (2004). Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* *303*, 808–813.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., and Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie Van Leeuwenhoek* *79*, 345–352.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., and Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* *80*, 47–53.

Torrens, J., Urpí, P., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (2008). Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *Int. J. Food Microbiol.* *124*, 48–57.

Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., and Querol, A. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* *134*, 237–243.

Turelli, M., and Barton, N.H. (2004). Polygenic variation maintained by balancing selection: pleiotropy, sex-dependent allelic effects and G x E interactions. *Genetics* *166*, 1053–1079.

U

Ugliano, M., Kolouchova, R., and Henschke, P.A. (2011). Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *38*, 423–429.

Ungerer, M.C., Halldorsdottir, S.S., Purugganan, M.D., and Mackay, T.F.C. (2003). Genotype-Environment Interactions at Quantitative Trait Loci Affecting Inflorescence Development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* *165*, 353–365.

Utter, M.F., Keech, D.B., and Nossal, P.M. (1958). Oxidative phosphorylation by subcellular particles from yeast. *Biochem. J.* *68*, 431–440.

V

Valero, E., Moyano, L., Millan, M.C., Medina, M., and Ortega, J.M. (2002). Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. *Food Chem.* *78*, 57–61.

Varela, C., Torrea, D., Schmidt, S.A., Ancin-Azpilicueta, C., and Henschke, P.A. (2012). Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.* *135*, 2863–2871.

Veerkamp, R.F., Simm, G., and Oldham, J.D. (1994). Effects of interaction between genotype and feeding system on milk production, feed intake, efficiency and body tissue mobilization in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* *39*, 229–241.

Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., and Cheynier, V. (2004). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Qual. Prefer.* *15*, 209–217.

Vieira, C., Pasyukova, E.G., Zeng, Z.B., Hackett, J.B., Lyman, R.F., and Mackay, T.F. (2000). Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *154*, 213–227.

de Vienne, D. (1998). marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales.

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S., and Henschke, P.A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *77*, 145–157.

Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I., and Yang, J. (2012). Five Years of GWAS Discovery. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 7–24.

Volschenk, H., Vuuren, H.J.J. van, and Viljoen–Bloom, M. (2003). Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Curr. Genet.* *43*, 379–391.

W

Wallace, J.G., Larsson, S.J., and Buckler, E.S. (2013). Entering the second century of maize quantitative genetics. *Heredity* *112*, hdy20136.

Wang, Q.M., Liu, W.Q., Liti, G., Wang, S.A., and Bai, F.Y. (2012). Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Mol. Ecol.* *21*, 5404–5417.

Ward, N., and Fraser, C.M. (2005). How genomics has affected the concept of microbiology. *Curr. Opin. Microbiol.* *8*, 564–571.

Warnes, G (2009). *gplots*: Various R programming tools for plotting data. R package version, 2(4).

Warringer, J., and Blomberg, A. (2003). Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *20*, 53–67.

Warringer, J., and Blomberg, A. (2014). *Yeast phenomics*-large scale mapping of the genetic basis for organismal traits. Phenomics CRC Press Boca Raton.

Warringer, J., Zörgö, E., Cubillos, F. a., Zia, A., Gjuvslund, A., Simpson, J.T., Forsmark, A., Durbin, R., Omholt, S.W., Louis, E.J., et al. (2011). Trait variation in yeast is defined by population history. *PLoS Genet.* *7*, e1002111.

Warringer, J., Liti, G., and Blomberg, A. (2017). Yeast Reciprocal Hemizygoty to Confirm the Causality of a Quantitative Trait Loci-Associated Gene. *Cold Spring Harb. Protoc.* *2017*, pdb.prot089078.

Wei, X., and Zhang, J. (2017). The Genomic Architecture of Interactions Between Natural Genetic Polymorphisms and Environments in Yeast Growth. *Genetics* *205*, 925–937.

West-Eberhard, M.J. (1989). Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* *20*, 249–278.

Whitfield, C.W., Cziko, A.-M., and Robinson, G.E. (2003). Gene Expression Profiles in the Brain Predict Behavior in Individual Honey Bees. *Science* *302*, 296–299.

Wine Economics Research Centre | Databases.

Wilkening, S., Lin, G., Fritsch, E.S., Tekkedil, M.M., Anders, S., Kuehn, R., Nguyen, M., Aiyar, R.S., Proctor, M., Sakhanenko, N.A., et al. (2014). An Evaluation of High-Throughput Approaches to QTL Mapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *196*, 853–865.

Winzeler, E.A., Richards, D.R., Conway, A.R., Goldstein, A.L., Kalman, S., McCullough, M.J., McCusker, J.H., Stevens, D.A., Wodicka, L., Lockhart, D.J., et al. (1998). Direct Allelic Variation Scanning of the Yeast Genome. *Science* *281*, 1194–1197.

Y

Yadav, A., Dhole, K., and Sinha, H. (2016). Genetic Regulation of Phenotypic Plasticity and Canalisation in Yeast Growth. *PLOS ONE* 11, e0162326.

Yang, D., Liu, Y., Cheng, H., Chang, L., Chen, J., Chai, S., and Li, M. (2016). Genetic dissection of flag leaf morphology in wheat (*Triticum aestivum* L.) under diverse water regimes. *BMC Genet.* 17, 94.

Yang, Y., Foulquié-Moreno, M.R., Clement, L., Erdeiva, Tanghe, A., Schaerlaekens, K., Dumortier, F.F., Thevelein, J.M., Foulquié-Moreno, M.R., Clement, L., et al. (2013). QTL Analysis of High Thermotolerance with Superior and Downgraded Parental Yeast Strains Reveals New Minor QTLs and Converges on Novel Causative Alleles Involved in RNA Processing. 9, e1003693.

Yéramian, N., Chaya, C., and Suárez Lepe, J.A. (2007). L-(-)-malic acid production by *Saccharomyces* spp. during the alcoholic fermentation of wine (1). *J. Agric. Food Chem.* 55, 912–919.

Yvert, G., Brem, R.B., Whittle, J., Akey, J.M., Foss, E., Smith, E.N., Mackelprang, R., and Kruglyak, L. (2003). Trans-acting regulatory variation in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of transcription factors. *Nat. Genet.* 35, 57–64.

Z

Zimmer, A. (2013). Etude du déterminisme génétique de la phase de latence chez *Saccharomyces cerevisiae* en conditions oenologiques. Impact des mécanismes de résistance au SO₂. (Université de Bordeaux 2, France).

Zimmer, A., Durand, C., Loira, N., Durrens, P., Sherman, D.J., and Marullo, P. (2014). QTL Dissection of Lag Phase in Wine Fermentation Reveals a New Translocation Responsible for *Saccharomyces cerevisiae* Adaptation to Sulfite. *PLoS ONE* 9, e86298.

Annexes

**GENETIC CAUSES OF PHENOTYPIC ADAPTATION TO THE SECOND FERMENTATION OF
SPARKLING WINES IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.**

**Maria Martí-Raga^{*,†}, Emilien Peltier^{†,‡}, Albert Mas^{*}, Gemma Beltran^{*},
Philippe Marullo^{†,‡}**

* Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

† Unité de recherche OEnologie, EA 4577, ISVV, Université Bordeaux, 33882 Villenave d'Ornon, France

‡ Biolaffort, 33100, Bordeaux, France

Reference numbers: 79

RUNNING TITLE: hybridization promotes heterosis

KEYWORDS: *heterosis, PMA1, VMA13, MSB2, PDR*

ABSTRACT

Hybridization is known to improve complex traits due to heterosis and phenotypic robustness. However, these phenomena have been rarely explained at the molecular level. Here, the genetic determinism of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation performance was investigated using a QTL-mapping approach on an F1-progeny population. Three main QTLs were detected, with positive alleles coming from both parental strains. The heterosis effect found in the hybrid was partially explained by three loci showing pseudo-overdominance and dominance effect. The molecular dissection of those QTLs revealed that the adaptation to second fermentation is related to pH, lipid or osmotic regulation. Our results suggest that stressful conditions of second fermentation have driven to select rare genetic variants adapted to maintain yeast cell homeostasis and, in particular, to low pH conditions.

CORRESPONDING AUTHORS: Philippe Marullo, ISVV, Unité de recherche OEnologie, EA 4577, ISVV, Université Bordeaux/Biolaffort, 210 chemin de Laysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France **+33 557 575 864**, philippe.marullo@u-bordeaux.fr

INTRODUCTION

In higher eukaryotes, hybridization is known to improve fitness and complex traits (Crow 1998; Lippman and Zamir 2007), accelerate evolution (Grant and Grant 1992) and confer better adaptation in novel or changing environments (C Zeyl and Bell 1997). The benefits of hybridization are mainly due to heterosis (hybrid vigor) and homeostasis (robustness to environmental changes). In organisms of agronomical interest, such phenomena are widely documented (Fridman 2014; Lippman and Zamir 2007) and have been used for decades in

plant and animal breeding programs (Welcker et al. 2005; Cassady, Young, and Leymaster 2002; Crow 1998).

Intra and inter-specific hybridization also plays a major role in phenotypic adaptation and evolution in fungi and yeasts. At the genomic scale, many comparative studies have shown that polyploidization (Albertin and Marullo 2012; Borneman et al. 2012; Curtin et al. 2012), reticulated evolution (Novo et al. 2009; Almeida et al. 2014) or interspecific hybridization (Morales and Dujon 2012) strongly drive the evolution of these eukaryotic microbes. Over the past five years, *Saccharomyces* yeasts have emerged as model organisms to study hybrid vigor and homeostasis by comparing hybrids and their relative parents, both at the intra- (Zörgö et al. 2012; Timberlake et al. 2011; Shapira et al. 2014) and inter-specific (da Silva et al. 2015; Dunn et al. 2013; R. Stelkens and Brockhurst 2014) level. The study of phenotypic responses of hybrids in various environmental conditions has provided a broad overview of hybridization benefits, highlighting phenotypic novelty (da Silva et al. 2015), heterosis (Timberlake et al. 2011; Zörgö et al. 2012; Shapira et al. 2014; da Silva et al. 2015), outbreeding transgression (R. B. Stelkens et al. 2014) and homeostasis (da Silva et al. 2015). However, the underlying genetic determinisms of these benefits have yet to be elucidated.

Chromosomal regions linked to heterosis (Semel et al. 2006) and homeostasis (Fraser et al. 2005; Bhatia et al. 2014) have, with great difficulty, been identified using quantitative genetic approaches in higher eukaryotes. However, such QTLs have rarely been dissected at the gene level (Krieger, Lippman, and Zamir 2010). Nowadays, thanks to its powerful genetics and its small genome, the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) has emerged as a promising model to achieve this task (Liti and Louis 2012). In 2002, a pioneering work identified one heterotic-QTL (Steinmetz et al. 2002) resulting from the combined effect of pseudo-overdominance (Sinha et al. 2006) and epistasis (Sinha et al. 2008). Although this organism has been used for many other QTL mapping studies (Zimmer et al. 2014; Yang et al. 2013; Marullo, Aigle, et al. 2007; Ambroset et al. 2011; Brice et al. 2014; Hubmann et al. 2013; Cubillos et al. 2011; Jara et al. 2014; Gutiérrez et al. 2013), further molecular examples of heterosis and homeostasis effects are still needed.

S. cerevisiae plays a crucial role in the production of food, beverages, biofuels and biochemicals. QTL mapping has therefore been employed to identify natural genetic variations in various industrial contexts, such as biofuel (Swinnen et al. 2012; Hubmann et al. 2013) and wine (Marullo et al. 2007a; Ambroset et al. 2011; Gutiérrez et al. 2013; Jara et al. 2014; Zimmer et al. 2014).

The harsh physiological conditions found in these industrial processes (low pH, high ethanol content, extreme temperature, low nitrogen availability) promote the efficacy of natural selection (Goddard, Godfray, and Burt 2005; Clifford Zeyl 2006), creating favourable conditions for the emergence of particularly well-adapted strains. In this study, we investigated the behaviour of *S. cerevisiae* wine strains during the production of sparkling wine such as Champagne and Cava. This particular winemaking process consists of two consecutive fermentations. A primary fermentation is conducted to obtain a base wine from grape must. The obtained base wine is then mixed with sugar and yeast to achieve a second fermentation stage that occurs inside the locked bottle (Carrascosa et al. 2011). Due to the extreme conditions (low pH, high ethanol, and a steady increase in CO₂ pressure), several weeks are required to complete this second fermentation (Ribéreau-Gayon et al. 2006). We recently found that the second fermentation kinetics is significantly affected by the choice of the yeast strain to conduct the fermentation (Martí-Raga et al. 2015). In order to decipher the molecular basis of this phenotypic discrepancy, we applied a QTL mapping approach using NGS based genotyping. Four genes involved in the genetic determinism of second fermentation kinetics were identified. These genes play a central role in maintaining cell homeostasis, such as intracellular pH regulation, yeast cell detoxification, control of plasma membrane composition, and response to cold stress. Furthermore, we can formulate a plausible molecular explanation for the observed heterosis and identified *genetics x environment* interactions explaining the phenotypic robustness of the hybrid to pH variations.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains used and culture conditions

All the *Saccharomyces cerevisiae* strains used are listed in Table 1. Both parental strains are monosporic clones derived from wine yeast starters. They

were both used under their diploid (GN and SB) and haploid forms (hoGN and hoSB). A set of 117 haploid segregants of the hybrid BN (hoSB x GN) was obtained by tetrad microdissection, as described in Marullo et al. (2006), and was used for QTL mapping. All strains were grown at 28 °C on YPD medium (1% yeast extract, 1% peptone, 2% glucose), solidified with 2% agar when required. When necessary, the antibiotic G418 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) and Nourseothricin (Werner bioagent, Germany) was added to the media at a final concentration of 100 µg/ml. Sporulation was induced on ACK medium (1% potassium acetate, 2% agar) during three days at 24 °C.

