



HAL
open science

Valorisation de la diversité chimique et génétique du houblon sauvage de la région Hauts-de-France dans un objectif de développement variétal et d'applications agro-alimentaires et agricoles

Anne-Sophie Paguet

► **To cite this version:**

Anne-Sophie Paguet. Valorisation de la diversité chimique et génétique du houblon sauvage de la région Hauts-de-France dans un objectif de développement variétal et d'applications agro-alimentaires et agricoles. Biotechnologies. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILR035 . tel-04368892

HAL Id: tel-04368892

<https://theses.hal.science/tel-04368892v1>

Submitted on 2 Jan 2024

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

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



*VALORISATION DE LA DIVERSITÉ CHIMIQUE ET GÉNÉTIQUE DU HOUBLON SAUVAGE
DE LA RÉGION HAUTS-DE-FRANCE DANS UN OBJECTIF DE DÉVELOPPEMENT VARIÉTAL
ET D'APPLICATIONS AGRO-ALIMENTAIRES ET AGRICOLES*

Thèse de doctorat

En vue d'obtenir le grade de docteur de l'Université de Lille

Spécialité Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment, physiologie

Préparée au sein de l'Unité Mixte de Recherche transfrontalière 1158 BioEcoAgro
École Doctorale n°104 Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Présentée et soutenue publiquement à Lille le 27 octobre 2022 par

Anne-Sophie PAGUET

Composition du jury

Séverine DERBRÉ

Maître de conférences HDR, Université d'Angers

Alexandre MACIUK

Maître de conférences HDR, Université Paris-Saclay

Alain HEHN

Professeur, Université de Lorraine

Philippe REIGNAULT

Professeur, Université du Littoral-Côte d'Opale-ANSES

Marc SCHMITT

Directeur de recherche, IFBM

Rapportrice

Rapporteur

Examineur

Président du jury, Examineur

Examineur

Direction de thèse

Céline RIVIÈRE

Maître de conférences HDR, Université de Lille

Sevser SAHPAZ

Professeur, Université de Lille

Ali SIAH

Professeur, JUNIA-ISA

Directrice de thèse

Co-directrice de thèse

Co-encadrant de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement ma directrice de thèse Céline Rivière pour son encadrement, ses conseils avisés, ses relectures attentives et son soutien tout au long de ce travail. Nous avons rencontré bien des déconvenues mais ces trois années à vos côtés ont été extrêmement enrichissantes tant sur le plan personnel que scientifique. Un immense merci de m'avoir fait confiance, j'en suis particulièrement reconnaissante.

Je remercie également les membres du jury de cette thèse d'avoir accepté de relire et d'évaluer ce travail, Séverine Derbré et Alexandre Maciuk en tant que rapporteurs, et Alain Hehn, Philippe Reignault et Marc Schmitt en tant qu'examineurs. Notamment, je remercie Alexandre Maciuk et Alain Hehn d'avoir fait partie de mes comités de suivi individuels, merci pour vos bons conseils et vos judicieuses orientations lors de nos discussions. Une pensée particulière pour Alain Hehn, qui m'a fait découvrir, il y a 6 ans déjà, le vaste monde des substances naturelles et du métabolisme spécialisé.

J'adresse aussi mes remerciements aux partenaires financiers de ce projet : la région Hauts-de-France, l'I-Site et l'Institut Français de la Brasserie et de la Malterie sans qui cette thèse n'aurait pu se concrétiser.

J'aimerais sincèrement remercier mon co-encadrant Ali Siah pour les excellentes conditions d'accueil à Junia ISA, ainsi que pour son soutien et son expertise dont il m'a fait part tout au long de ces trois années.

Mes remerciements vont également à Vincent Phalip et Jean-Louis Hilbert pour leur accueil au sein de l'Institut Charles Viollette ainsi que Sevser Sahpaz, co-directrice de ce travail de thèse, pour son accueil au sein du laboratoire de pharmacognosie et de l'équipe 5.

Au sein de l'UMRt, je remercie les collègues avec qui j'ai eu la chance de collaborer et qui ont vivement participé à la concrétisation de ce travail. En particulier, je remercie Marie-Laure Fauconnier et toute son équipe, notamment Franck Michels, pour le chaleureux accueil en Belgique et le partage de leur expertise pour les analyses de composés volatils ; Sylvie Chollet et Mathilde Vandenberghe pour la formation du panel bière et pour m'avoir initiée aux analyses sensorielles ; Thierry Cadalen pour m'avoir formée à l'utilisation du séquenceur capillaire et aux analyses de microsattellites ; Caroline Rambaud et son équipe pour la mise en place des cultures *in-vitro* ; François-Xavier Fontaine et Roland Molinié pour

leur accueil à l'Université d'Amiens, leur précieuse aide en métabolomique et leur entière disponibilité sur cette dernière ligne droite. Une pensée également pour Christophe Waterlot de m'avoir permis de réaliser les analyses de sols au LGCgE et pour son aide dans les dosages.

J'ai énormément appris grâce à vos accueils respectifs, merci d'avoir pris le temps de me former.

J'aimerais remercier aussi le Lycée de Douai, et en particulier David Lutun et Norman Degardin, pour l'accueil de la houblonnière expérimentale et la réalisation des brassins tests. Je remercie également Anne-Hélène Martin du comité de promotion de la Chambre d'Agriculture de la région Hauts-de-France, Aurélien Honoré pour les précieuses informations sur l'histoire des houblons en région, les houblonniers et tous les acteurs de la filière houblon de la région pour les échanges enrichissants. Mes remerciements vont également à la FREDON Hauts-de-France pour le suivi des ravageurs dans la houblonnière expérimentale.

Merci à tous les membres du panel bière qui ont accepté de goûter soigneusement tous les échantillons, ainsi qu'aux brasseurs qui ont bien voulu participer à l'enquête de filière. J'en profite également pour remercier Audrey Michenaud-Rague et Marie Stankowiak pour leur aide sur la réalisation de ces enquêtes.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire de pharmacognosie pour leur accueil et les moments de convivialité. Je remercie très vivement Gabriel pour les collectes et les informations du suivi de la houblonnière expérimentale, ainsi que les petits bavardages constructifs et son intérêt pour mon travail. Merci aussi d'avoir partagé votre savoir et vos connaissances du houblon. Je remercie également Jennifer pour son dévouement et son aide au laboratoire en toute circonstance, et Sophie, plus qu'une collègue, pour son précieux soutien scientifique et personnel. J'adresse enfin tout mon soutien à Asma, Abda et Malak pour la suite de leur doctorat.

À l'ISA, je remercie les membres de l'équipe BioGAP de m'avoir accueillie plus longtemps que prévu. En particulier je remercie Rémi, Justine, Marie-Astrid et Claire pour les bons moments de décompression passés ensemble.

De manière plus personnelle, je remercie mes amies pour leur écoute et les moments partagés ensemble, vous avez été d'un soutien essentiel. Nos rêves d'il y a quelques années se concrétisent, et malgré la distance et nos vies bien remplies, je sais que je peux compter sur vous. J'ai hâte de vous revoir ! Merci aussi à ma famille pour les trop rares mais si précieux moments passés ensemble, j'espère aussi vous revoir très vite. Jacques et Claude, je pense très fort à vous. Des immenses remerciements à mes parents qui sont toujours là pour me soutenir dans mes projets. Mon papa qui m'a donné le goût des défis et d'aller au bout des choses, et ma maman qui m'a appris à être curieuse et observatrice de la richesse de ce qui nous entoure. Si j'en suis arrivée là c'est grâce à vous, vos valeurs et votre amour, d'ailleurs tout à

commencé par mon initiation précoce aux allèles. Merci aussi la petite Marilotte (la vérité éclate au grand jour *so sorry*) pour tes potites blagounettes et ta délicieuse bonne humeur communicative, un shot de sérotonine en première ligne. Tu sais que tu peux compter sur moi, quel bonheur d'être ta grande sœur. Un merci poilu à mon lagomorphe préféré, le King BBR, de m'avoir tenu compagnie pendant toutes ces heures de rédaction. Enfin un merci aussi grand que mon amour pour Julien. Merci pour ton soutien inconditionnel et d'avoir pris soin de moi. Tu as illuminé ce petit bout de chemin, ensemble on s'est supporté vers la réussite ; et maintenant qu'on a des supers sacs-à-dos, j'ai hâte de voir quel sera notre prochain sommet à gravir ensemble.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	iii
Table des matières	vi
Table des illustrations	ix
Liste des tableaux	xii
Liste des abréviations	xiii
Avant-propos	xv
Valorisation scientifique	xviii
Introduction générale	1
CHAPITRE 1. Contexte	5
1. Botanique et chimie du houblon	7
1.1. Botanique	7
1.2. Composition chimique des cônes	9
2. Utilisation du houblon en brasserie	15
2.1. Historique de l'utilisation du houblon dans la fabrication de la bière	15
2.2. Processus de fabrication de la bière	16
2.3. Le houblonnage	20
3. Marché du houblon	24
3.1. Production mondiale	24
3.2. Production française	25
3.3. Production dans les Flandres	26
4. Analyse de la filière brassicole en région Hauts-de-France	27
4.1. Introduction	28
4.2. Matériel et méthodes	30
4.3. Résultats de l'enquête	31
4.4. Conclusion de l'analyse de filière	42
Objectifs de la thèse	43
CHAPITRE 2. État de l'art	45
Partie A. Le houblon sauvage : un réservoir de diversité	47
1. L'importance de la diversité génétique	47
2. Travaux d'investigation de la diversité des houblons sauvages	48
3. De l'investigation de la diversité à la création variétale	50
4. Outils analytiques d'investigation de la diversité des houblons sauvages	51
<i>Agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding</i>	52
<i>Abstract</i>	52
<i>Introduction</i>	52
<i>Chemical characterisation of hops for variety discrimination and the brewing industry</i>	53
<i>Genetic and genomic resources for hop breeding</i>	63
<i>Agronomic challenges of hop production related to chemical composition</i>	69
<i>References</i>	84
Partie B. Concepts théoriques et outils techniques pour l'investigation de la diversité sauvage	95
A. ANALYSE ET CARACTÉRISATION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE	95
1. Outils d'analyse de la diversité génétique	95
1.1. Notion de polymorphisme	95
1.2. Les marqueurs génétiques	96
1.3. Biais possibles en génétique des populations	99

2. Analyse des structures génétiques.....	100
2.1. Indicateurs de la diversité	100
2.2. Arbre phylogénétique	104
2.3. Méthode bayésienne	104
B. CARACTÉRISATION PHYTOCHIMIQUE	105
1. Extraction et analyse des composés volatils	105
1.1. Définition des composés terpéniques volatils	105
1.2. Extraction des composés volatils	106
1.3. Analyse des composés volatils	109
2. Caractérisation d'extraits végétaux et quantification des composés phénoliques	111
2.1. Séparation et détection des composés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) ...	111
2.2. Mise en place et validation d'une méthode de quantification	117
2.3. Analyse de métabolomique non ciblée	119
C. ANALYSES SENSORIELLES	122
1. Définition	122
2. Etablissement d'un profil sensoriel par un panel qualifié	122
2.1. Qualification des sujets.....	123
2.2. Entraînement, contrôle et suivi du panel	123
2.3. Conditions de dégustation.....	124
2.4. Tests sensoriels : établissement d'un profil sensoriel	125
2.5. Formation des sujets	126
2.6. Réalisation du profil sensoriel	127
D. ANALYSES MULTIVARIÉES	129
1. Objectifs	129
2. Exemple d'analyses multivariées.....	130
2.1. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)	130
2.2. Analyse en Composantes Principales (ACP)	131
2.3. Analyse Factorielle Multiple (AFM)	132
2.4. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA)	135
CHAPITRE 3. Résultats	137
Étude I. Analyses multivariées pour l'identification et la caractérisation de la diversité des houblons sauvages des Hauts-de-France collectés in situ	140
<i>Multivariate analysis of chemical and genetic diversity of wild hop (Humulus lupulus L.) collected in situ in Northern France</i>	142
Abstract	142
1. Introduction	142
2. Results and discussion	145
3. Conclusion	154
4. Materials and methods	154
References	157
Supplementary informations	159
Étude II. Caractérisation de la diversité phénotypique des houblons sauvages des Hauts-de-France.....	190
1. Introduction	190
2. Matériel et méthodes	191
3. Résultats.....	191
4. Conclusion	196
Étude III. Potentialité de l'utilisation des houblons sauvages du Nord de la France pour un futur développement variétal	197
A. Potentiel agronomique des accessions sauvages étudiées : suivi des pathogènes en houblonnière expérimentale	199
1. Méthodologie.....	199
2. Résultats.....	200
3. Conclusion.....	206

B. Caractérisation phytochimique des houblons sauvages du Nord de la France en conditions ex-situ : potentiel aromatique des houblons issus du terroir	207
<i>Phytochemical characterization of wild hops (Humulus lupulus L.) from northern France and evaluation of their aromatic potential in beer: towards a lead of a local hop variety</i>	209
Abstract	209
1. Introduction	209
2. Material and methods	210
3. Results	211
4. Discussion	214
5. Conclusion	222
References	223
Supplementary informations.....	226
Discussion générale	245
Partie expérimentale.....	251
1. Matériel collecté.....	253
1.1. Échantillonnage des houblons sauvages en conditions in-situ	253
1.2. Échantillonnage des houblons sauvages en conditions ex-situ	254
2. Phénotypages	254
3. Caractérisation des biotopes : analyse de sols	254
3.1. Poids secs et perte au feu.....	254
3.2. Mesures de pH et de conductimétrie	255
3.3. Dosage des éléments Ca, Mg, Na et K	255
4. Caractérisation génétique par marqueur microsatellites	256
4.1. Extraction de l'ADN.....	256
4.2. Amplification des régions microsatellites	256
4.3. Analyse par électrophorèse capillaire	258
4.4. Traitement statistique.....	259
5. Caractérisation phytochimique des cônes	260
5.1. Caractérisation des composés volatils par HS-SPME GC-MS	260
5.2. Quantification des composés phénoliques majoritaires par UHPLC-UV	262
5.3. Analyses de métabolomique non ciblée	271
6. Caractérisation physico-chimique et aromatique des bières	273
6.1. Recette des brassins tests.....	273
6.2. Caractérisation physico-chimique	273
6.3. Analyse des composés volatils par SBSE-GC-MS	275
6.4. Analyse sensorielle.....	275
7. Analyse statistique.....	276
7.1. Analyse indépendante de chaque jeu de données.....	276
7.2. Analyse multivariée sur les données in-situ par AFM	277
7.3. Analyse multivariée des données ex-situ par OPLS-DA	277
Bibliographie	279
Annexes	299

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. A : Houblonnière dans les Flandres. B : Houblon sauvage dans le Nord de la France (photos personnelles).....	7
Figure 2. A : Cônes. B : Schéma d’une coupe longitudinale de cône de houblon (d’après Camille 2000).....	8
Figure 3. Développement racinaire du houblon (d’après Graf et al., 2014).....	9
Figure 4. Principales activités des extraits de houblon en santé humaine (adapté de Lin et al. 2019 et Bocquet et al. 2018).....	10
Figure 5. Structures chimiques des flavonoïdes majoritaires des cônes de houblon.....	11
Figure 6. Structures chimiques des acylphloroglucinols majoritaires des cônes de houblon.....	12
Figure 7. Terpènes majoritaires de l’huile essentielle des cônes de houblon.....	14
Figure 8. Diagramme des opérations de fabrication de la bière (d’après Fillaudeau et Blanpain-Avet 1999).....	16
Figure 9. Transformation des acides α (A) et β (B) au cours du processus de fabrication de la bière.....	18
Figure 10. Pellets de houblons (source : alphabière.fr).....	21
Figure 11. Répartition de la production mondiale de houblon en 2021 par pays (en volume), d’après Bart-Haas Group (2022).....	24
Figure 12. Évolution de la production française de houblon, de 1961 à 2018 (en tonnes), d’après FAOSTAT (2022).....	25
Figure 13. Évolution des surfaces de houblon (à gauche) et du nombre de planteurs (à droite) dans le Nord depuis 1972 (source : Chambre d’Agriculture NPDC 2022).....	26
Figure 14. Répartition géographique des 148 brasseries de la région Hauts-de-France.....	28
Figure 15. Principaux acteurs de la filière houblon en région Hauts-de-France.....	29
Figure 16. Variétés utilisées par les brasseurs enquêtés.....	32
Figure 17. Fournisseurs des houblons des brasseries enquêtées. Informations récoltées sur 60% des volumes achetés. A : volumes (en kg). B : Fournisseurs, par type de brasseries.....	32
Figure 18. Part de contractualisation dans les brasseries répondantes.....	33
Figure 19. Forme de houblons utilisée par les brasseurs.....	34
Figure 20. Critères de choix des houblons selon les répondants.....	35
Figure 21. Définition du terme “local” selon les répondants en fonction de leur département.....	35
Figure 22. Raisons évoquées par les répondants pour lesquelles ils ne privilégient pas l’utilisation de houblon local.....	36
Figure 23. Préoccupation du critère « impact carbone » pour l’utilisation de houblon local selon les répondants.....	36
Figure 24. Niveau de connaissances des brasseries répondantes sur la filière régionale, selon leur niveau de production.....	37
Figure 25. Moyens d’information des brasseurs sur les différentes variétés de houblon existantes.....	37
Figure 26. Leviers d’amélioration des connaissances des variétés locales par les brasseurs selon les répondants.....	

.....	38
Figure 27. Attentes des répondants sur les caractéristiques du houblon produit en local.	39
Figure 28. A : Possibilité de co-investissement dans l’installation de houblonniers. B : Possibilité de financer l’installation de jeunes houblonniers ou le développement des houblonniers actuels en augmentant le prix d’achat du houblon.	40
Figure 29. Valeurs à défendre par le label “houblon local” selon les répondants s’il venait à être mis en place.	41
Figure 30. Leviers envisagés par les répondants pour le développement de la filière houblon en région.	41
Figure 31. Parenté entre les variétés anglaises de houblon (d’après Haunold 1981).	48
Figure 32. Technique de marquage par microsattellites (d’après le GNIS, 2019).	98
Figure 33. Synthèse des interactions des plantes avec leur environnement induites par les composés volatils (d’après Dudareva et al. 2006).	105
Figure 34. Schéma du dispositif SPME (d’après Papet et al. 2010).	107
Figure 35. Illustration de l’extraction par barreau SBSE immergé (d’après Prieto et al. 2010 et Malandain 2012).	108
Figure 36. Schéma des principaux composants d’une GC/MS (d’après Emwas et al. 2015).	109
Figure 37. Représentation schématique du principe de la technique de spectrométrie de masse (d’après Menet 2011).	113
Figure 38. Représentation d’un analyseur de masse quadripolaire (d’après El-Aneed et al. 2009).	115
Figure 39. Schéma d’un analyseur hybride constitué d’un hexapôle de focalisation (q_0), d’un quadripôle (Q_1), d’une cellule de collision (q_2) et d’un tube de vol orthogonal (d’après Mesmin 2012).	116
Figure 40. Niveau d’intervention de la métabolomique dans l’échelle d’organisation moléculaire du vivant.	120
Figure 41. Workflow de déroulement d’analyses métabolomiques (d’après Roux et al. 2011a).	121
Figure 42. Salle de dégustation de Junia ISA conforme à la norme NF 8589 :2007.	125
Figure 43. Exemple de dendrogramme, avec un seuil de coupure définissant 4 classes.	130
Figure 44. Présentation des données traitées par ACP. A : Carte factorielle du poids des individus ; B : Carte factorielle du poids des variables (d’après Su et Yin 2021).	132
Figure 45. Structuration des jeux de données pour une AFM (d’après Husson).	132
Figure 46. OPLS-DA workflow (d’après Boccard et Rutledge 2013).	135
Figure 47. Exemple de graphiques des scores prédictifs OPLS-DA consensuels. A : diagramme de score prédictif t_p1 vs. t_p2 ; B : diagramme de score orthogonal t_o1 vs. t_o2 (d’après Boccard et Rutledge 2013).	136
Figure 48. Exemples de variabilité morphologique parmi les houblons sauvages étudiés. (A) Feuille monlobée (D2) ; (B) Feuille trilobée (H1) ; (C) Feuille pentalobée (G1) ; (D) Grand cône (D4) ; (E) Petit cône (H3) (F) Tige rouge (C3) ; (G) Tige verte (A3).	192
Figure 49. ACP sur les caractéristiques morphologiques les plus discriminantes des 50 accessions sauvages caractérisées. A : Carte factorielle des individus ; B : Loading plot.	195
Figure 50. Houblonnière de conservation des accessions sauvages au lycée de Douai-Wagnonville en septembre 2021.	197
Figure 51. Récapitulatif du nombre d’accessions caractérisées dans les différentes études du présent manuscrit.	198
Figure 52. Suivi des populations d’acariens. A : Évolution des populations de tétranyques tisserands sur l’ensemble des pieds de houblon ; B : Évolution du pourcentage moyen de feuilles infestées par les tétranyques, sur l’ensemble des pieds de houblon.	200

Figure 53. Suivi des populations de pucerons. A : Évolution des populations de pucerons sur l'ensemble des pieds de houblon. B : Évolution du pourcentage moyen de feuilles infestées par les pucerons sur l'ensemble des pieds de houblon	201
Figure 54. Révélation aux UV du gel d'agarose à 1% après migration dans le TAE des échantillons d'ADN amplifiés par PCR avec le marqueur HI GT-16 permettant de vérifier le correct déroulement du protocole d'amplification.	258
Figure 55. Capture d'écran du logiciel Genotyper (Applied Biosystem, CA) permettant l'analyse des tailles d'allèles des amplicons, ici pour les marqueurs HI GT-16 en bleu et GT1-K1-4 en vert.....	259
Figure 56. Protocole d'obtention des composés phénoliques prénylés.....	263
Figure 57. Chromatogramme obtenu par UHPLC-DAD à 330 nm du sous-extrait DCM de cônes femelles de houblon cv. Nugget injecté à 100 µg/mL.	264
Figure 58. Profil chromatographique de la purification des acylphlorogucinols et du XN par CPC avec le système Arizona P à 330 nm (en bleu) et 370 nm (en rose).	265
Figure 59. CCM des fractions 18 à 28 issues de la CPC lors de la purification des acides α et β avec le système Arizona P à 365 nm à partir du sous-extrait organique de cônes de Nugget.....	266
Figure 60. Chromatogramme obtenu par UHPLC-DAD à 330 nm de la fraction F1, constituée des acides α et β en sortie de CPC, injectée à 100 µg/mL.	266
Figure 61. Chromatogramme obtenu par UHPLC-DAD à 370 nm de la fraction de xanthohumol, en sortie de CPC, injectée à 100 µg/mL.	266
Figure 62. Profil chromatographique de purification des acylphloroglucinols par HPLC-UV préparative à 330 nm.	268

Seules les figures du corps de texte du manuscrit, en français, sont référencées dans la table ci-dessus. Les figures des articles ont leur propre numérotation.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition chimique moyenne des cônes de houblon après séchage (d'après Almaguer et al. 2014).	9
Tableau 2. Récapitulatif des différents types de houblonnage (d'après Podeszwa and Harasym 2016).	23
Tableau 3. Récapitulatif des brasseries enquêtées selon leur volume de production (en hL) et leur département.	31
Tableau 4. Consommation en houblon des brasseries répondantes.	31
Tableau 5. Avis des répondants quant à une possible contractualisation.....	39
Tableau 6. Classification des principales causes des erreurs de données de marqueurs microsatellites d'après Pompanon et al. 2005.	99
Tableau 7. Indices de fixation et de différenciation génétique utilisés dans le cadre de cette étude (d'après Dalongeville, 2017).	102
Tableau 8. Caractéristiques des différents sorbants greffés sur les fibres SPME (d'après Burgot 2019).	107
Tableau 9. Normes à respecter lors de l'entraînement, du contrôle et du suivi d'un groupe de sujets (d'après Actia 2014).	124
Tableau 10. Tableau de synthèse des tests sensoriels pouvant être utilisés suivant l'objectif de l'étude (d'après ACTIA 2014).	126
Tableau 11. Tests statistiques utilisés en analyse sensorielle (d'après ACTIA 2014).	128
Tableau 12. Descripteurs morphologiques qualitatifs (tiges, feuilles, cônes) des houblons sauvages caractérisés.	193
Tableau 13. Moyenne et ANOVA des traits morphologiques des houblons sauvages caractérisés.	194
Tableau 14. Index de conversion du nombre de formes mobiles et d'oeufs en classe, établi par Weihrauch (source : FREDON 2021).....	200
Tableau 15. Pourcentage de feuilles infestées par les acariens, pucerons ou lépidoptères, ou présentant des auxiliaires, selon les pieds de houblon.....	204
Tableau 16. Composition du mix de PCR pour un échantillon.....	256
Tableau 17. Programme de PCR pour l'amplification des régions microsatellites	257
Tableau 18. Gradient utilisé pour la quantification par UHPLC-UV des composés phénoliques prénylés dans les extraits hydro-éthanoliques.....	262
Tableau 19. Gradient utilisé pour le fractionnement de la phase organique avec l'HPLC préparative	267
Tableau 20. Pureté des standards purifiés, analyses sur l'UHPLC-MS-DAD.	268
Tableau 21. Rendements en acides α et β purifiés par HPLC préparative.....	269
Tableau 22. Paramètres de validation des gammes étalon du xanthohumol, de la cohumulone, de l'humulone, de la colupulone et de la lupulone par UHPLC-UV pour le dosage des métabolites majoritaires dans les extraits bruts de houblon (pour l'Étude I).....	270
Tableau 23. Précision de la méthode de dosage des métabolites majoritaires de l'extrait brut de cônes. Les coefficients de variation (en %) expriment la répétabilité intra et inter-jour.....	270
Tableau 24. Gradient en UHPLC utilisé pour les analyses de métabolomique non ciblée	271

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	Analyse en Composante Principale
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> / Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
AFMD	Analyse Factorielle de Données Mixtes
AFNOR	Association française de normalisation
ANOVA	Analyse de la variance
CAH	Classification Ascendante Hiérarchique
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CE	<i>Capillary electrophoresis</i> / Électrophorèse capillaire
CP	Composante Principale
CPC	<i>Centrifugal Partition Chromatography</i> / Chromatographie de Partage Centrifuge
DAD	<i>Diode Array Detection</i> / Détection par barrette de diodes
DDA	<i>Data-dependent acquisition</i> / Analyse dépendante de données
DMX	Desméthylxanthohumol
dNTP	Mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy adénine triphosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine triphosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate)
DVB/CAR/PDMS	Divinylbenzène / Carboxène / Polydiméthylsiloxane
EI	<i>Electronic Impact</i> / Impact électronique
EB	Extrait brut
EBC	<i>European Brewers Convention</i>
EBU	<i>European Bitterness Units</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i> / Agence Européenne du médicament
ESI	<i>Electrospray ionisation</i>
6-FAM	6-Carboxyfluorescéine
F_{ST}	Indice de fixation
GC-MS	<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i> / Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
ha	Hectares
Hex	6-Carboxy-1,4-dichloro-2',4',5',7'-tétrachlorofluoresceine
hL	Hectolitres
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> / Chromatographie liquide haute performance
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> / Spectrométrie de masse haute-résolution
HSI	<i>Hop Storage Index</i>
HS-SPME	<i>Head-Space Solid Phase Microextraction</i> / Micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête
HW	Hardy-Weinberg
IBU	<i>International Bitterness Unit</i>

ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IMS	<i>Ion Mobility Spectrometry / Spectrométrie par Mobilité Ionique</i>
ISO	Organisation Internationale de normalisation
IXN	Isoxanthohumol
L/L	Liquide/Liquide
LOD	<i>Limite Of Detection / Limite de détection</i>
LOQ	<i>Limite Of Quantification / Limite de quantification</i>
MCMC	Chaînes de Markov avec technique de Monte Carlo
MS	<i>Mass spectrometry / Spectrométrie de masse</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OPLS-DA	<i>Orthogonal partial least squares discriminant analysis / Projection orthogonale sur structures latentes</i>
PDA	<i>Photodiode-array / Détecteur à barrette de diodes</i>
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction / Réaction en chaîne par polymérase</i>
6-PN	6-prénylnaringénine
8-PN	8-prénylnaringénine
ppm	Partie par million
Q-ToF	<i>Quadrupole Time-of-flight / Quadrupôle-temps de vol</i>
HSI	<i>Hop Storage Index</i>
QC	<i>Quality Control / Contrôle qualité</i>
RAPD	<i>Random amplification of polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction fragment-length polymorphism</i>
RI	<i>Retention index / Indice de rétention</i>
SBSE	<i>Stir bar sorptive extraction / Extraction par sorption sur barreau magnétique</i>
S/L	Solide-liquide
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism / Polymorphisme nucléotidique</i>
SSR	<i>Simple sequence repeat</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
T_A	Température d'amplification
UHPLC	<i>Ultra high performance liquid chromatography / Chromatographie liquide à ultra haute performance</i>
UV	Ultraviolet
XN	Xanthohumol

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Unité Mixte de Recherche transfrontalière 1158 BioEcoAgro. Cette UMR est une nouvelle structure rassemblant environ 400 chercheurs franco-belges. Elle ambitionne de devenir un centre d'excellence internationale dans les domaines de l'ingénierie biologique appliqués à l'agriculture, la biotechnologie, l'agro-alimentaire et l'environnement. Elle rassemble des chercheurs de l'INRAE, de l'Université de Lille, de l'Université de Liège, de l'Université de Picardie Jules Verne et de JUNIA-ISA. Elle se focalise sur la combinaison d'approches (éco)systémique et moléculaire pour (i) la compréhension du fonctionnement des plantes et des écosystèmes dans des environnements naturels ou contrôlés et dans un contexte de changement climatique ; (ii) le décryptage et la maîtrise de la synthèse ou de la bioproduction de biomolécules actives (métabolites spécialisés et polymères d'origine végétale, enzymes et métabolites secondaires d'origine microbienne, peptides actifs issus de l'hydrolyse de protéines alimentaires) ; (iii) la biopréservation et la formulation des aliments. Ma thèse se positionne dans l'équipe 5 (métabolites spécialisés d'origine végétale) animée par le Pr. Sevser Sahpaz.

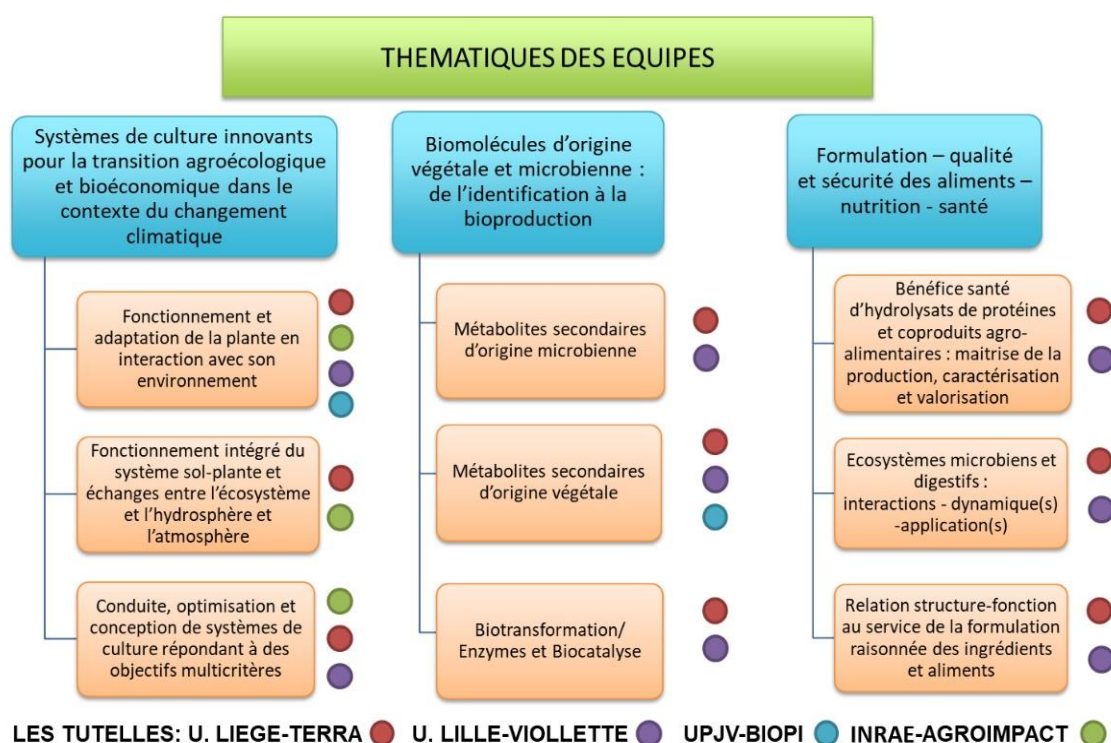


Figure i. Organisation des thématiques de recherche au sein de l'UMRt 1158 BioEcoAgro (source : www.bioecoagro.eu).

Au cours de mes travaux de recherche, j'ai pu bénéficier de la pluridisciplinarité de l'UMRt 1158 car ma thèse implique différents champs disciplinaires : phytochimie et métabolomique, génétique, agronomie, mathématiques appliquées et analyse sensorielle. J'ai ainsi eu l'opportunité de réaliser mes travaux de recherche sur plusieurs sites composant l'Unité Mixte de Recherche transfrontalière BioEcoAgro :

- la préparation des extraits de houblon, la purification et l'identification structurale des composés phénoliques prénylés, leur quantification dans les extraits par UHPLC-UV ont été effectuées au laboratoire de pharmacognosie sous l'encadrement du Dr Céline Rivière à la Faculté de Pharmacie (Université de Lille) ;
- les analyses de composés volatils dans les extraits de houblon par HS-SPME-GC-MS et dans les bières par SBSE-GC-MS ont été réalisées à Gembloux AgroBioTech (Université de Liège) en collaboration avec l'équipe du Pr Marie-Laure Fauconnier ;
- les analyses de métabolomique non-ciblée par UHPLC-HRMS et certaines analyses statistiques ont été principalement réalisées sur la plateforme analytique de l'Université de Picardie Jules Verne en collaboration avec les Drs Roland Molinié, Jean-Xavier Fontaine et David Mathiron. Les premiers passages d'échantillons ont été effectués sur la plateforme Realcat de l'Université de Lille en collaboration avec les Drs Barbara Deracinois et Christophe Flahaut ;
- les extractions d'ADN et l'amplification des régions microsatellites ont été faites à l'Institut Supérieur d'Agronomie (ISA, groupe JUNIA, Hauts-de-France) sous l'encadrement du Pr. Ali Siah ; leur analyse a été réalisée à la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lille avec la collaboration du Dr Thierry Cadalen ;
- les analyses sensorielles ont été effectuées au sein du laboratoire d'analyses sensorielles de Junia-ISA en collaboration avec le Dr Mathilde Vandenberghe et le Pr Sylvie Chollet.

J'ai également réalisé les analyses de sol au Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement (ULR 4515) sur le site de Junia-Isa, en collaboration avec le Pr Christophe Waterlot.

Le houblon est une plante régionale qui a déjà fait l'objet de précédentes recherches au sein de l'UMRt 1158 (anciennement Institut Charles Viollette). Celles-ci ont été initiées dès 2012 par le Dr Céline Rivière et plus particulièrement entre 2015 et 2018 avec la thèse de Laetitia Bocquet qui a porté sur l'utilisation des composés phénoliques du houblon comme moyen de lutte contre la résistance microbienne¹. Cette thèse a permis à mon encadrante de faire émerger plusieurs autres projets de recherche autour du houblon au sein de l'UMRt, dont par exemple la valorisation du houblon et des co-produits de culture du houblon en santé du végétal en collaboration avec le Pr Ali Siah et le Dr Jérôme Muchembled (Junia ISA) et le développement de cultures *in vitro* de houblon en collaboration

¹ Bocquet L (2018) Les composés phénoliques du houblon, *Humulus lupulus* L. : Lutte contre la résistance microbienne et perspectives industrielles. 201.

avec le Dr Caroline Rambaud (Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lille). Ces différents travaux ont amené ma directrice de thèse à interagir avec les différents acteurs de la filière houblon et brassicole en région, et plus récemment avec l'interprofession du houblon Interhoublon dont la création a vu le jour en 2020. Ces différentes interactions ont permis de mettre en place mon projet de recherche portant sur la diversité chimique et génétique des houblons sauvages en Région, financé par la Région Hauts-de-France, l'I-Site et l'IFBM (Institut Français de la Brasserie et de la Malterie). Ces travaux s'appuient sur une collection de houblons sauvages prélevés en *in-situ* par les Drs Céline Rivière et Gabriel Lefèvre en septembre 2019, pour lesquels des boutures de rhizomes ont été transplantés en houblonnière provisoire au lycée agricole de Douai-Wagnonville. Cette thèse de doctorat s'inscrit dans un projet plus large (financement FEADER 2021-2024)², réalisé en collaboration avec certains membres de l'UMRt BioEcoAgro, la Chambre d'Agriculture des Hauts-de-France, le lycée agricole de Douai et le GRECAT. Ce projet Feader est construit autour de 5 grands axes :

1. Mise en place de 1 ou 2 houblonnières expérimentales et conservatoires pérennes permettant d'accueillir la collection de houblons sauvages, les variétés commerciales cultivées en Région et certaines variétés anciennes
2. Suivi technique des houblonnières expérimentales
3. Suivi scientifique de ces houblonnières (notamment suivi des ravageurs et pathogènes et suivi phénotypique)
4. Brassage et analyse sensorielle
5. Analyse de filière auprès des brasseurs et des houblonniers

² Feader (2021-2024), sous-mesure 16.02 « aide aux projets pilotes et à la mise au point de nouveaux produits, pratiques, procédés et technologies » : Préservation et valorisation des variétés locales et sauvages de houblons des Hauts de France. Collaboration Université de Lille (porteur du projet : Dr Céline Rivière) / Junia-Isa (coordinateur : Pr Ali Siah) / Lycée agricole de Douai (coordinateur : David Lutun) / Chambre d'agriculture des Hauts-de-France (coordinatrice : Anne-Hélène Martin).

VALORISATION SCIENTIFIQUE

❖ PUBLICATIONS

Anne-Sophie Paguet, Ali Siah, Gabriel Lefèvre, Sevser Sahpaz et Céline Rivière. «Agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding». *Phytochemistry Reviews* 21, 667-708 (2022).