Second fermentation phenotypic analysis

The strains were phenotyped for their fermentative behaviour during the second fermentation according to the procedure described in Martí-Raga et al. (2015). Briefly, yeast cells were acclimated before their inoculation into the base wine by successive cultures in YNB media and synthetic wine with increasing ethanol concentrations. Upon acclimatisation, yeast cells were inoculated into base wine supplemented with sucrose (22 g/l) and bentonite (30 mg/l) at 0.2 units of OD₆₀₀ (2×10^6 cells/ml). The base wine used was kindly donated by Juve & Camps (pH 3.1, ethanol concentration 9.4 g/l, and YAN content of 23.17mgN/l). When required, the pH of the base wine was modified using phosphoric acid (85%) or sodium hydroxide (10 M). The mixture was introduced into bottles (750 ml) that were hermetically closed. The second fermentation took place at 16 °C, and the fermentation performance was assessed by monitoring CO₂ production inside the bottle through time using an aphrometer (L.sensor.CO2, L PRO SRL, Camisano Vicentino, Italy). This technique enables the measurement of pressure inside the bottle in a non-invasive way. The values were normalized according to the temperature using Henry's law constant, and expressed as pressure at 10 °C. Fermentation kinetics data was fitted using the 5PL model (Gottschalk) to extract relevant parameters, such maximum pressure achieved (*P_{max}*), fermentative rate (*rate*) or time to achieve 0.5, 2, and 5 bars during the fermentation (*t_{0.5}*, *t₂*, *t₅*) (Martí-Raga et al. 2015). The trait heritability and the percentage of transgression were calculated as described in Marullo et al. (2006).

Genotyping and marker map construction

The whole genome sequences of the parental strains (SB and GN) have been previously obtained by pair end Illumina sequencing. The list of SNP compared

to the reference genome was extracted using the SAMtools package (Zimmer *et al.* 2014). The non-common SNP between parental strains were subtracted using a custom R script (File S1).

All the 117 progeny clones were genotyped by whole genome sequencing at a low coverage (3-6 X). Total DNA was extracted using Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) following the manufacturer's instructions. DNA libraries were constructed using the Illumina Nextera XT kit (Illumina, California, USA) as indicated by the manufacturer. DNA libraries were then pooled and sequenced with a MiSeq apparatus using the standard kit v2 (Illumina, California, USA) generating paired end reads of 2x250bp in the Bordeaux University's genomic facility. All sequencing data (filtering and mapping) was performed using the available tools at the public Galaxy server (<https://usegalaxy.org>). Sequencing data was treated as single reads. To optimize downstream analysis, quality control was applied using *FASTX-Toolkit* (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) for every read as follows: reads were trimmed at their 3' end to eliminate the bases with a low sequencing quality, then only the reads with a Phred quality scores higher than 20 were retained. Filtered reads were then mapped to the reference genome of *Saccharomyces cerevisiae* strain s288c, using *BWA* software (H. Li and Durbin 2010) with default parameters. Once the reads have been mapped, BAM files were extracted and a *pileup* dataset was generated using *SAMTools*' (H. Li et al. 2009) for every sequenced segregant. The *pileup* dataset was open in R and the genotype of each segregant at the position of the non-common SNP of the parental strains was evaluated using an R script (File S1). To construct the marker map we retained the markers that met the following requests: having a 1:1 segregation among the progeny (Chi 2 test, >0.05), having an evenly distribution along the genome (1 marker ~15kb) and having the genotype of at least 50% of the progenies. All the genetic and phenotypic dataset is listed in Table S1.

Linkage analysis

QTL mapping was performed using an R script applying a non-parametric test (Wilcoxon), in order to avoid any normality issues for every phenotype at every marker position (File S1). The linkage result (LK) was expressed as the $-\log_{10}$ of the *p-value*. To calculate the significance of a QTL we permuted 1000 times the phenotypic value, recording at each permutation the highest LK score. We

considered a QTL significant if its LK score was higher than the 0.05 tail of the 1000 permuted LK scores.

The genetic effects of the mapped QTL were then determined by an analysis of variance. The ANOVA was applied following the general linear model:

$$Y_i = m + QTL1_i + QTL2_i + QTL3_i + QTL1_i * QTL2_i + QTL2_i * QTL3_i + QTL1_i * QTL3_i + E_i$$

where Y_i was the value of the trait according to the genotype i ; m was the overall mean; $QTL1$, $QTL2$ and $QTL3$ were the simple QTL effects; $QTL1 * QTL2$, $QTL2 * QTL3$ and $QTL1 * QTL3$ the interaction effect between QTLs; and E the residual error. The conditions of ANOVA application were controlled by verifying the homoscedasticity (Levene test) and normal distribution of residues (Shapiro-Wilks test).

QTLs dissection

The genomic intervals of the mapped QTL were then evaluated in the *Saccharomyces* genome database (SGD). The selected candidate genes contained non-synonymous SNP in the sequence of the parental strains. The candidate genes were validated by reciprocal hemizyosity analysis according to Steinmetz *et al.* (2002). Briefly, each selected gene was deleted using *Kan-Mx4* cassettes. The deletion cassettes were obtained by PCR amplification of the disruption cassette plus ~500pb of the flanking regions using as genomic template the genomic DNA of the strains Y04381, Y06979, Y05455, Y06978, Y04644, Y05451 and Y24376 and Y24639, which contain disruption cassettes for the following genes *PDR1*, *GSC2*, *VMA13*, *MSP1*, *MSB2*, *SRO7*, *PMA1* and *SEC9*, respectively. The PCR conditions and primers used are listed in File S2. The hybrid strain (HO-BN) was transformed with each deletion cassette using the lithium acetate protocol as described in Gietz and Schiestl (Gietz and Schiestl 2007). All constructions were verified by insertion PCR. Briefly, the verification consisted in positively amplifying by PCR a fragment containing ~600 pb of the 5'-flanking region and the 5' part of the *KanMx4* cassette. All the primers and PCR conditions used for this test are listed in File S2. Once the insertion of the disruption cassette had been verified, we designed a RFLP analysis in order to assess the genotype of the remaining allele. The aim was to obtain a different RFLP profile for each allele of the parental strains. The primers, enzymes and conditions of each RFLP are listed in File S3. Three

distinct clones of both hemizygous hybrids were then tested for their fermentative behaviour during the second fermentation as described before.

GENETIC VARIABILITY ANALYSIS

The allelic frequencies of the four validated genes (*PDR1*, *MSB2*, *VMA13*, *PMA1*) were estimated among a large set of fully sequenced *S. cerevisiae* strains (97). Amino acid alignments as well as, the name of the strains are listed in File S3 to S6. We focused our analysis at protein level, as non-synonymous SNP were found for all genes. Putative deleterious effect of non-synonymous SNP were tested using the SIFT and PROVEAN algorithms (<http://sift.jcvi.org>) (Table S2) by aligning 144 proteins using the NCBI non-redundant database. The structural alignment of Pma1p was carried out with the *phyre2* tools (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) using default parameters.

Statistical analysis

All the statistical and graphical analyses were carried out using R software (R Development Core Team 2011). The variation of each trait was estimated by the analysis of variance (ANOVA) using the *av* function. Duncan's multiple comparison test was used to determine which group of means differ significantly (*agricolae* package) (de Mendiburu 2014). Heterosis was estimated using the following formula:

$$d/m = (\text{hybrid value} - \text{mid parental value}) / \text{mid parental value}$$

that measures the phenotypic divergence between the hybrid and the parental strains.

Data policy

All the strains parents, hybrids and progenies are available under request to the corresponding author. The scripts used as well as the phenotypic and genotypic dataset are given in the supplementary information.

RESULTS

Distribution of second fermentation traits reveals heterosis and transgressive segregation

A QTL mapping based on a F1-hybrid design was used to investigate the genetic determinism of the second fermentation kinetics. The 117 progeny

clones used were derived from the hybrid BN (hoSB X GN) as previously described (Marullo, Aigle, et al. 2007). The second fermentation kinetics was measured in locked bottles via CO₂ pressure development over the course of time (Figure 1A). These kinetics were modelled using a 5-parameters logistic fit (5PL model) and five kinetic parameters were extracted. In addition to the maximum pressure (*P*_{max}) and the maximum fermentative rate (*rate*), we investigated the time needed to reach 0.5, 2.0 and 5.0 bars (*t*_{0.5}, *t*₂, *t*₅), representing the initial, middle and final stage of the fermentation. The phenotypic segregation of the fermentation rate was shown for all the progenies, their relative haploid parental strains (hoGN and hoSB), and the hybrid BN (Figure 1B).

The values of each parameter for the diploid and haploid parental strains are shown in Table 2. The kinetic parameters between haploid and diploid forms did not show significant differences, except for the *rate*. Haploids exhibited a significantly higher fermentation rate, certainly due to the ploidy level effect on this trait, as reported elsewhere (Salmon 1997; Marullo et al. 2006). The ANOVA confirmed that, at the same ploidy level, the parental strains showed significant differences for the *rate*, *t*₂ and *t*₅. The parental strain SB exhibited faster fermentation, with a higher fermentative *rate* (0.73 bar/day) and lower *t*₅ (15 days), than the parental GN.

Interestingly, a heterosis effect (*d/m*) between the HO-BN hybrid and the parents (diploids) was observed for all the traits except for *P*_{max} (Table 2). For the *rate*, the hybrid showed a best parent heterosis effect with a trait value 2.1-fold higher than the mid parental value. This result suggests that both parents contain alleles that can improve fermentation efficiency, thereby providing an opportunity to investigate the molecular bases of heterosis. The continuous distribution observed for all the traits investigated among the segregating clones indicates their polygenic determinism (Figure 1B). Some segregants had phenotypic values outside the parental ranges, with a transgression level varying between 18.8% and 58.12%, depending on the trait (Table 2). This high transgression level reflects that alleles with opposite effects and/or genetic interactions are effective in the BN hybrid. Finally, broad sense trait heritability was higher than 90% (except for the time needed to reach 0.5), suggesting that the major part of variance captured was genetically determined (Table 2).

Linkage analysis for second fermentation traits

The sequencing and genotyping of all the progenies resulted in the construction of a genetic marker map of 1071 markers, evenly distributed, with Mendelian segregation among the progenies. The resulting marker map can be observed in Figure S1. Linkage analysis was conducted by applying the Wilcoxon test. Three QTLs localized on distinct chromosomes were detected (FDR<5%) and linked to three kinetics traits (t_2 , *rate* and t_5) (Figure 2A).

The time to reach 2 bars (t_2) was linked to both QTL1 (Chromosome IV: 564-579 kb, $p_{val}=1.45 \cdot 10^{-3}$) and QTL2 (Chromosome VII 544-594 bp, $p_{val}=2.88 \cdot 10^{-5}$). For QTL1, the inheritance of the GN allele conferred a faster fermenting profile while, for QTL2, the inheritance of SB allele conferred a more rapid CO₂-release in the initial part of second fermentation. The QTL2 was also linked to the fermentation rate (*rate*), where the SB inheritance promoted a higher fermentation rate. The last QTL (QTL3) was mapped in Chromosome XVI (618-654 kb, $p_{val}= 1.23 \cdot 10^{-05}$) in association with the time needed to reach 5 bars (t_5), which is related to the final stage of the second fermentation. For this locus the inheritance of GN allele had a positive impact on the CO₂ time course release (Figure 2B).

The variance explained by each QTL and their interactions was estimated by the analysis of variance (ANOVA) (Table 3). For the phenotypes associated with the initial fermentation stages (t_2 and *rate*), QTL2 had a higher contribution than QTL1. In contrast, QTL3 had a strong effect on final fermentation stage (t_5) explaining approximately 50% of the total variance observed. QTL3, although not detected by the linkage test, also explained 14% of t_2 total variance. The full statistical model used allowed the detection of significant interactions between QTL2 and the other two QTLs. For each trait, the part of variance captured by the ANOVA ranged between 34-64%, suggesting that other minor QTLs and/or epistatic interactions remain unidentified. The fact that positive alleles were brought by both parental strains could explain the high transgression levels found in BN progeny, as well as the heterosis effect detected.