Anne-Sophie Paguet, Ali Siah, Gabriel Lefèvre, Sophie Moureu, Jennifer Samaillie, Franck Michels, Harmony Alves Dos Santos, Audrey Etienne-Debaecker, Barbara Deracinois, Christophe Flahaut, Thierry Cadalen, Caroline Rambaud, Sylvie Chollet, Roland Molinié, Jean-Xavier Fontaine, Christophe Waterlot, Marie-Laure Fauconnier, Sevser Sahpaz et Céline Rivière. « Multivariate investigation of the chemical and genetic diversity of wild hop (*Humulus lupulus* L.) collected *in situ* in Northern France». Acceptée dans *Phytochemistry*.

Anne-Sophie Paguet, Ali Siah, Gabriel Lefèvre, Mathilde Vandenberghe, David Lutun, Norman Degardin, Jennifer Samaillie, David Mathiron, Franck Michels, Marie-Laure Fauconnier, Sylvie Chollet, Roland Molinié, Jean-Xavier Fontaine, Sevser Sahpaz, Céline Rivière. « Phytochemical characterization of wild hops (*Humulus lupulus* L.) from northern France and evaluation of their aromatic potential in beer: towards a lead of a local hop variety ». En préparation.

Justine Jacquin, Sophie Moureu, Caroline Deweer, Asma Hakem, **Anne-Sophie Paguet**, Natacha Bonneau, Simon Bordage, Charles Dermont, Sevser Sahpaz, Jérôme Muchembled et Céline Rivière. « *In vitro* anti-oomycete activities of hop essential oil, extracts and some of their metabolites against *Phytophthora infestans* ». Acceptée dans *Agronomy*.

❖ COMMUNICATIONS ORALES EN LIGNE

Anne-Sophie Paguet « Exploration de la diversité chimique et génétique des houblons sauvages de la région Hauts-de-France dans un objectif d'usage brassicole local ». Journées MétaSP, 15 octobre 2020 (communication orale en ligne).

Anne-Sophie Paguet, Ali Siah, Sophie Moureu, Barbara Deracinois, Gabriel Lefèvre, Egon Heuson, Charles Dermont, Caroline Rambaud, Jean-Louis Hilbert, Sevser Sahpaz et Céline Rivière. “Investigation of chemical and genetic diversity of wild hops from the North of France into an objective of local brewery use”. Congrès FB2NP (The Franco-Brazilian Network on Natural Products), 14 décembre 2020 (communication orale en anglais en ligne).

Anne-Sophie Paguet, Ali Siah, Sophie Moureu, Barbara Deracinois, Gabriel Lefèvre, Egon Heuson, Marie-Laure Fauconnier, Caroline Rambaud, Jean-Louis Hilbert, Sevser Sahpaz et Céline Rivière. « Study of chemical and genetic diversity of wild hops in French Flanders. » Second annual Centre for Natural Products Discovery (CNPD) Conference 2021, Liverpool John Moores University, Liverpool, Angleterre, 13 et 14 mai 2021 (présentation flash en anglais en ligne).

Anne-Sophie Paguet, Ali Siah, Gabriel Lefevre, Sophie Moureu, Barbara Deracinois, Thierry Cadalen, Caroline Rambaud, Marie-Laure Fauconnier, Christophe Waterlot, Jean-Xavier Fontaine, Roland Molinié, Sevser Sahpaz et Céline Rivière. « Multivariate investigation of the diversity of wild hops *Humulus lupulus* L. collected in Northern France (Hauts-de-France region) ». Journées scientifiques AFERP (Association Francophone pour l’Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie), les 12 et 13 juillet 2022 (présentation orale en ligne).

❖ COMMUNICATIONS ORALES EN PRÉSENTIEL

Anne-Sophie Paguet, Ali Siah, Sophie Moureu, Gabriel Lefevre, Barbara Deracinois, Jean-Xavier Fontaine, Roland Molinié, Marie-Laure Fauconnier, Caroline Rambaud, Jean-Louis Hilbert, Sevser Sahpaz et Céline Rivière. « Analyse de la diversité chimique des houblons sauvages de la région Hauts-de-France dans un objectif de développement brassicole local ». 29^{èmes} journées scientifiques des Enseignants-Chercheurs en Sciences végétales et fongiques des Facultés de Pharmacie de langue française (Association STOLON). Reims, du 25 au 27 août 2021 (présentation orale en présentiel).

Anne-Sophie Paguet, Ali Siah, Gabriel Lefevre, Sophie Moureu, Barbara Deracinois, Thierry Cadalen, Caroline Rambaud, Marie-Laure Fauconnier, Christophe Waterlot, Jean-Xavier Fontaine, Roland Molinié, Sevser Sahpaz et Céline Rivière. « Multivariate analysis to investigate the diversity of wild hops *Humulus lupulus* L. collected in situ in the North of France ». PSE Young’s researchers meeting. Kolymbari, Crète, du 23 au 26 mai 2022 (présentation orale en présentiel).

❖ AUTRES ACTIVITÉS EN PARALLÈLE DU DOCTORAT

Participation à la 7^{ème} édition du Challenge Doc', organisé par le Collège Doctoral Lille Nord de France. **Anne-Sophie Paguet**, Asma Hakem et Justine Domont. « Optimisation de la récolte à maturité des graines de bourrache pour l'entreprise EARL Saint Antoine ». Challenge Doc 2021, Lille, du 30 juin au 2 juillet 2021. Obtention du prix de la cohésion d'équipe.

En parallèle de mes travaux de recherche, j'ai également fait partie entre avril 2021 et juin 2022 d'une équipe de doctorant(e)s du réseau *MétaSP* organisant des webinaires mensuels *MétaSP en Herbe* à destinations de jeunes chercheur(e)s en biologie végétale et membres du réseau *MétaSP*.

J'ai également été élue comme représentante des doctorants au conseil de laboratoire de l'ICV dès la première année de ma thèse.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le houblon, *Humulus lupulus* L., est une plante vivace dioïque, dont les pieds femelles sont cultivés pour leur utilisation en brasserie et dans une moindre mesure pour leurs applications pharmaceutiques. Les inflorescences femelles, appelées communément cônes, produisent des glandes à lupuline contenant des acides amers (dérivés d'acylphloroglucinol), des polyphénols et une huile essentielle riche en monoterpènes et sesquiterpènes qui confèrent à la plante ses activités biologiques et son originalité aromatique.

Le Nord de la France est historiquement une région productrice de houblon et une région brassicole. Bien que cette production brassicole régionale soit minoritaire sur le marché international (environ 0.04% de la production mondiale (Bart-Haas Group 2021)), on assiste depuis quelques années à un net regain d'intérêt pour la consommation de bières artisanales, brassées avec des ingrédients locaux, qui se traduit par une forte augmentation du nombre de micro-brasseries. Cette observation se traduit également par une demande croissante en houblons présentant des caractéristiques aromatiques originales pour leur utilisation en brasserie, ainsi que des caractéristiques agronomiques adaptées au terroir. Dans ce contexte, la diversité génétique des houblons sauvages constitue une ressource intéressante comme base pour une potentielle amélioration variétale. Plusieurs études portent sur la caractérisation de la diversité génétique et chimique du houblon sauvage aux États-Unis et dans différentes parties de l'Europe, mais aucune ne s'était encore intéressée à la diversité des houblons sauvages de la région des Hauts-de-France.

Ainsi, dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons cherché à caractériser la diversité des houblons sauvages de la région Hauts-de-France. Pour cela, 50 accessions sauvages ont été collectées en septembre 2019 par les Drs Céline Rivière et Gabriel Lefèvre dans le Nord de la France. Cette collection a constitué la base de ces travaux de recherche. Des boutures de rhizomes de ces accessions ont été transplantées dans une houblonnière expérimentale au lycée agricole de Douai afin de conserver ces ressources génétiques. Elles ont été comparées à dix variétés commerciales cultivées en région par la CoopHounord, la coopérative houblonnière du Nord de la France, et à trois variétés anciennes provenant de chez Yoris Cambie, houblonnier belge en agriculture biologique installé à Poperingue. Ce matériel génétique est également conservé sous forme de vitro-plants. L'étude *in-situ* et *ex-situ* de ces différentes accessions porte principalement sur leurs caractéristiques morphologiques, génétiques et phytochimiques. Des analyses sensorielles ont également été réalisées sur des brassins élaborés avec certaines de ces accessions plus productives et nous ont ainsi permis

d'analyser les caractéristiques organoleptiques et aromatiques de ces houblons.

Le présent manuscrit s'attache tout d'abord à comprendre le contexte régional et les attentes des brasseurs afin d'adapter au mieux le développement variétal, permettant ainsi de définir les objectifs de cette thèse (**Chapitre 1**). Un état de l'art sous forme de revue introduira l'agronomie du houblon et les pratiques culturelles ainsi que les enjeux de sa culture et de sa sélection pour l'industrie brassicole. Il mettra aussi en lumière les travaux antérieurs portant sur les houblons sauvages et leur potentiel dans le cadre d'un développement variétal. Cet état de l'art sera complété par une présentation des différents aspects techniques abordés au cours de ces travaux de recherche (**Chapitre 2**). Les principaux résultats obtenus seront ensuite décrits et discutés sous forme d'articles scientifiques (**Chapitre 3**). Enfin, avant un détail de la méthodologie employée, une discussion générale mettra en exergue les différentes perspectives dégagées par ces résultats.

CHAPITRE 1. CONTEXTE

CHAPITRE 1. CONTEXTE

1. Botanique et chimie du houblon

1.1. Botanique

Le houblon, plante d'intérêt dans le cadre de ma thèse, appartient à la famille des Cannabacées, tout comme le cannabis (*Cannabis sativa* L.) et d'autres espèces appartenant à l'ancienne famille des Celtidaceae. Selon le site actuel de *World Flora Online*, 6 espèces se distinguent dans le genre *Humulus* : *H. cordifolius* Miq., *H. lupulus* L., *H. neomexicanus* (A.Nelson & Cockerell) Rydb., *H. pubescens* (E. Small) Tembrock, *H. scandens* (Lour.) Merr. et *H. yunnanensis* Hu. (World Flora Online 2022). Certaines espèces ont en effet récemment été élevées du rang de variétés au rang d'espèces (Tembrock et al. 2016). Cependant, la taxonomie du genre *Humulus* reste très complexe et très discutée dans la littérature (Paguet et al., 2021)³. C'est une espèce diploïde ($2n = 2x = 20$) avec des chromosomes sexuels hétéromorphes (XX chez les plants femelles, XY chez les mâles) (Neve 1991). Ma thèse porte principalement sur *H. lupulus*. Le houblon est une plante vivace et volubile qui pousse en hauteur le long d'un support, pouvant atteindre jusqu'à 10 mètres de haut (**Figure 1**).



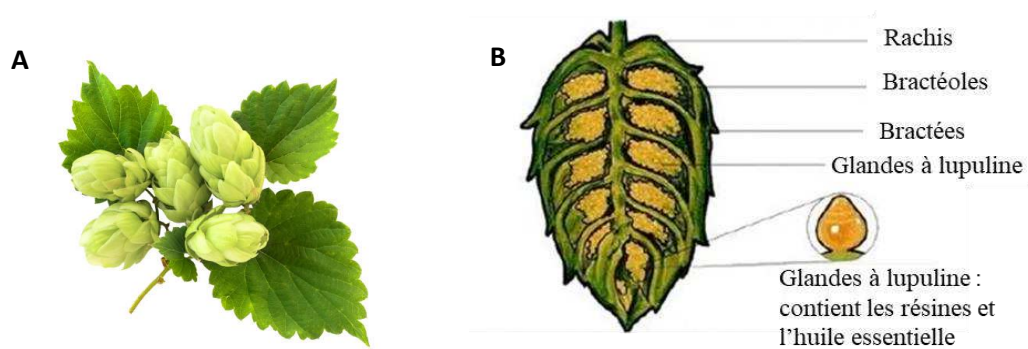
Figure 1. A : Houblonnière dans les Flandres. B : Houblon sauvage dans le Nord de la France (photos personnelles).

C'est une plante dioïque ; seuls les pieds femelles sont cultivés. Les parties épigées sont composées d'organes végétatifs (bourgeons, tiges et feuilles) et d'organes génératifs (pour la production de graines). Les tiges poussent verticalement, formant 5-6 entre-nœuds, puis l'apex commence à tourner dans le sens des aiguilles d'une montre sur le support. On parle d'enroulement dextrogyre. Les feuilles de houblon sont opposées, et constituées de 1, 3 ou 5 lobes dentés. Les inflorescences mâles sont composées de petites fleurs organisées en panicules. Les fleurs femelles quant à elles sont groupées en strobiles, de forme ovoïde, de 2,5 à 5,5 cm de long, appelés « cônes ». Ces cônes sont composés de bractées foliacées jaunes imbriquées, avec à leur base des poils

³ Depuis la rédaction de notre article paru dans *Phytochemistry Reviews*, le site de World Flora Online a fait évoluer la taxonomie du genre *Humulus* et reconnaît désormais 6 espèces au lieu de 3.

épidermiques glandulaires (trichomes) de 150 à 250 μm de long. Lors de la floraison (de juin à septembre dans l'hémisphère nord), ces poils se présentent sous la forme d'une poudre granuleuse, odorante, de couleur jaune brillant, la « lupuline » contenant les métabolites spécialisés originaux du houblon (**Figure 2**) (Bruneton 2016).

Figure 2. A : Cônes. B : Schéma d'une coupe longitudinale de cône de houblon (d'après Camille 2000).



Le houblon est une plante vivace rhizomateuse. Chaque année, de nouvelles lianes repartent de ce rhizome. En culture en serres, après une période d'environ 3 semaines, la partie supérieure de la racine primaire et de l'hypocotyle augmentent en épaisseur et peuvent ressembler à une racine pivotante charnue. Cet élargissement est dû en partie à l'augmentation de la vascularisation tissulaire et au développement de l'amidon (Miller 1959). Le système racinaire du houblon peut atteindre 120 à 150 cm de profondeur et 150 à 200 cm de longueur de rayon. Trois parties principales peuvent être différenciées au niveau du rhizome : a) une section sous la butte réalisée par les houblonniers en mai-juin, avec un nombre élevé de racines fibreuses annuelles adventives estivales, b) une section cylindrique avec un système racinaire à croissance plate autour du rhizome jusqu'à une profondeur de 0,4 m, c) une section cuboïde avec un système racinaire plus profond orienté vers le bas (Graf et al. 2014) (**Figure 3**).

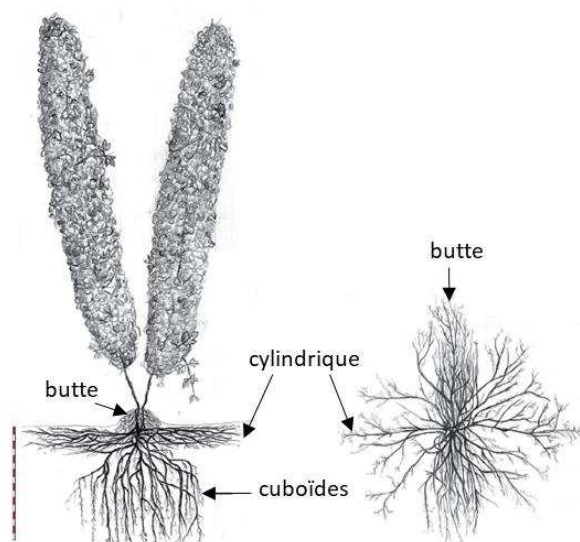


Figure 3. Développement racinaire du houblon (d'après Graf et al., 2014).

1.2. Composition chimique des cônes

L'intérêt porté aux cônes de houblon s'appuie sur leur richesse en métabolites spécialisés (Bocquet et al. 2018b). Certains de ces composés influencent fortement les caractéristiques organoleptiques de la bière, mais ils se montrent également particulièrement intéressants pour la recherche cosmétique et pharmaceutique (Bocquet et al. 2018c). Le **Tableau 1** rapporte la composition chimique moyenne des cônes (Almaguer et al. 2014).

Tableau 1. Composition chimique moyenne des cônes de houblon après séchage (d'après Almaguer et al. 2014).

Composition	Teneur (%)
Résines totales	15-30
Huile essentielle	0.5-3
Protéines	15
Monosaccharides	2
Polyphénols (tanins)	4
Pectines	2
Acides aminés	0.1
Cires	Traces-25
Cendres	8
Humidité	10
Cellulose, ect	43

En particulier, ce sont les tanins, les résines (molles ou dures suivant leur solubilité dans l'hexane) et l'huile essentielle qui font l'originalité chimique des cônes de houblon. Le houblon est notamment connu pour ses propriétés sédatives, oestrogéniques, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Il est utilisé en phytothérapie et possède une monographie établie par l'HMPC (*Herbal Medicinal Products Committee*) de l'Agence Européenne du Médicament (EMA, 2014). Les extraits de houblon appartiennent à la liste des produits dits « GRAS » (*Generally Recognized as Safe*) (FDA, 2022). Ces dernières années de nombreux travaux s'intéressent au potentiel thérapeutique plus

large de certains métabolites spécialisés du houblon contenus dans les résines. Les activités biologiques des dérivés d'acylphloroglucinol ou acides amers retrouvés dans les résines molles (solubles dans l'hexane) et le xanthohumol présent dans les résines dures (insolubles dans l'hexane) sont particulièrement étudiés. (**Figure 4**) (Veitch et al. 2012 ; Bocquet et al, 2018a). Des travaux portant sur l'intérêt du houblon, de ses co-produits agricoles et de certains métabolites spécialisés en santé humaine et animale sont d'ailleurs menés au sein de notre laboratoire (Bocquet et al., 2018b ; Bocquet et al., 2019 ; Jacquin et al., 2022). De nombreux métabolites spécialisés ont été décrits dans le houblon (Bocquet et al., 2018b), mais seuls ceux d'intérêt en brasserie seront développés ici : acides amers, chalcones et terpènes contenus dans l'huile essentielle.

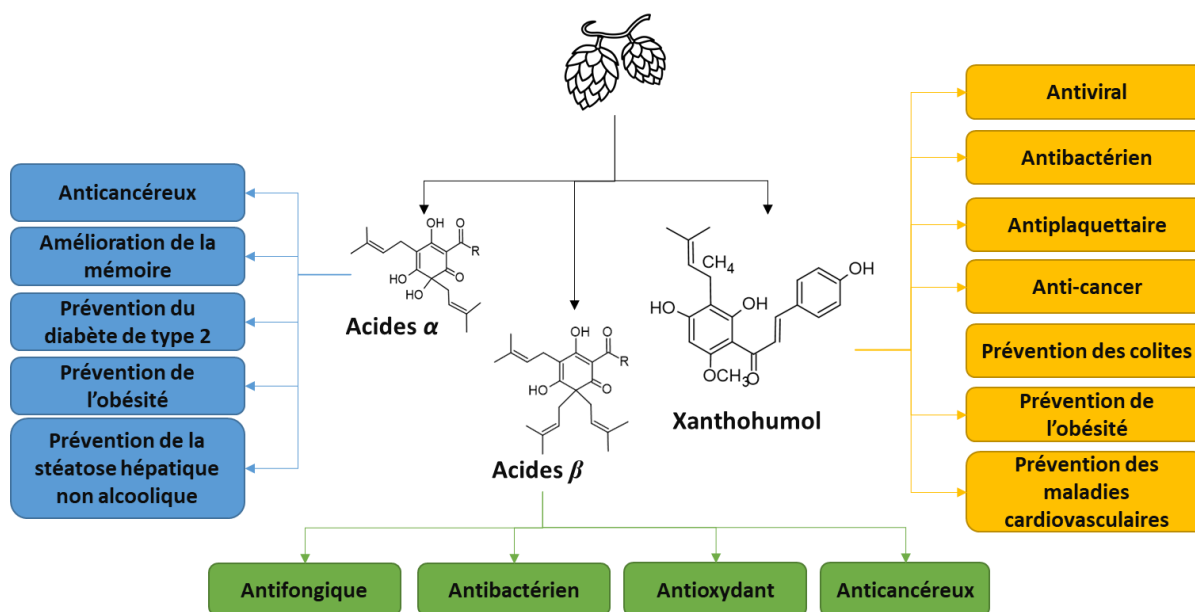


Figure 4. Principales activités des extraits de houblon en santé humaine (adapté de Lin et al. 2019 et Bocquet et al. 2018).

1.2.1. Les composés phénoliques

Les cônes de houblon sec contiennent 4 à 14% de composés phénoliques, incluant notamment des tanins, des chalcones, des flavanones, des flavonols glycosylés, des lignanes, des stilbènes, des acides phénoliques et des dérivés d'acylphloroglucinol (Bocquet et al. 2018a).

1.2.1.1. Flavonoïdes prénylés

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels chez les végétaux. Leur structure de base, le 2-phénylchromane, est constituée de deux cycles aromatiques reliés par 3 carbones : C6-C3-C6. Ces molécules sont synthétisées par la combinaison des voies de l'acide shikimique et des polyacétates. Les flavonoïdes sont ainsi issus de la condensation de trois molécules de malonyl-CoA issus de la voie des polyacétates, avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydroxycinnamique, en général le *p*-coumaroyl-CoA issu de la phénylalanine. Cette condensation est catalysée par la chalcone synthase. Le produit de la réaction est la chalconaringénine, considéré comme le point de départ de la

voie des phénylpropanoïdes. La glycosylation et l'acylation amènent les flavonoïdes à leur forme définitive dans laquelle ils se trouvent *in vivo*.

Les cônes de houblon contiennent des flavonoïdes : des hétérosides de flavonols comme le quercétol et le kaempférol, des tanins, et jusqu'à 1% de xanthohumol (XN), la chalcone prénylée majoritaire du houblon responsable de la couleur jaune des glandes de lupuline (Zanoli et Zavatti 2008) (**Figure 5**). On y trouve aussi le précurseur biogénétique du XN, le desméthylxanthohumol (DMX), issu de la prénylation de la chalconaringénine par HIPT-1 (*Humulus lupulus* prényltransférerase-1). Le DMX est converti en XN par une *O*-méthyltransférerase. Le DMX est susceptible de former deux flavanones, les (±)-6- et (±)-8-prénylnaringénine (respectivement 6-PN et 8-PN) (Bruneton 2016) (**Figure 5**). La 8-PN est un puissant phyto-oestrogène, certaines études montrent que son efficacité est similaire à celle de l'oestradiol (Zanoli et Zavatti 2008). Le XN est facilement convertible en une autre flavanone, l'isoxanthohumol (IXN), représentant 0,008% du poids sec des cônes. L'isomérisation du XN en IXN n'a pas été démontrée *in vivo*. Le XN se cycliserait pour devenir l'IXN en milieu aqueux basique (pH supérieur à 9) et au cours du processus de brassage (Kaminski et al. 2017) (**Figure 5**). Le xanthohumol est très étudié par ailleurs pour ses propriétés biologiques (antimicrobienne, anti-inflammatoire, prévention de l'obésité...) en raison de son obtention assez facile et de sa bonne stabilité (Bocquet et al. 2018a).

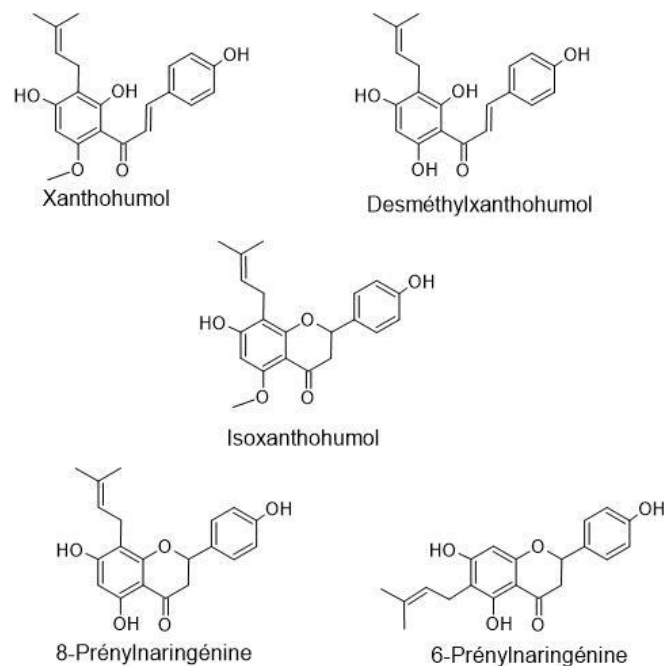


Figure 5. Structures chimiques des flavonoïdes majoritaires des cônes de houblon.

1.2.1.2. Dérivés d'acylphloroglucinols : les acides α et β

Les acides amers sont des dérivés prénylés d'1-acylphloroglucinol. Ils représentent 10 à 20% de la masse sèche des cônes, et 50 à 80 % de la masse sèche des glandes à lupuline. Ces composés sont synthétisés dans les trichomes glandulaires des cônes, où ils s'accumulent pendant la phase de maturation du cône, induisant l'augmentation des glandes à lupuline (De Keukeleire et al. 2003). La teneur en acides amers des cônes de houblon dépend de la variété de houblon, de la maturation des strobiles et de facteurs environnementaux (Patzak et al. 2015). Les acides amers comprennent les acides α ou dérivés de l'humulone et les acides β ou dérivés de la lupulone (**Figure 6**). Les acides β se différencient des acides α par la présence d'une chaîne prénylée supplémentaire. Les acides α sont principalement représentés par l'humulone, la cohumulone et l'adhumulone, tandis que les acides β sont principalement représentés par la lupulone, la colupulone et l'adlupulone. Ces dérivés d'acylphloroglucinols sont présents en proportions variables. Il existe aussi d'autres acides amers plus minoritaires, tels que la préhumulone et la posthumulone ou la pré-lupulone et la postlupulone (Farg et al. 2012). Ils se différencient par la longueur de leur chaîne acylée R, plus ou moins longue suivant l'acide aminé à longue chaîne ramifié (BCAA Branched Chain Amino Acid) duquel ils dérivent (valine, leucine ou isoleucine) (Clark et al. 2013).

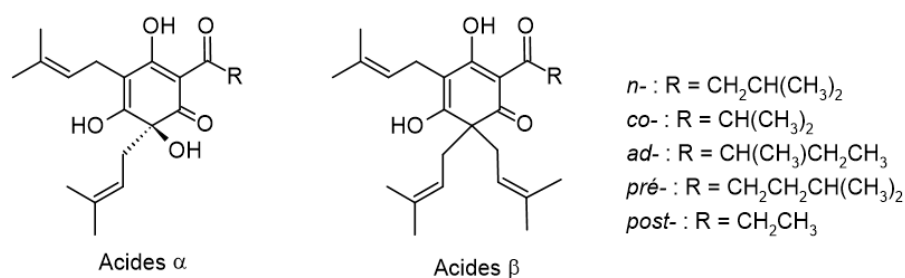


Figure 6. Structures chimiques des acylphloroglucinols majoritaires des cônes de houblon.

D'un point de vue biosynthétique, les acides α et β sont synthétisés à partir de la voie des polycétides. Dans le cytosol, trois malonyl-CoA sont additionnés à une molécule initiatrice acyl-CoA dérivée des BCAA pour former la phloroisovalérophénone (PIVP) par l'action de la valérophénone synthase (Clark et al. 2013 ; Bocquet et al. 2018a). La PIVP ainsi formée est transférée dans les plastes et subit une prénylation par l'ajout d'un diméthylallyl diphosphate (DMAPP) *via* une prényltransférase HIPT-1 pour former la prénylphloroisovalérophénone (PPIVP). Une seconde prénylation est ensuite assurée par une autre prényltransférase, avec l'ajout d'un DMAPP, pour donner la diprényl-PIVP (DP-PIVP). Cette molécule est le précurseur direct des acides α par oxydation ou des acides β par une dernière prénylation (Tsurumaru et al. 2012 ; Bocquet et al. 2018a).

L'importance de la fraction en acides α est principalement due à leur contribution majeure au goût amer de la bière. La cohumulone, un peu plus soluble que les autres acides α , apporterait une amertume plus dure que l'humulone selon les brasseurs. Au cours du processus de brassage et notamment au cours de l'ébullition, les acides α difficilement solubles dans le mout sont convertis en

acides-iso- α plus solubles. L'isomérisation des acides α génère des acides-iso- α *cis* et *trans*. Ces acides-iso- α contribuant à l'amertume sont présents dans la bière à une concentration allant jusqu'à 4 mg/mL et permettent grâce à leurs propriétés tensioactives de stabiliser la mousse. Ils contribuent également à préserver la bière du développement de microorganismes (De Keukeleire 2000). Les acides β ne s'isomérisent pas durant l'ébullition. Ils vont plutôt apporter une saveur amère au cours du vieillissement de la bière par un processus d'oxydation. Ils sont aussi impliqués dans la stabilité de la mousse de la bière et sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (De Keukeleire 2000). Les acides α et β sont par ailleurs très sensibles aux phénomènes d'oxydation au cours du stockage du houblon (Taniguchi et al. 2013).

Outre les propriétés mentionnées ci-dessus, ces acides amers participent aux activités sédatives du houblon utilisé contre l'insomnie et l'anxiété depuis l'Antiquité (Small 2016). Ils sont également connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires et pour leur intérêt dans la prise en charge des troubles métaboliques (Van Cleemput et al., 2011). Enfin, les acides amers, tout comme le xanthohumol, sont connus pour leurs activités antimicrobiennes (Bocquet et al. 2018c).

1.2.2. Huile essentielle

L'huile essentielle correspond à 0,5-3% du poids du cône sec (**Tableau 6**), mais les composés organiques volatils sont très recherchés en brasserie. Ils participent à la saveur des bières, et en particulier à ses caractéristiques aromatiques. Les dérivés terpéniques retrouvés dans l'huile essentielle sont aussi produits dans les trichomes glandulaires des cônes de houblon (Wang et al. 2008). Cette biosynthèse dépend du génotype mais également de facteurs biotiques et abiotiques. La plupart des programmes de sélection du houblon se sont intéressés aux teneurs en composés aromatiques afin d'identifier de nouvelles variétés caractérisées par des arômes appréciés (Van Opstaele et al. 2012). L'huile essentielle de houblon est considérée comme complexe : plus de 450 composés volatils ont déjà été identifiés (Roberts et al. 2004). Le rendement de l'hydrodistillation de l'huile essentielle de houblon varie entre 3 et 10 mL/kg de biomasse sèche (Bruneton 2016).

Les constituants de l'huile essentielle du houblon sont généralement classés en trois groupes chimiques : les hydrocarbures (50-80%), les composés oxygénés (20-50%) et les composés organosulfurés (<1%) (Sharpe et Laws 1981). La fraction soufrée ne contient que des éléments à l'état de traces. Toutefois, en raison du faible seuil de détection du goût de ces composés, ils peuvent affecter de manière significative le goût et l'odeur de la bière, mais parfois de manière négative (saveur de moisi) (Sharpe et Laws 1981). La fraction oxygénée est un mélange d'alcools, d'aldéhydes, de cétones, d'époxydes, d'esters et d'acides. En raison de leur plus grande solubilité dans les solutions aqueuses, ces substances peuvent influencer le goût de la bière de manière significative. En particulier, le linalol, alcool terpénique, est l'un des principaux composants de ce groupe (Štěřba et al., 2015). Cependant, les terpènes non oxygénés sont les plus représentés ; le β -myrcène, l' α -humulène et le β -caryophyllène constituent 90% des arômes totaux (**Figure 7**) (Almaguer et al. 2014).

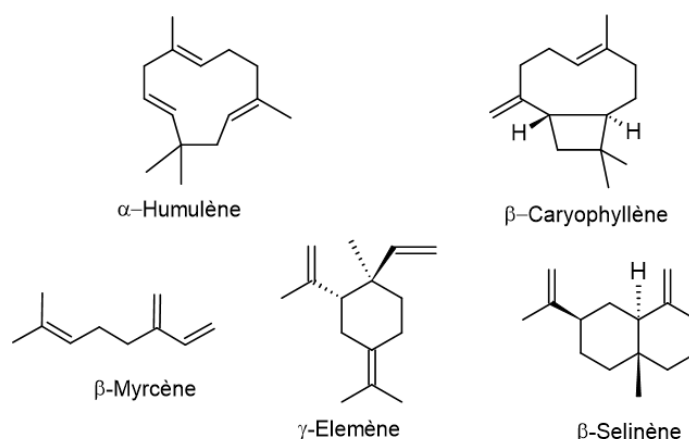


Figure 7. Terpènes majoritaires de l'huile essentielle des cônes de houblon.

Le β -myrcène est le monoterpène majoritaire (30 à 60 % de l'huile essentielle de houblon) et le principal composant responsable de l'odeur âcre du houblon frais (Almaguer et al. 2014). Cependant, le β -myrcène contribue généralement peu à l'arôme du houblon dans la bière, car sa concentration est souvent inférieure au seuil de détection sensoriel, en raison de son évaporation pendant l'ébullition (Kishimoto et al. 2005). D'autres monoterpènes sont également présents dans l'huile essentielle de houblon, tels que l'ocimène, le β -pinène, le limonène et le p -cymène, mais en quantités significativement plus faibles (Stevens 1967). Parmi les sesquiterpènes, l' α -humulène et le β -caryophyllène peuvent représenter jusqu'à 51 % et 15 % de l'huile essentielle respectivement (Bocquet et al. 2018a). Ces deux composés sont généralement utilisés comme marqueur de la qualité aromatique du houblon. En particulier, un ratio α -humulène/ β -caryophyllène élevé est typique des variétés européennes « nobles » ; s'il est supérieur à 2,5, c'est un gage de qualité (Cibaka et al. 2014). Leur arôme est terreux et épicé (Patzak et al. 2010). Les isomères du farnésène sont des sesquiterpènes acycliques (**Figure 7**) également indicateurs de la qualité aromatique. Ils sont caractérisés par un arôme boisé, herbacé et d'agrumes. En particulier, la présence de *trans*- β -farnésène est utilisée comme indice pour déterminer si un houblon possède des caractéristiques "nobles" (Krofta 2003). Un autre sesquiterpène, le sélinène, avec ses deux isomères α et β , est typique du houblon sauvage et se caractérise par un arôme herbacé. Patzak et al. (2010), dans leur étude portant sur le houblon sauvage et cultivé en Europe, ont rapporté que le sélinène était particulièrement présent dans ces houblons à la différence des houblons nord-américains.

Les différents composés volatils du houblon interagissent entre eux et donnent ainsi à la bière toute sa complexité aromatique (Dietz et al. 2020). L'huile essentielle de houblon est connue pour ses activités sédatives, anti-oxydantes, analgésiques, anti-prolifératives et anti-inflammatoires (Rutnik et al. 2021). Notre laboratoire a par ailleurs antérieurement mis en évidence l'activité antifongique de l'huile essentielle de houblon en biocontrôle contre *Zymoseptoria tritici* (Bocquet et al. 2018b).

2. Utilisation du houblon en brasserie

2.1. Historique de l'utilisation du houblon dans la fabrication de la bière

La bière est une boisson à base de céréales fermentées, dont la date et l'origine sont discutées. Suivant les zones géographiques, les céréales ne sont pas les mêmes : riz en Asie, millet ou sorgho en Afrique et principalement orge en Europe. En 2018, la découverte d'un site de production de bière au nord d'Israël, datant de -13 000 av. J-C a remis en cause la date et l'origine de la bière jusque-là être supposée originaire de la Mésopotamie, vers -4 000 avant J-C (Liu et al. 2018).

Les civilisations antiques (sumériennes, égyptiennes, grecques, gauloises...) fabriquaient et consommaient des boissons de céréales fermentées. Le « Sikaru » a souvent été considéré comme la première bière de l'histoire (- 5000 av J-C). Fabriquée en Mésopotamie, cette boisson est issue de la fermentation de pain dans de l'eau mélangée à des épices (Mark 2011). Le même produit, le « Zythum », est retrouvé en Egypte. Les grecs puis les gaulois brassaient la cervoise, des céréales germées et brassées, aromatisées par un bouquet d'aromates, le « gruyt », dont la composition varie grandement selon les terroirs. Au VII^{ème} siècle, les Francs arrivent dans les Flandres et installent des abbayes qui développent leurs propres bières. Au IX^{ème} siècle, Charlemagne donne aux moines le monopole du brassage. Puis, au XII^{ème} siècle, l'abbesse et herboriste allemande Hildegarde Von Bingen décrit le rôle antiseptique du houblon : « en raison de sa propre amertume, le houblon arrête la putréfaction lorsqu'on le met dans la bière, on peut l'ajouter pour qu'elle se conserve beaucoup plus longtemps » (von Bingen H et Throop 1998). Le houblon est ensuite introduit dans la recette de la bière au XV^{ème} siècle sous l'impulsion de Jean Sans Peur. En effet, le Comte de Flandres souhaite concurrencer l'évêché de Liège qui tire profit de la vente du *gruyt*, un mélange d'herbes aromatiques contenant notamment *Myrica gale* L. (Myricaceae), *Achillea millefolium* L (Asteraceae) et *Rhododendron tomentosum* Harmaja (Ericaceae) (Bocquet et al. 2018a). Il souhaite également optimiser les vertus conservatrices du houblon, afin de fixer la recette de la bière et d'en faire une boisson typique des Flandres (De Keukeleire et al. 1992). Avec le développement des communautés monastiques, la production de bière se développe et se diversifie. En 1857, Pasteur découvre *Saccharomyces cerevisiae* responsable de la fermentation alcoolique (Pasteur 1857). Avec la pasteurisation, les bières peuvent alors mieux se conserver, ainsi débute l'industrie brassicole. Même s'il est utilisé en petites quantités, le houblon reste un ingrédient essentiel dans le processus de fabrication de la bière pour son effet conservateur, l'amertume et les arômes qu'il lui confère (Behre 1999).

2.2. Processus de fabrication de la bière

2.2.1. Processus général

La bière est obtenue à partir de 4 principaux ingrédients : le malt, le houblon, l'eau et des levures. Pour 1 litre de bière, il faut environ 6L de d'eau, 140 g d'orge malté, 2 grammes de houblon en pellets et 10 g de levure. Cependant, ces proportions peuvent varier selon le type de bière. La **Figure 8** détaille les principales étapes du processus général de brassage des bières.

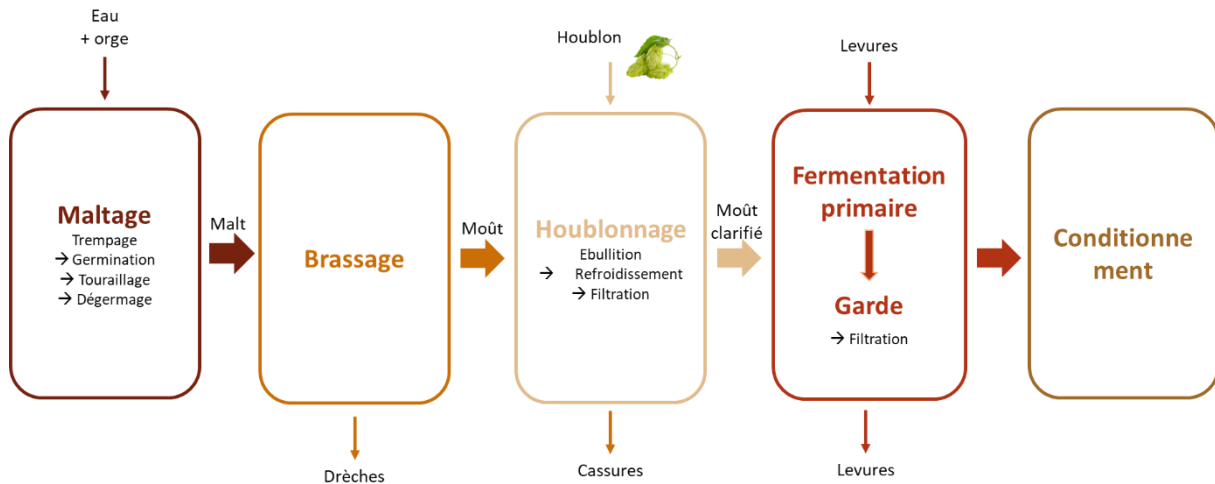


Figure 8. Diagramme des opérations de fabrication de la bière (d'après Fillaudeau et Blanpain-Avet 1999).

Tout d'abord, le **maltage** consiste à transformer l'orge en malt par une étape de germination, lui permettant d'accumuler des enzymes hydrolytiques qui transformeront l'amidon en sucre plus simple et hydrolyseront les protéines lors du brassage. Les grains d'orge (*Hordeum vulgare* L., Poaceae) sont séchés et nettoyés. Le maltage se déroule en trois étapes : (i) *le trempage*, au cours duquel l'humidité des grains passe de 12 à 45% ; (ii) *la germination*, la dormance des grains est levée dans des conditions favorables (humidité proche de 100%, température de 15°C, pendant 4 à 6 jours), permettant ainsi la synthèse des enzymes hydrolytiques ; (iii) *le touraillage* : les grains sont séchés par chauffage de 45 à 105°C, ce qui stoppe le processus de germination et les colore ; cette étape aura un impact très important sur les qualités organoleptiques du malt et donc de la bière (Fillaudeau and Blanpain-Avet 1999).

Le malt obtenu est ensuite **brassé**. Les grains sont concassés, moulus et mélangés à de l'eau. Ce mélange, appelé maïsche, est chauffé, permettant l'activation des enzymes hydrolytiques (protéases, glucanases, α et β -amylases) en vue de l'hydrolyse des protéines et de l'amidon en sucres fermentescibles (glucose, maltose...) et non fermentescibles (dextrines). En particulier, le chauffage de la maïsche peut se faire par infusion (ou monopulier) ou par décoction (Faiveley 2020).

L'infusion, souvent employée pour la confection des ales britanniques et utilisée dans le cadre de ma thèse, consiste à porter le moût à la température souhaitée, entre 65 et 69°C ; l'extraction se faisant sur toute la durée du palier. Cette température permet d'activer simultanément les α - et β -

amylases et donc d'obtenir un profil de moût comportant des sucres fermentescibles ou non, en proportion plus ou moins équivalente. Les α -amylases, dont l'activité optimale se situe à une plage de température plus élevée (65°C à 75°C) que les β -amylases (55°C à 65°C), vont favoriser la formation de sucres plus complexes de type dextrans qui resteront même après la fermentation et contribueront au corps de la bière et à une bonne tenue de la mousse. L'infusion permet aussi une meilleure maîtrise des cycles thermiques.

La décoction, technique traditionnelle pour la fabrication des bières de fermentation basse, consiste à porter à ébullition une partie de la maïsche, appelée trempe, dans une chaudière annexe, puis à la réinjecter dans le mélange. Cet apport d'énergie permet d'atteindre les paliers de température cible (environ 50°C, 65°C et 75°C) et d'optimiser le rendement d'extraction du brassage. Lors de la trempe, une partie des enzymes sont détruites, les bières obtenues ont donc un profil fort malté. Les méthodes de chauffage par décoction sont plus longues (en général supérieures à 3 heures), tandis que les techniques de chauffage par infusion sont limitées à 2 heures. Cet écart s'explique par le nombre de trempes et leur temps de chauffage (Faiveley 2020). Les systèmes de brassage modernes par méthodes mixtes ont été développés avec une seule trempe pour passer du stade de protéolyse vers 50°C à un palier à 63°C favorisant plutôt la formation de sucres fermentescibles puis de chauffer pour obtenir la saccharification totale de l'amidon à 72°C (Simard 2011 ; Eßlinger 2009). Chaque système de chauffage induit des spécificités sur l'arôme et sur l'équilibre dextrans/alcool (Faiveley 2020).

La maïsche est ensuite filtrée, permettant la séparation des drèches et du moût clair. Le moût clair est ensuite porté à ébullition. Ce chauffage est fondamental pour la qualité finale de la bière et c'est à cette étape que les houblons seront ajoutés au moût, on parle alors de l'étape de **houblonnage**. Ces étapes vont permettre de :

- stériliser le moût ainsi que l'inactivation des enzymes (Fillaudeau et Blanpain-Avet 1999). À une température supérieure à 77°C, les enzymes sont détruites.
- concentrer le moût : l'ébullition du moût permet l'ajustement de la densité par évaporation de l'eau (Fillaudeau et Blanpain-Avet 1999).
- amériser la bière. Les houblons amérisants sont souvent ajoutés dans le moût au début de l'ébullition. Comme évoqué dans la partie **1.2.1.2.**, au cours du chauffage en houblonnage traditionnel, entre 90 et 100°C, les acides α des cônes sont isomérisés en acides-iso- α (**Figure 9A**), en configuration *cis* et *trans* dans des proportions d'environ 70/30 (Schönberger et Kostecky 2011). Les acides iso- α ont une solubilité plus importante que les acides α (De Keukeleire et Verzele 1971) ; à la fin de l'ébullition leur concentration dans le moût varie entre 15 et 100 mg/ mL (Heyerick et al. 2003) et sont responsables de l'amertume de la bière, jusqu'à 80% pour certains auteurs (De Keukeleire et al. 1992).
- aromatiser la bière. Les houblons aromatiques interviennent quant à eux plutôt 15 minutes avant la fin de l'ébullition ou après l'ébullition afin de préserver leurs composés volatils et

donc leurs arômes. Les arômes herbeux sont plutôt attribués à la présence d'aldéhydes, tels que l'hexanal, alors que la saveur fruitée de la bière est liée à la présence d'esters éthyliques tels que l'éthyl 3-methylbutanoate ou le 4-decenoate par exemple. Par contre, les alcools monoterpéniques comme le linalol, le géraniol et le citronellol, certaines cétones terpéniques ou encore certains sesquiterpènes oxydés vont plutôt apporter des arômes floraux (Rettberg et al 2018 ; Machado et al. 2021). Comme évoqué dans la partie 1.2.2, les sesquiterpènes non oxygénés, comme l' α -humulène ou le β -caryophyllène, peuvent aussi apporter des notes épicées, herbacées, boisées ou d'agrumes (Patzak et al. 2010 ; Krofta 2003), souvent liées à leur oxydation. De façon générale, les effets du houblon, et d'autant plus de ses composés volatils, sur le profil aromatique d'une bière sont complexes à étudier (Dietz et al. 2020) car il faut aussi prendre en considération les phénomènes d'oxydation et de la présence des autres composants de la bière (levure, glucides, malt, éthanol...);

- dans une moindre mesure, les acides β participent également à l'amertume de la bière en s'oxydant en dérivés d'hulupones (Almaguer et al. 2014 ; Steenackers et al. 2015) (**Figure 9B**).

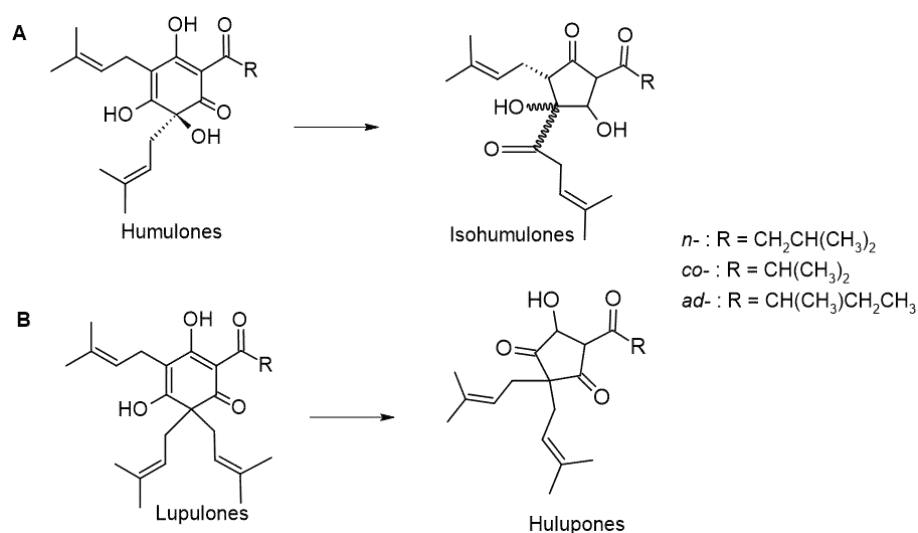


Figure 9. Transformation des acides α (A) et β (B) au cours du processus de fabrication de la bière. L'isomérisation des acides α en acides-iso- α en position *cis* et *trans*.

- concernant les autres composés phénoliques du houblon, comme évoqué dans la partie 1.2.1.1., le xanthohumol (XN) se cyclise en milieu aqueux basique ($\text{pH} > 9$) pour devenir l'isoxanthohumol (Kaminski et al. 2017). La concentration finale en XN dans la bière atteint au maximum 1 mg/L (Karabín et al. 2013). Le desméthylxanthohumol quant à lui, est converti en 6 et 8-prénylnaringénine, présentes dans la bière à des concentrations avoisinant les 0,3 mg/L (Sandoval-Ramírez et al. 2017). Quant aux stilbènes, le *trans*-resvératrol est dégradé à haute température ; le *trans*-picéide est moins thermosensible et donc résiste à l'ébullition, mais sera transformé en resvératrol plus tard par les levures (Collin et al. 2013). Certains dérivés d'acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques

peuvent aussi être retrouvés dans la bière sous forme cyclisée ou décarboxylée (Collin et al. 2013).

- enfin, le chauffage permet d'éliminer certaines substances volatiles nuisibles à la saveur de la bière, générées par des composés du malt et du houblon (comme par exemple de l'acétate d'éthyle) (Fillaudeau et Blanpain-Avet 1999 ; Hanke et al. 2010).

Cette étape d'ébullition dure environ 90 minutes, durée nécessaire pour obtenir une amertume optimale (Fillaudeau et Blanpain-Avet 1999). Les drêches de houblon sont ensuite éliminées, et le moût houblonné et stérile est ensuite refroidi rapidement afin d'être préparé pour la **fermentation primaire**. Cette température varie en fonction du type de levure utilisée et du type de bière à produire. Elle varie de 6 à 9 °C en fermentation basse avec les levures *Saccharomyces carlbogensis* E.C. Hansen (= *S. pastorianus* Reess.) ou *S. uvarum* Beij., et de 16 à 20 °C en fermentation haute avec *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen (Fillaudeau et Blanpain-Avet 1999). Le moût est alorsensemencé. La fermentation se déroule en deux phases successives. Tout d'abord au cours de la fermentation principale, qui dure environ 7 jours, les levures consomment environ 90% des sucres fermentescibles (glucose, saccharose, maltose et maltotriose) et produisent ainsi du dioxyde de carbone et de l'éthanol. Ensuite, au cours de la fermentation secondaire (2 à 3 jours) les esters et alcools supérieurs s'accumulent. Le taux d'ensemencement est exprimé en millions de cellules par volume de moût (en mL), en degré Plato. Un moûtensemencé à $1,4 \cdot 10^7$ cellules par mL a ainsi un degré Plato de 14.

Après fermentation, le moût subit une étape de **garde**, entre 0 et 5 °C sous 0,3 à 0,6 bar (pour une bière de fermentation basse) et nécessite souvent l'ajout de stabilisant. La garde dure entre 3 et 60 jours et varie selon la densité et le type de bière. Cette fermentation, plus lente et à l'abri de l'oxygène (pour éviter l'oxydation de la bière), permet la maturation de la bière. Ses saveurs s'affinent et se développent : la bière verte issue de la fermentation principale est riche en saveur de levure, amère et peu consommable. La garde permet de transformer des familles de composés tels que les diacétones, les aldéhydes, les acides gras volatils et les composés soufrés. Les levures et autres particules en suspension précipitent dans le fond de la cuve, pour obtenir des bières plus brillantes. Une étape de clarification permet ensuite d'éliminer des levures et des protéines d'orge en suspension par filtration sur des filtres de Kieselguhr, des fossiles de diatomées broyés (Fillaudeau et Blanpain-Avet 1999 ; Jeantet et al., 2007). La bière clarifiée est ensuite **soutirée**, conditionnée en bouteille ou en fût, avant de subir une pasteurisation à 60°C-70°C dans le cas des procédés industriels classiques.

Le processus décrit ci-dessus est un processus général. Suivant les types de bière souhaitées, des modifications peuvent être apportées. Ainsi, les bières blanches ne sont pas clarifiées. Ces dernières années, la perception du public a changé et les bières ne sont plus toujours pasteurisées afin de préserver certaines saveurs. Quant au houblon, il peut aussi être ajouté en dehors de l'ébullition, à la fin de la phase de fermentation. Cette technique est appelée « *dry hopping* » et favorise l'aromatisation de la bière en limitant son amertume et en conservant les molécules aromatiques

volatiles (Machado et al. 2019). Il existe également des bières dites « *harvest ale* » (bières de récolte) brassées en automne avec du houblon frais.

2.2.2. Classification des bières

En France, les bières sont légalement classées en cinq classes selon leur degré d'alcool : les bières de luxe type spécial dont le degré d'alcool est supérieur à 5.5% vol., les bières de luxe (entre 4.40 et 5.5% vol.), les bières de bock (entre 2.21 et 4.39% vol.), les bières de table (entre 2.00 et 2.20% vol.) et les panachés et bières sans alcool dont le degré d'alcool est inférieur à 1.2% vol (Fillaudeau et Blanpain-Avet 1999). Néanmoins, cette catégorisation reste peu connue par les consommateurs, qui utilisent plutôt une catégorisation par couleur. L'EBC (*European Brewers Convention*) est une échelle qui permet de classer entre 1 et 140 les bières en fonction de leur couleur, et donc du malt utilisé (Faiveley 2020). Les bières blanches sont brassées avec des malts pâles et des malts de froment ; les blondes avec des malts d'orge pâles ; les bières ambrées avec des malts grillés et torrifiés (malts « caramels ») ; les bières brunes avec des maltes très torrifiés et très aromatiques (malts « chocolats ») (Brasseurs de France). Les bières peuvent également être classées selon leur type de fermentation, on distingue les *ales* à fermentation haute (21°C), des *lagers* à fermentation basse (12°C) ou à fermentation spontanée (Faiveley 2020) ; leur origine géographique (bières belges, allemandes, anglaises...), les caractéristiques du brasseur (industriel, micro-brasserie, bistro-brasserie...), ou encore selon les méthodes de conditionnement (filtrée, pasteurisée, refermentée en bouteille...) (Brasseurs de France). La classification des bières est un sujet très complexe, les dénominations telles que « pils », « ales », « lager », « stouts », « porter », « IPA », « saison », « triple », « sour », « d'abbaye », « de garde », « de Noël » se réfèrent à une recette, une origine historique ou géographique, des ingrédients particuliers, que chaque brasseur combine pour donner naissance à des bières originales (Faiveley 2020).

2.3. Le houblonnage

Le houblon est utilisé en petites quantités lors du brassage. 1 à 2 grammes de houblon sont classiquement utilisés pour brasser 1 litre de bière (Brasseurs de France, 2019). Cependant, cette quantité peut être augmentée pour certains types de bière. Le choix du houblon est un critère déterminant pour les arômes de la bière et pour ses caractéristiques à la dégustation. Les brasseurs élaborent des mélanges entre différentes variétés de houblon afin d'aromatiser leurs bières. Le houblon peut être ajouté à la bière sous différentes formes (Clarke 1986) :

- sous forme de cônes séchés : ils sont séparés des feuilles et des tiges puis directement séchés après récolte puis emballés sous vide sans transformation. Les cônes doivent alors être utilisés pour le brassage dans l'année.
- en pellets : les fleurs de houblon sont broyées et compressées en conditions contrôlées afin de ne pas altérer la qualité des cônes (**Figure 10**). Cette forme de stockage permet

de limiter le volume des houblons et donc leur surface de contact avec l'air et de maximiser le contact entre la lupuline et le moût à ébullition. Suivant les variétés, les pellets contiennent jusqu'à 25 % d'acides α . Ils se conservent jusqu'à 3 ans à -20°C et à l'abri de la lumière. On distingue deux types de pellets : les 90 et les 45. Les granulés de type 90 contiennent environ 90 % des constituants du houblon cru : leur qualité et leur composition chimique, notamment en substances amères, correspondent à ceux des cônes de houblon. Les granulés de type 45 ont quant à eux une valeur amère standardisée et sont composés d'environ 45 % des composants des cônes séchés (Biendl et al. 2015).



Figure 10. Pellets de houblons (source : alphabiere.fr).

- en extraits : ils peuvent être obtenus par macération dans l'éthanol ou obtenus par extraction par fluide supercritique (Sanz et al. 2019). Les extraits contiennent dans ce cas entre 30 et 35% d'acides α . Ils permettent d'éviter les débris retenus dans le moût après ébullition et d'obtenir un meilleur rendement que les cônes séchés et en pellets qui infusent relativement mal leurs composés aromatiques et amersants. Enfin, ils confèrent à la bière une saveur particulière, puisque seuls les arômes sont infusés, sans les parties végétales de la fleur. Ils se conservent jusqu'à 8 ans.

La qualité des cônes est un critère déterminant dans le développement des arômes lors du brassage ; les brasseurs y sont particulièrement attentifs lors du choix des cônes. Ces derniers doivent être bien secs (au maximum 8% d'humidité), verts avec des glandes de lupuline jaune-orangée. Au toucher, ils doivent être de faible densité et ne pas s'effriter en poudre. Les arômes dégagés à l'écrasement du cône permettent d'avoir une première idée de ses qualités aromatiques ou de leur amertume. Une odeur dominante (florale, menthe, herbée, citronnée, boisée) claire indique des cônes de bonne qualité. En revanche, une odeur de paille ou de foin indiquera un houblon de mauvaise qualité. Une infusion des cônes, le thé de houblon, peut être réalisée, afin d'avoir un aperçu de l'odeur que le houblon donnera à la bière. C'est une manière de simuler les odeurs dégagées lors du passage du houblon dans la cuve de brassage. En complément de ces analyses sensorielles, des analyses en laboratoire peuvent être réalisées afin de s'assurer de la qualité des cônes. Ainsi, le HSI (*Hop Storage Index*) est un indicateur de cette qualité. Il s'agit du rapport des absorbances d'un extrait de houblon dans du méthanol à 275 nm (maximum de l'absorbance des acides bêta) et 325 nm (maximum de

l'absorbance des acides alpha). Un HSI (A_{275}/A_{325}) compris entre 0,28 et 0,31 indique qu'un houblon est frais (valeur moyenne pour toutes les variétés). En revanche, au-delà de 0,69, le houblon est considéré comme âgé, avec des acides α et β oxydés (Rutnik et al. 2022). Un dosage des résidus polluants, dont les éléments traces métalliques (ETM) et des résidus de pesticides peut être également réalisé afin de s'assurer de la bonne qualité des houblons. Enfin, un dernier point d'attention des brasseurs sur la qualité des houblons concerne la présence de graines. Bien que la pollinisation permette d'augmenter le poids des cônes (Thomas et Neve 1976), la matière grasse contenue dans les graines peut modifier la saveur de la bière si les graines sont écrasées pendant le processus. La grande majorité des houblons utilisés en brasserie aujourd'hui sont dépourvus de graines. De plus, en raison de leur petite taille, les graines ont tendance à rester intactes lors de la pelletisation ou de l'extraction par CO₂ supercritique (Korpelainen et Pietiläinen 2021).

Une fois la qualité des cônes vérifiée, leur choix se fait en fonction des saveurs recherchées par les brasseurs, essentiellement déterminée par leur teneur en métabolites secondaires. Cette composition des cônes peut être analysée en laboratoire et dépend de différents facteurs. Si les facteurs génétiques sont stables pour une même variété ; ce sont les facteurs biotiques et abiotiques (conditions pédo-climatiques, période de récolte, traitement post-récolte...) qui influencent la teneur des cônes en métabolites secondaires (Schönberger et Kostelecky 2011).

Ainsi, on distingue deux types de houblons en fonction de leurs teneurs en acides α : les houblons aromatiques (3 à 4 % d'acides α) et les houblons amérisants (8 à 15% d'acides α) (Jelinek et al. 2010). Néanmoins, cette classification est de plus en plus discutée et ne reflète plus le choix et l'utilisation des variétés par les brasseurs. Les houblons aromatiques sont des variétés appréciées pour leur profil et leurs caractéristiques aromatiques, et ont souvent une teneur en acides α proche de celle des houblons sauvages (Palmer 2006 ; Solberg et al. 2014). L'IBU (*International Bitterness Unit*) est une unité de mesure de cette amertume. Elle permet de calculer la contribution des composés chimiques dans l'amertume de la bière, sa valeur est donc notamment dépendante des teneurs en acides α et β (Parkin et Shellhammer 2018) et traduit la concentration de la bière en acides iso-c. Ainsi l'IBU augmente avec l'amertume de la bière, bien que d'autres composés, notamment des composés d'oxydation, interviennent aussi dans la perception de l'amertume de la bière (Kishimoto et al. 2022). L'IBU se calcule suivant les recommandations définies par l'*American Society of Brewing Chemists* (méthode Beer-23A) (American Society of Brewing Chemists 1992). Les bières commerciales ont des IBU en général autour de 16 ; une bière amère a une IBU autour de 60-70. À partir de 100 IBU, l'échelle montre ses limites et le palais humain est saturé et n'est plus capable de différencier les produits dégustés. Les houblons utilisés sont ainsi notamment choisis en fonction de leur composition en composés volatils et en acides amers, et donc pour leur impact potentiel final sur l'amertume et l'originalité aromatique de la bière. Bien que les houblonnages les plus classiques soient le *bitter* et le *aroma hopping*, il en existe également d'autres types, qui, pour un même houblon, modifient l'aromatique et l'amertume finaux de la bière (**Tableau 2**). Ainsi, le *dry hopping* (houblonnage à cru)

consiste à ajouter le houblon dans les cuves de garde, en fin de fermentation, une fois le moût refroidi. Le houblon n'apporte ainsi pas d'amertume à la bière et permet de lui apporter des arômes habituellement perdus pendant l'ébullition (Brasseurs de France 2017). Le houblon est aussi historiquement utilisé pour ses propriétés antibactériennes et conservatrices. Il a aussi été montré que des extraits de houblons avaient des activités antifongiques. En revanche, les métabolites du houblon n'ont pas d'effet sur les levures utilisées pendant le brassage telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *pastorianus* (Bocquet et al. 2018a). Enfin, les houblons ont aussi un rôle dans les caractéristiques et la stabilisation de la mousse (De Keukeleire et al. 1992). Le groupement hydroxyle des *iso*-humulones aurait un rôle de tensioactif qui contribuerait à renforcer les liaisons électrostatiques entre les bulles et stabiliserait de ce fait la mousse. Ainsi, les acides amers influencent sa texture (densité), son adhérence au verre, sa couleur (plus ou moins blanche), ainsi que la taille des bulles (Asano et Hashimoto 1980 ; Bishop et al. 1974). Cet effet sur la mousse s'ajoute à celui des peptides et de la dextrine obtenus après hydrolyse des protéines et de l'amidon du malt (Simard 2011).

Tableau 2. Récapitulatif des différents types de houblonnage (d'après Podeszwa et Harasym 2016).

<i>Technique</i>	<i>Principe</i>	<i>Résultat sur le produit fini</i>
Houblonnage du premier moût (pré-ébullition)		
<i>First wort hopping</i>	Ajoutés avant que le moût ne soit en ébullition, dès la filtration	Amertume plus douce
<i>Mash hops</i>	Houblons ajoutés dans la maïsche	Amertume plus douce
Houblonnage pendant l'ébullition		
<i>Bitter hopping</i>	Dès le début de l'ébullition, et pour une longue durée ($T^{\circ} > 80^{\circ}\text{C}$) : isomérisation des acides α	Diffusion de l'amertume
<i>Aroma hopping</i>	Ajout des houblons aromatiques faibles en acide α dans les 10 à 15 dernières minutes de l'ébullition afin de préserver les huiles essentielles	Aromatique
<i>Continuous hopping</i>	Ajout de petites quantités pendant toute l'ébullition à intervalles de temps réguliers	Aromatique et amertume
Houblonnage après ébullition		
<i>Flame-out (late hopping)</i>	Ajout des houblons à la fin de l'ébullition, lorsque l'eau est encore chaude (plus de 80°C) : extraction et conservation des huiles essentielles	Arômes floraux et fruités. Amertume plus douce si houblons amérisants
<i>Whirlpooling (hop stand)</i>	Température du brassin entre 60 et 80°C : favorise l'aromatisation	Arômes d'agrumes et de fruits tropicaux
<i>Dry hopping</i>	Ajout après la fermentation primaire	Apporte des arômes sans amertume

Dans le cadre de ma thèse, la technique de houblonnage utilisée se rapproche du *whirlpooling* (ou *hop-stand*). Le houblon aromatique est ajouté après l'ébullition, une fois le moût refroidi afin de préserver au maximum les composés volatils du houblon, sans les dégrader. Ceci permet notamment d'avoir des notes florales et d'agrumes (Sharp et al. 2017).

3. Marché du houblon

3.1. Production mondiale

Aujourd'hui, le houblon est cultivé dans de nombreux pays pour son usage dans l'industrie brassicole. Seuls les pieds femelles sont cultivés pour leurs inflorescences. Le houblon est principalement cultivé dans les régions tempérées entre les latitudes 35° et 55°. Les principales zones de culture mondiale se trouvent pour la grande majorité aux États-Unis (40% des surfaces houblonnières mondiales, essentiellement dans les États de Washington, de l'Oregon et l'Idaho) et en Allemagne (33% des surfaces, en grande majorité en Bavière) (**Figure 11**) (Bart-Haas Group 2022). Dans l'hémisphère nord, le houblon est également cultivé dans d'autres pays d'Europe de l'Est, notamment la République Tchèque, ainsi qu'en Chine. A l'échelle mondiale, la production française de houblon est très faible : environ 950 tonnes ont été produites en 2021, ce qui représente moins de 1% de la production mondiale (Bart-Haas Group 2022). Dans l'hémisphère sud, une production existe en Australie et en Nouvelle-Zélande. Entre 2020 et 2021, la surface mondiale de houblon a progressé de 7 %, et se situe globalement autour de 120 000 tonnes par an (Bart-Haas Group 2022).

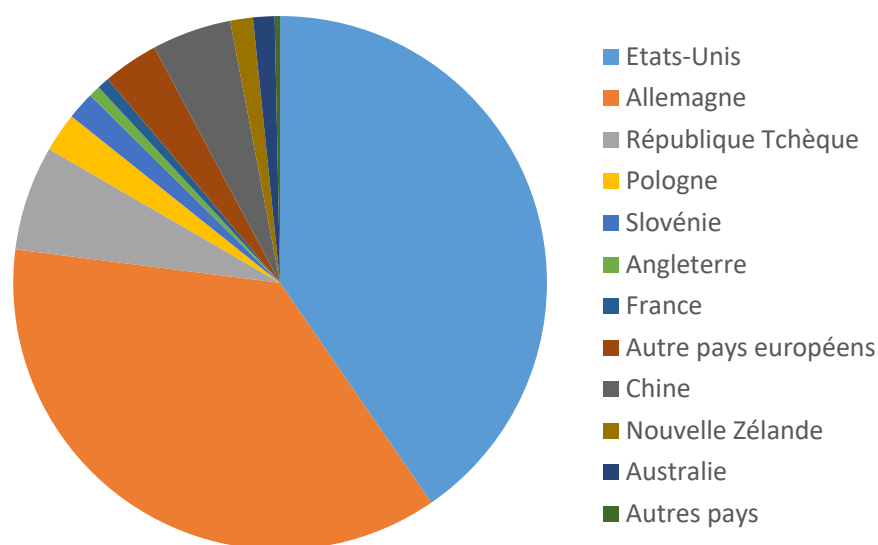


Figure 11. Répartition de la production mondiale de houblon en 2021 par pays (en volume), d'après Bart-Haas Group (2022).

3.2. Production française

La **Figure 12** représente l'évolution de la production de houblon français.

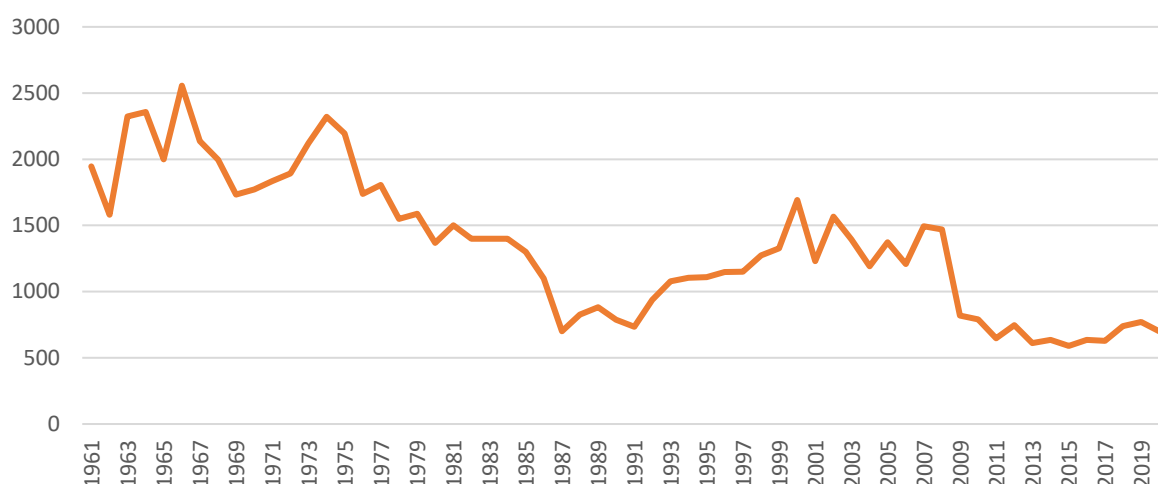


Figure 12. Évolution de la production française de houblon, de 1961 à 2018 (en tonnes), d'après FAOSTAT (2022).

La production française de houblon est en nette diminution depuis la deuxième moitié du XX^{ème} siècle. Le marché français du houblon a traversé deux crises successives en 2007 et 2008. En 2007, la Cophoudal, représentant les houblonniers français pour l'Alsace, a perdu un important contrat avec AB InBev, l'un des quatre plus gros brasseurs au niveau mondial (Cougard 2018). En 2008, les conditions climatiques ont été très favorables à la culture du houblon, les volumes mondiaux ont été très importants, d'où une baisse du prix. A l'époque, le marché du houblon ne connaissait pas sa croissance actuelle portée par les brasseries artisanales, ce qui a provoqué une diminution des surfaces cultivées. Le prix du houblon est très variable, il est vendu en général autour 8 et 10 € le kilo en agriculture conventionnelle et 24 et 32 € le kilo en agriculture biologique (Chambre d'agriculture NPDC 2021).

En 2021, 55 producteurs cultivaient une vingtaine de variétés sur environ 500 hectares. Cette surface houblonnière était en hausse de 16 % par rapport à la campagne précédente (Bart-Haas Group 2022). La première région française productrice de houblon est le Grand-Est, avec Cette dernière possède 465 ha de terres agricoles dédiées au houblon, exploitées par 45 houblonniers.

En 2020, 30 % de cette production étaient commercialisés sur le marché français ; 70% étaient exportés, notamment au Royaume-Uni (25% des volumes), en Belgique (15%) et aux États-Unis (12%). De nouveaux marchés ont vu le jour pour le houblon français, comme le Vietnam (3% des volumes), le Japon (1%) et le Brésil. Environ 85% des surfaces houblonnières françaises sont contractualisées (Bart-Haas Group 2021).

3.3. Production dans les Flandres

La région Hauts-de-France est la deuxième région productrice de houblon après la région Grand-Est, et est une région historique pour la production de houblon : environ 550 ha étaient cultivés en 1950 et plus de 2000 ha au début du XX^{ème} siècle (Ducloux et al. 1910), contre 35 ha en 2020 (Bart-Haas Report 2021) (**Figure 13**).

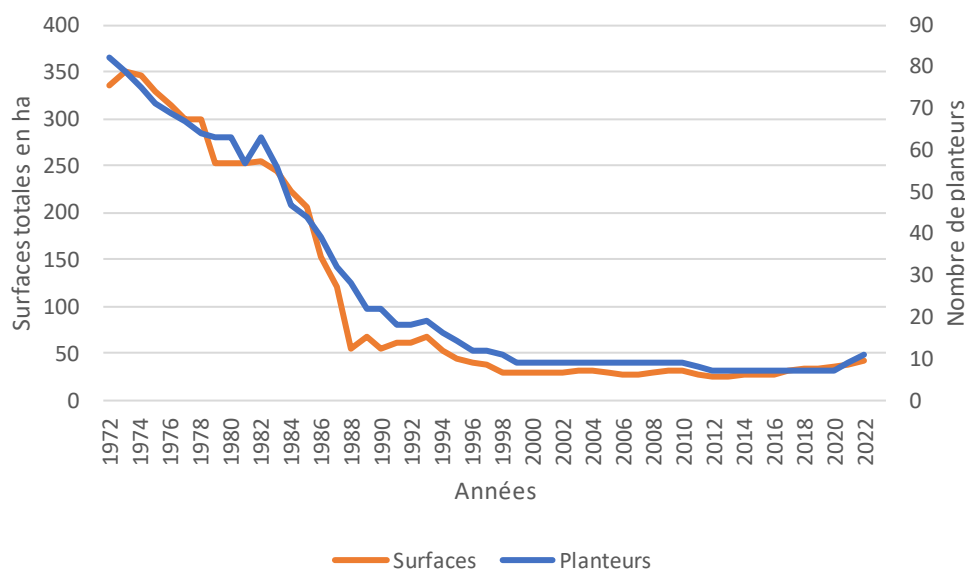


Figure 13. Évolution des surfaces de houblon (à gauche) et du nombre de planteurs (à droite) dans le Nord depuis 1972 (source : Chambre d'Agriculture NPDC 2022).

Plusieurs facteurs expliquent cette importante baisse des surfaces houblonnières (AGPH, 2022) :

- après la deuxième guerre mondiale, la production de la bière s'industrialise. Les producteurs de houblons sont contraints de s'adapter à cette mutation dans le mode de fabrications de la bière, et choisissent alors des variétés de houblons plus précoces tels que le Brewers Gold et le Northern Brewer afin de pouvoir étaler la saison de récolte. Ils recherchent également des houblons avec des taux en lupuline plus hauts ;
- à partir des années 1960, la cueillette se mécanise, impliquant la disparition des petites houblonnières qui ne peuvent se permettre les investissements nécessaires ;
- à cela s'ajoute l'arrivée de la concurrence étrangère, notamment des houblons polonais et chinois. Les petites houblonnières de la région ont du mal à y faire face, d'autant que le terroir est peu adapté à la culture des houblons les plus recherchés en brasserie.
- en 1984, une tempête décime les quelques houblonnières en place.

En 1978, la Coopounord, la coopérative agricole houblonnière du Nord s'est installée dans les Flandres, regroupant à l'origine sept houblonniers.

En 2021, environ 54.7 tonnes de houblon (dont 3 tonnes en agriculture biologique) de 10 cultivars différents (Brewers Gold, Cascade, Challenger, Fuggle, Goldings, Magnum, Northern Brewer, Nugget, Strisselspalt, Target) ont été produits par 11 producteurs (dont 3 en Agriculture Biologique). Ces derniers sont installés en Flandre intérieure, notamment à Staple, Steenvorde, Boeschepe, Bailleul,

Méteren et Saint Jans-Cappel (59) et sont représentés par le Syndicat des Planteurs du Nord. En raison d'un regain d'intérêt par les consommateurs pour les bières artisanales et locales, ces surfaces bien que réduites sont en pleine expansion. Entre 2020 et 2022, la région a gagné environ 7 hectares (soit une augmentation des surfaces d'environ 15 %), portant les surfaces houblonnières de la région en 2022 à 42,2 ha, répartis ainsi (Chambre d'agriculture NPDC 2022) :

- 33 ha en agriculture conventionnelle,
- 4,7 ha en agriculture biologique,
- 4,3 ha en conversion.

Les rendements moyens en région une fois la culture installée varient entre 1 tonne/ha en agriculture biologique et 1,5 à 2,5 tonnes/ha en agriculture conventionnelle, selon les variétés (Chambre d'agriculture NPDC 2021). Les clients de la Coophounord sont en grande majorité des brasseurs de la région, souhaitant brasser une bière avec des ingrédients du terroir (Malcurat 2020). Même si la région peine à faire sa place sur le marché international de la production de houblon, cette culture reste un marqueur fort du paysage et de son patrimoine et partage un passé historique avec la Belgique. Différents éléments traduisent le nouveau dynamisme de cette filière locale, ainsi 2 houblonniers se sont installés en 2021 ; et d'ici 2022, la Coophounord commercialisera deux nouvelles variétés (Hallertau Tradition et Chinook), portant ainsi à 12 le nombre total de variétés disponibles.

4. Analyse de la filière brassicole en région Hauts-de-France

Comme le houblon cultivé dans la Région Hauts-de-France est actuellement principalement à destination de la production brassicole régionale, nous nous sommes intéressés aux attentes des brasseurs de la région en termes de typicité des houblons produits. Pour cela, des enquêtes ont été réalisées auprès des brasseurs de la Région lors d'entretiens semi-dirigés. Ces enquêtes, auxquelles j'ai participé, ont été menées dans le cadre du programme Feader en collaboration avec la Chambre d'Agriculture de la Région Hauts-de-France (Anne-Hélène Martin) et le GRECAT (Groupe de Recherche et d'Études Concertées sur l'Agriculture et les Territoires) de Junia-Isa (Audrey Michenaud-Rague et Marie Stankowiak). Un questionnaire a été construit afin de mieux cerner les besoins des brasseurs. Ces résultats ont fait l'objet d'une restitution lors d'une journée réunissant les acteurs de la filière houblon en région Hauts-de-France, organisée le 7 juillet 2022 à Lorgies par le Dr Céline Rivière et Anne-Hélène Martin de la Chambre d'Agriculture.