Dissection of second fermentation QTLs

The genomic sequences of mapped QTLs were examined in order to identify possible candidate genes. Due to the low contribution of QTL1 (less than 8 %),

we focused the molecular dissection on QTL2 and QTL3. For each single gene found in the QTL regions, the non-synonymous Single Nucleotide Polymorphisms (ns-SNP) between SB and GN were tracked. The protein function of candidate genes presenting such polymorphisms was also taken into account. We selected six candidate genes for QTL2: *GSC2*, *MSP1*, *MSB2*, *PDR1*, *PMA1* and *SEC9*, and two genes, *SRO7* and *VMA13*, for QTL3. The gene functions, as well as the protein sequence changes within the parental strains, are listed in Table 4.

To validate candidate genes, Reciprocal Hemizyosity Analysis (RHA) was performed. Each reciprocal hemizygote, the hybrid strain (HO-BN), and the diploid parental strains (SB, GN), were phenotyped for the second fermentation, in three replicates. The *rate*, *t2* and *t5* achieved by each hemizygote are represented in Figure 3 A-C, respectively.

The hemizygotes for *PMA1* significantly impact the fermentation *rate*. As expected, the hemizygote hybrid carrying the SB allele (*PMA1-SB/ΔGN*) had a faster fermentation rate than the one presenting the GN allele (*PMA1-GN/ΔSB*). The *t2* trait has a more complex genetic determinism. Three genes had an impact on this phenotype (*MSB2*, *PDR1* and *PMA1*). According to the segregation profile shown in Figure 3B, the hemizygotes containing only the SB allele of *PMA1* and *PDR1* ferment faster than those containing GN alleles, achieving lower *t2*. Surprisingly, for *MSB2*, the GN-allele reduced the value of *t2*. Consequently, this locus presented a particular feature: three beneficial alleles with alternated inheritance (SB for *PMA1* and *PDR1*, GN for *MSB2*). This particular type of configuration has been previously reported for another loci, generating a heterosis by a pseudo-overdominance effect (Steinmetz et al. 2002). The ANOVA model of the 117 genotyped progenies indicated that the inheritance of *PMA1*, *PDR1* and *MSB2* markers explained 4.23%, 35.11% and 8.99% of phenotypic variance, respectively. Moreover, a strong interaction effect (40.65%) was found between these genes. Segregant groups with the same parental inheritance for the three genes represent 62.8% of the total genotyped population due to the strong linkage disequilibrium of these loci. However, numerous recombined clones allowed for the effect of each gene to be tested (Figure 4). The inheritance of the specific allelic combination (SSG) for *PDR1*, *PMA1*, and *MSB2* determined the lower average values for *t2*, in accordance with the Reciprocal Hemizyosity Analysis (RHA). Among the 117

genotyped progenies, only 12 individuals showed this allelic profile. Surprisingly, only one progeny clone has the opposite inheritance profile (GGS). For *t5*, the RHA indicated that *VMA13* (QTL3) and *MSB2* (QTL2) genes had a significant effect on this phenotype (Figure 3C). In both cases, the GN inheritance confers faster fermentation kinetics, illustrating the positive contribution of the GN allele set to the second fermentation final stage. The overall combination of positive alleles at different loci constitutes another mechanism of the heterosis observed in the hybrid by a simple dominance effect.

Exploration of causative mutations

All the four genes impacting the second fermentation kinetics (*PDR1*, *MSB2*, *VMA13*, *PMA1*) showed SNP and small INDEL (INSertion-DELetion) within SB and GN parental strains. These punctual genetic variations generate a ns-SNP for each gene (Table S2). For the *MSB2* gene, the non-optimal parental strain, SB, showed a transition (*C518528T*), resulting in *S529F* amino acid substitution in the extracellular protein part. The *S529F* allele is a rare allele (singleton mutation) that was not found in the GN parent or in any other of the 96 strains analyzed. This substitution could have an effect on protein function according to the Provean analysis (a tool predicting the functional impact of any amino acid substitution based on amino acid conservation). For the *VMA13* gene, we found, again, a unique transition (*A644194G*) leading to the *D120G* substitution on the strain GN. In such case, this mutation represents the positive allele, and was not found in the remaining 97 strains analyzed (including SB).

For the essential gene *PMA1*, encoding for the membrane ATPase proton pump, drastic genetic variations were found between parental strains. Indeed, nine ns-SNPs were identified between SB and GN (Figure 5A). When compared to the reference genome, eight of these nine substitutions were displayed by the parental strain SB, carrying the positive allele. Interestingly, three of them (H54Q, L176M, L290V) have not been found in any of the other sequenced strains. Each of the four other substitutions (D200E, Q283R, KQ431IE and E875Q) is shared by a small subset of strains, including the sparkling wine strain EC1118 (substitution frequencies of 0.02, 0.03, 0.06 and 0.02, respectively). Strikingly, five of the SB alleles provoke a change of residue charge (H54Q, Q283R, KQ431IE, D718N and E875Q) respective to the GN

(and the reference) protein that may affect the transporter proton affinity. Two of them (*D200E*, *E875Q*) were predicted to affect the protein function by Provean and/or SITF algorithm (File S1). The *D200E* substitution occurs in a very conserved region of the E1-E2 ATPase domain (Pfam 00122). Although aspartic and glutamine residues are functionally similar, only 3 proteins showing this substitution are found over 552 proteins belonging to a long range of organisms (*psy* blast alignment on uniprot database) (Figure 5B). The *E875Q* substitution occurs in the membrane segment M8, and was predicted to modify the Pma1p structure of SB protein using *phyre2* tools (Figure 5C).

The impact of *PDR1* polymorphisms is more complex to decipher. Pdr1p parental sequences showed an INDEL of five asparagines occurring in a N-rich region highly variable within the 97 strains compared. In addition, three single amino acid polymorphisms were found. The substitutions *L955S* is common to GN and 2 others strains, while *H438Y* and *F571L* are unique to SB, the positive parental strain. These last two polymorphisms are located in a fungal transcription factor domain (Pfam 04082) and the substitution *F571L* was predicted to affect the Pdr1p transcriptional activity.

GxE interactions, the effect of the base wine pH

The role of two genes encoding for ATPase protein complexes involved in pH homeostasis (*PMA1* and *VMA13*) was validated. Given the increased ethanol toxicity at low pH values (Alexandre and Charpentier 1998), commonly featured in base wines, this environmental factor represents one of the major constrains for successful second fermentation (completion/progress). Consequently, minimal variations of pH in base wine may have important consequences on yeast physiology. The pH of base wine was modified (2.8, 3.0, and 3.3) and the phenotypic response of hemizygotes hybrids for *PMA1* and *VMA13* genes was tested for all the kinetics parameters investigated in this study (Table 5). For *PMA1* gene, the beneficial effect of the SB allele increased at low pH (Figure 6). At pH=2.8, this gene affected all the kinetics parameters, while at pH=3.3 positive impact of this allele was detected only for the first fermentation part (*rate*, *t0.5*). The gene *VMA13* exhibited a more complex interaction with the base wine pH (Figure 6). At pH=2.8, the SB allele was the most beneficial and had a significantly positive contribution on the first part of the fermentation (*rate*, *t0.5*, *t2*) (Table 5). In contrast, for the last part of the second fermentation (*t5* and *Pmax*) the GN allele has a positive effect. Altogether, pH variations indicate

that both SB and GN alleles have beneficial effects for different kinetics parameters. At lower pH, the SB alleles of *PMA1* and *VMA13* promoted a faster fermentation start. At higher pH, the GN allele of *VMA13* had also a positive effect, accelerating the last part of the fermentation. Assuming the fact both *PMA1*^{SB} and *VMA13*^{GN} are mostly dominant (Figure 3), this switching effect might result in a higher robustness of heterozygous individual to pH variations.

DISCUSSION

Identification of natural genetic variations involved in pH homeostasis and stress response.

Deciphering the genetic mechanisms controlling natural trait variation is one of the major frontiers in genetics. *Saccharomyces cerevisiae* is a promising organism for bridging the phenotype-genotype gap (Liti and Louis 2012). In fundamental science, quantitative genetics allows such genetic paradigms as missing heritability (Bloom 2013) or epigenetic-control inheritance (Nagarajan 2010, Filleton et al 2015) to come to the fore. In a more applied field, QTL mapping is very useful to understand the natural genetic variations modulating the performance of industrial strains in specific contexts. For enological traits, this strategy has been prolific in several aspects, including undesirable compound production (Salinas et al. 2012; Gutiérrez et al. 2013; Jara et al. 2014). Moreover, QTL-mapping identifies natural genetic variations that can subsequently be used in molecular breeding approaches (Marullo, Yvert, et al. 2007; Dufour et al. 2013). Identifying those variations can be useful in improving the current understanding of cellular and biochemical mechanisms. In the current study, the genetic basis of oenological traits pertaining to the second fermentation was analyzed. The parental strains used were derived from industrial wine starters and showed strong differences in enological traits (Marullo et al. 2006; Marullo, Aigle, et al. 2007; Zimmer et al. 2014) including their kinetics during the second fermentation (Martí-Raga, 2015). We identified four genes (*PMA1*, *PDR1*, *MSB2*, *VMA13*), whose allelic variation affects second fermentation kinetics. Their functions are mainly in relation with cellular homeostasis. Firstly, *PMA1* is an essential gene that encodes for the principal membrane ATPase, the main agent regulating the intracellular pH. Different studies with Pma1p mutants showed that punctual mutations resulted in an inability of strains to grow at low pH or in the presence of weak acids,

suggesting a reduced ability to extrude protons from the cell (recently reviewed by Orij, Brul and Smits 2011). The allelic variation within *PMA1* may cause a reduction its enzymatic activity. Considering the low pH found in base wine, this weak enzymatic activity may affect both the intracellular pH and the fermentative efficiency of yeast. The sequence analysis of this proton transporter reveals 9 amino-acid substitutions within the parental strains. Two of them (*D200E* and *E875Q*) are predicted to affect the Pma1p function and are specifically found within another industrial genetic background (EC1118) belonging to the Champagne cluster (Novo et al 2009). Interestingly, we validated a second proton pump gene, *VMA13*, that encodes for the V1-subunit of the Vacuolar ATPase (*V-ATPase*), harbouring the sites for ATP hydrolysis. The V-ATPase is involved in the control of both vacuolar and cytosolic pH by pumping protons from the vacuole to the cytosol (Orij, Brul, and Smits 2011) and its activity has an impact on Pma1p expression and localization (Martínez-Muñoz and Kane 2008). In an oenological context, *VMA13* has been identified as one of the 93 essential genes needed to maintain the complete fermentation (Walker et al. 2014). Furthermore, this protein has been associated with ethanol resistance, thus strains lacking *VMA13* are more sensitive to ethanol (Fujita et al. 2006; Teixeira et al. 2009). In this study, *VMA13* showed one unique, rare allelic variation (*D120G*) that could explain the phenotypic discrepancy observed within the parental strains. The V-ATPase works in parallel with the HOG (High Osmolarity Glycerol) pathway in order to adapt yeast cells to osmotic stress (S. C. Li et al. 2012). The third gene identified, *MSB2*, is a mucine family member acting as an osmosensor in the Sho1p- mediated HOG pathway. This transmembrane sensor plays, therefore, a central role in adapting yeast cells to osmolarity changes (Hohmann 2009). Furthermore, the HOG pathway plays a role in yeast adaptation to other stress sources, such as cold and acidic environments, that are particularly prevalent in second fermentation (Hayashi and Maeda 2006; Mollapour and Piper 2007).

The last gene impacting the second fermentation kinetics, is *PDR1*. This gene encodes a transcription factor controlling the expression of several plasma membrane transporters belongs to the super-family of ATP-binding cassettes (ABC), including Pdr5p, Yor1p, and Pdr10p. These pleiotropic drug-response proteins (Balzi et al. 1987) detoxify the yeast cell and transport several compounds, including phospholipids, peptides and sterols. Hence, they are

thought to be implicated in controlling the membrane lipid homeostasis, the regulation of the membrane permeability and the phospholipid bilayer distribution (Wilcox et al. 2002; Y. Li and Prinz 2004; Jungwirth and Kuchler 2006). The maintenance of membrane composition and fluidity is of special relevance during the alcoholic fermentation, due to its impact on yeast fermentative performance and viability (Torija et al. 2003; Beltran et al. 2008).