80% du houblon utilisé par les brasseries de la région Hauts-de-France est importé de Belgique, Allemagne ou des États-Unis. Une petite partie provient cependant des 35 ha de surfaces houblonnières du Nord (Bart-Haas Group 2021). 10 variétés de houblons sont produites dans la région Hauts-de-France, collectées puis commercialisées par la CoopHou Nord. Depuis 1978, la CoopHou Nord joue un rôle central dans la structuration de la filière locale en mettant en relation les houblonniers de la région avec les brasseurs en recherche de houblons locaux. Cette structuration de la filière houblon est également fortement marquée à l'échelle nationale avec l'arrivée de nouveaux acteurs dans la production et le commerce du houblon depuis quelques années (**Figure 15**), tels que l'Association des Producteurs de Houblons de France (AGPH) ou encore l'association Houblons de France. Ces associations permettent de défendre le houblon français aux niveaux national et international, de promouvoir la production du houblon en région et de rassembler les acteurs de la filière (producteurs, négociants et transformateurs, en particulier les brasseurs). L'interprofession "InterHoublon" a été lancée en février 2020 à l'occasion du Comice du houblon (Michel 2020). Elle rassemble et représente les métiers et activités de la filière française de houblon, avec trois collèges : production, commerce et transformation. Enfin, la marque HopFrance® valorise le houblon français à l'export, sur le marché international et permet ainsi de donner une meilleure visibilité au houblon français. Les objectifs des acteurs de cette filière convergent vers une même volonté d'acquiescer de la technicité sur la culture du houblon, afin de pouvoir produire localement des houblons adaptés au terroir et qui puissent satisfaire en quantité et en qualité les brasseurs et les consommateurs.

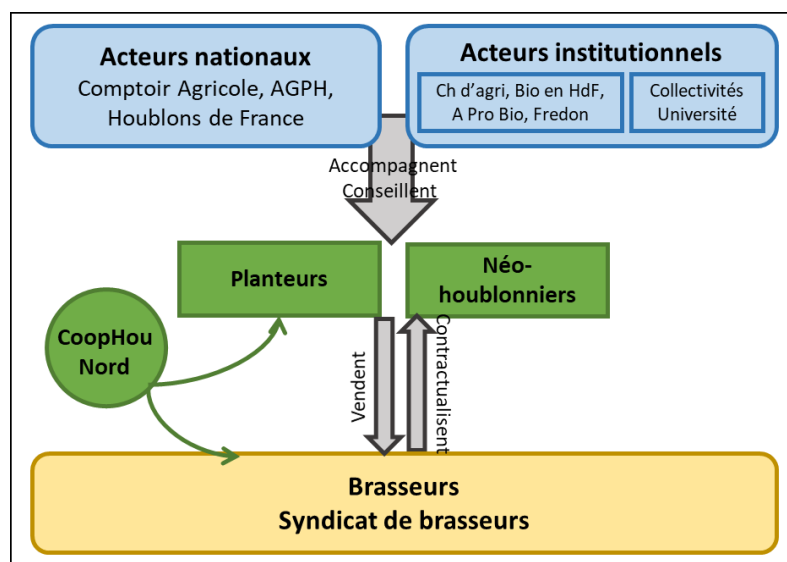


Figure 15. Principaux acteurs de la filière houblon en région Hauts-de-France.

Ainsi, afin de comprendre les dynamiques de la filière houblon en région Hauts-de-France et les potentielles perspectives de développement, des enquêtes qualitatives ont été réalisées auprès des brasseurs de la région, dans le cadre du programme Feader.

Ce questionnaire vise à comprendre le fonctionnement actuel des brasseurs de la région Hauts-

de-France en termes d'approvisionnement et d'utilisation du houblon, de connaître leurs attentes en termes de typicité de houblons et de façon plus large en termes de développement de la filière régionale.

4.2. Matériel et méthodes

Les entretiens ont été réalisés par des entretiens sur place ou en distanciel, avec les brasseurs et/ou les responsables de brasseries entre décembre 2021 et mars 2022.

4.2.1. Questionnaire

Le questionnaire a été construit autour de quatre grands axes : présentation générale de la brasserie, le houblon local, les attentes des brasseurs et les leviers de développement de la filière régionale (cf. **Annexe 8**).

Ces questions permettent d'obtenir à la fois des réponses qualitatives et des réponses quantitatives.

4.2.1.1. Présentation générale de la brasserie

Cette première partie vise à obtenir un profil général de la brasserie interrogée : sa production (volumes annuels produits et évolution présagée), sa consommation de houblon (variétés, origines des approvisionnements, quantités, conditionnement, fournisseurs et potentielles difficultés d'approvisionnement rencontrées) et son positionnement par rapport au houblon local.

4.2.1.2. Le rapport au houblon local

Cette partie s'intéresse plus en détails au positionnement des répondants par rapport au houblon local et à son utilisation. En particulier, les répondants sont interrogés sur leur définition du « houblon local », leur niveau de connaissance des acteurs et des variétés produites en région.

Les répondants étaient également interrogés sur leurs attentes par rapport au houblon local (priorités, variétés, les « valeurs » associées au houblon local...). Ils sont aussi questionnés sur leurs procédés de développement de nouvelles bières, leurs principaux critères de choix pour leur approvisionnement en houblon ainsi que les sources qu'ils utilisent pour s'informer sur les nouveautés et les procédés d'amélioration.

4.2.1.3. Le développement de la filière houblon régionale

Dans cette partie, les répondants sont interrogés sur différents leviers de développement de la filière houblon en région. Les possibilités de contractualisation, de co-investissement pour financer l'installation de houblonnières, le paiement d'un supplément permettant de faciliter l'installation de jeunes houblonniers ou encore de mise en place d'un label « houblon local » ont été des pistes notamment abordées. Plus largement, les répondants sont interrogés sur les leviers qu'ils envisagent

pour favoriser le développement de la production locale

4.2.2. Analyse des réponses de l'enquête

L'analyse des réponses quantitatives de ce questionnaire a été effectuée *via* des croisements sur Excel, à l'aide des tableaux croisés dynamiques. Les analyses qualitatives ont été traitées par occurrence de catégories.

4.3. Résultats de l'enquête

4.3.1. Profil des répondants et présentation générale des brasseries

Sur les 148 brasseries de la région, 23 brasseries ont été enquêtées (soit 15 %), réparties selon le tableau suivant (**Tableau 3**).

Tableau 3. Récapitulatif des brasseries enquêtées selon leur volume de production (en hL) et leur département.

	Aisne	Nord	Oise	Pas-de-Calais	Somme	TOTAL
Brasseries industrielle (>100 000 hL)	-	-	-	-	-	0
Brasseries (1 000 - 100 000 hL)	-	2	-	1	-	3
Brasseries artisanales (100 - 1 000 hL)	1	3	1	-	-	5
Micro-brasseries (100 hL)	1	8	1	3	2	15
TOTAL	2/12	13/75	2/19	4/29	2/13	23

Au total, les brasseries interrogées produisent en moyenne 777 hL/an, cette valeur allant de 45 hL à 45 000 hL/an. Aucune brasserie industrielle n'a été enquêtée. En effet, en 2018, une enquête avait déjà été réalisée par la Chambre d'Agriculture et avait ciblé plus spécifiquement ces brasseries. Au cours de la présente enquête, nous avons préféré interroger les brasseries qui n'avaient pas encore été enquêtées. Les bières les plus vendues dans la région Hauts-de-France sont les Blondes, les Triples, les Ambrées et depuis peu les bières de type IPA (*Indian Pale Ale*).

4.3.2. Approvisionnements : variétés et fournisseurs

4.3.2.1. Variétés utilisées

Les répondants ont été interrogés sur le type de houblon utilisé pour les brassages (**Tableau 4**).

Tableau 4. Consommation en houblon des brasseries répondantes.

n.c. : non communiqué

Type de houblon	En kg	En %
Amérisant	2256	5,4%
Aromatique	16046	38,5%
Mixte	7128	17,1%
n.c.	16215	38,9%
Total général	41645	100%

Au total 41 tonnes de houblon par an (soit 1,7 T en moyenne, allant de 38 kg à 9,8 T/an) sont utilisées par les brasseurs de la région. Ce sont en majorité des houblons aromatiques (38,5%) qui sont utilisés. Dans le détail, l'utilisation des variétés se répartit selon la **Figure 16**.

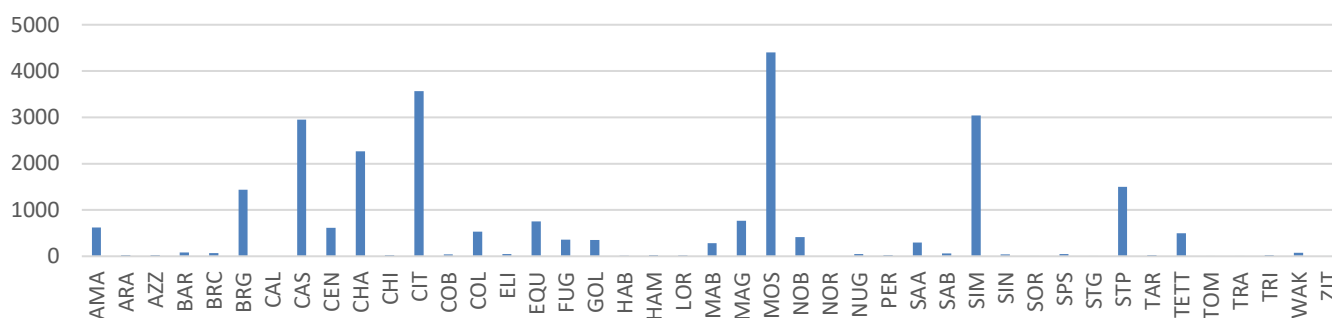


Figure 16. Variétés utilisées par les brasseurs enquêtés.

AMA : Amarillo ; ARA : Aramis ; AZZ : Azzacca ; BAR : Barbe rouge ; BRC : Brambling Cross ; BRG : Brewers Gold ; CAS : Cascade ; CEN : Centennial ; CHA : Challenger ; CIT : Citra ; COB : Cobb’s Golding ; ELI : Elixir ; EQU : Equinox ; FUG : Fuggle ; GOL : Golding ; HAB : Hallertau Blanc ; HAM : Hallertau mittlefruth ; LOR : Loral ; MAB : Mandarina bavaria ; MAG : Magnum ; MOS : Mosaïc ; NOB : Northern Brewers ; NOR : Northdown ; NUG : Nugget ; PER : Perle ; SAA : Saaz ; SAB : Sabro ; SIM : Simcoe ; SOR : Sorachi ; STG : Styrian Golding ; SPS : Spalter Select ; STP : Strisselspalt ; TAR : Target ; TETT : Tettang ; TOM : Tomahawk ; TRA : Tradition ; TRI : Triskel ; WAK : Wakatu ; ZIT : Zithos.

La consommation de houblon en région est largement dominée par les variétés Mosaïc (4,4 T), Citra (3,5 T), Simcoe (3 T), Cascade (2,9 T), Challenger (2,2 T) et Strisselspalt (1,5 T).

Sur les brasseries enquêtées, 14 brasseries se fournissent auprès de la CoopHounord pour la fourniture de houblon local (**Figure 17**). La majorité des brasseries ont plusieurs fournisseurs : 4 micro brasseries ne se fournissent qu’auprès d’un seul fournisseur. Il s’agit pour 3 brasseries sur 4 d’un grossiste qui propose une gamme de houblons, et qui offre un intérêt financier et logistique (souplesse) pour les micro-brasseries. En effet, les micro-brasseries peuvent commander en plusieurs fois ou des petites quantités de variétés de houblon français ou étranger. Pour les houblons locaux, certains brasseurs soulignent qu’il est parfois moins cher de commander via le grossiste qu’à la coopérative en direct (pas de franc de port).

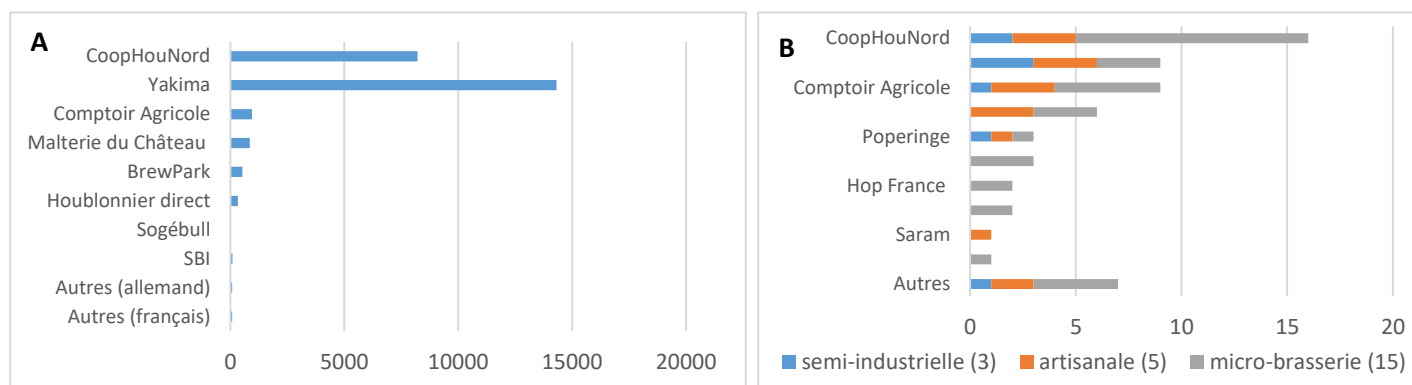


Figure 17. Fournisseurs des houblons des brasseries enquêtées. Informations récoltées sur 60% des volumes achetés. A : volumes (en kg). B : Fournisseurs, par type de brasseries.

Ainsi, sur les micro-brasseries et les brasseries artisanales enquêtées, la CoopHounord représente 40% des approvisionnements et Yakima 10%. Pour les brasseries semi-industrielles, la tendance est globalement identique avec 30% des approvisionnements via la CoopHounord et 11% des approvisionnements via Yakima. Par département, on note une forte représentation de la

Coophounord dans le département du Nord, alors qu'en Picardie la Malterie du château et le Comptoir Agricole⁴ sont majoritaires. Par ailleurs, Yakima n'est identifié comme fournisseur que dans le département du Nord. La nécessité de se fournir auprès d'autres fournisseurs que la Coophounord s'explique par :

- la recherche par les brasseurs de variétés (surtout aromatiques) qui ne sont pas produites en région, et qui ne sont peut-être pas adaptées à une production en région ;
- le manque de volumes disponibles à la coopérative ;
- la simplicité de passer par un grossiste : commandes groupées avec d'autres fournitures (grossiste non spécialisé en houblon), commandes multiples sur l'année (choix du fournisseur pour s'adapter à l'évolution des volumes brassés), commandes de petites quantités non adaptées à la logistique de la coopérative ;
- la variation du taux en acides α ou de la qualité des houblons, non compatible avec le procédé du brasseur.

Certaines micro-brasseries utilisent les houblons de Coophounord indirectement, en passant par un grossiste. Cela leur permet notamment de faire des commandes plus petites, plus fréquentes et parfois d'avoir des tarifs moins chers (notamment en évitant le franco ou avec des tarifs moins élevés que ceux proposés par la coopérative). Seul un brasseur interrogé (micro-brasserie) travaille à 100% avec des houblons régionaux *via* un partenariat direct avec un producteur. Enfin, les fournisseurs étrangers sont sollicités pour la fourniture de houblons non cultivés en région, donc non disponibles localement (Citra, Sabro...). Toutefois, ces fournisseurs sont également sollicités pour vendre des variétés proposées par la Coophounord (Cascade, Magnum, Golding...).

4.3.2.2. Contractualisation

Compte-tenu des faibles volumes, la notion de contrat/engagement diffère selon les brasseries : il peut s'agir d'un contrat, d'une réservation ou de l'expression d'un besoin (**Figure 18**).

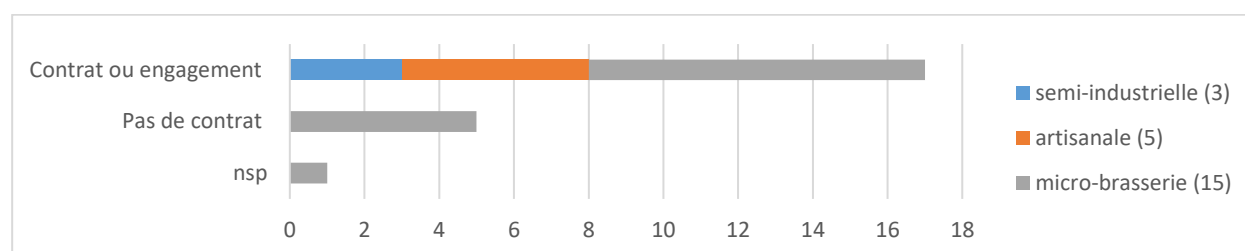


Figure 18. Part de contractualisation dans les brasseries répondantes.

nsp : ne se prononce pas.

18 brasseries ont évoqué la présence de contrat ou d'engagement sur un volume (forme non précisée, pas toujours formalisée) avec au moins un de leurs fournisseurs. Ces engagements sont souvent pris en N-1 (voire pour 1 micro brasserie, à 3 ans). Une brasserie semi-industrielle possède des

⁴ Le Comptoir Agricole est le nom de la coopérative houblonnière alsacienne actuelle

contrats à 4 ans avec clause de revoyure. Bien qu'ayant un engagement sur un volume auprès d'un fournisseur, elles peuvent connaître des difficultés d'approvisionnement avec la Coop'hounord, comme avec les autres fournisseurs. 5 micro-brasseries ne possèdent pas de contrat ; il s'agit de petits volumes de houblon. Certaines admettent tout de même rencontrer des problèmes d'approvisionnement.

4.3.2.3. Conditionnement

La **Figure 19** concerne la forme des houblons utilisée :

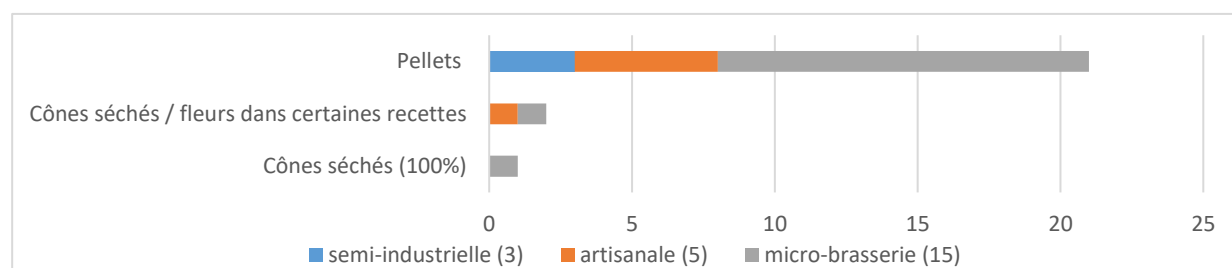


Figure 19. Forme de houblons utilisée par les brasseurs.

22 brasseurs utilisent le houblon sous forme de pellets en sacs de 5kg le plus souvent. Cette forme de houblon est adaptée pour les procédés des brasseries rencontrées, notamment en terme de facilités d'utilisation. Elle est également plus facile à stocker (moindre volume) et à conserver. Seul 1 micro-brasseur utilise uniquement des cônes séchés. 2 brasseurs indiquent utiliser des cônes séchés en compléments des pellets pour certaines recettes particulières (bières aromatiques). En revanche, aucun répondant n'a indiqué utiliser des extraits de houblon liquide.

4.3.2.4. Critères de choix des houblons

Les répondants indiquent choisir leur houblon en fonction de leurs qualités aromatiques (15 répondants sur 23), de leur provenance locale (12 sur 23) et de leur teneur en acides α (7 sur 23) (**Figure 20**). Certaines microbrasseries (4 sur 16) indiquent être à la recherche de houblons issus de l'agriculture biologique. Deux brasseries artisanales sur les 4 interrogées et une microbrasserie sont à la recherche de produits innovants pour de nouvelles recettes. Le prix, en revanche, ne semble pas être un réel critère de choix, puisqu'il n'a été cité que par 2 répondants. Un brasseur a indiqué que le prix n'était pas un critère au vu des faibles quantités de houblons utilisées pour un brassin et donc du faible impact que cela pouvait avoir sur le coût final de fabrication.

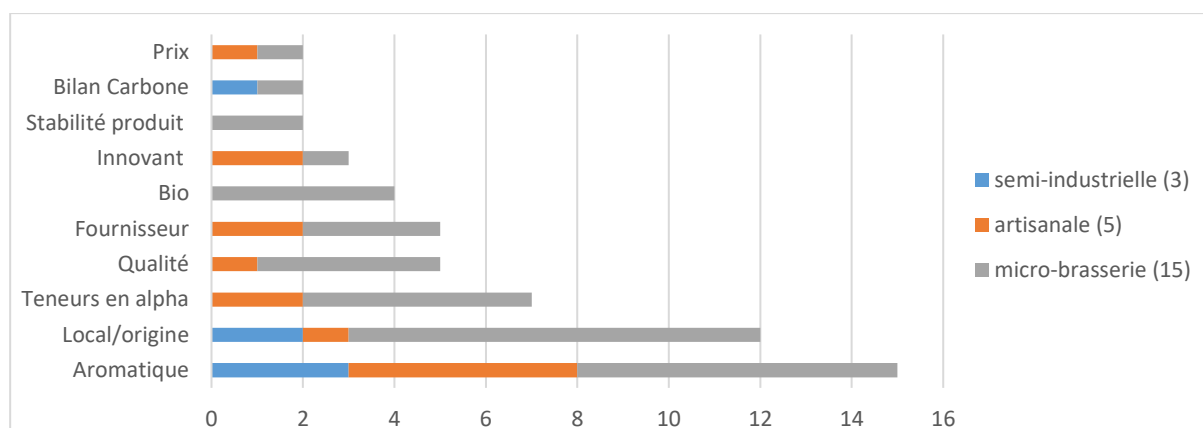


Figure 20. Critères de choix des houblons selon les répondants.

4.3.3. Houblon local

4.3.3.1. Définition du terme « local »

Le critère de l'origine du houblon étant un paramètre qui apparaît comme primordial dans le choix du houblon, les répondants ont été interrogés sur leur définition du terme "local" pour qualifier le houblon. Leurs réponses diffèrent, notamment en fonction de la localisation géographique des répondants (Figure 21).

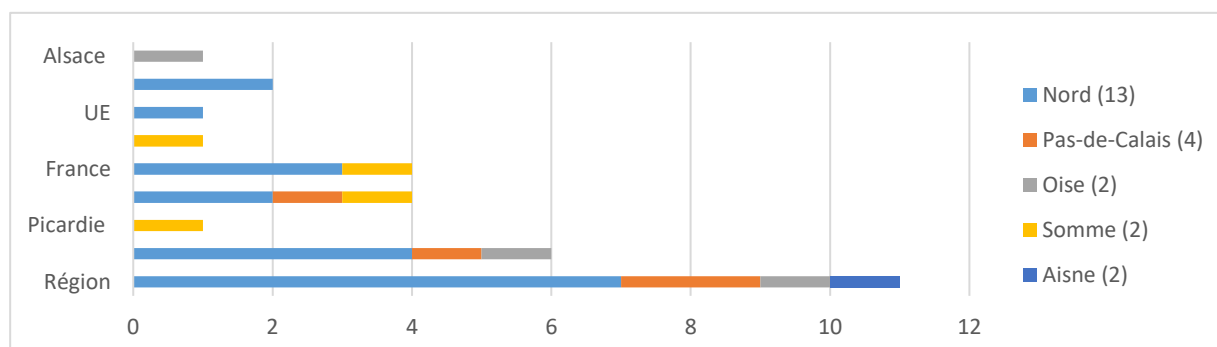


Figure 21. Définition du terme "local" selon les répondants en fonction de leur département.

Pour 11 répondants sur 23, un houblon local est un houblon provenant de la région Hauts-de-France. Un houblon local est un houblon cultivé dans les Flandres pour 6 répondants (dont 4 originaires du Nord), ou provenant de la Belgique (pour 4 répondants, dont 3 originaires de départements frontaliers), ou de France (4 répondants). A la marge, la désignation "local" s'applique pour des houblons provenant d'Alsace (1), d'Allemagne (1) ou de l'Union Européenne (1). Plus globalement, 3 répondants associent le houblon local à un produit rare, 2 à un produit de qualité, et 2 à un produit cher. Au contraire pour 2 répondants, houblon local n'est pas forcément synonyme de qualité, et est plus coûteux pour 2 autres répondants.

Ainsi une majorité de répondants (14/23) serait largement favorable à l'utilisation de houblon local. En particulier, pour 6 d'entre eux, cela correspond à la démarche et à la logique de leur brasserie,

mais deux soulignent que la Coopounord n'est pas toujours en mesure de les approvisionner.

4.3.3.2. Pourquoi ne pas utiliser du houblon local ?

L'enquête s'intéresse désormais aux motivations des brasseurs qui n'utilisent pas de houblon local (**Figure 22**).

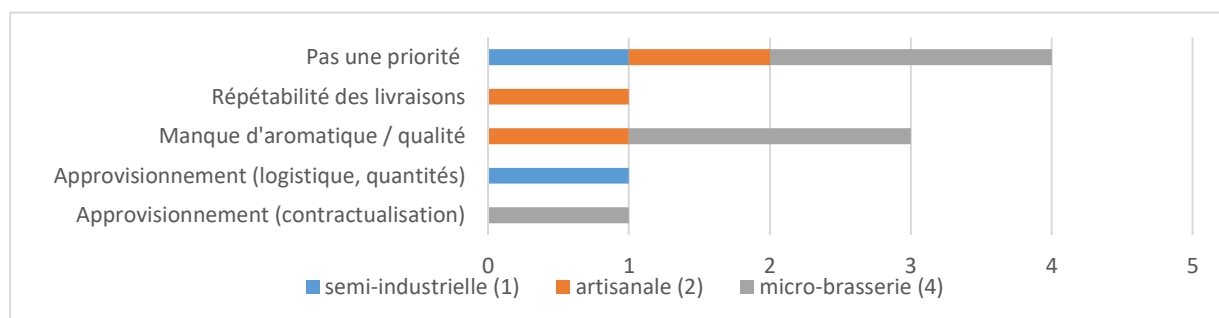


Figure 22. Raisons évoquées par les répondants pour lesquelles ils ne privilégient pas l'utilisation de houblon local.

7 brasseries, dont 3 du territoire de l'ex-Picardie, ne se fournissent pas auprès de la Coopounord. Pour les brasseries qui ne travaillent pas avec la Coopounord, le caractère local du houblon n'est pas une priorité. Le manque de puissance aromatique des houblons proposés, les difficultés d'approvisionnement (pas de visibilité sur les volumes, logistique non adaptée en termes de volume, répétabilité dans le temps) expliquent le choix d'autres fournisseurs. 4 brasseries n'ont pas pu tester les variétés produites par la Coopounord, et seraient intéressées pour le faire.

4.3.3.3. Notion de réduction de l'impact Carbone

Nous avons également souhaité savoir si la diminution de l'impact carbone pouvait être une motivation pour utiliser du houblon local (**Figure 23**).

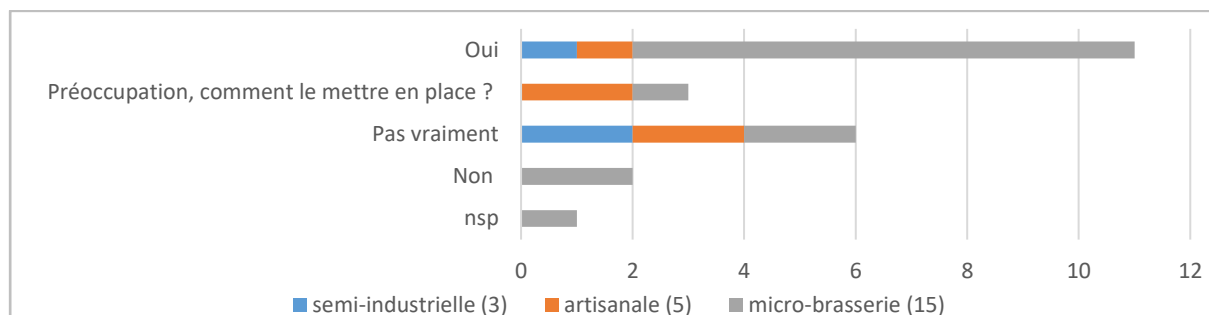


Figure 23. Préoccupation du critère « impact carbone » pour l'utilisation de houblon local selon les répondants.

La notion de "réduction de l'impact carbone" associé au houblon local peut être intéressante pour 11 brasseries sur 23. L'approvisionnement en local semble être cohérent avec une politique RSE (responsabilité sociétale des entreprises) développée (mise en place d'une consigne...) ou souhaitée par les brasseries car en cohérence avec la stratégie d'avoir des partenaires locaux, réduction des transports.... Le mode de suivi et de communication auprès du consommateur n'est cependant pas évoqué. Pour 8 brasseries, le critère "réduction de l'impact carbone" associé au houblon local n'est pas

ou pas vraiment intéressant à exploiter car difficile à calculer et à valoriser. L'impact carbone semble plutôt à travailler au niveau de la production et du stockage que de la logistique.

4.3.3.4. Niveau de connaissances des répondants sur la filière régionale

Les répondants sont amenés à estimer leur niveau de connaissance sur les houblons produits en région Hauts-de-France (**Figure 24**).

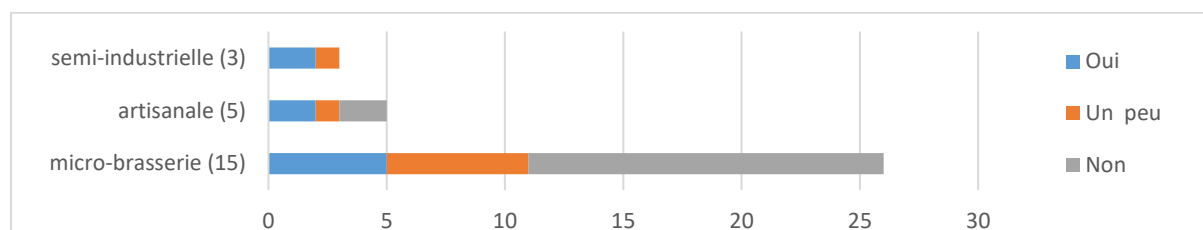


Figure 24. Niveau de connaissances des brasseries répondantes sur la filière régionale, selon leur niveau de production.

9 brasseries répondantes connaissent les variétés proposées par la Coophounord. Pour les brasseries Bio, elles connaissent le néo-houblonnier Edouard Roussez et la Coophounord et/ou ses producteurs bio. Au niveau de la coopérative, les brasseurs conventionnels, connaissent surtout Yvon Pruvost, le président de la coopérative, avec qui ils ont de nombreux échanges. Parmi les 6 brasseries qui ne connaissent pas la filière régionale, on retrouve les brasseries qui s'approvisionnent auprès d'autres fournisseurs. 8 brasseries disent ne pas bien connaître les producteurs/variétés en région. Ce n'est pas forcément une attente forte, de leur part. Ils n'ont pas vraiment cherché à se renseigner sur les variétés produites autres que celles qu'ils utilisent. En l'absence de nouveauté, ils ne cherchent pas à davantage connaître la filière. Globalement, la communication portant sur les producteurs locaux et les variétés produites en région mérite d'être accentuée.

Nous avons voulu savoir comment les brasseurs récupèrent des informations sur les variétés de houblons existantes (**Figure 25**).

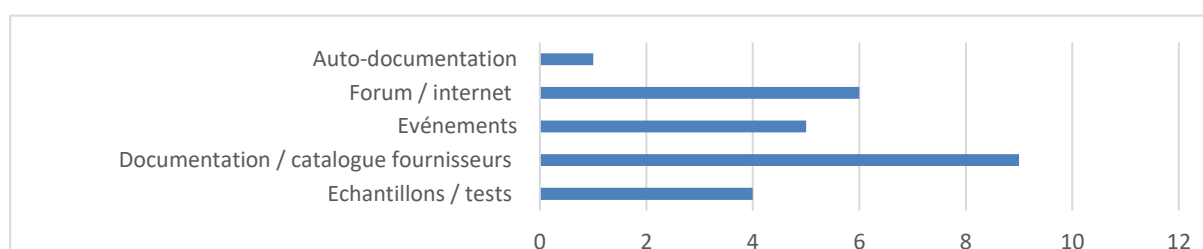


Figure 25. Moyens d'information des brasseurs sur les différentes variétés de houblon existantes.

Actuellement, la plupart des répondants s'informe *via* les informations fournies par les fournisseurs (pour 9 répondants), ou *via* des forums ou sur internet (6 répondants). Les événements (rencontres entre brasseurs, salons, ...) sont également un bon moyen de mieux connaître les nouvelles variétés (pour 4 répondants). De manière plus globale, 3 répondants soulignent que les informations sur les variétés existantes sont difficiles d'accès.

Comme les variétés cultivées localement semblent assez peu connues des répondants, il s'est montré intéressant d'identifier les possibles leviers d'amélioration de la connaissance des variétés produites localement (**Figure 26**).

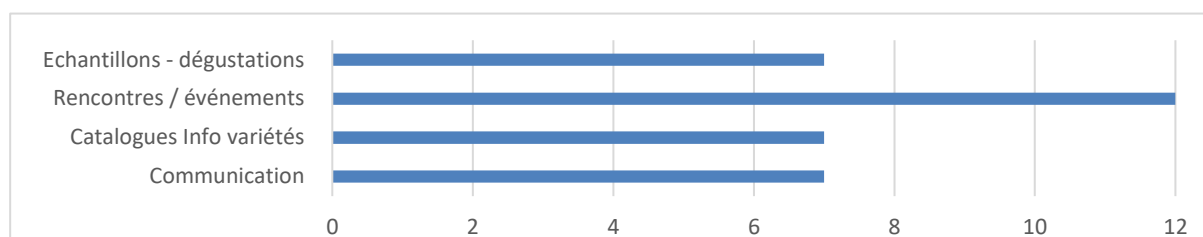


Figure 26. Leviers d'amélioration des connaissances des variétés locales par les brasseurs selon les répondants.

Ainsi, pour les répondants, l'amélioration de la visibilité et de la connaissance des variétés produites en région passe par :

- l'organisation d'événements et de rencontres entre les houblonniers, les fournisseurs et les brasseurs (pour 12/23),
- davantage de communication, en particulier de la part de la Coop'hounord (pour 7/23),
- l'édition d'un catalogue avec les caractéristiques aromatiques et chimiques des houblons et les nouveautés disponibles (pour 7/23),
- l'envoi d'échantillons pour des brassins test (pour 7/23).

4.3.4. Développement de la filière régionale

4.3.4.1. Attentes

Les répondants ont été questionnés sur leurs attentes concernant les houblons cultivés en région (**Figure 27**).

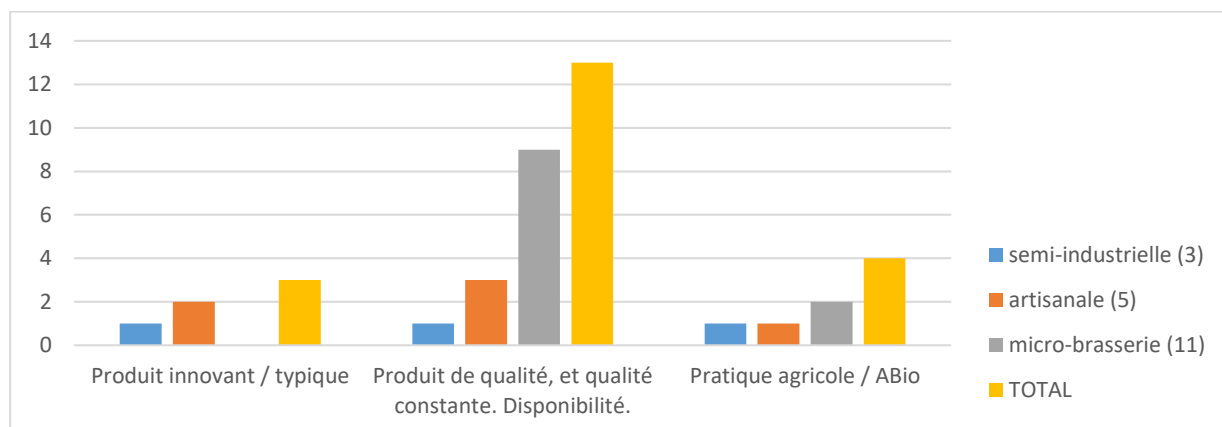


Figure 27. Attentes des répondants sur les caractéristiques du houblon produit en local.

Pour un houblon local, les répondants sont essentiellement à la recherche de houblon de qualité (aromatique notamment) et de qualité constante (7/23). Il doit aussi être disponible dans les volumes souhaités, à tout moment de l'année (4/23). Les répondants sont également attentifs à la pratique agricole (agroécologie, haute valeur environnementale...) (4/23), dont le label Agriculture Biologique pour deux répondants. 2 répondants sont notamment attentifs à la qualité de la conservation des houblons. Enfin, une minorité de répondants est à la recherche d'un produit innovant (2/23), typique de la région (1), pouvant ainsi nécessiter un développement variétal.

4.3.4.2. Contractualisation

Le développement des surfaces en région implique de la visibilité pour les houblonniers, et donc des perspectives/engagements d'achat de la part des brasseurs. Pour cela, une majorité des répondants seraient favorables à la contractualisation (12 répondants sur 23), et ce quel que soient les volumes produits par la brasserie (**Tableau 5**).

Tableau 5. Avis des répondants quant à une possible contractualisation.

nsp : ne se prononce pas

	Semi-industrielle (3)	Artisanale (5)	Micro-brasserie (15)	TOTAL (23)
Oui	2	3	7	12
à 1 an			4	4
à 3 ans	1	1	2	6
à 5 ans		1	1	2
long terme	1			1
Non			2	2
À réfléchir	1	1	1	3
nsp			7	7

Quatre répondants seraient prêts à s'engager sur les variétés actuellement produites en région. En particulier, les variétés les plus attendues sont le Brewers Gold (4 répondants), le Cascade (4 répondants) et le Magnum (3 répondants).

4.3.4.3. Co-investissement et soutien financier aux houblonniers

L'installation d'une houblonnière coûte chère (entre 70 et 100 000 € / ha). Pour aider l'installation des jeunes houblonniers les premières années, différents moyens de financements ont été envisagés par les brasseurs, notamment la possibilité de co-investir dans des houblonnières, ou bien de payer le houblon un peu plus cher afin de financer un fond d'aide pour les houblonniers. Les répondants sont désormais interrogés quant à leur positionnement par rapport à ces deux leviers de financement (**Figure 28**).

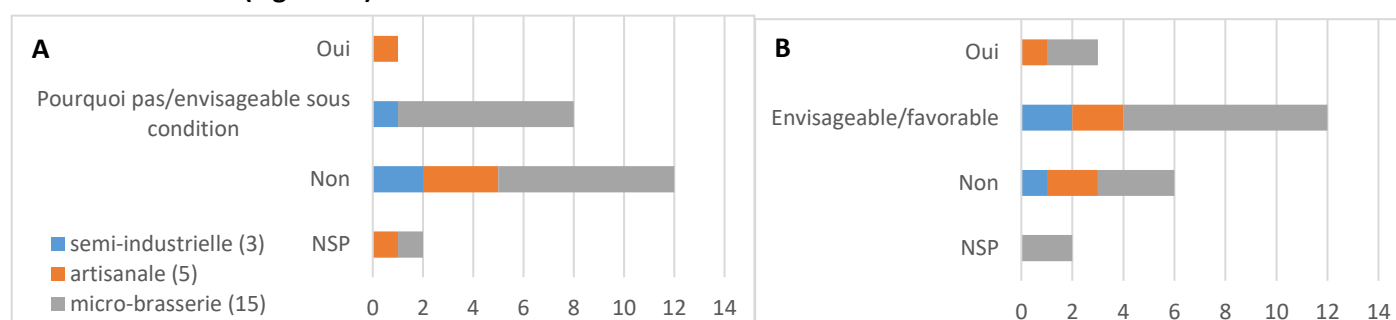


Figure 28. A : Possibilité de co-investissement dans l'installation de houblonniers. B : Possibilité de financer l'installation de jeunes houblonniers ou le développement des houblonniers actuels en augmentant le prix d'achat du houblon.

12 brasseries ne sont pas prêtes à aider à l'installation de producteurs. En effet, elles n'ont soit pas de financements, soit considèrent que ceci ne constitue pas leur métier. 8 brasseries seraient ouvertes au fait de soutenir l'installation de nouveaux producteurs, mais pas en direct :

- soit par un investissement dans le terrain (surtout s'il est à proximité de la brasserie), soit en s'engageant sur des volumes (5/23)
- soit en passant par une association ou la Coop'hounord (pas de soutien individuel direct) (2/23)
- soit en co-investissant dans une houblonnière (1 micro brasserie détenue par un agriculteur)

1 brasserie artisanale serait prête à soutenir un tel projet car totalement en phase avec sa stratégie.

Concernant la possibilité de payer le houblon local un peu plus cher pour créer un fond d'investissement pour la création variétale, 12 brasseries seraient prêtes ou favorables à payer un plus cher leur houblon, à condition d'avoir un résultat visible, qui corresponde à leur attente (aromatique, variété typique), et qui soit pérenne (résultat sur le long terme).

4.3.4.4. Mise en place d'un label régional

Afin de mettre en valeur la typicité et le terroir de la région Hauts-de-France, la mise en place d'un label "houblon local" ou "houblon du Nord" est discutée. Pour 10 répondants, la mise en place de ce label avec un logo sur le produit fini pourrait avoir un intérêt ; 2 répondants seraient prêts à y réfléchir ; 3 s'y opposent et 8 ne se prononcent pas. La mise en place d'une marque a été suggérée par 1 répondant. Si un tel label venait à se mettre en place, il devrait répondre à différents critères, tels que ceux résumés dans le **Figure 29**.

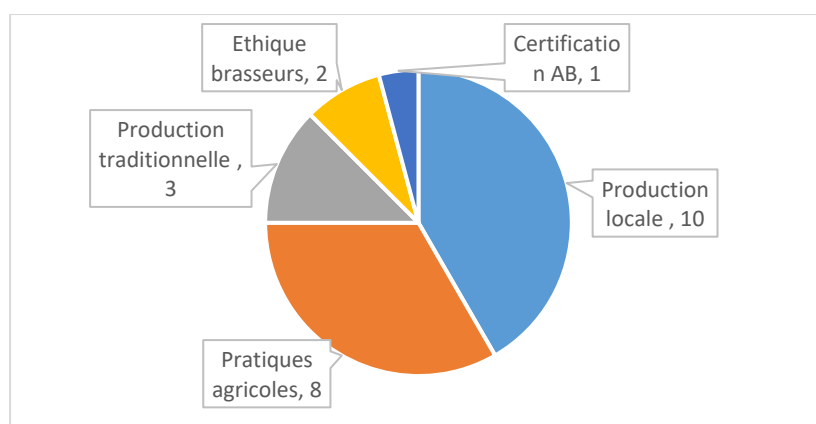


Figure 29. Valeurs à défendre par le label "houblon local" selon les répondants s'il venait à être mis en place.

Ce label devrait donc selon les répondants satisfaire essentiellement à des critères géographiques, en suivant un mode de production strict (Agriculture Biologique, haute valeur environnementale...).

Enfin, les répondants ont été interrogés sur les leviers qu'ils envisageaient pour le développement de la filière houblon en région (**Figure 30**).

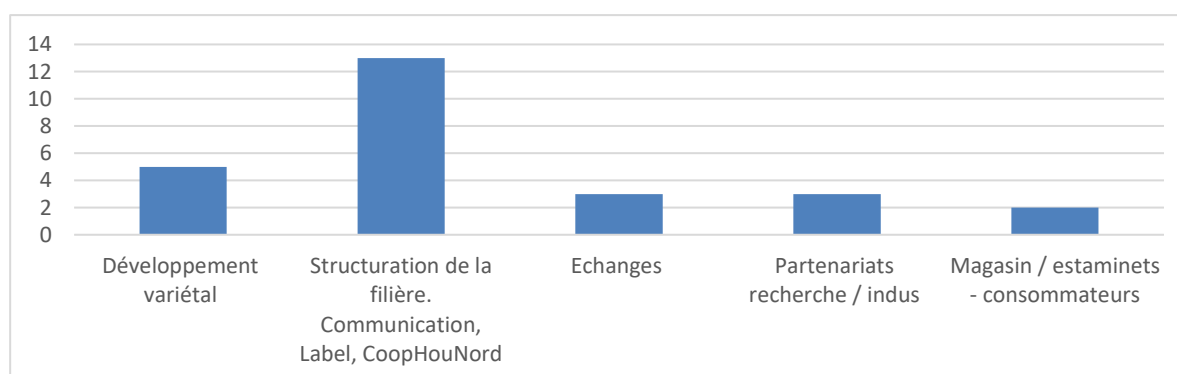


Figure 30. Leviers envisagés par les répondants pour le développement de la filière houblon en région.

11 répondants suggèrent une structuration de la filière, notamment en s'appuyant sur la CoopHouNord, et en améliorant sa visibilité et les services proposés. Certains suggèrent d'améliorer la traçabilité des produits, les conditions de séchage, ensachage et conditionnement des houblons, ou encore de perfectionner les conseils techniques. 5 répondants insistent sur l'importance d'améliorer la communication autour des activités brassicoles de la région, notamment *via* la mise en place d'un

logo, l'organisation d'événements, ou encore la mise en place d'un site internet. 5 répondants seraient intéressés par le développement d'une variété de houblon avec une typicité aromatique, permettant de se démarquer des houblons existants. L'idée de prendre exemple sur ce qui se fait à l'étranger, et notamment en Belgique a été évoquée par deux répondants.

4.4. Conclusion de l'analyse de filière

Cette analyse de filière réalisée auprès des brasseurs de la Région Hauts-de-France a donc permis de dégager les principales tendances et attentes du secteur. En particulier, il en ressort que les variétés les plus utilisées par les brasseurs de la région sont les variétés Mosaïc, Citra, Simcoe, Cascade, Challenger et Strisselspalt, qui sont considérées comme des houblons aromatiques voire mixtes. Ceci atteste donc de l'intérêt de rechercher une variété aromatique adaptée au terroir de la région, puisque plusieurs brasseurs regrettent le manque de potentiel aromatique des houblons cultivés localement.

Les répondants regrettent aussi le manque de communication et de structuration de la filière locale. Ils souhaiteraient être davantage informés sur les productions locales par le biais d'organisations d'événements par exemple. En effet, un intérêt certain pour le houblon local se dégage de ces enquêtes, non seulement dans une démarche de diminution de l'impact carbone, mais surtout pour répondre à une demande forte des consommateurs qui recherchent des bières avec une identité régionale forte et avec des notes aromatiques marquées. Ceci va également de pair avec la défense d'une agriculture locale et raisonnée typique d'un terroir. Les brasseurs sont donc à la recherche d'ingrédients de qualité, et de qualité constante, empreints d'une identité régionale forte, et avec un approvisionnement en quantité suffisante. Ainsi, les répondants alertent notamment sur les procédés post-récolte (séchage, pelletisation, conservation...) qui influencent grandement la qualité finale des cônes. Pour répondre à ces exigences de qualité et de typicité du houblon local, les répondants seraient prêts à envisager un engagement financier et/ou contractuel permettant de soutenir la filière houblon régionale.

OBJECTIFS DE LA THESE

La région Hauts-de-France est une région historique pour la production de houblon et la production brassicole. Après un fort déclin au cours du XX^{ème}, la filière houblon régionale connaît désormais un nouvel élan, notamment sous l'impulsion de l'essor des micro-brasseries. Cette production constitue une culture de diversification intéressante pour les agriculteurs, mais intéresse également les brasseurs. Comme nous venons de le mettre en évidence au cours de l'enquête précédente, les brasseurs de la région sont à la recherche de houblons aromatiques, et s'approvisionnent pour cela bien souvent à l'étranger, malgré la volonté de valoriser le terroir et les productions locales. Les acteurs de la filière, houblonniers comme brasseurs, seraient donc très intéressés par une variété de houblon régionale, sélectionnée pour ses qualités aromatiques et sa résistance aux pathogènes, en vue d'une culture durable pour une utilisation par l'industrie brassicole régionale.

Cette thèse de doctorat s'inscrit donc dans cette dynamique de la culture de houblon et de la culture brassicole en région Hauts-de-France et répond à une véritable demande de la part de l'ensemble des acteurs de la filière houblon. Ce projet porte sur le potentiel des houblons sauvages locaux. De nombreux travaux antérieurs ont en effet montré que les houblons sauvages pouvaient constituer un réservoir de diversité pouvant servir au développement variétal. Au cours de mon doctorat, une collection expérimentale de ressources génétiques a été constituée (50 accessions sauvages, 10 cultivars et 3 variétés anciennes). Des boutures de rhizomes des accessions sauvages ont été transplantées en houblonnière expérimentale afin de pouvoir comparer leur potentiel chimique en *in-situ* (soumis à des facteurs abiotiques et biotiques non contrôlés) et en *ex-situ* (conditions plus contrôlées). L'objectif général de ce projet de doctorat était notamment de vérifier si les houblons sauvages régionaux pouvaient présenter une diversité génétique et chimique. Cette diversité naturelle peut en effet permettre d'apporter d'excellentes caractéristiques agronomiques et aromatiques, adaptées au climat de la région Hauts-de-France, pour un développement variétal futur. Cette étude est à la première étape de ce projet, et vise à investiguer la diversité des houblons sauvages de la région : (i) en évaluant la diversité génétique du houblon sauvage du Nord de la France par rapport aux cultivars connus ; (ii) en réalisant une caractérisation chimique des génotypes, afin d'évaluer leurs caractéristiques qualitatives (iii) en réalisant une caractérisation agronomique et morphologique des génotypes de houblon sélectionnés ; (iv) en évaluant l'intérêt organoleptique des houblons sélectionnés par un panel de dégustation après brassage de ces houblons. Cette étude permettra également l'évaluation d'un potentiel effet "terroir" sur les caractéristiques chimiques des houblons.

CHAPITRE 2. ETAT DE L'ART

CHAPITRE 2. ÉTAT DE L'ART

Partie A. Le houblon sauvage : un réservoir de diversité

1. L'importance de la diversité génétique

La diversité biologique est définie comme la « variabilité des organismes vivants de toute origine [...] cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes » (Sommet de la Terre 1992). Cette définition reflète les différents niveaux de la biodiversité et l'interaction complexe entre les éléments biotiques et abiotiques. La communauté scientifique s'accorde ainsi à définir trois niveaux de diversité : (i) la diversité écosystémique : diversité des écosystèmes et interaction des populations entre elles ou avec leur environnement, (ii) la diversité interspécifique : diversité des espèces (systématique), (iii) la diversité génétique, qui se traduit par la variabilité des gènes au sein d'une même espèce, entre individus ou entre populations. Bien que la diversité biologique soit reconnue comme l'une des ressources les plus importantes de la planète, elle est grandement menacée par l'homme et ses activités qui depuis la deuxième moitié du XX^{ème} siècle ont accru les concentrations de gaz à effets de serre dans l'atmosphère (GIEC 2001). Depuis les années 2000, le concept d'agrobiodiversité a émergé et désigne l'ensemble des composantes de la diversité biologique lié à l'alimentation, à l'agriculture et au fonctionnement des écosystèmes agricoles (Raimond et Garine 2020). Elle concerne ainsi les relations dynamiques et la diversité qui existent entre les sociétés humaines, les plantes cultivées, les animaux domestiques et les écosystèmes au sein desquels tous interagissent. Cela implique sa structure, ses fonctions, ainsi que les services écosystémiques rendus. Cependant, cette agrobiodiversité est menacée par les besoins croissants en ressources alimentaires ainsi que la standardisation du marché alimentaire mondial, qui conduisent à l'utilisation intensive de la monoculture (FAO 2019). Ceci a pour conséquence la disparition des variétés locales : environ 80% de la production alimentaire mondiale provient d'une douzaine d'espèces végétales et de cinq espèces animales (FAO Stat 2021). Au cours de l'histoire de la culture du houblon, la domestication et les programmes de sélection ont entraîné une diminution drastique de l'agrobiodiversité intraspécifique du houblon (**Figure 31**).

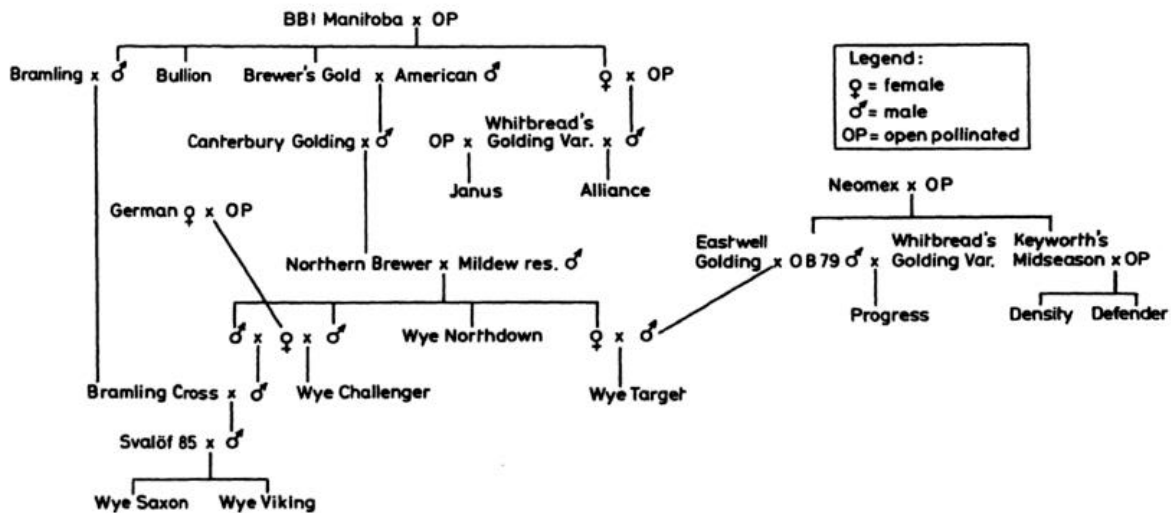


Figure 31. Parenté entre les variétés anglaises de houblon (d'après Haunold 1981).

2. Travaux d'investigation de la diversité des houblons sauvages

Dans ce contexte d'appauvrissement de l'agrobiodiversité, l'exploitation de la diversité sauvage existante par le biais de programmes de sélection apparaît comme un levier de développement. La sélection à partir d'accessions sauvages pourrait permettre de développer des génotypes avec, en ce qui concerne le houblon, des profils phytochimiques intéressants, mais aussi adaptés à une culture durable, compte tenu du contexte de changement climatique (Maxted 2013). Cette sélection pourrait permettre d'améliorer la résistance aux maladies, d'augmenter la teneur en résines et de favoriser de bons rendements. La connaissance des caractéristiques morphologiques, écologiques et agronomiques de tous les génotypes disponibles constitue des paramètres indispensables pour sélectionner les individus les mieux adaptés aux techniques modernes de culture répondant aux mieux aux besoins actuels. La conservation de la biodiversité est donc une priorité mondiale (Nations Unies 2016). Les germoplasmes sont le plus souvent conservés *ex situ*. Une fois collectées, les accessions du matériel végétal d'intérêt sont caractérisées et conservées en champ expérimental, afin de créer ces banques de germoplasme (Maxted 2013). Ces ressources génétiques peuvent également être conservées *in-vitro*, permettant ainsi de conserver un grand nombre de plantes dans un espace restreint, à l'abri des maladies et facilitant leur multiplication.

Ainsi, depuis une vingtaine d'années, plusieurs études ont porté sur l'investigation de la diversité des houblons sauvages collectés dans différentes régions du monde. Ces travaux soulignent différents aspects de la diversité, notamment morphologique, génétique et chimique (composition en composés volatils et/ou en composés phénoliques majoritaires).

Parmi ces travaux, nombreux sont ceux qui ont exploré la diversité génétique. On peut notamment citer ceux :

- de Murakami et al. (2006) réalisés sur 147 accessions sauvages collectées à travers l'hémisphère nord et qui ont ainsi pu retracer l'historique de migration des houblons ;
- de Rodolfi et al., (2018) portant sur 80 accessions sauvages italiennes et 43 variétés commerciales européennes ;
- de Horreo et al. (2014) réalisés sur 88 accessions sauvages de Galice (Espagne) ;
- de Mafakheri et al. (2020) portant sur 54 accessions collectées en Iran en comparant différents types de marqueurs génétiques.

Concernant les études portant sur l'exploration de la diversité chimique, on peut mentionner celles :

- de McCallum et al. (2019) portant sur 30 accessions sauvages collectées au Canada ;
- de Martins et al. (2020) axées sur le potentiel aromatique de 75 houblons sauvages portugais et de 34 variétés commerciales par le biais d'une analyse de leur composition en composés volatils et d'une analyse sensorielle ;
- de Mongelli et al. (2016) basées sur l'analyse de la composition en composés volatils de 11 écotypes italiens et 10 variétés commerciales.

Certaines études combinent également des approches pluridisciplinaires pour investiguer cette diversité. Les travaux de Kondić et al. (2021), par exemple, ont porté sur une caractérisation phytochimique et morphologique de 7 populations de houblons sauvages collectées en Bosnie-Herzégovine. Mongelli et al. (2015) ont comparé génétiquement 22 accessions sauvages italiennes avec 9 variétés commerciales, et ont complété ce génotypage par des analyses phytochimiques (composés volatils, XN et acides α et β). Quant à Dabbous-Wach et al. (2021), ils ont caractérisé génétiquement 4 accessions sauvages collectées en Corse, les ont comparées à 3 variétés commerciales et ont complété cette caractérisation par une analyse de l'huile essentielle et une description morphologique. Enfin, certaines études ont porté sur les caractéristiques agronomiques de certains germoplasmes, comme ceux de Krofta et al. (1998) en République Tchèque ou plus récemment de Trefilová et al. (2021) sur le mildiou. Ces différents travaux ont pu montrer une diversité génétique, chimique et morphologique remarquable pour ces différentes accessions.

3. De l'investigation de la diversité à la création variétale

Le patrimoine du houblon sauvage constitue donc un réservoir de biodiversité énorme qui pourrait enrichir l'agrobiodiversité existante. Selon la Convention internationale des producteurs de houblon (IHGC), 291 variétés commerciales étaient recensées en 2021 (à l'exclusion des sélections expérimentales et des enregistrements sans nom), incluant 69 variétés amérisantes et 222 variétés aromatiques (Rossini et al. 2021). Bien que leur variation génétique soit relativement limitée, les principaux cultivars de houblon se différencient globalement en deux groupes ; le premier est composé de variétés traditionnelles européennes, tandis que le second dérive des variétés de houblons sauvages d'Amérique du Nord. Quelques caractéristiques importantes de certaines variétés, comme la résistance aux maladies et la teneur élevée en acides α , proviennent du houblon sauvage (Murakami et al. 2006). Le houblon sauvage peut être utilisé comme donneur de gènes pour différentes résistances aux maladies et aux insectes, pour l'adaptation à des environnements stressants (Acquaah 2012) et pour des profils phytochimiques originaux (arômes et saveurs). Les pratiques de sélection actuelles visent à : (i) améliorer la résistance aux maladies (flétrissement verticillien, mildiou et oïdium), (ii) augmenter la teneur en acides α et en huile essentielle et (iii) conférer un rendement élevé et stable et de bons paramètres agro-techniques (Seigner et al. 2009 ; Mongelli et al. 2015). C'est par exemple le cas de la variété Progress, obtenue au cours des années 60 par croisement entre la variété Whitbreds Golding Variety et OB 79 WGV, un houblon américain sauvage à pollinisation ouverte mâle (ARS USDA, 2022), ou des variétés Neoplanta ou Ahil, obtenues notamment à partir de germoplasmes mâles sauvages collectés en Yougoslavie (ARS USDA, 2022).

Les variétés de houblon bénéficient de différentes protections de la propriété intellectuelle. Aux Etats-Unis, les variétés sont le plus généralement protégées par des brevets ou "Plant Patents" (PLP), des noms de marques commerciales, des droits d'obteneurs ou "Plants Breeder's Rights" (PBR), ou encore des listes nationales ou des listes de références (ARS USDA, 2022). En Europe, le houblon n'est pas une espèce inscrite au catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France (GEVES, 2022) ni *a priori* au niveau européen (EU Plant Variety Database, 2022). Les variétés françaises Aramis, Barbe rouge, Bouclier, Mistral, Triskel ont été développées à partir de croisements (Peacock 2014) et sont commercialisées par le Comptoir Agricole en partenariat avec Wye Hops Ltd. Plusieurs de ces variétés ont pour pied mère la variété ancienne alsacienne Strisselspalt. Ces variétés sont protégées au niveau européen par des droits d'obteneurs (CPVO, 2022). A terme, des possibilités pourraient exister pour des accords de production moyennant des redevances sur les ventes (Comptoir Agricole, 2022).

4. Outils analytiques d'investigation de la diversité des houblons sauvages

L'historique de la domestication du houblon, les différents challenges auxquels est confrontée la filière houblon, les outils disponibles pour l'investigation de la diversité chimique et génétique du houblon ainsi que les leviers agronomiques permettant de maximiser la production des substances recherchées en brasserie (acides α et composés volatils notamment) ont fait l'objet d'une publication dans *Phytochemistry reviews* (Facteur d'impact = 4,298).

Anne-Sophie Paguet, Ali Siah, Gabriel Lefèvre, Sevser Sahpaz and Céline Rivière. «*Agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding*». *Phytochemistry Reviews* **21**, 667-708 (2022)⁵.

Résumé de l'article :


Le houblon, *Humulus lupulus* L., est une plante grimpante dioïque dont les pieds femelles portent des inflorescences particulières, appelées cônes ou strobiles, composées d'une série de bractées membraneuses et de bractéoles. À la base de ces cônes se trouvent des trichomes glandulaires où est synthétisé un métabolome complexe constitué principalement de terpénoïdes (constituants de l'huile essentielle) et de composés phénoliques prénylés originaux. Ces derniers sont représentés par des acylphloroglucinols comprenant des acides α (humulone et ses dérivés) et des acides β (lupulone et ses dérivés), ainsi que des chalcones (xanthohumol et desméthylxanthohumol). Certains de ces composés, les terpénoïdes et les composés soufrés des huiles essentielles ainsi que les acides α , sont particulièrement recherchés par les brasseurs car ils ont un impact sur l'amertume, l'arôme, la saveur et les propriétés de conservation de la bière. Le rendement en acides amers et les performances en matière d'amertume ont guidé la sélection des cultivars jusqu'à l'apparition d'une demande de saveurs alternatives de la part des brasseurs artisanaux. Les cultivars plus aromatiques avec un caractère fruité intense sont très recherchés ces dernières années en raison de la tendance pour les bières très houblonnées et du houblonnage à sec ou *dry hopping*. Le développement de la bière artisanale est par ailleurs associé au concept de consommation locale. En outre, les consommateurs et les producteurs sont de plus en plus sensibles aux concepts de développement durable, en partie en réponse à la perception des effets du changement climatique liée aux activités humaines. Enfin, les circuits d'approvisionnement traditionnels sont également confrontés aux enjeux posés par les changements de mode de consommation et par l'émergence de nombreux petits producteurs locaux. Cette revue présente les défis actuels de la production de houblon et dresse un bilan des outils disponibles pour étudier la diversité génétique et chimique de cette plante.

Mots-clés : houblon ; *Humulus lupulus* L. ; production végétale ; génétique ; outils analytiques

⁵ Erratum : une petite erreur s'est glissée à la figure 2 de l'article pour la structure de l'humulone au niveau de sa chaîne acylée.



Agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding

A. S. Paguet · A. Siah · G. Lefèvre · S. Sahpaz · C. Rivière 



Received: 20 October 2021 / Accepted: 22 February 2022 / Published online: 31 March 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

Abstract *Humulus lupulus* L. (hop) is a dioecious climbing plant of which the females bear particular inflorescences, called hops, ‘cones’ or ‘strobiles’, made of a series of membranaceous bracts and bracteoles. At the base of these ‘cones’ occur glandular trichomes where a complex metabolome is synthesized mainly consisting of terpenoids (constituents of essential oil) and original prenylated phenolic compounds. These latter are represented by acylphloroglucinols including α -acids (humulone and its derivatives) and β -acids (lupulone and its derivatives), as well as chalcones (xanthohumol and desmethylxanthohumol). Some of these compounds, terpenoids and sulfur-containing compounds from essential oils and α -acids, are particularly sought after by brewers because they impact bitterness, aroma, flavour and storage properties of beer. Yield of α -acids and bittering performance drove selection of cultivars until demand for alternative flavour options from craft

brewers emerged. More aromatic cultivars with intense fruit-like character have been in high demand in recent years due to the trend for hoppy beers and dry hopping. Moreover, there is a tendency toward local consumption associated with craft beer. In addition, consumers and producers are understanding the concepts of sustainability, partially driven by perception of the effects of anthropogenic climate change. Finally, traditional supply chains are facing legitimate challenges from small scale local producers. This review presents the current challenges of hop production and appraises the tools available to investigate the genetic and chemical diversity of this plant.

Keywords Hop · *Humulus lupulus* L. · Crop production · Genetics · Analytical tools

Introduction

Hop is a climbing bine belonging to the genus *Humulus* in the Cannabaceae family. This botanical family includes *Cannabis sativa* L. and species from the former family Celtidaceae. The genus *Humulus* is generally recognized as including three species: *H. lupulus* L., *H. scandens* (Lourr.) Merr. (syn. *H. japonicus* Siebold & Zucc.) and *H. yunnanensis* Hu (Almaguer 2014, World Flora Online 2021). Nevertheless two species, *H. pubescens* (E. Small)

A. S. Paguet · A. Siah · G. Lefèvre ·
S. Sahpaz · C. Rivière (✉)
Joint Research Unit 1158 BioEcoAgro, Univ. Lille,
JUNIA, INRAE, Univ. Liège, UPJV, Univ. Artois,
ULCO, F-59650 Villeneuve d’Ascq, France
e-mail: celine.riviere@univ-lille.fr

Tembrock and *H. neomexicanus* (A. Nelson & Cockrell) Rydb, have been recently elevated from their former varietal rank (Tembrock et al. 2016; International Plant Name Index 2021). The main species that concerns this review is *H. lupulus* (in some cases more or less hybridized with *H. pubescens* and *H. neomexicanus*) usually named the Common hop. This plant is cultivated for its female inflorescences, also called ‘cones’, ‘strobiles’ or hops, and used by brewers.

Hops are one of the four main ingredients of beer along with water, malt and yeast. This species gradually replaced the *gruit*, a mixture of several herbs composed in particular of *Myrica gale* L., *Achillea millefolium* L., and *Rhododendron tomentosum* Harmaja, to improve taste, aroma and preservation of this beverage in Medieval times and later (Behre 1999). The antiseptic properties of hops in drinks were probably mentioned for the first time in the writings of the German abbess and herbalist Hildegard Von Bingen in the twelfth century (von Bingen and Throop 1998). Nowadays, beer is a beverage of economic importance which represented 40% of the alcoholic drinks market revenue in 2019 with 189.5 bn litres consumed (Statista 2020). Besides this consumption, plant secondary metabolites from hops, in particular prenylated phenolic compounds, also have some original biological activities, in particular estrogenic, sedative, antiproliferative, anti-inflammatory and antimicrobial properties (EMA 2014; Karabín et al. 2015, 2016; Bocquet et al. 2018a, 2018b, 2019). The multiple properties of this plant for brewing, and to a lesser extent for its health properties (Bocquet et al. 2018a), result in the cultivation of this plant in many different parts of the world.

The area devoted to hops worldwide has continued to grow at a rate of 3,000 ha/year since 2013, for a total of 62 110 ha in 2020, associated with the search for more aromatic cultivars rich in essential oils and less bitter for craft beer (IHGC 2021). This surface area remains modest, however, if we compare it to the approximately 7.5 million hectares of vines planted in the world recorded by the International Organisation of Vine and Wine (IOVW 2016). Surprisingly, the FAO for its part does not even differentiate in its calculation the hop *Humulus lupulus* from the *gesho*, *Rhamnus prinoides* L’Hér, the plant used to flavour beer in Ethiopia. As a consequence, FAO designates Ethiopia as the leading producer of “hop” (*Rhamnus*

prinoides) with 33,702 ha, ahead of the three major producers of hop (*Humulus lupulus*), the United States with 22,880 ha, Germany with 20,300 ha and the Czech Republic with 5000 ha (FAO 2019; Goettsch 1991). Global hop production ranges from 80,000 to 130,000 tonnes per year (122,003 tonnes in 2020), which corresponds to a production of 8,000 to 13,000 tonnes of α -acids per year (12,690 tonnes in 2020). The hop area under cultivation reached 62,366 ha in 2020 (Bart-Haas Report 2021). Expansion forecasts are planned for 2021 favouring the cultivation of aromatic hops (IHGC 2021).

Over the last twenty years, several publications have reviewed different aspects of hop, from in the field to its chemical composition and applications. An exhaustive review of the literature is not easy as this plant is subject to the interest of many researchers. Among the review articles, some of them have focused more specifically on its botany and its traditional uses (Korpelainen and Pietiläinen, 2021), its cultivation (Mozny et al. 2009; Turner et al 2011; Rossini et al. 2021), the biogenesis of its metabolites (Hong et al. 2021), its phytochemistry (Almaguer et al. 2014; Bocquet et al. 2018a), as well as the biological activities of its metabolites (Stevens and Page 2004; Van Cleemput et al. 2009; Zanoli and Zavatti 2008; Karabín et al. 2016; Bocquet et al. 2018b; Bolton et al. 2019; Astray et al. 2020). In a previous review article published in *Phytochemistry Reviews*, we examined the chemistry of hop and its interest for human health (Bocquet et al. 2018a). In this current review, we focused on agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding. This review article aims to underline the influence of these different parameters on the final chemical content of hops, especially on their characteristics for brewing.

Chemical characterisation of hops for variety discrimination and the brewing industry

Metabolites of hops

The primary metabolites of hops mainly consist of cellulose, lignin, water, proteins, monosaccharides, pectins, amino acids, lipids, and wax (Hough et al. 1982). However, the chemical peculiarity of hops is mainly based on its secondary metabolome, in particular by the production of original prenylated

Fig. 1 Focus on hop at different scales: hop field, hop cones, lupulin glands. **a** Hop field in the North of France (Rivière). **b** Female inflorescence of hop (Rivière). **c** Lupulin glands on a bract (Patzak et al. 2015). **d** Zoom on a lupulin gland (Patzak)

specialized metabolites. These compounds are synthesized and accumulated in the lupulin glands of the glandular trichomes located mostly at the base of the cone bracts (Fig. 1). They are mainly represented by bitter acids or acylphloroglucinol derivatives, including α - and β -acids, as well as by prenylated chalcones, including xanthohumol and desmethylxanthohumol (Fig. 2). All classes of compound have been shown to be affected by the cultivar and local environmental conditions (Bocquet et al. 2018a) and are summarized in Fig. 3.

Bitter acids are prenylated derivatives of 1-acylphloroglucinol. They can represent 10 to 20% of the dry mass of the cones, and 50 to 80% of the dry mass of the lupulin glands. A distinction is made between α -acids (derived from humulone) and β -acids (derived from lupulone), which have an additional prenylated chain compared to α -acids (Fig. 2). The α -acids can represent 2–17% of the dry weight of the hop, and depends upon sample collection and handling, genotype, environment, while β -acids are present in lower concentrations, on average between 2 and 10% of the dry weight (Van Cleemput et al. 2009). The predominance of α -acids over β -acids may have been driven by selection and horticulture. Several derivatives of humulone and lupulone were identified, including *n*-, *co*-, *post*-, *ad*-, *pre*-, *adpre*- derivatives, as well as their *cis* and *trans* stereoisomers. The length of their carbon side chain differs depending on their biosynthesis from branched chain amino acids (BCAA) (Clark et al. 2013). The biosynthesis of hop phloroglucinol derivatives is first initiated by valerophenone synthase (VPS) in glandular trichomes from acyl-CoA precursors derived from BCAA degradation intermediates and three molecules of malonyl-CoA to give phloroisovalerophenone (PIVP) (Goese et al. 1999). Then, two successive prenylations catalysed by aromatic prenyltransferases give diprenylisovalerophenone. A third prenylation leads to the synthesis of β -acids, while an oxygenation reaction leads to that of α -acids (Zuurbier et al. 1998; Tsurumaru et al. 2012). These phenolic compounds are very sensitive to oxidation during storage of hops



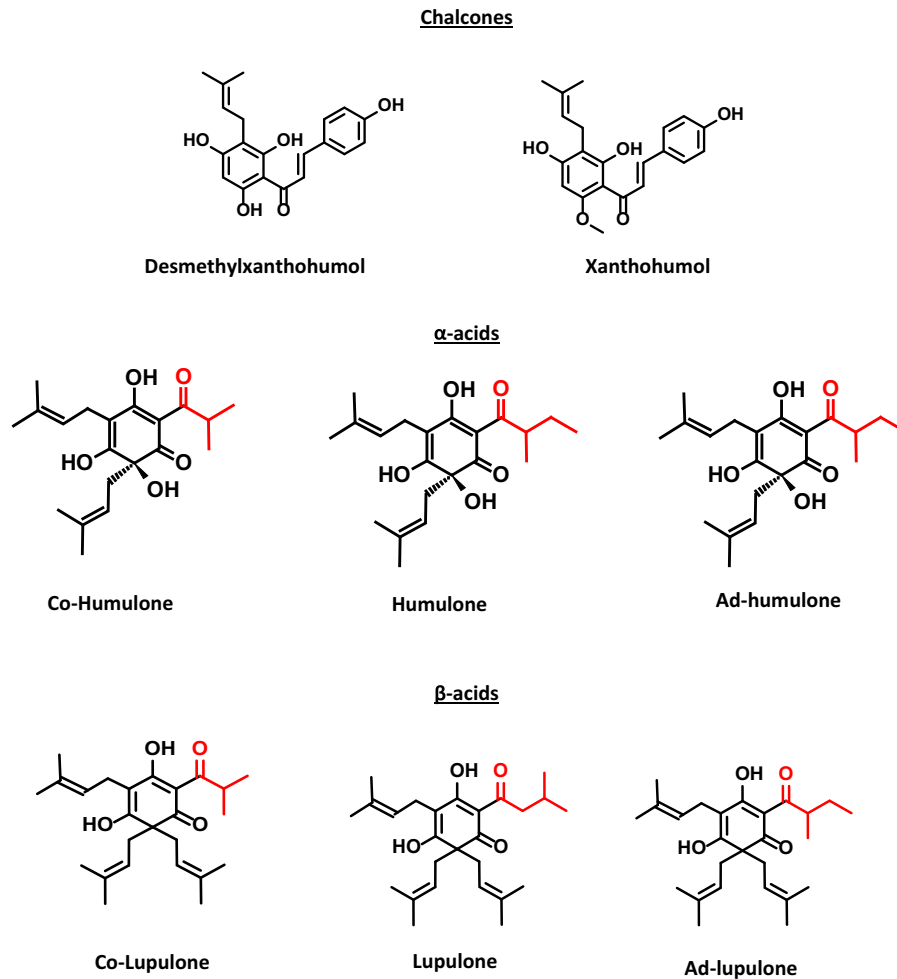


Fig. 2 Major chalcones and acylphloroglucinols produced by hops

(Taniguchi et al. 2013; Hao et al. 2020). During prolonged boiling in the wort, at elevated temperatures, the α -acids found in hop resins are isomerized into iso- α -acids, and more particularly into two diastereomeric forms, *trans*-iso- α -acids and *cis*-iso- α -acids (Fig. 4). These compounds are responsible for the bitterness of the beer, the foam stability and preservative properties. The degree of isomerization and the intensity of the bitter taste produced by the addition of hops depends especially on the type of hop and the duration the hops are boiled for (Caballero et al. 2012; Steenackers et al. 2015). This isomerization is actually initiated between 60 and 70 °C and accelerates rapidly when the temperature exceeds 60 °C (Kishimoto et al. 2021). *Trans*-iso- α -acids are more sensitive to photodegradation and radical-

assisted oxidation and can impact taste and flavour stability. β -acids are less soluble in water than α -acids, and oxidize in part into hulupones during the brewing process. These oxidation products affect, to a lesser extent, beer bitterness (Caballero et al. 2012; Steenackers et al. 2015).