The fermentation performances of sake yeast are modulated by the expression level of *PDR1* and its paralog *PDR3* and/or by mutations affecting the ABC transporters they regulate (Mizoguchi et al. 2002; Watanabe, Mizoguchi, and Nishimura 2000). Consequently, changes in the *PDR1* sequences could result in higher/lower transcription factor activity affecting the cell homeostasis, thereby modulating the viability and fermentative capacity of yeast.

We identified four genes that play a key role in various stress response, including pH and lipid homeostasis, ethanol and low temperature resistance and osmotic pressure. These stressful conditions are found during the second fermentation, and may have promoted the emergence of adapted alleles for these specific pathways. Except for *MSB2*, all the genes showing positive allele(s) are found with a low frequency in the yeast population (less than 6%). This suggests that many other possible adaptative mutations were possibly selected, but these still need to be identified.

Resolution at the molecular level of a novel case of heterosis

Recent studies on yeast aimed at deciphering the hybridization effect on a vast range of phenotypic traits, conclude that inter- and intraspecific hybridization can result in heterosis (Plech, de Visser, and Korona 2013; da Silva et al. 2015; Zörgö et al. 2012; Shapira et al. 2014). In this genetic mapping study, we detected and characterized at the gene level the heterosis effect observed for fermentation traits. Quantitative genetics studies show that heterosis may be attributable to dominance (Xiao et al. 1995; Cockerham and Zeng 1996), overdominance (Stuber *et al.* 1992; Li *et al.* 2001), pseudo-overdominance (Crow 1998; Lippman and Zamir 2007), and/or epistasis (Schnell and Cockerham 1992; Z.-K. Li et al. 2001). The present study sheds light on new examples of dominance and pseudo-overdominance. For the three mapped QTLs, the positive alleles were apparently given by strain GN (QTL1 and QTL3)

and by strain SB (QTL2) (Figure 2B). QTL1 and QTL2 were related to the first part of the fermentation, while QTL3 impacted the total time needed to finish fermentation. The combination of one positive copy of each QTL in the hybrid explains the hybrid vigor observed. As the three QTLs are not genetically linked, a large portion of the F1 haploid population presents transgressive values with respect to the parental strains. In addition to this basic dominance effect, a particular pseudo overdominance effect was found for the QTL2 identified. This locus impacts the traits *rate* and *t2*, which represents the middle fermentation. Reciprocal hemizyosity analysis showed that the genetic determinism of *t2* was positively enhanced by three alleles *PMA1^{SB}*, *PDR1^{SB}* and *MSB2^{GN}*. The heterosis observed in the hybrid strain constitutes a second example of pseudo-overdominance heterosis described in *S. cerevisiae*. Those particular loci can be revealed when the distinct populations (that have been evolved separately for a long period) interbreed (Liti et Louis, 2012). The strong physical linkage of these 3 genes, and the fact that positive alleles are quite rare strongly limit the chance of finding this optimal allele set in a natural isolate. As the parental strains GN and SB are derived from wine isolates genetically divergent (Richards et al. 2009) their hybridization promoted the association of positive alleles that have been generated by different selection events. This situation may explain why heterosis is prevalent among domesticated population (Plech et al. 2013). The SNP markers of *PMA1*, *PDR1* and *MSB2* showed a Mendelian segregation for the 117 genotyped progenies (Chi2 test >0.05); however, an unexpected misbalance inheritance for two specific haplotypes was found. Indeed, pattern SSG, which conferred the best phenotype, was found 12 times more than reciprocal pattern GGS. Although the spore clones used in this study were obtained by tetrad microdissection in a non-selective medium (YPD), this GGS pattern might be counter-selected as a result of genetic interactions, as previously reported (Jing et al. 2015). The presence of *CEN7* between *PMA1* and *MSB2* might influence this phenomenon by chromosome interference and/or gene conversion.

Alleles x pH interactions suggest that heterozygosity promotes a strong phenotypic robustness

As two of the validated genes, *PMA1* and *VMA13*, are ATPases involved in intracellular pH homeostasis, the effect pH of base wine was investigated.

Although relatively small (± 0.5 pH units), the range of pH explored has an important physiological impact in the oenological context, affecting the completion of second fermentation. Depending on the pH, the allelic variations of *PMA1* and *VMA13* modulated the fermentation kinetics in a complex way. For *PMA1*, the SB allele had a positive effect in low pH conditions whereas, for *VMA13*, the positive allele changed in relation to the pH. The SB allele conferred better fitness at pH=2.8, but in mild conditions (intermediate and higher pH) the GN allele was the beneficial one. The combination of both genotypes *PMA1*^{SB} and *VMA13*^{GN} in the hybrid BN could result in a better adaptation to a larger range of pH (between 2.5 and 4.5 in grape juice) suggesting that hybridization may confer phenotypic robustness. This observation is in accordance with a recent study, showing that intra- and interspecific hybridization generate a global phenotypic homeostasis in a winemaking context (da Silva et al. 2015).

CONCLUSION

In the present study we applied a QTL mapping approach for deciphering the genetic determinism of a complex industrial trait of economical interest. Thanks to the high quality of the genetic map generated, we found the impact of 4 genes to have a key function for cellular homeostasis. Interestingly the allele combination of favourable alleles generates a strong heterosis effect in the hybrid due to dominance and pseudo overdominance effects. Finally we observed that the heterozygous status of the hybrid for *PMA1* and *VMA13* provide more phenotypic robustness due to genetic x environment interactions between *PMA1* and *VMA13* genes with the pH of base wine. All these data illustrates the complexity of genetic determinism of quantitative traits and pave the way to improve yeast strains for fermentation applications.

REFERENCES

- Albertin, Warren, Telma da Silva, Michel Rigoulet, Benedicte Salin, Isabelle Masneuf-Pomarede, Dominique de Vienne, Delphine Sicard, Marina Bely, and Philippe Marullo. 2013. "The Mitochondrial Genome Impacts Respiration but Not Fermentation in Interspecific *Saccharomyces* Hybrids." *PLoS ONE* 8 (9).
- Albertin, Warren, and Philippe Marullo. 2012. "Polyploidy in Fungi: Evolution after Whole-Genome Duplication." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 279 (1738): 2497–2509.

- Alexandre, H, and C Charpentier. 1998. "Biochemical Aspects of Stuck and Sluggish Fermentation in Grape Must." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20 (1): 20–27.
- Almeida, Pedro, Carla Gonçalves, Sara Teixeira, Diego Libkind, Martin Bontrager, Isabelle Masneuf-Pomarède, Warren Albertin, et al. 2014. "A Gondwanan Imprint on Global Diversity and Domestication of Wine and Cider Yeast *Saccharomyces Uvarum*." *Nature Communications* 5 (May): 4044.
- Ambroset, C., M. Petit, C. Brion, I. Sanchez, P. Delobel, C. Guerin, H. Chiapello, et al. 2011. "Deciphering the Molecular Basis of Wine Yeast Fermentation Traits Using a Combined Genetic and Genomic Approach." *G3(Bethesda, Md.); Genes|Genomes|Genetics* 1 (4): 263–81.
- Balzi, E, W Chen, S Ulaszewski, E Capieaux, and A Goffeau. 1987. "The Multidrug Resistance Gene PDR1 from *Saccharomyces Cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* 262 (35): 16871–79.
- Beltran, Gemma, Maite Novo, José M. Guillamón, Albert Mas, and Nicolas Rozès. 2008. "Effect of Fermentation Temperature and Culture Media on the Yeast Lipid Composition and Wine Volatile Compounds." *International Journal of Food Microbiology* 121 (2): 169–77.
- Bhatia, Aatish, Anupama Yadav, Chenchen Zhu, Julien Gagneur, Aparna Radhakrishnan, Lars M Steinmetz, Gyan Bhanot, and Himanshu Sinha. 2014. "Yeast Growth Plasticity Is Regulated by Environment-Specific Multi-QTL Interactions." *G3 (Bethesda, Md.)* 4 (5): 769–77.
- Borneman, Anthony R, Brian A Desany, David Riches, Jason P Affourtit, Angus H Forgan, Isak S Pretorius, Michael Egholm, and Paul J Chambers. 2012. "The Genome Sequence of the Wine Yeast VIN7 Reveals an Allotriploid Hybrid Genome with *Saccharomyces Cerevisiae* and *Saccharomyces Kudriavzevii* Origins." *FEMS Yeast Research* 12 (1): 88–96.
- Brice, Claire, Isabelle Sanchez, Frédéric Bigey, Jean-Luc Legras, and Bruno Blondin. 2014. "A Genetic Approach of Wine Yeast Fermentation Capacity in Nitrogen-Starvation Reveals the Key Role of Nitrogen Signaling." *BMC Genomics* 15 (1): 495.
- Carrascosa, Alfons V, Adolfo Martínez-Rodríguez, Eduardo Cebollero, and Ramón González. 2011. "Saccharomyces Yeast II: Secondary Fermentation." In *Molecular Wine Microbiology*, edited by Adolfo Carrascosa, Rosario Munoz, and Ramon Gonzalez, 33–49. San Diego: Academic Press.
- Cassady, J P, L D Young, and K A Leymaster. 2002. "Heterosis and Recombination Effects on Pig Reproductive Traits." *Journal of Animal Science* 80 (9): 2303–15.
- Cockerham, C. C., and Z. B. Zeng. 1996. "Design III With Marker Loci." *Genetics* 143 (3): 1437–56.
- Crow, James F. 1998. "90 Years Ago: The Beginning of Hybrid Maize." *Genetics* 148 (3): 923–28.
- Cubillos, Francisco a., Eleonora Billi, Enikő ZÖrgÖ, Leopold Parts, Patrick Fargier, Stig Omholt, Anders Blomberg, Jonas Warringer, Edward J. Louis, and Gianni Liti. 2011. "Assessing the Complex Architecture of Polygenic Traits in Diverged Yeast Populations." *Molecular Ecology* 20 (7): 1401–13.

- Curtin, Chris D, Anthony R Borneman, Paul J Chambers, and Isak S Pretorius. 2012. "De-Novo Assembly and Analysis of the Heterozygous Triploid Genome of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera Bruxellensis* AWRI1499." *PLoS One* 7 (3). Public Library of Science: e33840.
- da Silva, Telma, Warren Albertin, Christine Dillmann, Marina Bely, Stéphane la Guerche, Christophe Giraud, Sylvie Huet, et al. 2015. "Hybridization within *Saccharomyces* Genus Results in Homeostasis and Phenotypic Novelty in Winemaking Conditions." Edited by Joseph Schacherer. *PLOS ONE* 10 (5). Public Library of Science: e0123834.
- de Mendiburu, Felipe. 2014. "Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research."
- Dufour, Matthieu, Adrien Zimmer, Cécile Thibon, and Philippe Marullo. 2013. "Enhancement of Volatile Thiol Release of *Saccharomyces Cerevisiae* Strains Using Molecular Breeding." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (13): 5893–5905.
- Dunn, Barbara, Terry Paulish, Alison Stanbery, Jeff Piotrowski, Gregory Koniges, Evgueny Kroll, Edward J. Louis, Gianni Liti, Gavin Sherlock, and Frank Rosenzweig. 2013. "Recurrent Rearrangement during Adaptive Evolution in an Interspecific Yeast Hybrid Suggests a Model for Rapid Introgression." *PLoS Genetics* 9 (3).
- Fraser, James A, Johnny C Huang, Read Pukkila-Worley, J Andrew Alspaugh, Thomas G Mitchell, and Joseph Heitman. 2005. "Chromosomal Translocation and Segmental Duplication in *Cryptococcus Neoformans*." *Eukaryotic Cell* 4 (2): 401–6.
- Fridman, Eyal. 2014. "Consequences of Hybridization and Heterozygosity on Plant Vigor and Phenotypic Stability." *Plant Science* 232. Elsevier Ireland Ltd: 35–40.
- Fujita, Katsuhide, Akinobu Matsuyama, Yoshinori Kobayashi, and Hitoshi Iwahashi. 2006. "The Genome-Wide Screening of Yeast Deletion Mutants to Identify the Genes Required for Tolerance to Ethanol and Other Alcohols." *FEMS Yeast Research* 6 (5): 744–50.
- Gietz, R Daniel, and Robert H Schiestl. 2007. "High-Efficiency Yeast Transformation Using the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method." *Nature Protocols* 2 (1). Nature Publishing Group: 31–34.
- Goddard, Matthew R, H Charles J Godfray, and Austin Burt. 2005. "Sex Increases the Efficacy of Natural Selection in Experimental Yeast Populations." *Nature* 434 (7033): 636–40.
- Grant, P R, and B R Grant. 1992. "Hybridization of Bird Species." *Science (New York, N.Y.)* 256 (5054): 193–97.
- Gutiérrez, Alicia, Gemma Beltran, Jonas Warringer, and Jose M Guillamón. 2013. "Genetic Basis of Variations in Nitrogen Source Utilization in Four Wine Commercial Yeast Strains." Edited by Joseph Schacherer. *PLoS One* 8 (6). Public Library of Science: e67166.
- Hayashi, Michio, and Tatsuya Maeda. 2006. "Activation of the HOG Pathway upon Cold Stress in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Biochemistry* 139 (4): 797–803.
- Hubmann, Georg, Lotte Mathé, Maria R Foulquié-Moreno, Jorge Duitama, Elke Nevoigt, and Johan M Thevelein. 2013. "Identification of Multiple