Hop cones contain up to 1% of xanthohumol, and its biogenic precursor, desmethylxanthohumol, in smaller proportions, derived from the prenylation of chalconaringenin by HIPT-1 (*Humulus lupulus* prenyltransferase-1) (Fig. 2). Desmethylxanthohumol is then converted to xanthohumol by an *O*-methyltransferase (Stevens and Page 2004). Desmethylxanthohumol can be isomerized into two flavanones, (\pm)-6- and (\pm)-8-prenylaringenin, by a chalcone isomerase, while xanthohumol is easily converted to

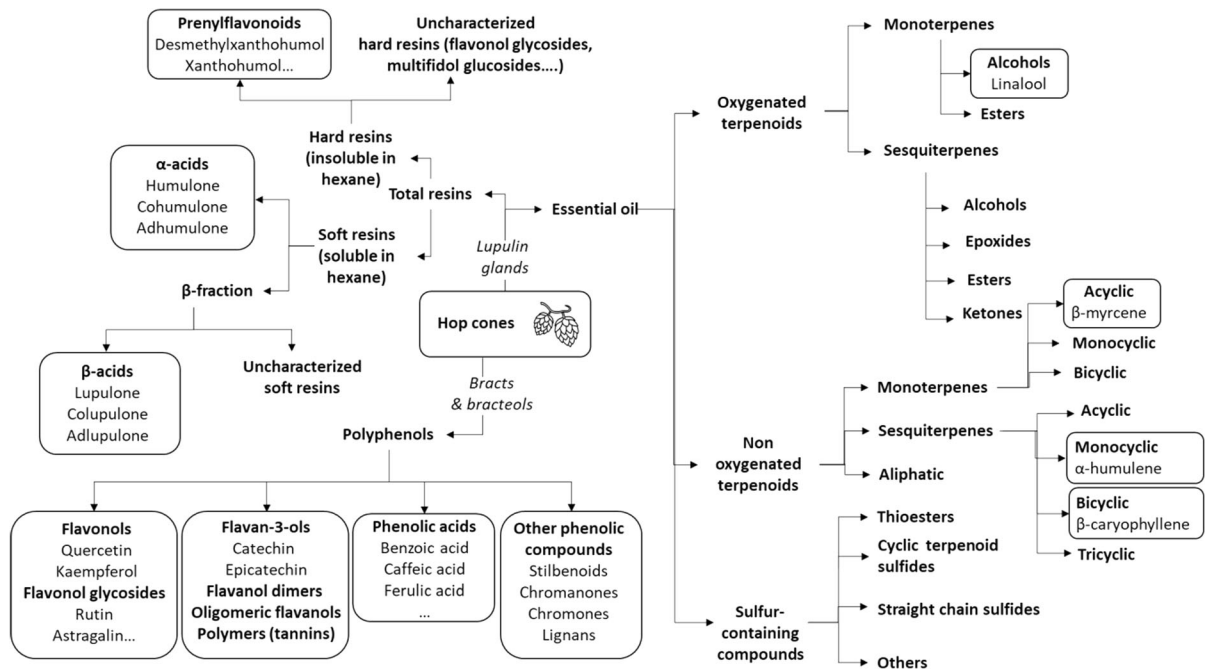


Fig. 3 Summary chart of main hops compounds (Almaguer et al. 2014; Bocquet et al. 2018a; Astray et al. 2020)

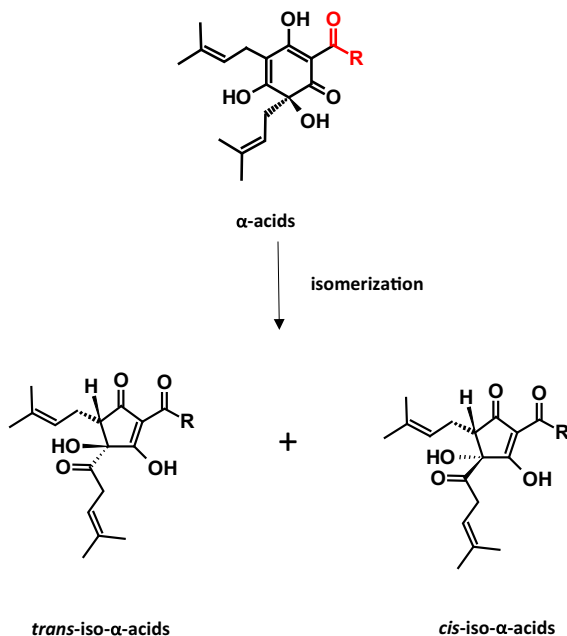


Fig. 4 Conversion of α -acids to iso- α -acids via isomerization

isoxanthohumulol, another flavanone representing 0.008% of the dry weight of the cones (Bruneton 2016). Isomerization of xanthohumol to

isoxanthohumulol has not been demonstrated in planta. Xanthohumol would cyclize to become isoxanthohumulol in basic aqueous medium (pH above 9) (Kaminski et al. 2017).

Hops also contains other more common phenolic compounds, including flavonols, flavan-3-ols, tannins, lignans, phenolic acids and stilbenoids (Fig. 3). They are also known to produce an essential oil composed mainly of non-oxygenated terpenes (Fig. 5), whose aromatic component specific to each cultivar is sought after by brewers. Some β -carboline derivatives have also been identified in cones (Tanaka et al. 2014).

Concerning aromatic hops, the analysis of the volatile fraction and in particular of the essential oil, is also necessary in order to characterize the varieties (Table 1). The essential oil of hops represents 0.5 to 3% (v/w) of the dry mass of the cone, composed mainly of the terpenes β -myrcene, α -humulene, β -caryophyllene and β -farnesene (Van Cleemput et al. 2009). Their biosynthesis also takes place, at least in part, in lupulin glands where they are stocked afterwards (Patzak et al. 2015; Ramírez and Viveros 2021). This yield can vary subject to various factors: variety, growing conditions, stage of maturity of the cone at harvest, drying and storage conditions (Schönberger

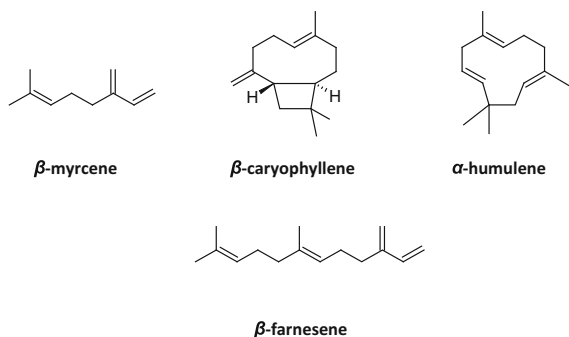


Fig. 5 Major terpenoids in hops essential oils

and Kostelecky 2011). Santagostini et al. (2020) identified peltate trichomes as the main sites of terpene production and accumulation. The essential oil of hops is rich in monoterpenes (β -myrcene, up to 57.9%) and non-oxygenated sesquiterpenes, in particular α -humulene and β -caryophyllene (Fig. 5). However, some sesquiterpenes can be considered as chemical markers for cultivars, such as β -farnesene, α - β - and δ -selinene or α - β - and δ - eudesmol (Peacock and McCarty 1992). Some alcohol-functional terpenes are important for the determination of beer aromas. In particular, (*R*)-(-)-linalool is considered to be the active flavour of beer and confers on it its floral character (Almaguer et al. 2014). Many other volatile compounds have been identified in the essential oil of different cultivars of hops (Bocquet et al. 2018a).

Due to the original chemical composition of hops, mainly characterized by prenylated phenolic compounds, and the composition of its essential oil, several biological properties were reported including sedative, estrogenic, antimicrobial, anti-inflammatory, antiproliferative and cancer-related bioactivities. Some studies also suggest health-protective effects against cardiovascular diseases and type-2 diabetes. For a recent and complete overview of the chemical composition, bioactivities, and biotechnology of hops, see Bocquet et al. 2018a.

Identification and quantification of prenylated phenolic compounds

The percentage of α -acids varies subject to, among other factors, the type of cultivar, the growing conditions, the drying methods and the climate. Because of this, the quality and quantity of α -acids

have an impact on the taste of beer and in particular its bitterness. Aromatic and bitter hop varieties can be differentiated by their content in α -acids. It is therefore essential to be able to quantify these substances in the hops and to follow the formation of iso- α -acids during brewing (Caballero et al. 2012; Steenackers et al. 2015). The quantity of hops used for craft brewing is determined depending on the α -acids content of the hops, expressed with the AAU (Alpha Acid Units) or Homebrew Bittering Units (HBUs). The calculation of this unit takes the weight of hops (in ounces) multiplied by the percentage of α -acids (Palmer 2006). Another way to estimate the perceived bitterness is International Bittering Units (IBUs), which is an estimation based on the concentration of the iso- α -acids formed by isomerization. This unit is calculated depending on the weight of hops added; the percent (weight/weight) of α -acids and the length of time the mixture has been left to boil (Schindler et al. 2019; Kishimoto et al. 2021). Some alternative methodologies can sometimes be developed for assessing beer bitterness using the IBU scale, such as the low-cost fluorescence based method (Calado et al. 2019). In the USA, the main technique used to determine the quality of commercial hops and their storage conditions is based on spectrophotometric analysis, which is a very simple, rapid and accurate method. This analytical procedure by spectrophotometry is published by the American Society of Brewing Chemists (2007) and is based on the fact that bitter acids do not absorb at the same wavelength as their oxidation products. This spectrophotometric quantification provides the HSI (Hop Storage Index), calculated as the ratio of the absorbance of an alkaline methanol extract at 275 nm (maximum absorbance of oxidized compounds) and 325 nm (maximum absorbance of bitter acids). An HSI (A275/A325) between 0.28 and 0.31 indicates a fresh hop (average value for all varieties). Above 0.69, hops are considered old, with oxidized α - and β -acids. Hence, the HSI is an important indicator of the degradation of α - and β -acids during storage and thus allows you to assess the quality of hops for brewers (Likens et al. 1970; Nickerson and Likens 1979; Srećec et al. 2008).

However, several studies are focused on the characterization of hop crude extracts by a more precise quantification of their major metabolites (chalcones, α - and β -acids) by hyphenated techniques, in particular HPLC or UHPLC coupled to UV

Table 1 Summary of the characteristics of the most representative commercial hop varieties (inspired from HopList[®] and Bart-Haas Report 2021)

Hop variety	Usage	Origin	Main area of cultivation	Chemical characteristics						
				Alpha	Beta	Coh	Myr	Car	Far	Hum
Agnus	Bittering & aroma	Czech republic	Czech republic	40–55	4–6.5	4–6.5	40–55	8–10	0.01	15–20
Amarillo	Aroma	United States	Germany (Hallertau), United States (Washington, Idaho)	8–11	6–7	21–24	68–70	2–4	2–4	9–11
Apollo TM	Bittering	United States	United States (Washington)	15–20	5.5–8	23–28	30–50	14–20	1	20–35
Aramis	Aroma	France	France	7.9–8.3	3.8–4.5	U	40	7.4	2–4	21
Aurora	Bittering & aroma	Slovenia	Slovenia	7–12	2.7–5	22–26	51	5–9	5–10	17–25
Azacca [®]	Bittering & aroma	United States	United States (Washington)	14–16	4–5.5	38–45	46–55	8–12	< 1	14–18
Bobek	Bittering & aroma	Slovenia	Slovenia	3.5–9.3	4–6.6	26–31	30–63	12–19	3–7	12–19
Bravo TM	Bittering	United States	United States	14–27	3–5	29–34	25–50	10–12	0–1	18–20
Brewers Gold	Bittering	United Kingdom	Germany	9.3	4.8	39.5	66.7	6.5	0.1	11.3
Cascade	Aroma	United States	Germany, Australia (Tasmania), United States (Washington, Oregon)	4.5–8.9	3.6–7.5	33–40	45–60	4–6	4–8	8–16
Cashmere	Bittering & aroma	United States	United States (Washington)	7–9.1	3.3–7.1	22–24	39–42	12–13	1	26–29
Celeia	Aroma	Slovenia	Slovenia	5–6	3–4	25	49.5	7.2	5.6	17.6
Centennial	Bittering & aroma	United States	United States (Washington, Oregon)	9.5–11.5	3.5–4.5	28–30	45–55	5–8	0–1	10–18
Challenger	Bittering & aroma	United Kingdom	United Kingdom	6.5–9	3.2–4.5	20–25	30–42	8–10	1–3	25–32
Chinook	Bittering	United States	United States (Washington, Idaho)	12–14	3–4	29–34	35–40	9–11	0–1	18–25
Citra [®]	Bittering & aroma	United States	United States (Washington, Idaho, Oregon)	10–15	3–4.5	20–35	60–70	5–8	1	7–12
Cluster	Bittering & aroma	United States	Australia, United States (Washington)	5.5–9	4–6	36–42	38–55	6–10	1	15–20
Columbus- Tomahawk- Zeus (CTZ)	Bittering	United States	United States (Washington, Idaho)	13–17.5	4.5–6.5	30–40	45–55	5–10	< 1	9–14
Comet	Bittering & aroma	United States	Germany, United States (Washington)	9.4–12.4	3–6.1	41	67	10	0.1	1
El Dorado [®]	Bittering & aroma	United States	United States (Washington, Idaho)	13–17	7–8	28–33	55–60	6–8	0.1	10–15
Ella TM	Aroma	Australia	Australia (Victoria, Tasmania)	13.3–16.3	4.8–7.8	34–38	4.5	12–18	0–1	16–22

Table 1 continued

Hop variety	Usage	Origin	Main area of cultivation	Chemical characteristics						
				Alpha	Beta	Coh	Myr	Car	Far	Hum
Eureka™	Bittering & aroma	United States	United States	18–19	5–6	27	43	0.2	U	29.8
First Gold	Bittering & aroma	United Kingdom	United Kingdom	5.6–9.3	2.3–4.1	31–36	24–28	6–7	2–4	20–24
Fuggle	Aroma	United Kingdom	France, United Kingdom	5	2.5	26.9	43.4	9.1	4.3	26.6
Galaxy	Bittering & aroma	Australia	Australia (Victoria, Tasmania)	11–16	5–6.9	32–42	33–67	7–9	2–4	1–2
Galena	Aroma	United States	United States	12	7.5	39	55–60	3–6	0–1	10–15
Golden star	Aroma	Japan	Japan	5.5	4.5	50.2	53.6	5.7	U	13.6
Golding	Aroma	United Kingdom	United Kingdom	4–6	2–3	20–29	25–42	9–16	1	27–45
Hallertau Blanc	Aroma	Germany	Germany (Hallertau)	9–12	4.5–6	22–26	50–75	0–2	0–3.5	0–3
Hallertau Magnum	Bitter	Germany	Germany (Elbe-Saale, Hallertau)	12–14	4.5–5.5	24–25	30–35	8–12	0.1	34–40
Hallertau Taurus	Bittering & aroma	Germany	Germany (Hallertau)	12.3–17.9	4–6	23–25	30	8	0–1	30–31
Hallertau Tradition	Aroma	Germany	Germany (Hallertau)	4.6–7	4–5	23–29	20–25	10–15	0–1	40–55
Herkules	Bittering & aroma	Germany	Germany (Tettngang, Elbe-Saale, Hallertau)	12–17	4–5.5	32–38	30–50	7–12	1	28–45
Hersbruck Spaet	Aroma	Germany	Germany (Hallertau)	2–5	4–6	19–25	10–25	7–15	0–1	15–35
Huell Melon	Aroma	Germany	Germany (Hallertau)	6.9–7.5	7.3–7.9	25–30	36	5–10	< 1	10–20
Lubelski	Aroma	Poland	Poland	3–5	2.5–4	25–28	22–35	6–11	10–14	30–40
Mandarina Bavaria	Aroma	Germany	Germany (Hallertau)	8.5–10.5	5–6.5	33	70	2	1	5
Marynka	Bittering & aroma	Poland	Poland	9–12	10.2–13	26–33	28–31	10–13	1.8–2.2	33–36
Mosaic®	Bittering & aroma	United States	United States (Washington, Idaho, Oregon)	11.5–13.5	11.5–13.5	24–26	47–53	5–8	0	13–16
Nelson Sauvvin	Bittering & aroma	New Zealand	New Zealand	12–13	6–8	24	22	10.7	10.7	36.4
Northern Brewer	Bittering	United Kingdom	Germany (Elbe-Saale)	7–10	3.5–5	27–33	25–45	10–20	< 1	35–50
Nugget	Aroma	United States	Germany (Hallertau), United States (Oregon)	9.5–14	4.2–5.8	22–30	48–59	7–10	0–1	12–22
Olympic	Bittering	United States	United States	10.6–13.8	3.8–6.1	31.1	40.8	12	0.9	12.2
Opal	Bittering & aroma	Germany	Germany (Hallertau)	13–14	3.5–5.5	28–34	30–45	9–10	0–1	20–25
Perle	Aroma	Germany	Germany (Elbe-Saale)	10.0	3.9	27.7	43.0	11.7	0.1	29.3
Pilgrim	Bittering & aroma	United Kingdom	England	9–13	4.2–5.2	36–38	36	7	0.3	17

Table 1 continued

Hop variety	Usage	Origin	Main area of cultivation	Chemical characteristics						
				Alpha	Beta	Coh	Myr	Car	Far	Hum
Polaris	Bittering & aroma	Germany	Germany (Elbe-Saale, Hallertau)	18–23	4.5–6	22–28	50	8–13	1	20–35
Premiant	Aroma	Czech Republic	Czech Republic	8–12.5	4.5–8	22–23	25–50	7–13	1–1.5	25–35
Pride of Ringwood	Bittering	Australia	Australia (Victoria, Tasmania)	7–11	4–8	33–39	25–53	5–10	1	2–8
Progress	Aroma	United Kingdom	United Kingdom	6–7.5	2–3.3	25–34	24–33.5	10.6–14	1	36–47
Saaz	Aroma	Czech republic	Czech Republic, Germany (Elbe-Saale)	2.5–4.5	4–6	23–28	25–40	6–9	14–20	15–30
Saphir	Aroma	Germany	Germany (Hallertau)	2–4.5	4–7	12–17	25–40	9–14	< 1	20–30
Savinjski Golding	Aroma	Slovenia	France (Alsace), Slovenia	2.8–6	2–3	25–30	27–33	9–11	2–5	34–38
Simcoe®	Bittering & aroma	United States	United States (Washington, Idaho, Oregon)	12–14	4–5	15–20	60–65	5–8	0–1	10–15
Sládek	Aroma	Czech Republic	Czech Republic	4.5–8	4–7	23–30	35–50	9–14	1	20–40
Southern brewer	Aroma	South Africa	South Africa	9.6	4.2	39.7	46	5.6	11.9	19.6
Spalt	Aroma	Germany	Germany (Spalt)	2.5–5.7	3–5	22–29	20–35	8–13	12–18	20–30
Spalter Select	Aroma	Germany	Germany	3–6.5	2–5	20–28	40–50	6–8	10–15	15–20
Strissepalt	Aroma	France	France (Alsace)	4.7	3.2	27.4	47.4	10.7	0.1	24.6
Summit™	Bittering	United States	United States	16–18	3.3–4.3	26–33	30–50	10–16	0–1	15–25
Super Pride	Bittering	Australia	Australia (Victoria, Tasmania)	13.5–15	6.4–6.9	26.8–28	19–34	5–8	0–1	1–2
Tardif de Bourgogne	Aroma	France	France	4.5	4.9	19.9	40.3	5.8	U	14.1
Target	Bittering & aroma	United Kingdom	Germany, United Kingdom	8–12.5	5–5.5	29–35	17–22	0–1	0–1	8–10
Tettnang	Bittering & aroma	Germany	Germany (Tettnang)	3–5.8	2.8–5.3	24	40.6	6.2	11.3	20.4
Topaz™	Bittering & aroma	Australia	Australia (Victoria)	13.7–17.7	6.4–7.9	48–51	34–56	7–13	1	8–13
Triskel	Aroma	France	France (Alsace)	8–9	4–4.7	20–23	60	6.1	1	13.5
Vic Secret™	Bittering & aroma	Australia	Australia (Victoria)	14–17	6.7–7.8	51–56	38–41	11–15	0–1	12–21
Willamette	Aroma	United States	United States (Oregon)	4–6	3–4	30–35	30–55	7–8	5–6	20–30

Alpha = alpha-acids (%); Beta = beta-acids (%); CoH = cohumulone (%); Myr = β -myrcene (%); Car = β -caryophyllene (%); Far = β -farnesene (%); Hum = α -humulene

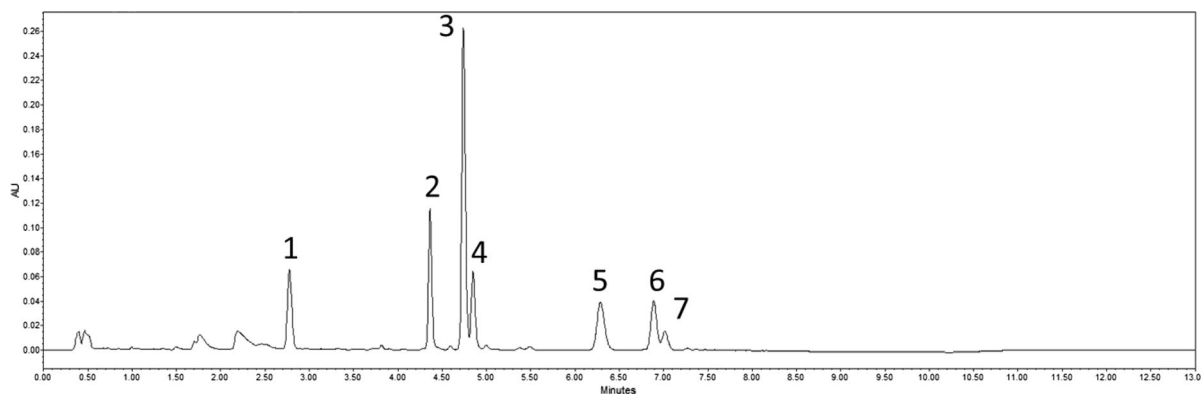


Fig. 6 HPLC chromatogram at 330 nm of a hydro-ethanolic extract of hops. 1 = Xanthohumol; 2 = Cohumulone; 3 = Humulone; 4 = Adlupulone; 5 = Colupulone; 6 = Lupulone; 7 = Adlupulone

detection (Fig. 6). Surprisingly, even if the LC–MS/MS is more sensitive and selective, the UV remains the most prevalent detection for the quantification of phenolic compounds in hop extracts, beer or biological samples (Dhooghe et al. 2010; Nikolić and van Breemen 2013; Prencipe et al. 2014; Schindler et al. 2019; Vázquez Loureiro et al. 2019). Analytical method validation can be performed using EMA (EMA 2011) or ICH (ICH 2005) guidelines. In recent years, however, some teams have developed quantification methods by means of LC–MS/MS operating in the multiple reaction monitoring (MRM) mode (Intelmann et al. 2009; Rodda et al. 2013; Cortese et al. 2020). Different studies also underlined the application of nuclear magnetic resonance, in combination with analytical tools, for the detection and quantification of prenylflavonoids and bitter acids in hop crude extracts (Hoek et al. 2001, Farag et al 2012, Killeen et al. 2017, Bertelli et al 2018). NMR methods, combined in some cases with chemometric tools, are also useful for beer characterization and quality control (Duarte et al 2002; Lachenmeier et al 2004; Da Silva et al 2019; Palmioli et al 2020; Cavallini et al 2021). NMR techniques have been used for many years to identify these different phenolic compounds (Alderweireldt and Verzele 1964, Molyneux and Wong 1975). An important point to note during NMR analyses is the observation of a solvent-dependent keto-enol tautomerism, in particular for β -acids. In non-polar solvents, such as chlorinated solvents, a major tautomer in a 70:30 ratio predominates, whereas a single tautomer predominates in polar solvents such as methanol or DMSO (Tyrrell et al 2010; Decuyper

et al 2020). Other spectroscopic methods, coupled with chemometrics, have also been developed and have been shown to be very competitive in comparison with other techniques. Vibrational spectroscopies, including infrared (IR), near-infrared (NIR), and Raman spectroscopy, allowed the characterization of the composition of hop powder in bitter acids and xanthohumol, but also to discriminate beers and to determine beer quality (Li et al 2009; Giovenzana et al 2014; Killeen et al 2014, Killeen et al. 2017). These qualitative and quantitative analyses pursue different goals: (i) to characterize the chemical profile of commercial varieties (Prencipe et al. 2014; Santagostini et al. 2020); (ii) to follow the biosynthesis of phenolic compounds in hops during plant growth (De Keukeleire et al. 2003) (iii) to follow the evolution of phenolic compounds in beer (Cortese et al. 2020); (iv) to follow the presence of some phenolic compounds and derivatives in biological matrices (Rodda et al. 2013); (v) to investigate the diversity of wild hops (Patzak et al. 2010; Prencipe et al. 2014; McCallum et al. 2019); (iv) to compare wild hops with commercial cultivars (Mongelli et al. 2016). These latter studies relating to the investigation of the chemical diversity of wild hops have underlined the interest of wild germplasm resources for cultivar development.

Volatile compounds analysis

Several publications dealing with the analysis of volatile compounds of hops carry on the essential oil, obtained by steam distillation (Mongelli et al. 2016; Santagostini et al. 2020; Dabbous-Wach et al. 2021) or

by supercritical CO₂ extraction (Dzingelevičius et al. 2011; Dietz et al. 2020). The yield of the hop essential oil obtained by hydrodistillation varies between 3 and 10 ml per kilo of dry biomass. The analysis of the essential oil is classically realized by gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (MS). However, hydrodistillation provides very low yields, 6.3 mL per kg of dry cones according to Bocquet et al. (2018a) and this method requires large amounts of raw materials, as well as a long time of extract preparation. As a result, other methods for the analysis of volatile compounds can be considered, and in particular the headspace solid phase microextraction (HS-SPME). This preconcentration method is non-destructive and does not require any sample preparation. Volatile compounds are adsorbed on a polymeric phase fibre, then they are thermally desorbed on GC and the fibre is regenerated. The SPME is called HS (headspace) if the sorption of the volatile compounds is performed in the head-space above the sample volatilized by heating (Papet et al. 2010). The combination of SPME with GC–MS is a powerful tool with great sensitivity and is increasingly used for establishing metabolomic fingerprints of hops. This method requires between 0.5 g of grounded samples (Martins et al. 2020) and 2 g (Liu et al. 2018), and is hence a way to study the volatile fingerprinting even for small amounts of hops. A wide range of volatile compounds can be identified. For instance, 84 compounds were identified in three Chinese hop varieties (Liu et al. 2018) and 109 compounds in 71 Portuguese native varieties and 33 commercial cultivars (Martins et al. 2020). Some other dynamic headspace techniques, such as in-tube extraction gas-chromatography-mass spectrometry (ITEX-GC–MS), can also be employed (Salañá et al. 2016). Stir-bar sorptive extraction method coupled to GC-MS can be also employed for flavor profiling of beers (Cucu et al. 2021).

Some of these studies dealing with the analysis of volatile compounds are coupled with sensory properties (Dietz et al. 2020; Martins et al. 2020). In this case, an olfactometry detection can be coupled with gas chromatography analysis (Su and Yin 2021), in order to correlate the chemotypes with aroma profiles. GC–MS can also be applied to the analysis of fatty acids after derivatization. A bioguided fractionation process by GC–MS allowed the identification of unsaturated fats oleic and linoleic acids in hops with antimicrobial properties (Stavri et al. 2004).

Hop taxonomy

In 1978, Small described the lack of research on the classification of the genus *Humulus* despite the economic importance of this plant at the global level. In his article, the first real in-depth reference work, he was able to conduct a numerical and nomenclatural analysis of the “geo-morphological” taxa *Humulus*. He was able to propose a classification, while announcing that subsequent studies in chemistry and cytology would clarify it later (Small 1978). Yet the taxonomy of the genus *Humulus* is still debated today. Boutain, who published an in-depth molecular study of the genus in 2014, concluded his PhD with a recommendation for additional research to better understand the relationships at the varietal level (Boutain 2014). However, if we refer to the World Flora Online (WFO) website, an international consortium of reference botanical institutions, the genus *Humulus* includes three species: *H. lupulus* L., *H. scandens* (Lour.) Merr., *H. yunnanensis* Hu (World Flora Online 2021). According to WFO, *H. lupulus* L. is a synonym of *H. lupulus* var. *lupulus*, but also of *H. cordifolius* Miq. The species *H. lupulus* L. includes two varieties: *H. lupulus* var. *lupuloides* E. Small as well as *H. lupulus* var. *neomexicanus* A. Nelson & Cockerell. The variety *H. lupulus* var. *lupuloides* E. Small is considered synonymous with *H. americanus* Nutt., as well as *H. lupulus* subsp. *americanus* (Nutt.) Á. Löve & D. Löve.

On the other hand, if we refer to the Plants of the World Online site (another reference site created by the Royal Botanical Gardens Kew, member of the WFO consortium), seven species of *Humulus* are accepted: *H. americanus* Nutt., *H. cordifolius* Miq., *H. lupulus* L., *H. neomexicanus* (A. Nelson & Cockerell) Rydb., *H. pubescens* (E. Small) Tembrock, *H. scandens* (Lour.) Merr. and *H. yunnanensis* Hu. (Plants of the World Online 2021). In 2016, Tembrock et al. recommended the recognition of three new species of *Humulus*: *H. lupuloides* (E. Small) Tembrock, *H. neomexicanus* (A. Nelson & Cockerell) Rydb. and *H. pubescens* (E. Small) Tembrock. He proposed to elevate these three new species from their position as varieties (*H. lupulus* var. *lupuloides* E. Small, *H. lupulus* var. *neomexicanus* A. Nelson & Cockerell, *H. lupulus* var. *pubescens* E. Small). Two of his propositions, *H. neomexicanus* and *H. pubescens* were recently accepted by IPNI (International Plant Name

Index 2021). Furthermore, for IPNI, the new combination *H. lupuloides* based on *H. lupulus* var. *lupuloides* Small, if it can be considered as legitimate, is superfluous, because *H. americanus* Nutt. has been included as a synonym. Indeed, if Tembrock notices that the species *Humulus americanus* Nutt. is not viable, because Nuttall designated all the American species by this name, he includes *Humulus americanus* Nutt. as a synonym, and therefore make the new species superfluous.

Regardless of these taxonomic discussions, Neve in 1991 reports that all forms of hops used for cone production are interfertile and that most professionals in the sector do not separate them. Thus, we see that workers do not necessarily attach importance to the delineation of species as defined by taxonomists.

This interfertility between wild and cultivated hops led Ernest Salmon to initiate a hybridization program at the start of the twentieth century. This very famous hybridization program produced important varieties for the profession. For example, the commercial variety Brewer's Gold was developed from seed collected in 1919 from an open pollination between a wild Manitoba hop with an unknown English male. Salmon warned, however, about the difficulty of this type of varietal selection, which he described as a long and painful road (Salmon et al. 1943).

Sometimes, the variety being exploited is the direct result of discoveries of fortuitous hybridizations with wild hops, as is the case of the hop plant named "VGXP01" marketed under the brand name Amarillo TM. It was raised by Virgil Gamache Farms in the Yakima Valley and was patented in 2003 (Gamache et al. 2003). As the patent states: "This invention relates to a new and distinct variety of hop plant, and more particularly to a new hop plant variety which was asexually reproduced from a hop plant of unknown origin discovered in a cultivated hop field in Toppenish, Was. " The patent goes on to explain how the peculiar characteristics of this plant led the grower to file this patent to protect the exploitation of this plant.

More recently, there have also been rare cases of research programs interested in selecting a commercial variety based solely on wild hops. This is the case with the brand name Medusa TM, which is the result of selection only on *H. neomexicanus*, this wild drought-resistant hop native to southwestern North America. This hop is produced exclusively by CLS farms (Medusa 2021).

This research into the agronomic potential of the gene pool of the genus *Humulus* even exists for a species considered to be quite distinct. Thus, Neve said about *Humulus yunnanensis* Hu that it would have potential as a crossbreeding material to extend the growing area of hops since it grows at lower latitudes than other members of the genus. In contrast, this author considers *Humulus scandens* (Lour.) Merr. to be irrelevant from a brewing point of view, as its cones mature sequentially and do not have lupulin glands. Also, the plant, while sometimes used as an ornamental, is an aggressive weed that escapes easily and is naturalized easily (Small 1978). In addition, the USDA considers it an invasive plant making the issue of hybridization problematic (USDA 2021).

In conclusion, assessment and exploitation of the genetic diversity of wild hops has been patchy, which to some extent may be linked to the inconclusive classification of the genus.

Genetic and genomic resources for hop breeding

History of hop domestication

Phylogenetic studies suggest that hop is native to China. Analyses of ribosomal DNA and non-coding regions of chloroplast DNA showed that wild hops belong to two clades: European hop (from Portugal to Altai) characterized by a low diversity, suggesting their recent introduction; and Asian and North American hops characterized by a high diversity (Neve 1991; Murakami et al. 2006). Few traces of hop cultivation were recorded before the Middle Ages. While originally harvested from specimens in the wild, their cultivation began in Germany in the ninth century; hops were used in breweries from this period onwards and then hop growing became organized. The true varietal selection of hops started in the twentieth century. Before this period, hops with good adaptability to a terroir were empirically selected and propagated by rootstock or the cutting of underground stems (Darby 2005). Consequently, some hops were identified depending on their growing location, such as Saaz (from the Saaz region in the Czech Republic), or Hallertau and Tettang (from Germany); other hops were also obtained by natural clonal changes, and so named in reference to their grower, for example Golding (after Mr Golding), or Fuggle (after Mr

Fuggle). As a result, by the beginning of the nineteenth century, more than 20 varieties were known in England (Darby 2005). As mentioned previously in the Taxonomy section, breeding efforts to improve hop varieties and to adapt them to agronomic stakes were initiated by the Wye College programme started by Salmon in 1906. The aim was to improve hop resistance to pests and diseases, local conditions and to the various needs of the brewing industry (search for more or less bitter hops, also allowing a better preservation of the beers). This programme used in particular wild North American hops in its breeding programme, because of their high content in α -acids. Other breeding programmes were also initiated in different parts of the world, such as the United States, Denmark, Japan... the Huell programme in 1926 aimed to improve the resistance of hops against serious downy mildew infections threatening German hop production (Darby 2005; Seigner et al. 2009). These programmes were particularly efficient, especially concerning hops α -acid content, while hops failed to reach 4% of α -acid in the 1900's, by the end of the century, varieties producing more than 16–18% were available. Of particular note were Brewer's Gold (released in 1934), Bullion (1938) and Northern Brewer (1944), a seedling produced from Golding and a male derived from the 'American' line. These three varieties bred by Salmon were used as the starting point for all high α breeding programs around the world and there have only been two bitter-type varieties that do not include one of Salmon's varieties in their immediate or close family (Darby 2005). In parallel, Oregon and Washington State University programs have produced other successful α varieties: Nugget (1983), Olympic (1983), and Chinook (1985) (Darby 2005). Concerning aromatic varieties, for a long time the traditional varieties continued to be used, but because of their elongated shape, they were not suited to mechanization (Darby 2005). Since the second half of the twentieth century, varietal improvement has relied mainly on the development and the use of genetic markers to maximize the rapidity and efficiency of the crosses (Townsend and Henning 2005). Modern hop cultivars are derived from hybridization, which eliminated any genetic variability in hop cultivars; that is why wild germplasm are being investigated to provide new genetic resources for breeding, in order to overcome this limited genetic variation in modern hop breeding programs (Peredo

et al. 2010; Patzak et al. 2010; Rodolfi et al. 2018; Mafakheri et al. 2020). According to the IHGC (2021), 291 varieties were produced in 2020 (excluding experimental ones and no-named records), including 69 labelled as bitter hops and 222 aroma hops. Nowadays, the hop selection is still focused on their gustative, aroma, and bitterness qualities, but above all for their agronomic characteristics (resistance to pests and diseases, yields, and adaptation to climate change) along with their suitability for the terroir (Murakami et al. 2006; Seigner et al. 2009; Mongelli et al. 2016). The international union for the protection of new varieties of plants publishes guidelines to performing tests for distinctness, uniformity, and stability, in particular to identify the characteristics of hop plants and to harmonize variety descriptions (UPOV 2006). The work of Guimarães et al. (2021) aimed to study the different aspects of the intellectual property of hops and the modalities of registration of hop cultivars according to the legislation of different countries. The registration process adopted by many countries that follow the UPOV test is essentially about botanical data. Surprisingly, it rarely concerns chemical data except in a few countries such as the USA. The registration may also deal with resistance to pests and diseases, yield, and possible genetic modification. After registration following the UPOV test, hop varieties are thus generally protected by plant breeders' rights, as is the case in Europe with Community Plant Variety Rights (CPVO 2022). This plant variety protection avoids the illegal propagation of the breeding, although genes are free for any other variety creation. Surprisingly, *Humulus lupulus* is not a species listed in the official catalogue of species and varieties at European level (EU Plant Variety Database 2021). In the USA new hop varieties are protected under a Plant Patent that protects their genome, and thus their breeding, for the time of the patent as highlighted by Guimarães. On the contrary, Trademarks are also used but are only linked to the ownership of the name registered, they do not protect the plant's genome.

Hop growers are looking first and foremost for hops with good chemical qualities for brewing, and therefore for high concentration in bitter acids, especially colupulone, but also hops suitable for the local terroir with good yields (Henning and Townsend 2005). Hence, *H. pubescens* and *H. neomexicanus* are wild genotypes used in breeding programs because of their

characteristics of adaptability and productivity conferred upon the newly obtained cultivars destined for dry and warm environments. The adoption of these new varieties therefore seems to suggest the possibility of expanding hop cultivation to semi-arid and warm-arid environments (Carr 2017). In addition, metabolomic studies have been able to demonstrate that *Humulus neomexicanus* has significantly higher bitter acid, prenylflavonoid, and flavonol glycoside levels in its leaves, which may confer greater resistance to pathogens and insect pests (Morcol et al. 2021).

Besides traditional crossbreeding methods of varietal improvement, other methods can be considered, for instance polyploidy (Trojak-Goluch and Skomra 2018) or genetic modifications, transforming hops with particle bombardment (Batista et al. 2008).

Hop structural genetics

The European hop (*Humulus lupulus*) is a diploid organism ($2x = 18 + XY$) with nine autosomal bivalent chromosomes and two sex chromosomes, XX in female plants and XY in male plants, where the Y chromosome is shorter than the X chromosome (Winge 1929; Parker and Clark 1991). Visualization of the 20 hop chromosomes was performed by fluorescence in situ hybridization (FISH) staining, allowing their identification by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining and a construction of the hop karyotype (Karlov et al. 2003). Cytogenetic analyses revealed atypical and non-disomic meiotic configurations such as crossovers (Zhang et al. 2017), while other studies highlighted the tendency for sex chromosomes to be involved in quadrivalent or multiple associations (Sinotô 1929; Winge 1929). The size of the hop genome was estimated to about 2799 pg (Grabowska-Joachimciak et al. 2006). Illumina sequencing and contiguous assembly allowed the estimation of the total length of the hop genome to 2.05 Gb, with 34.7% of repeated sequences (Natsume et al. 2015; Padgitt-Cobb et al. 2021).

Compared to other crops, there have been few genetic and genomic resources for hop until recently. It remains a plant for which we have little knowledge of the genetic bases of its agronomic traits such as disease resistance and yields, as well as quality and quantity of aroma and the differences in bitterness among hop varieties (Winge 1929; Neve 1991;

Haunold 1991; Shephard et al. 2000). This is mainly due to its dioecism and obligate outcrossing, high degree of heterozygosity, large genome size, and a poorly understood sex-determination system, constituting the main obstacles for studying hop genome (Neve 1958; Natsume et al. 2015). Natsume et al. (2015) reported the draft genomes of two hop cultivars: Shinshu Wase, a Japanese cultivar and Saazer, a European cultivar built by assembly of genomic DNA scaffolds. The authors identified hence at least 41,228 putative protein-encoding genes. Thanks to Hill et al. (2017), hop genomes of cultivars Cascade, Teamaker and Shinshu Wase are currently available in a single resource accessible to researchers and hop breeders, on the HopBase database (www.hopbase.org). The TrichOME database (www.plantrichome.org) integrates a wealth of omics data, including expressed sequence tag (EST) sequences, as well as mass-based metabolic profiles, and trichome-associated genes from different trichome plants including hops (Dai et al. 2010). However, Zhang et al. (2017) regret the limited number of specific hop genetics resources and a “normal” reference genome, specifically with targeted resequencing and a map of the consensus genomic regions would be very useful for understanding structural differences arising from rearrangement events. To improve the hop genotyping in breeding programs, in silico screening of primers may avoid regions with the tendency to segregation distortion.

Marker-assisted selection

To characterize hop diversity, biochemical profiling may be used, but biochemical characteristics could be greatly affected by environmental factors such as the locality or harvest year (Kenny 1990; Henning et al. 2004; Krofta 2011). DNA-based markers successfully eliminate the influence of environmental and epigenetic factors and provide objective information on the targeted cultivar.

Several early studies focused on the genetic analysis of hop genotypes by using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Seefelder et al. (2000a) analysed 90 hop cultivars of various origins and used AFLP markers to determine their phylogenetic relationships and to identify clusters. European hops were identified as aromatic, whereas American hops appear to be more bitter. AFLPs were also used

for hop breeding purposes to obtain cultivars resistant to mildew (Seigner et al. 2009). On the other hand, random amplified polymorphic DNA (RAPD) was also used in hop genetics, to rapidly identify for instance the sex of the plant. Thirty-two primers have been identified as Y-chromosome specific, allowing the determination of the sex of hops derived from sexual reproduction (Polley et al. 1997) and the building of genetic maps between male and female hops (Seefelder et al. 2000b). RAPD markers were also performed for hop genetic profiling. These markers were used for instance to assess the genetic relationship within 65 genotypes of cultivated hops (Uštar-Vozlič and Javornik 1999), 51 wild hops (Murakami et al. 2006) and 61 hop cultivars (Patzak 2011).

Microsatellites or single sequence repeats (SSRs) were also used for the genetic characterisation of hops, since their first isolation from the hop genome in 1996 (Brady et al. 1996). Furthermore, these markers were then developed and have become the most widely used markers to study hop polymorphism (Jakše and Javornik 2001, 2008; Jakše, et al. 2002; Stajner et al. 2005; Hadonou et al. 2004; Koelling et al. 2012). For instance, they were used to characterize 124 wild and cultivated hops from North America, Europe, and Asia (Jakše et al. 2004) using primers described by Brady et al. (1996). They highlighted a high genetic diversity and different evolutionary dynamics among the assessed wild hops collected from different geographical areas (Jakše et al. 2004). Other studies using microsatellites focused on the diversity of wild hops collected from different areas of the Northern Hemisphere (e.g. Murakami et al. 2006; Mongelli et al. 2016). Mongelli et al. (2016) investigated the diversity of Italian wild hops using nine pairs of microsatellite primers described by Stajner et al. (2005), with a combination of these genetic assays with analyses of phenotypes and α - and β -acids and volatile compounds in the tested hops. Several other studies used microsatellites for hop genetic characterisation, with a varying number of markers depending on the targeted genotypes (Bassil et al. 2008; Murakami et al. 2006; Stajner et al. 2005; Jakše et al. 2002, 2008; Korbecka-Glinka et al. 2016; Mafakheri et al. 2020).

Single nucleotide polymorphism (SNP) markers were used to detect hop polymorphism, especially for varietal identification. Pitra et al. (2013) identified 17,128 SNPs by next generation sequencing (NGS) of

178 hops, and were able to build robust dendrograms from these SNPs. Yamauchi et al. (2014) used different combinations of SNPs to identify 21 different hop varieties, while Henning et al. (2015a) identified seven SNPs to differentiate 116 hop germplasms. Recently, Van Holle et al. (2019) generated SNPs from 56 commercial varieties originating from different continents, harvested between 2013 and 2016. SNP-based phylogenetic analyses coupled with a quantification of hop essential oil, α -, and β -acid content, highlighted a “terroir” and “year” effect on the production of the assessed secondary metabolites. The use of these chemical and genetic markers could be relevant indicators to ensure the quality of selected hops in brewing.

Table 2 summarizes the different methods of analysis of the polymorphisms used in studies devoted to the investigation of wild hops. Amplification of microsatellites remains the most used technique, even if, in the last few years, new methods have been developed, such as dART or SNPs, which are increasingly used for the useful and complete information that they provide. Most of this genotyping is coupled with other analyses especially on the hop chemical composition, but also on the morphology of the plant, which makes it possible to obtain a characterization going from genotype to phenotype. This genetic information can be used to address different issues depending on the plant material selected: to perform phylogenetic studies, to study hop genetic diversity, but also to initiate varietal development.

QTLs controlling traits of interest

Few investigations have been carried out to identify quantitative trait loci (QTLs) involved in the variability of quantitative traits in hop plants (Gupta et al. 2010). For instance, Henning et al. (2011) focused in part on powdery mildew caused by *Podosphaera humuli*. They first identified two AFLP markers bordering the QTL determining susceptibility to the disease, then they completed these results with mixed linear models to identify 15 markers associated with resistance to powdery mildew (Henning et al. 2017b). Furthermore, Padgitt-Cobb et al. (2020) took these results further and identified two regions that actively respond to powdery mildew infection. Moreover, using RNAseq, these authors also identified and

Table 2 Main studies investigating the genetic diversity of hops

Plant material	References	Ex situ sampling	Genetic marker	Complementary analysis	Purpose of the study
69 hops germplasm from the Institute for Hop Research and Brewing in ěalec	Jakše et al. (2001)	From a germplasm collection	AFLP Microsatellites (4)		Comparison of microsatellites and AFLP, to compare their applicability for hop genetic diversity studies
124 hops from Europe, North America and Asia wild or cultivated	Jakše et al. (2004)	From germplasm collection	Microsatellites AFLP		Assessing the usefulness of the two types of markers for various aspects of genetic resource evaluation
51 wild hops from the northern hemisphere	Murakami et al. (2006)	Wild samples	Microsatellites (11 SSRs loci)		Phylogenetic study of wild hops: index on the evolution and domestication of hops Evaluation of the biodiversity and of the relations among spontaneous and cultivated hops from Europe, North America and Asia
147 individual wild hops: 62 native hops of Canada and 58 plants of Caucasus in comparison with 104 European plants and 27 North American plants	Patzak et al. (2010)	Yes	Microsatellites (9) and 3 STS sites	Chemical analysis: essential oils, polyphenols and bitter acids)	Study of the relationships and genetic diversity among wild hops in Canada and the Caucasus region by chemical and molecular analyses
25 genebank preserved clones of older European landraces and cultivars	Karlsson Strese et al. (2014)	Leaf collected on remnants site of hop culture (20 leaf samples)	Microsatellites (10)		Identification of residual hops from the 15th to eighteenth centuries and their adaptation to the terroir
62 hops plant from Denmark 34 hop plants from Norway	Solberg et al. (2014)	Yes	AFLP	Morphological analysis Chemical analysis: cohumulone and colupulone, total α -acids, total β -acids Disease resistance to <i>Sphaerotheca humeli</i>	Correlation between genetic variability, zone of origin, chemical composition and morphology
5 cultivated varieties 22 Italian wild hops	Mongelli et al. (2016)	Yes	Microsatellites (9 SSRs)	Morphological analysis Volatile compound Bitter acid content	Identification of ecotypes that can be the subject of varietal development

Table 2 continued

Plant material	References	Ex situ sampling	Genetic marker	Complementary analysis	Purpose of the study	
80 wild hop samples from Italy 43 hop cultivars from Europe and USA	Rodolfi et al. (2018)	Yes	Microsatellites (9 SSRs)		Evaluation of the genetic variability of native hops accessions collected in Northern Italy, compared with different known hop cultivars	
78 samples from 56 of the commercially most relevant hop varieties,		Van Holle et al. 2019	Yes	SNPs	Bitter acid content (α and β -acids) Profiling of oil volatiles by HS-SPME-GC-MS	Genetic and biochemical fingerprintings to characterize hop batches: influence of growing area and harvest year
253 plants at the seedling stage	Čerenak et al. (2019)	No, on seeds	DaRT		Fast and early sex determination of hop, to sort by female and male plants using male specific markers	
54 samples from 15 Iranian wild populations	Mafakheri 2020	No	Microsatellites (20), ISSR (14), RAPD (5)	Morphological analysis	Evaluation of the genetic diversity at the population level	
159 samples of wild hops clustered in 12 populations 6 commercial varieties	Riccioni et al. (2021)	No Fresh leaves	Microsatellites	Total α -acids and total beta acids quantification Essential oil analysed by SPME	Investigation of the intraspecific diversity of native hops in Central Italy	
4 Corsican wild hops Cascade, Tettnanger and Smaragd cultivars cultivated in Corsica or in their native environment (Tettngang Valley)	Dabbous-Wach et al. (2021)	Yes	Microsatellites (6)	Morphological analysis Essential oil	Evaluation of the characteristics of wild Corsican hops to characterize of new sources of genetic material for breeding purposes Evaluation of the terroir adaptability and influence of German hops grown in a native territory or in Corsica	

defined the genes involved in the expression of traits under genetic control and their relative positions along the linkage group. On the other hand, Henning et al. (2015b) characterised QTLs responsible for the resistance of hop to downy mildew caused by *Podosphaera macularis*. They showed that resistance to downy mildew is controlled by multiple loci across several linkage groups, and they identified in hop 22 SNPs markers linked to downy mildew resistance across different environments. Regarding low trellis hop yards, Henning et al. (2017a) identified eight QTLs linked to short stature, which constitute an efficient support to help breeders in their selection of hop plants with dwarf characteristics.

A large number of hop studies looking for genetic markers associated with chemical characteristics were dedicated to linkage with α -acid levels and yields. Works on this topic were initiated by Henning and Townsend (2005), to estimate genetic variances and heritability as well as genetic correlations among important hop traits, including yield and cone composition in α - and β -acids and in xanthohumol. Several investigations revealed complex genetic architecture underlying variation in sex, yield and cone chemistry. Several QTLs governing metabolite accumulations were highlighted, such as those involved in the biosynthesis levels of α - and β -acids, xanthohumol, cohumulone ratio to α -acids, colupulone ratio to β -acids, α -caryophyllene, and β -farnesene levels (Koie et al. 2005), α -acids (Čerenak et al. 2006, 2009b), xanthohumol and desmethylxanthohumol (Patzak et al. 2012), and essential oil content (McAdam et al. 2013).

The exploitation of these QTLs in breeding hops with original aroma profiles and good agronomic properties is complex since it involves the selection of certain traits without negatively affecting others (McAdam et al. 2013). This information shows the complexity of the relationships between genotype and phenotype and its importance for understanding the mechanisms of genetic regulation of the traits sought in breeding programs. QTL-based knowledge is crucial in the process of marker-assisted selection (MAS), even if most of the markers identified still require validation in unrelated populations prior to implementation in breeding programs. More recently, Čerenak et al. (2019) suggested an application of DaRT (Diversity arrays technology) on crude sample multiplex PCR, to distinguish quickly and with high

accuracy male and female genotypes, directly in the seedling stages. This is then a way to efficiently identify the sex of offspring in breeding programs, and in the case of hops, where only female plants are cultivated, to reduce the size and the cost of the trial.

Agronomic challenges of hop production related to chemical composition

Use and varieties

As previously mentioned in the section dealing with chemical composition, hops are typically added to wort during the boil (kettle hopping) to extract the bitterness and allow the thermal chemical isomerization of the α -acids to the more bitter water-soluble iso- α -acids (Fig. 4). These compounds once formed also contribute both to the stability of beer foam and the microbiological stability (Caballero et al. 2012). These iso- α -acids exist in freshly brewed beers in two epimeric forms, *trans*-iso- α -acids and *cis*-iso- α -acids, with a *trans/cis* ratio of about 0.4. This ratio can evolve due to the instability of *trans*-iso- α -acids to photodegradation and radical-assisted oxidation and therefore impact taste and flavour stability (Steenackers et al. 2015). If the iso- α -acids are predominantly responsible for bitterness, a number of compounds in the essential oil are responsible for imparting hoppy flavour and aroma to beer. The composition of the essential oil varies considerably with genetics, geographical location, growth conditions, and the levels of infections from diseases and/or attacks from pests. The composition can be altered during processing and storage, hence increasing the complexity due to oxidation, hydrolysis and rearrangements (Eyres and Dufour 2009). In traditional hopping, hops added during the boiling step leads to the volatilization of volatile compounds, and thus a loss of part of the richness of the aroma of the beer (Brendel et al 2019). To minimize the evaporation of essential oil and to retain aroma compounds, premium aroma hops are added at the end of boiling (late hopping) or even to the whirlpool (Benitez et al. 1997; Fritsch and Schieberle 2003). As a result, most of the hop aromas are preserved. Another brewing practice is dry hopping, which consists of adding hops in the fermentation or maturation tank, when the wort is cold, to amplify hop aroma (Lafontaine et al. 2019). Biendl

et al. specify that raw hopping methods are endless and respond more to an intuitive or sensory approach than an analytical one. But in general, it can be considered that the absence of heating preserves certain molecules of aromatic interest and that the presence of ethanol promotes the extraction of such molecules, in particular myrcene, α -humulene and β -caryophyllene. In addition, the CO₂ resulting from the fermentation being a source of evaporation of the aromas, the timing of when the hops are added will be an important factor to take into account, but on the other hand, the moment chosen should also be considered carefully regarding the inevitable oxygenation that occurs during the operation (Biendl et al. 2014). Brewers often use several varieties in a single beer to achieve the desired balance of bitterness and aroma. The quantity of hops used for brewing and the boiling time are determined relative to the α -acid content of the hops, expressed with the AAU (Alpha Acid Units) (Palmer 2006). Varieties of hops have been historically classified based on the α -acid content. Low- α aroma hop varieties contain less than 5% of α -acid levels. By contrast, if the α -acid levels are greater than 10%, the varieties are classified as high- α bittering varieties. Some intermediate varieties with α -acid levels around 6–10% and volatile compounds can be considered as dual-purpose varieties and are used to add aroma and bitterness to beers. Nevertheless, this classification no longer reflects the choice and use of the varieties by craft brewers. Aroma hops are varieties appreciated for their aromatic profile and their desirable flavour characteristics, but often have an α -acid content assumed to be similar to the wild hop (Palmer 2006; Solberg et al. 2014). Some of the most important traded bittering hop varieties on the world market are Citra, Magnum, Nugget, Cascade, Simcoe, CTZ (Columbus-Tomahawk-Zeus); the representative aroma hop varieties are Perle, Mosaic and Saaz (Barth-Haas report 2021). Each year, the Barth-Haas report details the evolutions of hop production and hop market precisely. Different cultivars are important for the production of typical styles of beers. For instance, Bullion—a former hop with a strong aroma and high myrcene and α -acid content, no longer grown—used to be suitable for strongly bitter ales, and is not suitable for final hopping of light lager.

New challenges in hop production

In this context, hop growers have to deal with the new trends in hop growing and beer brewing, including the emergence of microbreweries and the specified types of beer that they propose. Expansion forecasts were planned for 2021 favouring the cultivation of aromatic hops (IHGC 2021). Beer is one of the most widely consumed beverages in the world (Statista 2020). However, the beer palette consumption has undergone changes in recent years. Consumers are turning to craft beers over the well-established name brands. In general, craft beers come from a small and independently owned brewery that uses traditional brewing methods and focuses on manufacturing beer with a unique taste, a strong identity and quality rather than on mass production (Lafontaine and Shellhammer 2019). These microbreweries have been in full development since 2000 in the United States, and for a decade in Europe (Pokrivčák et al. 2019). Broadly speaking, in recent years, consumers are looking for more aromatic and hoppier beer, based on IPA-style (Indian Pale Ale) such as American IPA or Cloudy North Eastern IPA (Jaeger et al. 2020). Consumers are also concerned by food safety and interested in organic, sustainable, and low-input agricultural products (Walsh et al. 2016). One limit to expansion might be the search for healthier lifestyles of western populations (Pokrivčák et al. 2019), but an alternative is the expansion of non-alcoholic beers (Statista 2021).

Regarding this, these microbreweries are looking for aromatic hop varieties, in keeping with consumer behaviour, local and hence suitable to the terroir, with good agronomic and taste characteristics. Research is being carried out in different parts of the world to investigate hop diversity and to identify hops addressing these growing and brewing issues. In this way, breeding programs have focused on desirable characteristics, while improving yield and disease resistance (Palmer 2006). These rapid changes in demand constitute a new challenge for brewers, breeders, growers and suppliers because the demand for a variety can change in just a few years, while hops are a perennial culture productive after three years and reach their maximum productivity after 12 to 20 years (Machado et al. 2018; Donner et al. 2020).

The following sections consider the effects of cultural practices on the chemistry of the cones; all the effects are synthesized in Fig. 7.

Growth and development

Hop is a dioecious and perennial plant which grows from a rhizome. From this stem, measuring 30 to 40 cm long and 10 to 15 cm wide, bines grow on wire or strings up to 10 m high, depending on the variety and the cropping method. Hop reproduces by two modes, seed-propagation and vegetative propagation. In the case of sexual reproduction, the pollination is ensured by the wind. However, hop plant propagation is primarily from rhizome and softwood cuttings. This asexual reproduction ensures a certain genetic uniformity and stability of the plant. From this overwintering structure a perennial root system allows absorption of the minerals essential to the plant, with lateral spreading roots (2–5 m) that are wiry and many-branched, along with vertical roots (2–3 m) (Henning et al. 2009; Bruneton 2016; Prat and Rubinstein 2016; Machado et al. 2018). Female inflorescences or cones are the product of interest for the brewing industry. They are made up of interlocking leafy bracts and are 2–5 cm long. The bracts are yellowish-green, membranous, and sessile (Bruneton 2016). Some studies examining the diversity of hops have described morphological features (Mongelli et al. 2016; Mafakheri et al. 2020; Small 1978). Different phenotypic descriptors on cones, bracts and leaves can be studied, including the width, the length and the shape of the

different parts, as well as the fresh and dry weight of cones, or even the colour of the cones and the main shoots. Small (1981) showed that the geographical origin of cultivars from different continents can be identified with considerable reliability based on morphological examination. These morphological characteristics can follow the standard guidelines published by the International Union for the Protection of new varieties of plants (UPOV 2006), by the Czech Council for Plant Genetic Resources Hop Institute (Rígr and Faberová 2000) or in the publication of Čeh et al. (2012). Morphological examination allows the determination of phenotypical stages of hops, as described by Meier in 1997 and illustrated by the *Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie* (BBCH) scale (Rossbauer et al. 1995, Meier 1997).

In hop fields, the cones are produced without pollination and only female plants are found; except in UK and New Zealand where pollinators are used in the commercial crops. The presence of male plants in the surroundings of hop fields is undesirable, because of their pollen, which may fertilize hop cones and produce seeded flowers not wanted by brewers. Male plants are only required for a breeding purpose (Machado et al. 2018). However, the issue of pollination of female hops in production is not completely closed. Indeed, the yields are more interesting when

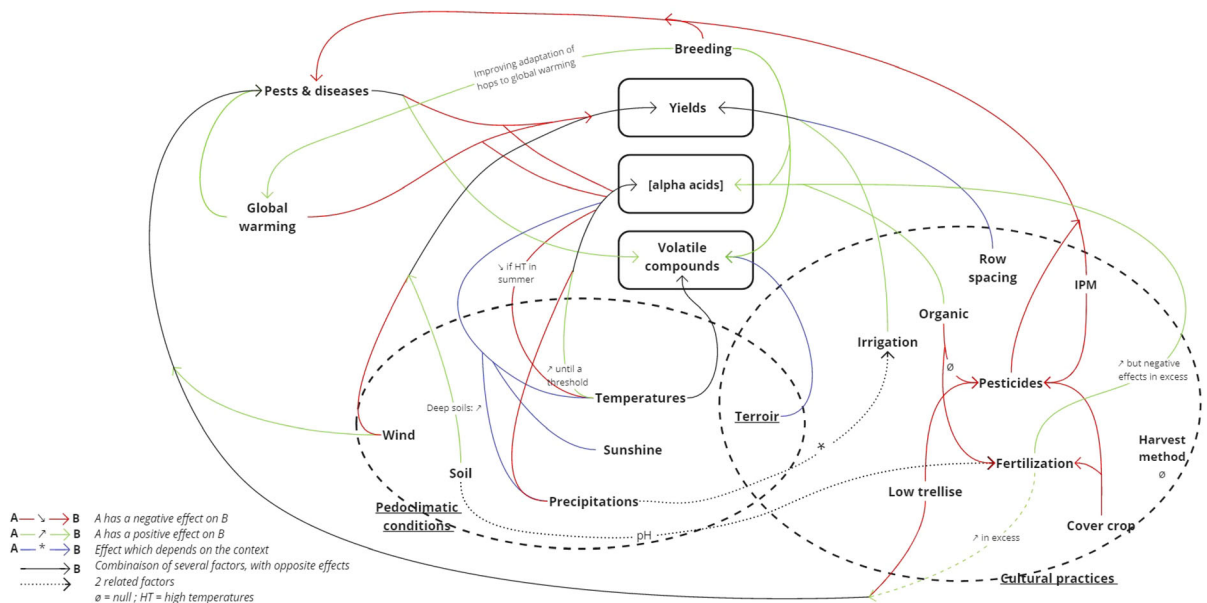


Fig. 7 Biotic and abiotic factors influencing the qualitative and quantitative composition of hops

the hops are pollinated, whether by diploid males (Thomas 1976) or more interestingly, by triploid males as in New Zealand, as they generally produce stimulated seedless cones. Nevertheless, the occasional presence of cones containing seeds makes this practice only used for certain productions in the United States (Haunold and Nickerson 1979, Haunold 1991).

In fact, the abandonment of the pollination of female inflorescences has become systematized at the same time as the abandonment of pressed cones in favour of industrial forms such as hop pellets and extracts requiring grinding. Indeed, the proteins and fats contained in the seeds, if present, might be released during grinding and lead to the deterioration of the end products (Trojak-Goluch and Skomra 2020).

The planting period begins at the end of winter, after the last frosts. Depending on the cultivation region, plants are separated by various distances from 1.2×2.3 m in the UK to 2.1×4.2 m in parts of the USA. Koren (2007) studied the influence of row spacing on quality and yield of hops and showed that the best compromise is a row spacing of 3×1.14 m (Fig. 7).

It is difficult to know how long hops can live, however Karlsson Strese et al. reported an isolated male hop population in Sweden whose presence seems attested since 1765, suggesting an age of at least 250 years (Karlsson Strese et al. 2014). In general, they are replanted every 25 years, depending on the market demands and decreasing yields (Biendl et al. 2014). Jelínek et al (2012) observed that the older plants contain higher bitter acid and essential oil content; while younger plants contained higher amounts of polyphenols. Donner et al (2020) also showed that the highest α -acid content in hop cones was reached in the first year of cultivation, followed by a logarithmic decline in the following years. Regarding yields, they increase for the first three years until they stabilize and then slightly decrease for 15 to 17 years, often because of virus and viroid infestations.

In the Northern Hemisphere, long shoots with little leaf area begin to emerge from hills (a single plant or multiple rhizomes planted together) as soon as March in early spring. The number of shoots is dependent on the size of the crown and the root system, the severity of the spring pruning and the cultivar. When the plants

reach about 30 cm in height, the training on to strings or wires takes place from the end of April to the beginning of May. Vegetative development of hop plants is fast. They can grow from 10 to 25 cm per day during their vegetative development, and can reach up to 6 to 8 m in height in the classic trellis system (Assirelli et al. 2020). As a follow-up, the bloom period of hops extends from June to September. After flowering, cones develop rapidly, regardless of fertilization. The lupulin glands accumulate much of their contents in the last few weeks before cones become ripe and ready for harvest. The density and the composition of these lupulin glands vary greatly among commercial cultivars, production areas and environmental conditions of the growing season. The development of the lupulin glands would appear to take place in two stages: (i) in early summer, the formation and development of the cones, (ii) and the synthesis and accumulation of phenolic compounds in the glands during cone maturation, thanks to the expression of genes involved in their biosynthesis (De Keukeleire et al. 2003; Patzak et al. 2015). Strobiles are collected when the optimum resin concentration in the lupulin glands is reached. Once ripe, cones may deteriorate rapidly. The concentrations of prenylated phenolic compounds increase gradually during cone development, with the exception of β -acids, the synthesis of which seems to reach a maximum at the start of cone formation (De Keukeleire et al. 2003). Moreover, as the flower cone develops, not only does the amount of essential oil increase but also the proportions of compounds change. For instance, oxygenated compounds are synthesized first, followed by sesquiterpenes (predominantly α -humulene and β -caryophyllene) and monoterpenes (primarily β -myrcene) which are produced last as the flowers ripen (Briggs et al. 2004). Therefore, the harvest time affects the composition of the essential oil. The β -myrcene concentration can be used as a measure of hop ripeness. On the other hand, the humulene/caryophyllene ratio remains constant and is a varietal characteristic (Briggs et al. 2004). Depending on the cultivar, harvest in the Northern Hemisphere begins in mid to late August and may continue through late September; harvest in the Southern Hemisphere is correspondingly in February. In 2019, the global average yield was 1.9 t/Ha and 206 kg/Ha of α -acids. In 2020, 46.8% of this production concerned aromatic hops; the remaining 53.2% concerned bitter varieties. However,

these proportions are very different depending on the countries. For example, in terms of percentage of acreage in 2020, Slovenia and the Czech Republic almost only produce bitter hops; while the United States grows 23.7% bitter hops and 76.3% aromatic hops, and Germany produces 45.3% bitter hops and 54.7% aromatic hops (Bart-Haas Report 2021).

After cones are removed from the bine, they are dried carefully for around 10 to 12 h, in a kiln with a maximum temperature generally of 45–60 °C to reduce moisture content of the hop mass from 75–80% at harvest to 8–10% for storage (Almaguer et al. 2014). Between 60 and 65 °C, the oil yield loss increases, with an important loss of myrcene (Raut et al. 2020). A great number of studies have been dedicated to the problems of hop drying and storage, because an excess of moisture can lead to mould and mildew, and a general oxidation of chemical compounds, especially a degradation of α - acids (Doe and Menary 1979; Canbaş et al. 2001; Sturm et al. 2020).

Irrigation and fertilization

Irrigation

Hop plants are sensitive to water shortage but tolerant to drought; seasons with a lack of rainfall lead to reduced yields and economic losses. To achieve the best yields water availability must be carefully managed. The most critical hop growth stages, which require adequate soil watering, are early spring, that is to say before mid-April in the Northern Hemisphere, and just before and during the flowering period in early July (Evans 2003). Thus, hop cultures necessarily require an access to water. Hop yields increase in both rainfed and irrigated conditions (Mozny et al. 2009; Fandiño et al. 2015). In the case of water deficit, this can be offset by various irrigation systems, such as drop-irrigation or micro sprinkling, which increase yields and do not affect the quality of the cones while increasing the photosynthetic accumulation of energy released (Hniličková and Novák 2000). Hence, Svoboda et al. (2008) also determined that the use of irrigation increases yields by 20 to 26% in comparison with non-irrigated plants. Thus, as mentioned in Fig. 7, irrigation has a positive effect on yields and may be indispensable in some situations (Slavík 2000). Hejnák et al. (2016) supported these observations on the response of juvenile hop plants to water

stress, since they observed a drop of the stomatal conductance, photosynthetic rate, and transpiration. However, the irrigation does not seem to impact positively the quality of cones and in particular the synthesis of bitter acids, while high temperatures (> 30 °C) from mid-June until harvest can have a negative impact on bitter acid levels as regarding crops in the Northern Hemisphere (Fandiño et al. 2015; Nakawuka et al. 2017; Donner et al. 2020). Transcriptional analysis by Eriksen et al. (2021) suggests that expression of genes involved in the biosynthesis pathways of bitter acids in the lupulin glands may be impacted by high temperatures and low-water stress.

Fertilization

High hop yields also depend on adequate soil nutrients and nitrogen levels, thus fertilization is typically applied (Benitez and et al. 1997). Hop nutrient needs vary depending on terroir, cultivars, and climate; that is why the best way to determine hop nutrient needs is to carry out soil tests.

Mineral nitrogen fertilizing (N) is one of the treatments that can strongly influence cone quality and yields. N is taken up in advance of dry matter production, stored in the leaves, and transferred to cones (Gingrich et al. 2000). During the vegetative development, while bines grow rapidly, hop has significant requirements in fertilization; this is a period of rapid uptake; around 3.3 to 4.5 kg/ha/day. For crops in the Northern Hemisphere, they had accumulated 90 to 170 kg N/ha in the trained biomass by the end of July (Sullivan et al. 1999). However, depending on growing localities and the vigour of the cultivated varieties, nitrogen may not be a limiting factor. Neve (1991) explained that the less vigorous cultivars might require greater applications than the most vigorous ones, which might have excessive growth. Thus, nitrogen can be managed through both fertilizer additions by early June to mid-June as well as soil organic matter, manure, cover crops and the return of compost crop debris to the soil after harvest (also for the Northern Hemisphere). Depending on the locality, some recommendations of nitrogen dose applications are provided, in one split or more: 160 kg/ha in Slovenia in two splits (Bavec et al. 2003), 90 to 170 kg/ha in the USA (Gingrich et al. 2000), and 135 kg/ha in England (Neve 1991). However, N excess can be detrimental to hops by increasing

disease and pest pressure (Huber and Watson 1974), reducing the final hop cone quality (Maļceva et al. 2011), and increasing leaf growth to the detriment of cone formation. Mineral nitrogen fertilizing can also have negative environmental impacts, such as the contribution to waterway eutrophication and ground-water contamination.

Hop requirements in phosphorus are rather low, it usually takes up 22 to 34 kg P/ha which can be compensated by P_2O_5 application (Sirrinc et al. 2010). Regarding the potash needs of hop, it takes up on average 90 to 170 kg K/ha. Depending on the cultivation area and the characteristics of the soil, a contribution in potash (K_2O) can be advised to replace the potassium uptake by hops during the season (Gingrich et al. 2000). It is recommended to manage phosphorous and potassium applications based on preliminary soil analyses to optimize the amendment rates.

Soil pH is an important parameter as it affects the nutrient availability in the soil. Hop can grow in a large variety of soils but prefers mildly acidic soil, with a pH ranging from 6.0 to 6.5 (Darby 2011). A range from pH 5.8 to pH 7.5 is possible, even though a pH of 6.5 is optimal. Manganese (Mn) is an essential element. However, when it is accumulated beyond plant needs, its level in the soil increases as soil pH decreases. Decreasing tissue Mn is one reason for maintaining soil pH above 5.7 for hop production. Lime ($CaCO_3$) may be applied to neutralize the acid; but no lime is required if the soil pH is above 6.5 (Gingrich et al. 2000). Soils with high pH (above 7.5) are often associated with zinc deficiencies; if the soil is too basic, ammonium sulphate fertilizer can be used.

As the market for organic products increases, different methods are being employed to limit the use of chemical input. Therefore, the application of compost, cover crops, and other organic amendments such as cattle slurry is more and more common (Čeh 2014). Composted leaves and stems are generally returned to the field; they contain approximately 18 kg N/t of dry material. Application of hop bine residues thus reduces nitrogen fertilizer inputs (Sullivan et al. 1999) but it should be composted to reduce the likelihood that viable pathogens remain in the residue (Turner et al. 2011). Depending on the compost and the initial soil quality, 0.8 to 1.2 tons of compost per hectare should satisfy nutrient needs in organic systems (Sirrinc et al. 2010). On the other

hand, a cover crop can be applied to reduce fertilizer and pesticide costs, to improve soil quality and crop yields, to prevent soil erosion, to conserve soil moisture, to scavenge nitrogen excess, and to provide a beneficial insect habitat (Sirrinc et al. 2010).

Pests and diseases

Hop is susceptible to various pathogens that can cause significant yield reductions. The homogeneity of hop plants reproduced by asexual vegetative propagation and their growth in monoculture makes them vulnerable to diseases and pests (Čerenak et al. 2009a; Turner et al. 2011). The most frequently occurring and damaging diseases and pests on hop crops are summarised in Table 3.