- Interacting Alleles Conferring Low Glycerol and High Ethanol Yield in *Saccharomyces Cerevisiae* Ethanolic Fermentation.” *Biotechnology for Biofuels* 6 (1): 87.
- Jara, Matías, Francisco a Cubillos, Verónica García, Francisco Salinas, Omayra Aguilera, Gianni Liti, and Claudio Martínez. 2014. “Mapping Genetic Variants Underlying Differences in the Central Nitrogen Metabolism in Fermenter Yeasts.” *PLoS One* 9 (1): e86533.
- Jungwirth, Helmut, and Karl Kuchler. 2006. “Yeast ABC Transporters-- a Tale of Sex, Stress, Drugs and Aging.” *FEBS Letters* 580 (4): 1131–38.
- Krieger, Uri, Zachary B Lippman, and Dani Zamir. 2010. “The Flowering Gene SINGLE FLOWER TRUSS Drives Heterosis for Yield in Tomato.” *Nature Genetics* 42 (5). Nature Publishing Group: 459–63.
- Li, Heng, and Richard Durbin. 2010. “Fast and Accurate Long-Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (5): 589–95.
- Li, Heng, Bob Handsaker, Alec Wysoker, Tim Fennell, Jue Ruan, Nils Homer, Gabor Marth, Goncalo Abecasis, and Richard Durbin. 2009. “The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (16): 2078–79.
- Li, Sheena Claire, Theodore T Diakov, Jason M Rizzo, and Patricia M Kane. 2012. “Vacuolar H⁺-ATPase Works in Parallel with the HOG Pathway to Adapt *Saccharomyces Cerevisiae* Cells to Osmotic Stress.” *Eukaryotic Cell* 11 (3): 282–91.
- Li, Yifu, and William A Prinz. 2004. “ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters Mediate Nonvesicular, Raft-Modulated Sterol Movement from the Plasma Membrane to the Endoplasmic Reticulum.” *The Journal of Biological Chemistry* 279 (43): 45226–34.
- Li, Zhi-Kang, L. J. Luo, H. W. Mei, D. L. Wang, Q. Y. Shu, R. Tabien, D. B. Zhong, et al. 2001. “Overdominant Epistatic Loci Are the Primary Genetic Basis of Inbreeding Depression and Heterosis in Rice. I. Biomass and Grain Yield.” *Genetics* 158 (4): 1737–53.
- Lippman, Zachary B., and Dani Zamir. 2007. “Heterosis: Revisiting the Magic.” *Trends in Genetics* 23 (2): 60–66.
- Liti, Gianni, and Edward J. Louis. 2012. “Advances in Quantitative Trait Analysis in Yeast.” *PLoS Genetics* 8 (8).
- Luo, L. J., Z.-K. Li, H. W. Mei, Q. Y. Shu, R. Tabien, D. B. Zhong, C. S. Ying, J. W. Stansel, G. S. Khush, and A. H. Paterson. 2001. “Overdominant Epistatic Loci Are the Primary Genetic Basis of Inbreeding Depression and Heterosis in Rice. II. Grain Yield Components.” *Genetics* 158 (4): 1755–71.
- Martí-Raga, M, M Sancho, J M Guillamón, A Mas, and G Beltran. 2015. “The Effect of Nitrogen Addition on the Fermentative Performance during Sparkling Wine Production.” *Food Research International* 67 (January): 126–35.
- Martínez-Muñoz, Gloria A, and Patricia Kane. 2008. “Vacuolar and Plasma Membrane Proton Pumps Collaborate to Achieve Cytosolic pH Homeostasis in Yeast.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (29): 20309–19.
- Marullo, Philippe, Michel Aigle, Marina Bely, Isabelle Masneuf-Pomarède,

- Pascal Durrens, Denis Dubourdieu, and Gaël Yvert. 2007. "Single QTL Mapping and Nucleotide-Level Resolution of a Physiologic Trait in Wine *Saccharomyces Cerevisiae* Strains." *FEMS Yeast Research* 7 (6): 941–52.
- Marullo, Philippe, M Bely, I Masneuf-Pomarede, M Pons, M Aigle, and D Dubourdieu. 2006. "Breeding Strategies for Combining Fermentative Qualities and Reducing off-Flavor Production in a Wine Yeast Model." *FEMS Yeast Research* 6 (2): 268–79.
- Marullo, Philippe, Gael Yvert, Marina Bely, Michel Aigle, and Denis Dubourdieu. 2007. "Efficient Use of DNA Molecular Markers to Construct Industrial Yeast Strains." *FEMS Yeast Research* 7 (8): 1295–1306.
- Mizoguchi, Hiroko, Takahiro Yamauchi, Mutsumi Watanabe, Hiroshi Yamanaka, Akira Nishimura, and Hideo Hanamoto. 2002. "Different Missense Mutations in PDR1 and PDR3 Genes from Clotrimazole-Resistant Sake Yeast Are Responsible for Pleiotropic Drug Resistance and Improved Fermentative Activity." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93 (2): 221–27.
- Mollapour, Mehdi, and Peter W Piper. 2007. "Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Targets the Yeast Fps1 Aquaglyceroporin for Endocytosis, Thereby Rendering Cells Resistant to Acetic Acid." *Molecular and Cellular Biology* 27 (18): 6446–56.
- Morales, Lucia, and Bernard Dujon. 2012. "Evolutionary Role of Interspecies Hybridization and Genetic Exchanges in Yeasts." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 76 (4): 721–39.
- Novo, Maite, Frédéric Bigey, Emmanuelle Beyne, Virginie Galeote, Frédéric Gavory, Sandrine Mallet, Brigitte Cambon, et al. 2009. "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* 106 (38): 16333–38.
- Orij, Rick, Stanley Brul, and Gertien J Smits. 2011. "Intracellular pH Is a Tightly Controlled Signal in Yeast." *Biochimica et Biophysica Acta* 1810 (10): 933–44.
- Plech, M., J. a. G. M. de Visser, and R. Korona. 2013. "Heterosis Is Prevalent Among Domesticated but Not Wild Strains of *Saccharomyces Cerevisiae*." *G3(Bethesda, Md.) ; Genes|Genomes|Genetics* 4 (2): 315–23.
- R Development Core Team, R. 2011. "R: A Language and Environment for Statistical Computing." Edited by R Development Core Team. *R Foundation for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Ribéreau-Gayon, Pascal, Denis Dubourdieu, Bernard Donèche, and Aline Lonvaud. 2006. *Handbook of Enology, Vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2nd editio. Wiley.
- Salinas, Francisco, Francisco A Cubillos, Daniela Soto, Verónica Garcia, Anders Bergström, Jonas Warringer, M Angélica Ganga, Edward J Louis, Gianni Liti, and Claudio Martinez. 2012. "The Genetic Basis of Natural Variation in Oenological Traits in *Saccharomyces Cerevisiae*." *PloS One* 7 (11):
- Salmon, Jean Michel. 1997. "Enological Fermentation Kinetics of an Isogenic

- Ploidy Series Derived from an Industrial *Saccharomyces Cerevisiae* Strain." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83 (3): 253–60.
- Schnell, F W, and C C Cockerham. 1992. "Multiplicative vs. Arbitrary Gene Action in Heterosis." *Genetics* 131 (2): 461–69.
- Semel, Yaniv, Jonathan Nissenbaum, Naama Menda, Michael Zinder, Uri Krieger, Noa Issman, Tzili Pleban, Zachary Lippman, Amit Gur, and Dani Zamir. 2006. "Overdominant Quantitative Trait Loci for Yield and Fitness in Tomato." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (35): 12981–86.
- Shapira, R, T Levy, S Shaked, E Fridman, and L David. 2014. "Extensive Heterosis in Growth of Yeast Hybrids Is Explained by a Combination of Genetic Models." *Heredity*, no. October 2013. Nature Publishing Group: 1–11.
- Sinha, Himanshu, Lior David, Renata C. Pascon, Sandra Clauder-Münster, Sujatha Krishnakumar, Michelle Nguyen, Getao Shi, et al. 2008. "Sequential Elimination of Major-Effect Contributors Identifies Additional Quantitative Trait Loci Conditioning High-Temperature Growth in Yeast." *Genetics* 180 (3): 1661–70.
- Sinha, Himanshu, Bradly P. Nicholson, Lars M. Steinmetz, and John H. McCusker. 2006. "Complex Genetic Interactions in a Quantitative Trait Locus." *PLoS Genetics* 2 (2): 140–47.
- Steinmetz, Lars M, Himanshu Sinha, Dan R Richards, Jamie I Spiegelman, Peter J Oefner, John H McCusker, and Ronald W Davis. 2002. "Dissecting the Architecture of a Quantitative Trait Locus in Yeast." *Nature* 416 (6878): 326–30.
- Stelkens, R B, M A Brockhurst, G D D Hurst, E L Miller, and D Greig. 2014. "The Effect of Hybrid Transgression on Environmental Tolerance in Experimental Yeast Crosses." *Journal of Evolutionary Biology* 27 (11): 2507–19.
- Stelkens, RB, and MA Brockhurst. 2014. "Hybridization Facilitates Evolutionary Rescue." *Evol Appl.* Dec; 7(10): 1209–1217.
- Stuber, C W, S E Lincoln, D W Wolff, T Helentjaris, and E S Lander. 1992. "Identification of Genetic Factors Contributing to Heterosis in a Hybrid from Two Elite Maize Inbred Lines Using Molecular Markers." *Genetics* 132 (3): 823–39.
- Swinnen, Steve, Kristien Schaerlaekens, Thiago Pais, Jürgen Claesen, Georg Hubmann, Yudi Yang, Mekonnen Demeke, et al. 2012. "Identification of Novel Causative Genes Determining the Complex Trait of High Ethanol Tolerance in Yeast Using Pooled-Segregant Whole-Genome Sequence Analysis." *Genome Research* 22 (5): 975–84.
- Teixeira, Miguel C, Luís R Raposo, Nuno P Mira, Artur B Lourenço, and Isabel Sá-Correia. 2009. "Genome-Wide Identification of *Saccharomyces Cerevisiae* Genes Required for Maximal Tolerance to Ethanol." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (18): 5761–72.
- Timberlake, William E, Margaret A Frizzell, Keith D Richards, and Richard C Gardner. 2011. "A New Yeast Genetic Resource for Analysis and Breeding." *Yeast (Chichester, England)* 28 (1): 63–80.
- Torija, M. J., Gemma Beltran, Maite Novo, Montse Poblet, José Manuel

- Guillamón, Albert Mas, and Nicolas Rozès. 2003. "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* 85 (1-2): 127–36.
- Walker, Michelle E, Trung D Nguyen, Tommaso Liccioli, Frank Schmid, Nicholas Kalatzis, Joanna F Sundstrom, Jennifer M Gardner, and Vladimir Jiranek. 2014. "Genome-Wide Identification of the Fermentome; Genes Required for Successful and Timely Completion of Wine-like Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae*." *BMC Genomics* 15 (1): 552.
- Watanabe, M, H Mizoguchi, and A Nishimura. 2000. "Disruption of the ABC Transporter Genes PDR5, YOR1, and SNQ2, and Their Participation in Improved Fermentative Activity of a Sake Yeast Mutant Showing Pleiotropic Drug Resistance." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89 (6): 569–76.
- Welcker, C., C. Thé, B. Andréau, C. De Leon, S. N. Parentoni, J. Bernal, J. Félicité, et al. 2005. "Heterosis and Combining Ability for Maize Adaptation to Tropical Acid Soils." *Crop Science* 45 (6). Crop Science Society of America: 2405.
- Wilcox, Lisa J, Dina A Balderes, Brook Wharton, Arthur H Tinkelenberg, Govinda Rao, and Stephen L Sturley. 2002. "Transcriptional Profiling Identifies Two Members of the ATP-Binding Cassette Transporter Superfamily Required for Sterol Uptake in Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (36): 32466–72.
- Xiao, J, J Li, L Yuan, and S D Tanksley. 1995. "Dominance Is the Major Genetic Basis of Heterosis in Rice as Revealed by QTL Analysis Using Molecular Markers." *Genetics* 140 (2): 745–54.
- Yang, Yudi, Maria R. Foulquié-Moreno, Lieven Clement, Éva Erdei, An Tanghe, Kristien Schaerlaekens, Françoise Dumortier, and Johan M. Thevelein. 2013. "QTL Analysis of High Thermotolerance with Superior and Downgraded Parental Yeast Strains Reveals New Minor QTLs and Converges on Novel Causative Alleles Involved in RNA Processing." *PLoS Genet* 9 (8): e1003693.
- Zeyl, C, and G Bell. 1997. "The Advantage of Sex in Evolving Yeast Populations." *Nature* 388 (6641): 465–68.
- Zeyl, Clifford. 2006. "Experimental Evolution with Yeast." *FEMS Yeast Research* 6 (5): 685–91.
- Zimmer, Adrien, Cécile Durand, Nicolás Loira, Pascal Durrens, David James Sherman, and Philippe Marullo. 2014. "QTL Dissection of Lag Phase in Wine Fermentation Reveals a New Translocation Responsible for *Saccharomyces Cerevisiae* Adaptation to Sulfite." *PLoS ONE* 9 (1): 37–39.
- Zörgö, Enikő, Arne Gjuvsland, Francisco a. Cubillos, Edward J. Louis, Gianni Liti, Anders Blomberg, Stig W. Omholt, and Jonas Warringer. 2012. "Life History Shapes Trait Heredity by Accumulation of Loss-of-Function Alleles in Yeast." *Molecular Biology and Evolution* 29 (7): 1781–89.

ABBREVIATIONS

QTL: Quantitative Trait Loci

ANOVA: Analysis of Variance

ns-SNP: non-synonymous Single Nucleotide Polymorphisms

INDEL: Insertion DEletion

RHA: Reciprocal Hemizygous Analysis

Pdrp: Pleiotropic drug response proteins

HOG: High Osmolarity Glycerol

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank Pr. Isabelle Sagot and Pr. Jonas Warringer for kindly giving some of the strain used in the study. The help of Christopher Hubert (genomic facility in Bordeaux) to properly construct the DNA libraries and sequence the genome was much appreciated by the authors. We also thank Alain Dautan for its help in the structural alignment of PMA1 with Pymol software. The English form of the present manuscript has been kindly controlled by Ray Geoffrey and Ana Hranilovic. Finally, many thanks to the winery Juve&Camps for providing base wine and to Biolauffort for funding the sequencing of the strains.

Strain	Genetic background	Genotype ^{a,b,c,d,e}	Origin ^f
Y04381	S288c	BY4741; <i>mat a</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2 Δ 0</i> ; <i>met15 Δ 0</i> ; <i>ura3 Δ 0</i> ; <i>YGL013c::kanMX4</i>	Euroscarf
Y06979	S288c	BY4741; <i>mat a</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2 Δ 0</i> ; <i>met15 Δ 0</i> ; <i>ura3 Δ 0</i> ; <i>YGL013c::kanMX4</i>	Euroscarf
Y05455	S288c	BY4741; <i>mat a</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2 Δ 0</i> ; <i>met15 Δ 0</i> ; <i>ura3 Δ 0</i> ; <i>YGL013c::kanMX4</i>	Euroscarf
Y06978	S288c	BY4741; <i>mat a</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2 Δ 0</i> ; <i>met15 Δ 0</i> ; <i>ura3 Δ 0</i> ; <i>YGL013c::kanMX4</i>	Euroscarf
Y04644	S288c	BY4741; <i>mat a</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2 Δ 0</i> ; <i>met15 Δ 0</i> ; <i>ura3 Δ 0</i> ; <i>YGL013c::kanMX4</i>	Euroscarf
Y05451	S288c	BY4741; <i>mat a</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2 Δ 0</i> ; <i>met15 Δ 0</i> ; <i>ura3 Δ 0</i> ; <i>YGL013c::kanMX4</i>	Euroscarf
Y24376	S288c	BY4743; <i>mat a/α</i> ; <i>his3Δ1/his3 Δ 1</i> ; <i>leu2 Δ 0/leu2 Δ 0</i> ; <i>lys2 Δ 0</i> ; <i>LYS2; MET15/met15 Δ 0</i> ; <i>ura3 Δ 0/ura3 Δ 0</i> ; <i>YGL008c::kanMX4/YGL008c</i>	Euroscarf
Y24639	S288c	BY4743; <i>mat a/α</i> ; <i>his3Δ1/his3 Δ 1</i> ; <i>leu2 Δ 0/leu2 Δ 0</i> ; <i>lys2 Δ 0</i> ; <i>LYS2; MET15/met15 Δ 0</i> ; <i>ura3 Δ 0/ura3 Δ 0</i> ; <i>YGL008c::kanMX4/YGL008c</i>	Euroscarf
GN	monosporic clone of VL1	<i>HO/HO</i> ; <i>chr: VIII</i> ; <i>chr: XV-t-XVI</i> ;	(Marullo, Aigle, et al. 2007)
SB	monosporic clone of BO213	<i>HO/HO</i> , <i>chr:VIII</i> , <i>chrXV</i> , <i>chr:XVI</i>	(Marullo, Aigle, et al. 2007)
hoGN	GN	haploid derivate of GN, <i>ho::NATMX4</i> , <i>mat a</i>	(Albertin et al. 2013)
hoSB	SB	haploid derivate of SB, <i>ho::kanMX4</i> , <i>mat α</i>	(Albertin et al. 2013)
BN	F1 hybrid	hoSB x GN hybrid, <i>ho::kanMx4/HO</i> , <i>mat a/mat α</i>	(Marullo et al. 2006)
HO-BN	F1 hybrid	SB X GN hybrid, <i>HO/HO mat a/mat α</i>	(Marullo, Yvert, et al. 2007)
GΔS-PDR1	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YGL013^{GN}::kanMX4/YGL013^{SB}</i>	this study
SΔG-PDR1	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YGL013^{GN}/YGL013^{SB}::kanMX4</i>	this study
GΔS-GSC2	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YGR032^{GN}::kanMX4/YGR032^{SB}</i>	this study
SΔG-GSC2	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YGR032^{GN}/YGR032^{SB}::kanMX4</i>	this study
GΔS-VMA13	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YPR036^{GN}::kanMX4/YPR036^{SB}</i>	this study
SΔG-VMA13	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YPR036^{GN}/YPR036^{SB}::kanMX4</i>	this study
GΔS-MSP1	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YGR028^{GN}::kanMX4/YGR028^{SB}</i>	this study
SΔG-MSP1	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YPR028^{GN}/YPR028^{SB}::kanMX4</i>	this study
GΔS-MSB2	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YGR014^{GN}::kanMX4/YGR014^{SB}</i>	this study
SΔG-MSB2	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YGR014^{GN}/YGR014^{SB}::kanMX4</i>	this study
GΔS-SRO7	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YPR032^{GN}::kanMX4/YPR032^{SB}</i>	this study
SΔG-SRO7	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YPR032^{GN}/YPR032^{SB}::kanMX4</i>	this study
GΔS-PMA1	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YGL008^{GN}::kanMX4/YGL008^{SB}</i>	this study
SΔG-PMA1	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YGL008^{GN}/YGL008^{SB}::kanMX4</i>	this study
GΔS-SEC9	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YGR009^{GN}::kanMX4/YGR009^{SB}</i>	this study
SΔG-SEC9	HO-BN	hemizygote hybrid <i>YGR009^{GN}/YGR009^{SB}::kanMX4</i>	this study

Table 1. Yeast strains used in the study.

a *mat a* or *mat α* refers to the mating type of the haploid line

b *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0* refers to auxotrophic markers

c *ho* and *HO* refers to the hetero/homothalism status of the strains

d *chr: XV-t-XVI* refers to the translocated form of the chromosome XVI described in Zimmer et al. 2016

e *NATMX4* and *kanMx4* refers to the antibiotic cassettes used for gene disruption

f Euroscarf collection web site: <http://www.euroscarf.de>

Table 2. Phenotypic characterization the parental strains, their hybrid (HO-BN) and the segregants.

	Pmax (bars)	Rate (bar/day)	t0.5 (days)	t2 (days)	t5 (days)
GN	5.33	0.53	4.00	8.60	26.00
SB	5.53	0.73	4.00	7.10	15.00
hoGN	5.50	0.61	5.00	9.00	28.00
hoSB	5.57	0.92	5.00	7.00	13.00
Significance^a (GN vs SB)		**		**	***
HO-BN	5.37	1.30	3.00	5.00	13.00
d/m	-0.011	1,06	-0,25	-0,36	-0,36
Heritability (%)	90.66	91.72	61.42	90.25	97.85
Transgression (%)	29.91	58.12	32.48	38.46	18.80

^a The levels of significance are indicated as follows: *** , pvalue ≤ 0.001 ; ** pvalue ≤ 0.01

Table 3. Phenotypic variance explained by each QTL detected.

Trait ^a	QTL1 (chr IV)	QTL2 (chr VII)	QTL3 (chr XVI)	QTL1*QTL2	QTL2*QTL3	QTL1*QTL3	Cumulated
<i>rate</i>	*	**		*			34.16%
	2.79%	23.60%		7.76%			
<i>t2</i>	.	**	*				37.73%
	7.80%	15.85%	14.07%				
<i>t5</i>			***		***		63.60%
			49.04%		14.56%		

^a The levels of significance are indicated as follows: ***, pvalue≤0.001; ** pvalue ≤0.01; * pvalue ≤0.05; . pvalue: ≤0.1.

Table 4. Candidate genes selected based on their position, function and the presence of non synonymous SNP in the parental strain sequences

GENE	FUNCTION	CHANGES IN THE PROTEINE SEQUENCE	QTL
GSC2	Catalytic subunit of 1,3-beta-glucan synthase, involved in formation of the inner layer of the spore wall.	SB: S124P, R1536M, I1502M, L1650F. GN: R382C	QTL2
MSP1	Mitochondrial protein involved in sorting of proteins in the mitochondria; putative membrane-spanning ATPase	SB: P38S, T284I	QTL2
MSB2	Mucin family member involved in various signaling pathways	SB: S529F	QTL2
PDR1	Zinc cluster protein that is a master regulator involved in recruiting other zinc cluster proteins to pleiotropic drug response elements (PDREs) to fine tune the regulation of multidrug resistance genes	SB: H438Y, F570, N1117K GN: L955S, K1020N.	QTL2
PMA1	Plasma membrane H ⁺ -ATPase, pumps protons out of the cell; major regulator of cytoplasmic pH and plasma membrane potential	SB: H54Q, L176M, D200E, Q283R, V289L, KQ431IE, D718N, E875Q. GN: P74L	QTL2
SEC9	t-SNARE protein important for fusion of secretory vesicles with the plasma membrane	SB: QW378XX, NA363DS, EVDHS366(370)SSNXG, deletion: 379-387(WFMDEQQQQ), L465V.	QTL2
SRO7	Effector of Rab GTPase Sec4p; forms a complex with Sec4p and t-SNARE Sec9p; involved in exocytosis and docking and fusion of post-Golgi vesicles with plasma membrane	SB: I81L, G432A	QTL3
VMA13	Subunit H of the V1 peripheral membrane domain of V-ATPase; part of the electrogenic proton pump found throughout the endomembrane system; serves as an activator or a structural stabilizer of the V-ATPase.	GN: D120G	QTL3

Table 5. Values of each kinetic parameter, plus their standard error, in every pH condition studied for both hemizygotes (*PMA1* and *VMA13*).

gene	pH	trait	GN/ Δ SB	Δ GN/SB	Significance ^a
<i>PMA1</i>	2.8	<i>Pmax</i>	5.49 ± 0.03	5.82 ± 0.06	**
		<i>rate</i>	0.54 ± 0.04	0.91 ± 0.13	*
		<i>t0.5</i>	2.56 ± 0.08	2.23 ± 0.03	*
		<i>t2</i>	7.46 ± 0.07	5.6 ± 0.06	***
		<i>t5</i>	27.13 ± 2.14	17.5 ± 0.72	*
	3	<i>Pmax</i>	5.74 ± 0.04	5.88 ± 0.03	
		<i>rate</i>	0.69 ± 0.07	1.27 ± 0.18	*
		<i>t0.5</i>	2.46 ± 0.03	2 ± 0.08	*
		<i>t2</i>	5.8 ± 0.15	4.6 ± 0.16	*
		<i>t5</i>	15.53 ± 0.63	14.6 ± 0.41	
	3.3	<i>Pmax</i>	5.64 ± 0.09	5.73 ± 0.04	
		<i>rate</i>	1.15 ± 0.06	1.5 ± 0.01	**
		<i>t0.5</i>	2.33 ± 0.06	1.86 ± 0.03	**
		<i>t2</i>	5.1 ± 0.2	4.6 ± 0.01	
		<i>t5</i>	17.03 ± 1.98	14.6 ± 0.05	
<i>VMA13</i>	2.8	<i>Pmax</i>	5.49 ± 0.02	5.42 ± 0.08	
		<i>rate</i>	0.51 ± 0.05	0.84 ± 0.03	**
		<i>t0.5</i>	2.66 ± 0.03	2.53 ± 0.03	**
		<i>t2</i>	6.1 ± 0.15	5.3 ± 0.03	**
		<i>t5</i>	14.9 ± 0.40	16.1 ± 0.82	
	3	<i>Pmax</i>	5.78 ± 0.02	5.53 ± 0.05	**
		<i>rate</i>	0.92 ± 0.10	1.13 ± 0.05	
		<i>t0.5</i>	2.36 ± 0.07	2.23 ± 0.08	
		<i>t2</i>	5 ± 0.15	4.76 ± 0.14	
		<i>t5</i>	12.7 ± 0.46	15.4 ± 0.50	**
	3.3	<i>Pmax</i>	5.74 ± 0.03	5.50 ± 0.05	*
		<i>rate</i>	1.15 ± 0.17	1.36 ± 0.06	
		<i>t0.5</i>	2.06 ± 0.09	2 ± 0.05	
		<i>t2</i>	4.57 ± 0.14	4.43 ± 0.14	
		<i>t5</i>	13.46 ± 0.67	15.73 ± 0.67	*

^a The level of significance is indicated as follows: *** , pvalue≤0.001; ** pvalue ≤0.01; * pvalue ≤0.05.

FIGURE CAPTION

Figure 1. (A) Second fermentation time course for all the strains used, in orange the parental strain hoGN, in red the parental strain hoSB, in purple their hybrid BN, in green the 117 segregants. (B) Fermentative rate phenotypic distribution among the segregating population. If possible try to make the parental dots entire

Figure 2. (A) Linkage analysis results. In purple for the fermentative rate, in green for the t2 and in orange for t5. (B) Segregants phenotypic distribution depending on their genotype at the loci of the mapped QTL.

Figure 3. Results of the RHA analysis for the fermentative rate (A), t2 (B) and t5 (C). The represented value is the mean of three different biological triplicates; the standard error is represented in error bars. An ANOVA was applied to assess the significance of the phenotypic difference between hemizygotes. The level of significance between hemizygotes is indicated as follows: * $p\text{value} \leq 0.05$; ** $p\text{value} \leq 0.01$; *** $p\text{values} \leq 0.001$.

Figure 4. Localization of the genes *PDR1*, *PMA1* and *MSB2* in the Chromosome VII, the allele indicated is the favourable one. Phenotypic distribution of the segregants grouped according to their genotype at those three genes. Different letters indicate significant differences between groups (significance level, $\alpha=0.05$).

Figure 5. (A) Non-synonymous sequence polymorphisms (ns-SNP) found within GN and SB on *PMA1* gene. Each orange star represents one ns-SNP, the predicted cytoplasmic and trans membrane region as well as the domains were obtain from the Pfam web site (Embl-Ebi). A protein sequence alignment allows the detection of 9 ns-SNP that will be compared to the sequence of 97 *S cerevisiae* strains (File S6). (B) The *D200E* variation found in the strain SB was located in a very conserved region within 144 transmembrane transporters. (C) The *E875Q* allele (SB) impacts the orientation of the 5th transmembrane domain of the protein (3D model carried out with *phyre2* tools)

Figure 6. Kinetic curves of the hemizygotes for *PMA1* and *VMA13*, and the diploid hybrid strain BN obtained when fermenting base wine at different pH: 2.8, 3.0 and 3.3. The kinetic curve is the mean between triplicates and the shadow around the line represents the standard error.

SUPPLEMENTARY FILE LEGEND

Figure S1 Genetic map used

Each red tick represents the position of one of the 1071 biallelic markers used for the QTL mapping.

Table S1 Genetic and phenotypic data used for the 117 progeny clones of hoBN.

Table S2 List of non-synonymous SNP found between SB and GN for the genes MSB2, PDR1, PMA1 and VMA13.

The deleterious or neutral effect of each amino acid change was tested by using both Proveal and SIFT algorithms (see methods)

File S1 R-scripts used

File S2 Supplementary methods

File S3 List of 97 Msb2p protein sequences

File S4 List of 97 Pma1p protein sequences

File S5 List of 97 Vma13p protein sequences

File S6 List of 97 Pdr1 protein sequences

Fig1.

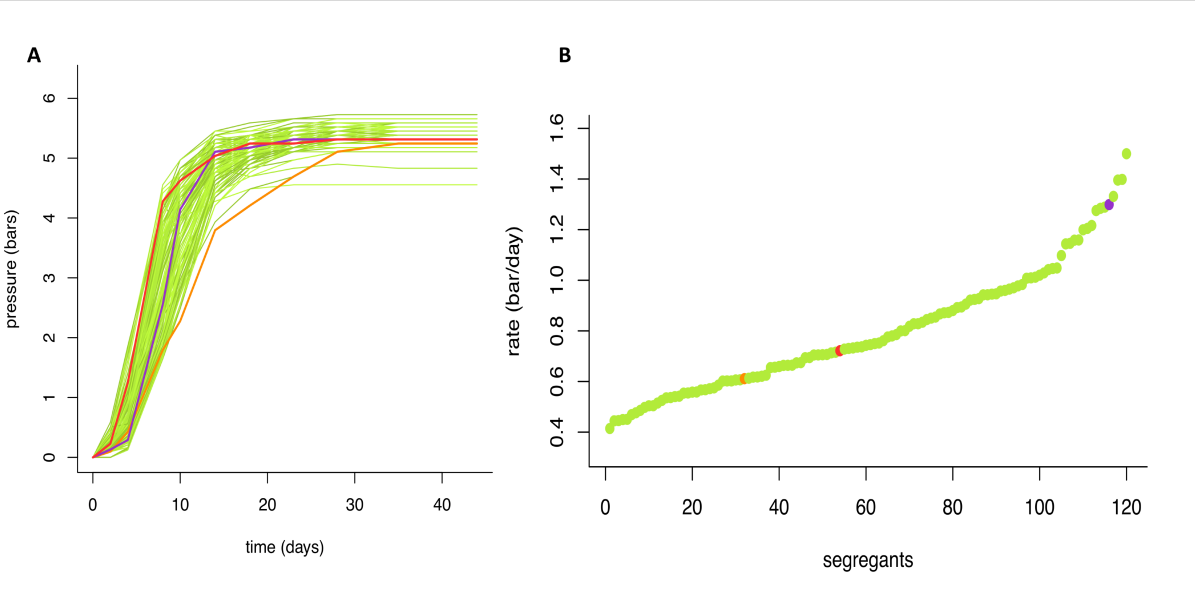
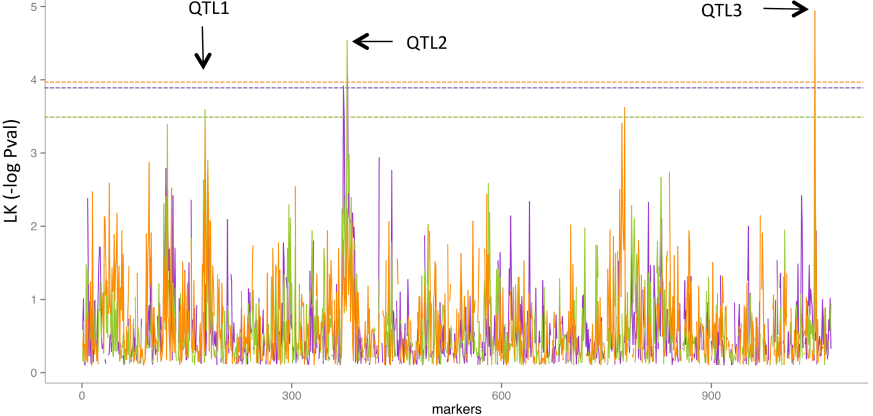


Fig2

A



B

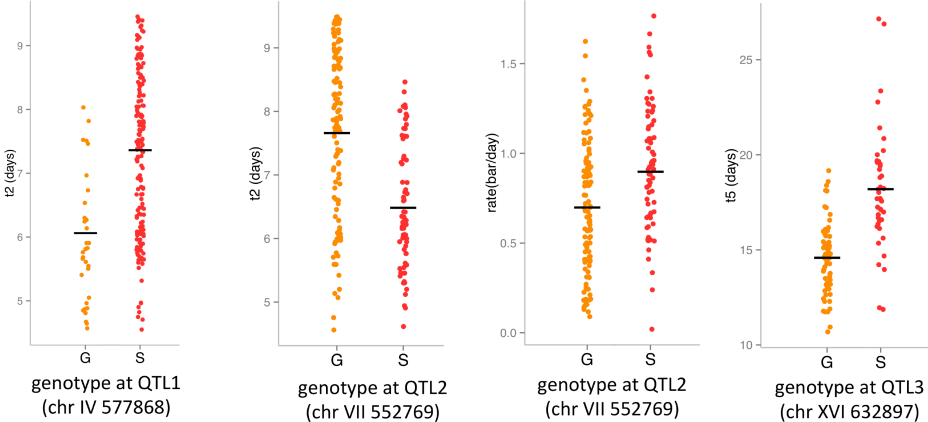


Fig3

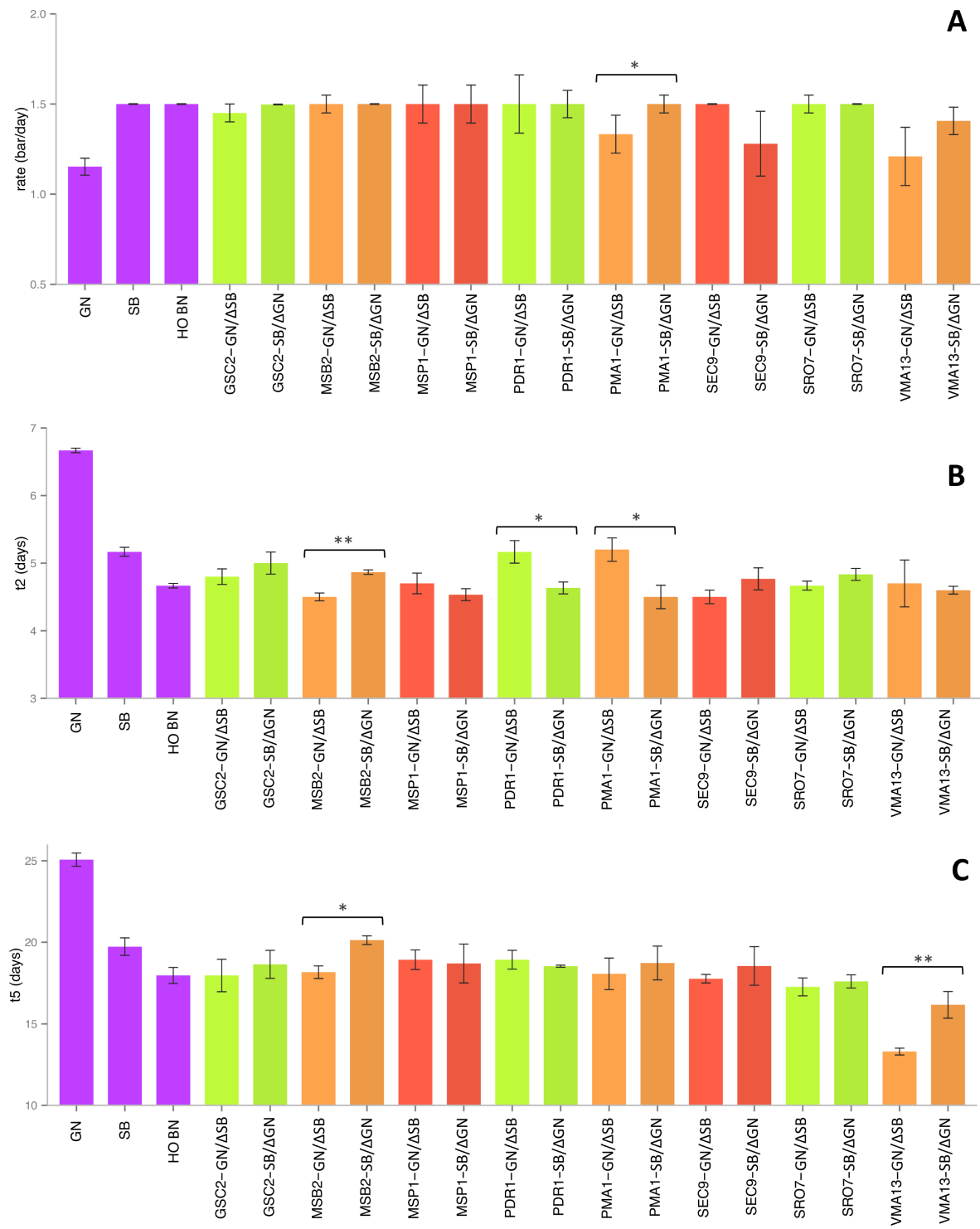


Fig4

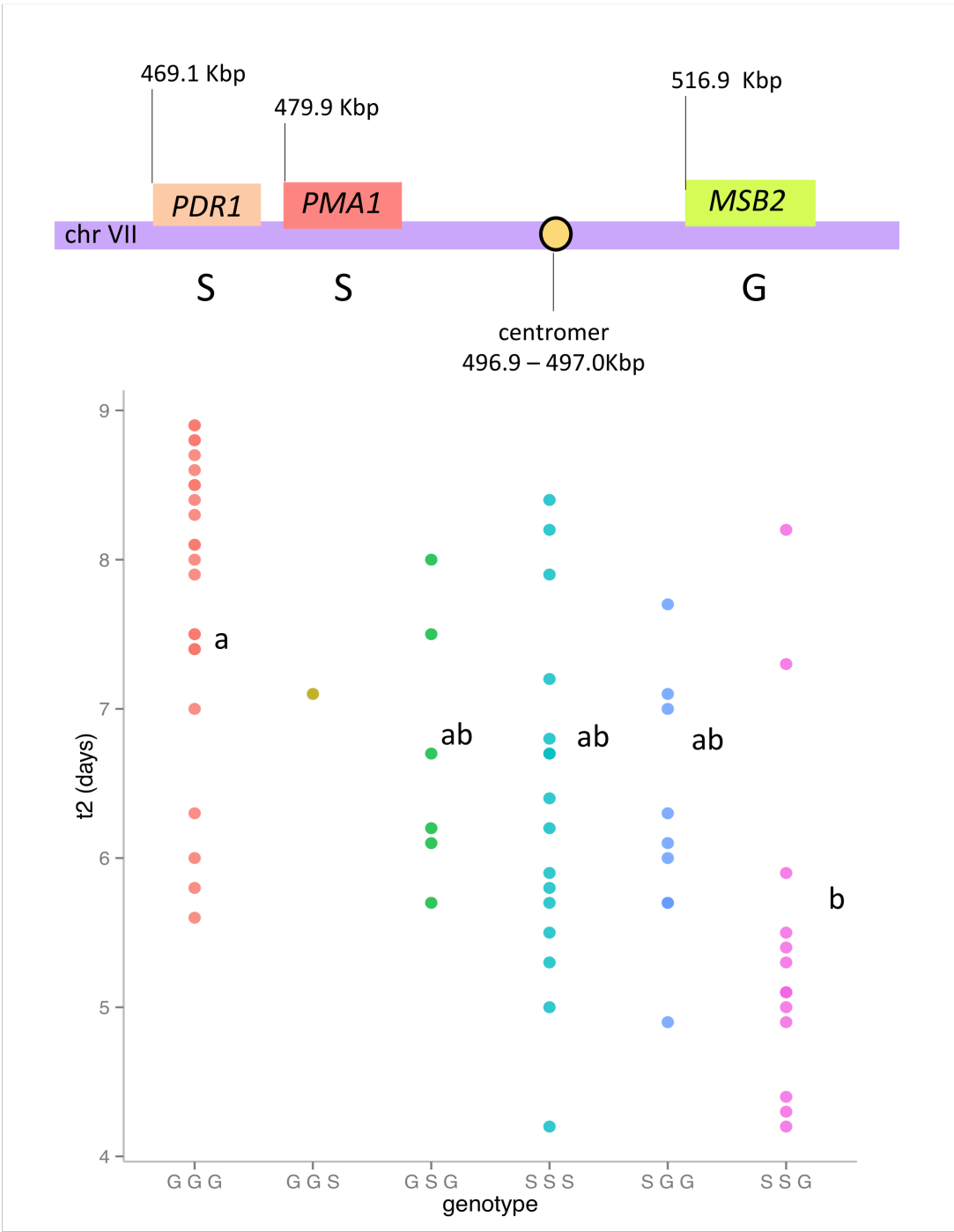


Fig5

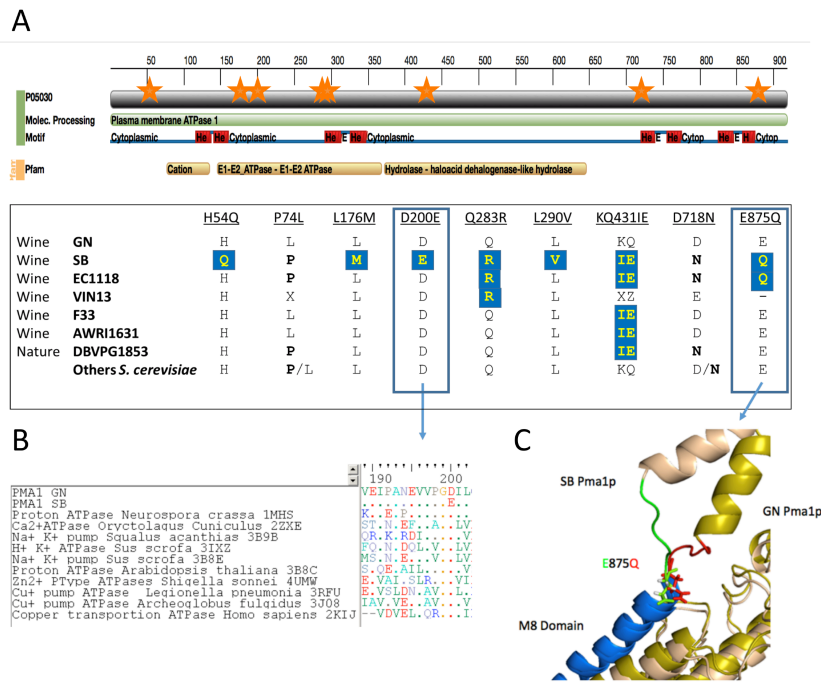
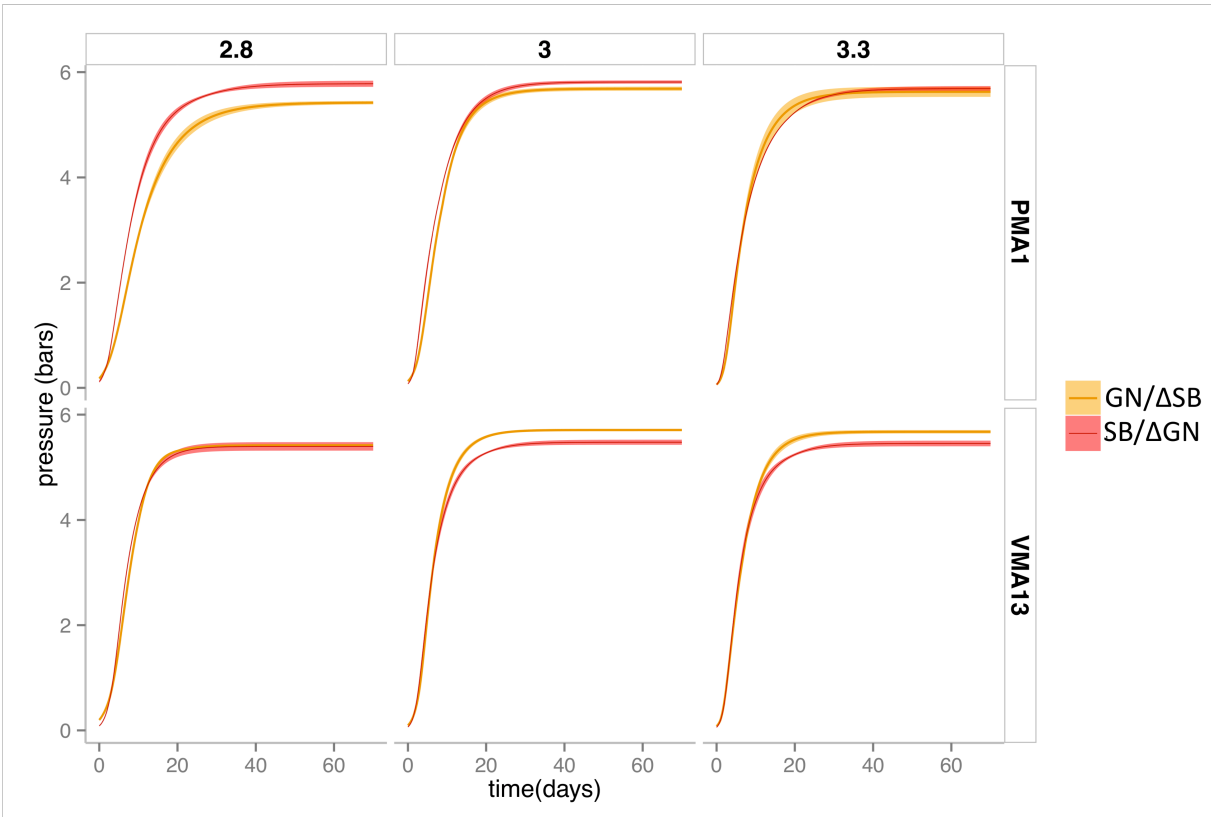


Fig6



Titre : Étude des causes génétiques de la plasticité phénotypique par une approche de cartographie de QTL. Cas de la levure œnologique *Saccharomyces cerevisiae*

Résumé :

La levure *S. cerevisiae* est la seule espèce capable de terminer la fermentation alcoolique du jus de raisin qui est l'étape principale de la vinification. A cause de la forte variabilité technologique retrouvée chez cette espèce, des travaux de sélection sont réalisés dans le but d'utiliser des levains performants pour l'industrie. Ces souches montrent des différences importantes à la fois dans leurs cinétiques fermentaires et leur bilans en métabolites, ce qui impacte la qualité des vins. La réponse phénotypique des levures varie également de manière considérable et non homogène face aux variations environnementales. La compréhension des mécanismes génétiques expliquant cette réponse différenciée est une question scientifique non triviale. Elle revêt une importance particulière en œnologie, où les conditions de vinifications sont très changeantes (millésimes, cépages, terroirs, conduites de vinifications...). Afin de pouvoir proposer des levains garantissant le succès des fermentations dans un large éventail de conditions, nous proposons ici de mieux comprendre ces mécanismes d'interaction Génétique x Environnement dans un contexte œnologique. L'identification de locus génétiques (*Quantitative Trait Loci* (QTL)) contrôlant des caractères quantitatifs est rendue possible par des approches de cartographie de QTLs. Celles-ci nécessitent l'étude d'une vaste descendance en ségrégation qui doit être caractérisée sur le plan génétique et phénotypique. L'établissement d'un lien statistique entre des marqueurs génétiques et un phénotype permet la localisation de QTLs influant les caractères phénotypés. Au cours de cette thèse une méthode de phénotypage pour suivre les fermentations de plusieurs centaines d'individus a été mise au point. Grâce à elle, deux descendances génotypées par séquençage à haut débit ont été phénotypées en faisant varier les conditions de fermentations. Cela a permis l'identification de nombreux QTLs et d'estimer leur impact sur la robustesse des souches. L'implication des allèles de trois gènes qui montrent une forte interaction avec l'environnement et qui possèdent des effets pléiotropiques liés au métabolisme du SO₂ a été prouvée moléculairement. Les résultats obtenus font l'objet d'une discussion générale sur l'utilisation de QTLs pour la sélection de levures plus performantes.

Title : Genetic basis of phenotypic plasticity by a QTL mapping approach. Case of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract :

The yeast *S. cerevisiae* is the only species able to complete the alcoholic fermentation of grape must which is the main step of the wine-making process. Because of the high technological variability found in this species, selection work is carried out with the aim of using efficient yeasts for the industry. These strains show important differences both in their fermentation kinetics and their metabolite yield which affects the wines quality. In addition to these important phenotypic variations, the phenotypic response of yeasts varies considerably and not homogeneously against environmental variations. Understanding the genetic mechanisms that explain these differentiated responses to environmental variations is a non-trivial scientific question. This is of particular importance in oenology, where the vinification conditions are highly variable (vintages, grape variety, terroirs, oenological practices...). In order to obtain yeasts ensuring the success of the fermentations under a wide range of conditions, we propose here to better understand these mechanisms of interaction Gene x Environment in an oenological context. The identification of genetic locus (*Quantitative Trait Loci* (QTL)) controlling quantitative characters is made possible by QTL mapping approaches. These approaches require the study of a large progeny in segregation that must be characterized genetically and phenotypically. The establishment of a statistical link between genotype and phenotype allows the localization of QTLs that have an impact on phenotyped characters. During this thesis a phenotyping method that allows us to follow the fermentations of several hundred individuals has been developed. Thanks to it, two progenies genotyped by whole genome sequencing have been phenotyped in different environmental conditions. This lead to the identification of many QTLs and to the estimation of their impact in strain robustness. The implication of the alleles of 3 genes showing a strong interaction with environment and pleiotropic effects linked to the SO₂ metabolism has been proved molecularly. The results achieved are discussed in the context of QTL exploitation for the selection of more efficient yeast.