Fungi

Hop is particularly susceptible to mildews, major diseases for this crop. Downy mildew, caused by *Pseudoperonospora humuli* (Miyabe & Takah.) G. W. Wilson, is typically diagnosed by visual examination of foliar tissue (Rahman et al. 2019). Diseased hop plants develop characteristic diseased shoots, *spikes*, stunted with short internodes, and appear chlorotic with yellow-green, down curling or cupping leaves (Johnson et al. 2009; Higgins and Hausbeck 2021). Downy mildew can cause the complete loss of marketable hop yields, and even the death of hop plants in susceptible varieties. Regarding powdery mildew, caused by *Podosphaera macularis* (Wallr.) U. Braun & S. Takam, formerly *Sphaerotheca humuli* (DC.) Burrill), it is one of the oldest known hop diseases. Heavy infestations of this disease can destroy the crop. In 1997, despite years of quarantine efforts, over 1,200 ha of hop fields were destroyed in the United States by hop powdery mildew (Turechek et al. 2001). In Germany, it was a disease of little significance until Northern Brewer, a susceptible cultivar, was planted extensively (Čerenak et al. 2009a). Krofta and Nesvadba (2003) reported a reduction of up to 25% of hop α -acid content due to powdery mildew infection (Gent et al. 2010, 2014). *Verticillium* wilt is another fungal disease caused by soilborne pathogens that can also induce severe damage to hop crops, depending on the aggressiveness of the fungal strains and the susceptibility of the cultivars. Two main species with high pathogenicity are isolated from hop

Table 3 Main fungi, viruses, and pests attacking hop crops

Common name	Description	Symptoms and signs	Conditions suitable to development	Impacts	Management (preventive measures)	References
Fungi						
Downy mildew <i>Pseudoperonospora humuli</i> (Miyabe & Takah.) G. W. Wilson	- Peronosporaceae family	- Angular leaf lesions, on the surface and undersurface	-DM thrives in moderate temperatures (20–25 °C) and moist environments	-Infected plants and rhizomes become weak: low-yield and eventually die-off	-Planting healthy and resistant or moderate resistant cultivars (Colombia, Fuggle, Sterling, Willamette)	Neve (1991), Coley-Smith (1964), Gent et al. (2017), Undas et al. (2018)
	-Homothallic oomycete pathogen and obligate biotroph	-Sporulation on the underside of leaves	-Mild and warm day temperatures and free leaf wetness lasting 1.5 h; or if temperatures lower than 5 °C with wetness that last more than 24 h	-Up to 100% yield losses	-Field sanitation practices: planting healthy plants, crowning, removal of diseased plants early in the spring, elimination of basal spikes, weeding, stripping infected leaves	
	-Infection overwinter in buds and crown in the form of mycelium, can affect the shoot development	-“Spikes”: stunted shoots with short internodes and chlorotic appearance	-Sporangia during the night if rainy conditions (humidity > 90%) and temperature greater than 6 °C		-Rotation in the mode of action of fungicides to avoid developing fungicide resistance	
	-Infections of buds and leaves can develop at any time during the growing season	-Infested inflorescences become dark brown, shriveled and dried up			-Postharvest treatment to reduce the inoculum and outbreak for next spring	
		-Whole part of leaves become brown, hardened and will stop developing				
Powdery mildew <i>Podosphaera macularis</i> (Wallr.) U. Braun & S. Takam (formerly <i>Sphaerotheca humuli</i> (DC.) Burrill)	-Erysiphaceae family	-Characteristic circular, powdery, white colonies on buds, stems, leaves, cones	-Development favored by rapid plant growth, mild temperatures, high humidity, and cloudy weather	-Burs and young cones are very susceptible	-Use of healthy disease-free rhizome	Purayannur et al. (2021), Gargani et al. (2018)
	-Infects all above-ground plant parts: buds, stems, leaves, cones	-eventual occurrence of blisters before sporulation	-At 18 °C: PM complete its life cycle in five days	-Infection of cones reduce their quality and may lead to a total crop loss	-Resistant (Comet, Crystal) or tolerant varieties	
	-Powdery white spore colony characteristics, spread by wind rain splash, insects, etc...	-“Flag shoots”: shoots which emerge from infested buds, distorted leaves, white sporulation on the stem			-Early-maturing varieties have less infections (PM infect by late harvest)	
		-Reddish-brown discolored and distorted cones, with reducing size			-Spring cultivation: crowning, pruning	
		-Cones browning after kiln drying			-Removal diseased tissue to reduce spread	
					-In conventional agriculture, an intensive preventive program may be necessary, using different fungicides to avoid developing resistance. Some of them are also efficient against DM	
					-On infected plants, sulfur-based products have well controlled the pathogen	

Table 3 continued

Common name	Description	Symptoms and signs	Conditions suitable to development	Impacts	Management (preventive measures)	References
Verticillium wilt <i>Verticillium nonalfalfae</i> Inderb., H. W. Platt, R. M. Bostock, R. M. Davis and K. V. Subbarao (= <i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Berthold); <i>Verticillium dahliae</i> Klebahn	-Plectosphaerellaceae family -The colonization of host plants occurs through the root epidermis and, if successful, the fungus spreads to the vascular tissues (systemic infection of the plant)	-First symptoms on leaves (late July or early August): yellowing of the lower leaves, which gradually spreads to other leaves higher up the bine -Lower leaves dry out, wither and may fall, while wedge-shaped necrotic areas may develop on the upper leaves -Bines often become swollen (“fat bine”) and externally may appear brown and corky. Cutting the bine about 0.3–1 m from the base: characteristic light-brown discoloration of the internal woody tissues -In the case of aggressive strains, progressive wilt can affect the whole plant and progress across hop field destroying all plants within a few years	-Most prevalent and severe in wet seasons, -If the soil is excessively wet -From late July to early August			
Black Root Rot <i>Phytophthora citricola</i> Sawada (1927)	-Peronosporaceae family -Soil borne oomycete -Water lesions on the roots of the plants, blackened or yellow leaves, and wilting stems	-Causes a crown-and-root rot -Narrow border between diseased and healthy tissues -The infection can reach up the base of the bine. In some cases, wilt of the bines and chlorosis of the leaves, that can turn to brown -Visual symptoms close to these of <i>Verticillium wilt</i> , <i>Fusarium canker</i> , or damage caused by California prionus beetle	-Growth between 3 °C and 31 °C, optimum temperature for development: 25–28 °C -In poorly drained soils	-Decline in yields -Severely attacked plants can die at the end of the season	-Avoid water retention: optimization of the irrigation and ensure a good drainage; -Avoid roots damage: infection is favored by wound; -Elimination of plant debris and potential weed hosts that may host or promote the development and the survival of these organisms in the soil; -Chemicals treatments as phosphorous acid fungicides and various Ridomil can provide a control	Royle (1968) Hay (2009) Gargani et al. (2018) Blancard (2021)

Table 3 continued

Common name	Description	Symptoms and signs	Conditions suitable to development	Impacts	Management (preventive measures)	References
Viroids and viruses						
Hop stunt viroid (HSVd)	<ul style="list-style-type: none"> - Single-stranded RNA molecule of 297 nucleotides - Hostuviroid - First observed in Japan 	<ul style="list-style-type: none"> -Abnormal dwarfing of bines -Typical stunting symptoms of the main and lateral bines, only evident after years of being infected 		<ul style="list-style-type: none"> -Important economic losses 	<ul style="list-style-type: none"> -Transgenic HSVd-Nb: mature HSVd forms are resistant to RNA silencing -Use of virus/viroid-free planting material 	<ul style="list-style-type: none"> Gómez & Pallás, (2007) Marquez-Molins et al. (2021) Gargani et al. (2018)
Hop latent viroid (HLVd)	<ul style="list-style-type: none"> - Cocadviroid 	<ul style="list-style-type: none"> -Generally latent -Chlorosis, slow growth, reduction of cones size and yield, decrease in alpha acids level in some susceptible varieties 	<ul style="list-style-type: none"> By mechanical transmission (harvesting and cultural operations), latent nature, propagation of material infested 	<ul style="list-style-type: none"> -Reduction of yields and effects on chemical composition of cones 	<ul style="list-style-type: none"> - Use of virus/viroid-free planting material 	<ul style="list-style-type: none"> Patzak et al. (2001) Pethybridge et al. (2008) Gargani et al. (2018)
Citrus bark cracking viroid (CBCVd)	<ul style="list-style-type: none"> - Cocadviroid 	<ul style="list-style-type: none"> -After apparition of first symptoms, plant develop more severe symptoms each year such as premature flowering, reduction in cone size, dry root rotting 	<ul style="list-style-type: none"> By mechanical operation By contaminated tools and machinery, clothing and human hands 	<ul style="list-style-type: none"> -Died within a span of 3–5 years -Annual incidence progression up to 20% 	<ul style="list-style-type: none"> -Use of virus/viroid-free planting material 	<ul style="list-style-type: none"> Jakše et al. (2015) Mishra et al. (2020) Gargani et al. (2018)
Hop mosaic virus (HpMV)	<ul style="list-style-type: none"> - Carlaviruses - One of the most damaging viruses in hop production 	<ul style="list-style-type: none"> -Downward rolling of the leaves, interveinal chlorosis, stunting, failure of bine to climb on strings 		<ul style="list-style-type: none"> -Affect cones yield and lupulin composition -Can be lethal for “mosaic sensitive” cultivars, as Golding 	<ul style="list-style-type: none"> -Use of virus/viroid-free planting material 	<ul style="list-style-type: none"> Pethybridge et al. (2008)

Table 3 continued

Common name	Description	Symptoms and signs	Conditions suitable to development	Impacts	Management (preventive measures)	References
Arthropods						
Hop aphid <i>Phorodon humuli</i> (Schrank)	<ul style="list-style-type: none"> -Aphididae family - Small arthropod of 1/10 to 1/20 inches, pear-shaped, soft-bodied, pale whit (nymphs) to yellow-light green (adults), with or not direct damages - Piercing-sucking mouth parts to suck phloem, water and nutrients from vascular tissue of hops and cones - Typically, on the underside of leaves - Indirect damage (virus transmission) 	<ul style="list-style-type: none"> - Leaves can curl and wilt leading to defoliation because of feeding - Cones atrophy, browning and wilting because of feeding - Leaves and cones stick together from a sugar excretion: the “honeydew”: can interfere with the leaves photosynthesis and lead to the proliferation of fungi 	<ul style="list-style-type: none"> - Prefer mild temperatures Most dangerous during warm, dry weather and not usually a problem for well-watered plants - Can disappear during hot and dry conditions 	<ul style="list-style-type: none"> -Damage the quantity and quality of harvested cones -May completely destroy a crop -Economic losses because cones turn limp and brown: up to 80% economic losses 	<ul style="list-style-type: none"> -Regular scouting -Excessive nitrogen can increase population -Insecticides -Many naturally occurring enemies to control aphid: lady beetles, lacewings, parasitic wasps 	<ul style="list-style-type: none"> Barber et al. (2003) Lorenzana et al. (2013)
Two spotted spider mites (TSSM) <i>Tetranychus urticae</i> C.L. Koch	<ul style="list-style-type: none"> -Tetranychidae family -Arthropods smaller than aphid (1/50 inch long) -In small numbers, TSSM does not cause much damage; but under favorable conditions, multiplication is very fast and spider mites become a serious problem 	<ul style="list-style-type: none"> -Cones become dry, brittle, reddish coloration -Hop plants can tolerate TSSM if cones are not infested 	<ul style="list-style-type: none"> -Mites population increased rapidly during hot and dry conditions 	<ul style="list-style-type: none"> -Poor quality of cones: refused by brewers -Reduction of leaves productivity: total yield losses -Lower alpha acid contents and storage life -May completely destroy a crop 	<ul style="list-style-type: none"> -Dwarf hops - Biological control by inoculative release of the allochthonous predatory mite <i>Phytoseiulus persimilis</i> Athias-Henriot - Prophylactic routine: application of an acaricide 	<ul style="list-style-type: none"> Weihrach (2005)

Table 3 continued

Common name	Description	Symptoms and signs	Conditions suitable to development	Impacts	Management (preventive measures)	References
Japanese beetle <i>Popillia japonica</i> Newman	<ul style="list-style-type: none"> -Coleoptera (Scarabaeidae family) -Scarab beetle native to Japan; established in North America, the Azores and, more recently, in Northern Italy -Highly polyphagous species, listed in Annex I AII of the Directive 2000/29/EC 	<ul style="list-style-type: none"> -Feed on hop leaves, until skeletonization of leaves when population numbers are high. Often the mid-vein of leaves is left intact -Severely damaged leaves soon turn brown 	<ul style="list-style-type: none"> -Flight activity greatest on clear days, with temperature between 29 °C and 35 °C, relative humidity > 60%, and wind < 20 km/h 	<ul style="list-style-type: none"> -Reducing the photosynthetic activity of the plant 	<ul style="list-style-type: none"> -Traps containing floral attractant and synthetic pheromone -Cultural control: avoiding irrigation during peak seasons -Mechanical cultivation: reduction of the larvae population by direct damage and by reducing the suitability of the habitat -For small infestation: hand removal of adults -Biological control using <i>Paenibacillus popilliae</i> or <i>Steinernema spp.</i> and <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> -Chemical control 	Gargani et al. (2018)
California Prionus beetle <i>Prionus californicus</i> Motschulsky	<ul style="list-style-type: none"> -Coleoptera (Cerambycidae family) -Beetles are brown of 1 to 2 inches long, and larvae are cream-colored 	<ul style="list-style-type: none"> -Occurrence on the leaves undersurface and on the cones -Silvery discoloration on leaf surfaces and reddish coloration of infested cones -White webs on the underside of leaves 		<ul style="list-style-type: none"> -Severe infestation: destruction total of the crown = > kill the plant 		Gargani et al. (2018)
Hop flea beetle <i>Psylliodes punctulatus</i> Melsheimer	<ul style="list-style-type: none"> - Coleoptera (Chrysomelidae family) -Small bronze to black metallic beetles - Can jump like a flea when disturbed -Cycle of development of 1 year -Attack the young shoots of hops in late March or April 	<ul style="list-style-type: none"> -The larvae feed on the roots of the hops: causes surface traces and small tunnels -In spring adults cause damage on the leaves of young bines 		<ul style="list-style-type: none"> -Until 3,000 beetles per hops plant -Can completely nipple the leaves, they become skeletonised -Reduction of the photosynthesis, stunted growth - Significant losses of yield - In very rare cases, complete destruction of a crop 	<ul style="list-style-type: none"> -No insecticides available but those applied for hop aphid can provide control -Biological control using entomopathogenic nematodes may help to reduce populations of overwintering beetles - Cultural control with trap crops such as Chinese mustard or radish around hop yard, to intercept beetles - Plowing weeds and hop residues in autumn to destroy adult hibernating 	O'Neal (2015) Weihrauch et al. (2019)

plants: *Verticillium nonalfalfae* Inderb., H. W. Platt, R. M. Bostock, R. M. Davis and K. V. Subbarao (formerly *V. albo-atrum* Reinke & Berthold) and *V. dahliae* Klebahn. *V. nonalfalfae*, which is more frequently encountered in Europe, while *V. dahliae* is sometimes isolated in Europe and seems to be more common in North America. In cases of lethal wilt, severe chloroses and necroses with rapid dieback of leaves and lateral shoots can be observed (Li 2007; Progar et al. 2017; Kunej et al. 2020). Hop can also be affected by root rot diseases, such as Black root rot, in particular in the Southern Hemisphere, caused by *Phytophthora citricola* Sawada, or by generic Armillaria root rot and Rosselinia root rot caused by *Armillaria mellea* (Vahl) P.Kumm. or *Rosselinia necatrix* Berl. ex Prill. respectively. Some other fungal diseases occur but are less common (Royle 1968; Hay and Gent 2016; Gargani et al. 2018).

Viruses and viroids

Viruses and viroids are serious damaging pathogens for hop cultivation in some countries. Sixteen viruses and four viroids have been identified so far. The major pathogens include five viruses (*Apple mosaic virus* (ApMV), formerly known as *Prunus Necrotic Ring-spot Virus*, *Arabis mosaic virus hop strain* (ArMV-H), *Hop mosaic virus* (HMV), *Hop latent virus* (HLV) and *American hop latent virus* (AHLV)), as well as two viroids (*Hop latent viroid* (HLVd), and *Hop stunt viroid* (HSVd)). However, in recent years, *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd) has also caused severe economic damage, in particular in Slovenia (Pethybridge et al. 2008; Gargani et al. 2018). Some viroids, such as HLVd, and viruses, such as ApMV, can impact the chemical composition of cones. As infected plants often have no visible symptoms, vegetative propagation of hops increases the pathogens' spread. The most effective strategy for limiting the spread of these viruses and viroids is the use of virus and viroid-free planting material (Pethybridge et al. 2002; Jelínek et al. 2010; Rossini et al. 2021).

Arthropods and nematodes

The major arthropod-induced pests encountered in hop crops are the hop aphid (*Phorodon humuli* (Schrank), Aphididae) and two-spotted spider mites (*Tetranychus urticae* C. L. Koch, Tetranychidae). The hop aphid can

cause direct damage after cone formation, hence compromising their quality. This small arthropod can also contribute to virus transmission, in particular the wide spreading of Carlaviruses (HMV, HLV and AHLV). Two-spotted spider mites mainly impact hops in the Northern Hemisphere. Their propagation is favoured by hot and dry weather. They produce damage when they reach large numbers (Gargani et al. 2018; Campbell 2018; Rossini et al. 2021). A large number of other species of arthropods, in particular Coleoptera, such as California prionus beetles (*Prionus californicus* Motschulsky, Cerambycidae), the hop flea beetle (*Psylliodes punctulatus* F. E. Melsheimer, Chrysomelidae) and Japanese beetles (*Popillia japonica* Newman, Scarabaeidae) can be considered as secondary pests worldwide. Some parasitic nematodes, such as the hop cyst nematode, *Heterodera humuli* Filipjev (Heteroderidae), may also have deleterious effects on hop crops (O'Neal 2015, Gargani et al. 2018; Weihrauch et al. 2019).

Pathogen and pest control

The different pests and pathogens occurring in hop crops can in many cases affect the cones from a qualitative and quantitative point of view (Jelínek et al. 2012). Pistelli et al. (2018) studied the effects of virus and viroid infestations on volatile fractions of hops, and showed that these infestations may increase the production of α -humulene, β -myrcene and β -farnesene, depending on the hop varieties. However, these infestations can lead to serious economic losses by reducing photosynthetic efficiency, and, in some cases, by causing the death of the plants, especially in the case of viruses. Several pest management strategies can be used to reduce disease severity and pest pressure in commercial hop production. These primarily include several applications of pesticides throughout the growing season; broad-spectrum pesticides can be used to control insect pests of crops, but they also destroy weed fauna. Additional release of biocontrol organisms is therefore recommended, which can be performed by ladybirds (Coccinellidae family) and common lacewings (*Chrysoperla carnea* (Stephens), Chrysopidae) against aphids. The aim here is to disrupt the insect's reproductive cycle and limit the development of pesticide-resistant genotypes (Undas et al. 2018). In addition to these biological methods, integrated pest management (IPM) is also

used as a preventive measure, such as good phytosanitary protection (reduced number of applications, working with clean tools, etc.), mulching bines, spring pruning, avoiding standing water, which is conducive to the proliferation of fungal species, planting healthy rhizomes, and destroying weeds involved in the development of viruses, insects, and mites (Lewis et al. 1997; Probst et al. 2016; Campbell 2018; Allan-Perkins et al. 2019). In countries where hop is a minor crop, no decision support tool or technical institute is available to help hop growers, hence communication between farmers remains essential to anticipate and to limit the proliferation of pests and the development of diseases. Finally, cultivars resistant to hop pests and diseases may also be used (Barber et al. 2003). For instance, the cultivars Newport and Comet seem to have good levels of quantitative resistance to the strains of powdery mildew present in the USA and that could be used in breeding programs against emerging virulent strains of *P. macularis* (Wolfenbarger et al. 2014). European cultivars such as Magnum, Challenger and Orion have high levels of resistance to downy mildew. Golding hops or hops with Golding heritage are most susceptible to hop mosaic virus (Hieronymus 2012).

Otherwise, it has been shown that organic farming may have an influence on α -acid content, depending on the cultivar. In their studies, De Keukeleire et al. (2007) showed that the hop variety First Gold had a clear trend for enhanced production of secondary metabolites in organic production when compared to conventional production.

Cultural practices

Labour force

A major issue of hop cropping is workforce distribution. Two short periods in the cultivation of hops are time-consuming and require manpower available with technical know-how for this tedious and meticulous work. The first one is the deployment of wires or strings and subsequent training of bines onto the strings. The second time-consuming period that requires a large workforce is the harvest. In general, harvesting in the classical trellis systems takes place in two stages: (i) the collection of all main bines in the field followed by (ii) the cone picking (Assirelli et al. 2020). These harvest steps have to be done quickly to

avoid the degradation of unstable chemical compounds, such as α -acids and volatile compounds (Matsui et al. 2016). Krofta and Ježek (2010) have not shown a significant influence of the harvesting method on yield and α -acid content on three Czech hop varieties.

Low-trellis hop yards

Hop is a climbing species of 4 to 8 m high, usually cultivated on wires or strings supported by trellises, to allow the plant to climb (Neve 1991). Since hop is a very brittle crop, susceptible to pests and diseases, it requires several stages of hard work during the cropping season and a large amount of water and nutrients to maximize their potential yield. Hence, in the face of all these challenges, some trials were carried out first early 1990s in the US (Neve 1991) and later on in the UK (Darby 2005) to develop new hop growing systems on shorter trellises (2–3 m high, compared to 7 m for “normal” trellises). This method of low trellises offers several advantages, including a reduction in costs, increased potential for mechanisation during harvest, thus reducing labour requirements, and reduced quantity of chemicals used against pests and diseases (Neve 1991; Darby 2005; Seigner et al. 2009; Turner et al. 2011). However, the yield reduction of at least 40% using traditional varieties on this system was too great and, to produce these advantages, it was necessary to breed specific dwarf varieties suitable for growing and harvesting on low-trellises (Darby 2005). First Gold was released in 1996 as the World’s first commercial dwarf variety, to be followed by Boadicea (2004), Sovereign (2006) and Endeavour (2010). In recent years, the establishment of these less expensive, more sustainable, and environmentally friendly low-trellis hop fields is increasing, which necessitates the breeding of further specific dwarf varieties, meeting the requirements of the current brewing industry. Thus, Nesvadba’s works (2016) focused on the crossbreeding and genetic selection of dwarf hops adapted to a dwarf hop farm, by crossing dwarf hop genotypes, from which they obtained 22 327 genotypes, 12 of them with interesting agronomic and organoleptic characteristics (aromas, α -acid content, good yields).

Pedoclimatic conditions

The growing area of hop is limited by temperature and photoperiod, which are two key constraints of climate. First of all, optimal conditions for hop growth include winter temperatures at 3 °C or lower for at least 42 days to break dormancy (Neve 1991). However, recent studies showed that hops do not require low temperatures to induce hop flowering (Bauerle 2019). Hops also require sufficient spring moisture followed by significant periods of summer sun and heat to ensure ample growth and full development of chemical compounds (Sirrinc et al. 2010). Several studies emphasize the influence of temperature on hop quality and yield. α -acid production is increased with increasing temperature (Mozny et al. 2009). However, this positive effect of temperature is only observed up to a threshold. Zattler and Jehl (1962) concluded that cones ripened during hot, dry, and very sunny summers contain lower resin quantities than cones ripened during moist summers with normal sunshine and temperatures. Recently, Donner et al. (2020) confirmed this observation showing that, depending on the cultivar, temperatures above 30 °C during summer may be the most significant factor that negatively influences the α -acid content.

Some studies have been devoted to proposing a mathematical model to estimate the impact of weather fluctuation on α -acid content in hop cones. Kučera and Krofta (2009) worked on the cultivar Saaz and used ten meteorological parameters in the Czech Republic; they showed that July temperatures, during flowering, cone formation and ripening, was the most significant parameter. MacKinnon et al. (2020) studied the α -acid level of the cultivar Aurora between 1994 and 2019 in Slovenia and they demonstrated that the leading factor is the sunlight capture, which has the greatest impact from early June to early August.

Hop has special requirements in terms of intensity and division of the wavelengths of sunlight in order to flower and produce an economic cone yield (Thomas 1969). Because of this effect of day length, the best geographical areas for hop cultivation are located between latitudes 30° and 55°, especially in Europe, in Central and Northern United States, and Central Asia. Outside of these latitudes, breweries have to import their hops. Breeding programs in these countries aim at selecting varieties adapted to much shorter day-lengths (Darby 2005). The major crop producing areas

in the Northern Hemisphere are found in the United States (44% of the world α -acid production), in Germany (40%), in the Czech Republic, in China, in Slovenia and in Poland (Barth-Haas Group 2021). In the Southern Hemisphere, hop cultivation is also expanding, in particular in New Zealand, with the development of varieties with particular aromas (Purdy et al 2021).

Hops are grown commercially on various soil types, including “deep alluvial loams, slight to moderately calcareous eolian silts, and clay-loam soils derived from lacustrine deposits” (Mahaffee et al. 2009). Hop growing requires a loose soil, so the roots may burrow deeply, and sufficient moisture, through rainfall, irrigation or adequate drainage (Sirrinc et al. 2010). These soils generally trap more water and provide an advantage in case of water-short years and improve plant drought resistance compared to crops planted in shallow or sandy soils. Deep soil would give good yields even if subjected to limited irrigation, because roots can grow to greater depths and can extract water from lower soil profiles, up to depths of 2.4 m or more (Evans 2003).

Several studies show that precipitations have a positive impact on α -acid content (Donner et al. 2020). Water stress during flowering and cone development and maturation affects the development of physiological processes, such as growth and photosynthesis, and induces a significant decrease of yields, including α -acid content. Climatic conditions of hop growth have an important impact on the chemical composition of hop cones (Fig. 7). Jelínek et al. (2012) assumed that hops grown in drier and warmer areas had higher concentrations of bitter acids and polyphenols; contrary to hop plants cultivated in colder areas with a higher amount of rainfall, which contained higher amounts of essential oils (Donner et al. 2020). On the other hand, hops are sensitive to wind; strong wind may loosen many bines from the ropes or wires; wind bruising can also damage cones, which favours fungal infections, such as *Alternaria alternata*, or damaged cones with a brown discoloration of hops (Neve 1991).

Due to the recent developments in the market and craft beer industry, which have led to an increasing demand for local raw materials, hop cultivation is being considered even in some environments where hop is not traditionally cultivated. Hop cultivation in a semi-arid environment around the Mediterranean area is focused on in the works of Marceddu et al. (2020)

and Rossini et al. (2021). They tested the suitability of three common cultivars in typical semi-arid environments of Sicily; sensory analysis through a panel test assessed excellent organoleptic characteristics of the obtained hop as well as the resulting beer.

Yield variations also occur between years due to differing climatic conditions, such as rainfall, temperature, and sunshine. Biotic and abiotic conditions, including soil type, climate, and management practices, have a major impact on the quality of the final product and constitute the definition of the terroir. Rodolfi et al. (2019) studied the influence of 13 territories in Italy (nine locations), Slovenia, Germany, and the USA (Michigan and Ohio) on the performance of the Cascade cultivar. They showed important differences in bitter acid content and in the composition of essential oils, for hops grown very far from each other, but also for hops grown in the same country, because of the influence of local pedoclimatic conditions. Van Holle et al. (2017) highlighted differences in the quality and quantity of essential oils between Amarillo hops grown in Washington State and Idaho, two states from north-western USA. Results showed a strong difference associated with the provenience of hops, especially in essential oil content; these differences are also noticed in the sensory analysis of monovarietal beers produced with the studied hops. Recently, Dabbous-Wach et al. (2021) studied the adaptability of the German hops to the Corsican terroir almost one year after planting, with an increase of zingiberene content and modifications in α -humulene, β -pinene, and linalool content. They also observed that German cultivars cultivated in Corsica present some features in common with morphological characters of Corsican wild hops. This adaptability of the same cultivar growing in different areas could be explained by epigenetic modifications induced by the environment (Hieronymus 2012). These studies show the importance in determining the area of hop cultivation since it strongly influences hoppy aroma in brewing.

Climate change

In the current context of global warming causing more frequent drought and extreme weather events, hop crops may be impacted (Grillakis 2019).

Actually, hop crops are very sensitive to climate change, and the increase in temperatures and changes

in precipitation patterns may lead to reduced yields while favouring weed, disease, and pest development (Nelson et al. 2009). In this context, a survey shows that the majority of Czech hop growers (56%) have already observed the effect of climate change on their crops (Lorencová et al. 2014).

However, worsening drought and unseasonably hot weather are creating major challenges to these efforts. For example, in Europe and the USA, most hop farms suffered from severe water shortage in 2015 (Zhang et al. 2017). This kind of event underlines the importance of the valorisation of genetic diversity in response to drought stress for a sustainable hop production system. Mozny et al. (2009) considered the impact of climate change on the yield and quality of Saaz hops in the Czech Republic using future climate simulations taking into account an increase in temperature, atmospheric CO₂ concentrations, the amount and seasonality of precipitation, and the availability of water resources. They predict an impact on commercial hop crops, with a decline in both (i) yields, of up to 7–10%, because of increased temperatures during the growing season and shorter periods of crop development, and (ii) α -acid content, of up to 13–32%, because of unseasonal precipitations or adverse temperatures and sunshine during hop crop development.

To understand the adaptability of hops to drought more clearly, a non-specific metabolomic study of the leaves of the hops has been carried out. This study showed significant variation of several compounds: five glycerolipids, glutaric acid, pheophorbide A, abscisic acid, roseoside, and dihydromyricetin. These changes in the primary and secondary metabolism still need to be understood with further research that hopefully will help determine markers of hop tolerance to drought (Morcol et al. 2020).

Different parameters can be taken into account to improve the resilience of hop crops to climate change. Since global warming changes can be favourable for the preponderance of certain pests and diseases, resistance to bio-aggressors is an important factor that should be considered during plant breeding programs (Skendzic et al. 2021). Hop resistance to drought and a warm climate should also be considered. In addition, cropping practices can also be adapted, by for instance using irrigation or silvicultural technologies that modify the microclimate, such as moisture and temperature regimes (Mozny et al. 2009). However,

climate change may have effect on the global distribution of hop growing and may gradually lead to a change in the regionalization of hop production. These changes in cultivation and cropping practices are harder to set up on perennial crops as opposed to annual crops, thus requiring more time and greater investment in cultivar development and crop establishment.

Figure 7 sums up the different aspects of hop cultivation, previously detailed, and their impact on the content of cones in α -acids and in volatile compounds, as well on production yields. Faced with the challenge of global warming and the changing demands of the brewing industry, hop breeding remains a good lever for continuing the improvement of hop production. As mentioned before, the qualitative and quantitative composition of hops is strongly influenced by biotic factors, especially pest and disease infestations. They are also affected by pedoclimatic conditions (type of soil, amount of precipitation, sunshine, temperatures, wind) and by cultural practices (organic or conventional farming, fertilization, use of pesticides or IPM methods...). The combination of pedoclimatic conditions and cultural practices defines the terroir, which has a strong impact on all these closely connected parameters, and contributes to a special chemical signature of hop cones, which results in an impact on the final taste of the beer.

Acknowledgements First, we would like to gratefully acknowledge Dr. Peter Darby for the reading of this manuscript and for his invaluable advice, as well as Cassandra Harvey for English grammar corrections. We also warmly thank Dr. Josef Patzak for providing some personal pictures for Fig. 1. This work has been carried out in the framework of Feader project which is financed by the European Union and the French Region of Hauts-de-France. The authors gratefully thank the Region Hauts-de-France (Feder), the University of Lille (I-Site) and the “Fondation de la brasserie et de la malterie française” for the funding of the PhD fellow Anne-Sophie Paguet.

References

- Alderweireldt and Verzele (1964) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and the Analysis of the Alpha Acids of Hops. *Wallerstein Lab Commun* 2:19–28
- Allan-Perkins E, Maurer K, LaMondia J (2019) Guidelines for integrated pests management for hops in Connecticut. The Connecticut Agricultural experiment station 1057
- Almaguer C, Schönberger C, Gastl M et al (2014) A review: *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. *J Inst Brew*. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- American Society of Brewing Chemists (2007) *Methods of Analysis, Hops – 6A Alpha and beta acids by spectrophotometry*, 12 HopStorage Index 9th ed., The Society, St Paul, MN
- Assirelli A, Carbone K, Ciccoritti R (2020) Mechanical hop-picking solutions in Italian cultivated areas. *Sustainability* 12:5006. <https://doi.org/10.3390/su12125006>
- Astray G, Gullón P, Gullón B et al (2020) *Humulus lupulus* L. as a Natural Source of Functional Biomolecules. *Appl Sci* 10:5074. <https://doi.org/10.3390/app10155074>
- Barber A, Campbell CAM, Crane H et al (2003) Cost-benefits of reduced aphicide usage on dwarf hops susceptible and partially resistant to damson-hop aphid. *Ann Appl Biol* 143:35–44. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2003.tb00266.x>
- Barth-Haas Group (2021) Barth-Haas report Hops 2020–2021. https://www.barthhaas.com/fileadmin/user_upload/news/2019-07-23/barthreport20182019en.pdf. Accessed 23 July 2021
- Bassil NV, Gilmore B, Oliphant JM et al (2008) Genic SSRs for European and North American hop (*Humulus lupulus* L.). *Genet Resour Crop Evol* 55:959–969. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9303-9>
- Batista D, Fonseca S, Serrazina S (2008) Efficient and stable transformation of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica by particle bombardment. *Plant Cell Rep* 27:1185–1196. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0537-6>
- Bauerle WL (2019) Disentangling photoperiod from hop vernalization and dormancy for global production and speed breeding. *Sci Rep* 9:16003. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52548-0>
- Bavec F, Čeh Brežniko B, Brežnik M (2003) Hop yield evaluation depending on experimental plot area under different nitrogen management. *Plant Soil Environ* 49:163–167. <https://doi.org/10.17221/4108-PSE>
- Behre KE (1999) The history of beer additives in Europe - a review. *Veget Hist Archaeobot* 8:35–48
- Benitez JR, Forster A, Denis De Keukeleire, et al (1997). Hops and Hop Products. Hans Carl, Nürnberg, Duitlsland, pp. 185
- Bertelli D, Brighenti V, Marchetti L et al (2018) Nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography techniques for the characterization of bioactive compounds from *Humulus lupulus* L. (hop). *Anal Bioanal Chem* 410:3521–3531. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0851-y>
- Biendl M, Engelhard B, Forster A et al (2014) Hops: Their Cultivation. Fachverlag Hans Carl, Composition and Usage, p 335p
- Blancard D (2021) *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. Pourritures à Oomycètes. Ephytia INRAE. <http://ephytia.inra.fr/fr/CI/23063/Tropileg-Pourritures-a-Pythium-Phytophthora>
- Bocquet L, Sahpaz S, Hilbert JL et al (2018) *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochem Rev* 17:1047–1090. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y>

- Bocquet L, Sahpaz S, Rivière C (2018b) An Overview of the Antimicrobial Properties of Hop. In: Natural Antimicrobial Agents, Mérillon Jean-Michel, Rivière Céline. Springer International Publishing: Imprint: Springer, Cham, pp 31–54
- Bocquet L, Sahpaz S, Bonneau N et al (2019) Phenolic Compounds from *Humulus lupulus* as Natural Antimicrobial Products: New Weapons in the Fight against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* Strains. *Molecules* 24:1024. <https://doi.org/10.3390/molecules24061024>
- Bolton JL, Dunlap TL, Hajirahimkhan A et al (2019) The Multiple Biological Targets of Hops and Bioactive Compounds. *Chem Res Toxicol* 32:222–233. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00345>
- Boutain JR (2014) On the origin of hops: genetic variability, phylogenetic relationships, and ecological plasticity of humulus (cannabaceae). PhD thesis, University of Hawai, 196 p
- Brady JL, Scott NS, Thomas MR (1996) DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS). *Euphytica* 91:277–284. <https://doi.org/10.1007/BF00033088>
- Brendel S, Hofmann T, Granvogel M (2019) Characterization of Key Aroma Compounds in Pellets of Different Hop Varieties (*Humulus lupulus* L.) by Means of the Sensomics Approach. *J Agric and Food Chem* 67(43):12044–12053. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05174>
- Briggs D, Boulton C, Brookes P, Stevens R (2004) Chapter 7 Hops. *Brewing: Science and Practice*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp 227–254
- Bruneton J (2016) Pharmacognosie - phytochimie, plantes médicinales. Tec&Doc
- Caballero I, Blanco CA, Porrás M (2012) Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends Food Sci Technol* 26:21–30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.001>
- Calado LS, Lacerda ALF, Fiaux SB et al (2019) Low-cost fluorescence-based method for beer bitterness measurement. *J Food Eng* 262:9–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.015>
- Campbell CAM (2018) Influence of companion planting on damson hop aphid *Phorodon humuli*, two spotted spider mite *Tetranychus urticae*, and their antagonists in low trellis hops. *Crop Prot* 114:23–31. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.014>
- Canbaş A, Erten H, Özşahin F (2001) The effects of storage temperature on the chemical composition of hop pellets. *Process Biochem* 36:1053–1058. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00134-0)
- Carr N (2017) Medusa Hops: The Mythical Multihead Hop Variety. In: Kegerator.com. <https://learn.kegerator.com/medusa-hops/>. Accessed 16 Jun 2021
- Cavallini N, Savorani F, Bro R, Cocchi M (2021) A Metabolic approach to beer characterization. *Molecules* 26:1472. <https://doi.org/10.3390/molecules26051472>
- Čeh B (2014) Impact of slurry on the hop (*Humulus lupulus* L.) yield, its quality and N-min content of the soil. *Plant Soil Environ* 60:267–273. <https://doi.org/10.17221/66/2014-PSE>
- Čeh B, Naglič B, Oset Luskar M (2012) Hop (*Humulus lupulus* L.) cones mass and length at cv. Savinjski golding. *Hop Bulletin* 12–16
- Čerenak A, Satovic Z, Javornik B (2006) Genetic mapping of hop (*Humulus lupulus* L.) applied to the detection of QTLs for alpha-acid content. *Genome* 49:485–494. <https://doi.org/10.1139/g06-007>
- Čerenak A, Kralj D, Javornik B (2009) Compounds of essential oils as markers of hop resistance (*Humulus lupulus*) to powdery mildew (*Podosphaera macularis*). *Acta Agric Slov*. <https://doi.org/10.2478/v10014-009-0015-z>
- Čerenak A, Satovic Z, Jakše J et al (2009) Identification of QTLs for alpha acid content and yield in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica* 170:141–154. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9920-9>
- Čerenak A, Kolenc Z, Sehur P et al (2019) New Male Specific Markers for Hop and Application in Breeding Program. *Sci Rep* 9:14223. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50400-z>
- Clark SM, Vaitheeswaran V, Ambrose SJ et al (2013) Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*). *BMC Plant Biol* 13:12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-12>
- Coley-Smith JR (1964) Persistence and identification of downy mildew *Pseudoperonospora humuli* (Miy. and Tak.) Wilson in hop rootstocks. *Ann Appl Biol* 53:129–132. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1964.tb03786.x>
- Cortese M, Gigliobianco MR, Peregrina DV et al (2020) Quantification of phenolic compounds in different types of craft beers, worts, starting and spent ingredients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chrom A* 1612:460622. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460622>
- Cucu T, David F, Devos C, Sandra P (2021) Untargeted flavor profiling of lager beers by stir bar sorptive extraction – capillary gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry: High analytical performance with a green touch. *J Chromatogr A* 1647:462164. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462164>
- Dabbous-Wach A, Rodolfi M, Paolini J et al (2021) Characterization of wild Corsican hops and assessment of the performances of German hops in Corsican environmental conditions through a multidisciplinary approach. *Appl Sci* 11:3756. <https://doi.org/10.3390/app11093756>
- Dai X, Wang G, Yang DS et al (2010) TrichOME: a comparative omics database for plant trichomes. *Plant Physiol* 152:44–54. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145813>
- Darby P (2005) The history of hop breeding and development. In: *Brewery history*. <http://www.breweryhistory.com/journal/archive/121/bh-121-094.htm>. Accessed 2 June 2021
- Darby H (2011) Fertility guidelines for hops in the Northeast. University of Vermont
- Da Silva LA, Flumignan DL, Tininis AG et al (2019) Discrimination of Brazilian lager beer by 1H NMR spectroscopy combined with chemometrics. *Food Chem* 272:488–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.077>
- Decuyper L, Kaur G, Versyck C et al (2020) Expedient Synthesis of Lupulones and Their Derivatization to 2,8–7H-Dihydrochromen-7-ones. *ChemistryOpen* 9:442–444. <https://doi.org/10.1002/open.202000008>

- De Keukeleire J, Janssens I, Heyerick A et al (2007) Relevance of organic farming and effect of climatological conditions on the formation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and Xanthohumol in Hop (*Humulus lupulus* L.). *J Agric Food Chem* 55:61–66. <https://doi.org/10.1021/jf061647r>
- De Keukeleire J, Ooms G, Heyerick A et al (2003) Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). *J Agric Food Chem* 51:4436–4441. <https://doi.org/10.1021/jf034263z>
- Dhooghe L, Naessens T, Heyerick A et al (2010) Quantification of xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, and 6-prenylnaringenin in hop extracts and derived capsules using secondary standards. *Talanta* 83:448–456. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.041>
- Dietz C, Cook D, Wilson C et al (2020) Sensory properties of supercritical CO₂ fractions extracted from Magnum hop essential oil: Sensory properties of Magnum hop oil and its fractions. *J Inst Brew* 126:263–279. <https://doi.org/10.1002/jib.61>
- Doe PE, Menary RC (1979) Optimization of the hop drying process with respect to alpha acid content. *J Agric Eng Res* 24:233–248. [https://doi.org/10.1016/0021-8634\(79\)90066-0](https://doi.org/10.1016/0021-8634(79)90066-0)
- Donner P, Pokorný J, Ježek J et al (2020) Influence of weather conditions, irrigation and plant age on yield and alpha-acids content of Czech hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. *Plant Soil Environ* 66:41–46. <https://doi.org/10.17221/627/2019-PSE>
- Duarte IF, Barros AS, Belton P et al (2002) High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Characterization of Beer. *J Agric Food Chem* 50:2475–2481. <https://doi.org/10.1021/jf011345j>
- Dzingelevičius N, Maruška A, Ragažinskienė O, Obelevičius K (2011) Optimization of hop essential oil extraction by means of supercritical CO₂ *Biologija*. <https://doi.org/10.6001/biologija.v57i2.1830>
- EMA, CHMP (2011) Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr.2
- EMA, HMPC (2014) Community herbal monograph on *Humulus lupulus* L., flos. 7. EMA/HMPC/682384/2013
- Eriksen RL, Padgitt-Cobb LK, Townsend MS, Henning JA (2021) Gene expression for secondary metabolite biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.) leaf lupulin glands exposed to heat and low-water stress. *Sci Rep* 11:5138. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84691-y>
- EU Plant variety database (2021). https://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/search/public/index.cfm. Accessed 21 March 2022
- Evans R (2003) Hop Management in Water-Short Periods. <http://www.willingham-nurseries.co.uk/books/Hops/em4816.pdf>. Accessed 23 July 2021
- Eyres G, Dufour J-P (2009) Hop Essential Oil: Analysis, Chemical Composition and Odor Characteristics. In: *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, pp 239–254
- Fandiño M, Olmedo JL, Martínez EM et al (2015) Assessing and modelling water use and the partition of evapotranspiration of irrigated hop (*Humulus lupulus*), and relations of transpiration with hops yield and alpha-acids. *Ind Crops Prod* 77:204–217. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.042>
- FAO (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Crops and livestock products. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QLL>. Accessed 20 August 2021
- Farang MA, Porzel A, Schmidt J, Wessjohann LA (2012) Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *Metabolomics* 8:492–507. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0335-y>
- Fillaudeau L, Blanpain-Avet P (1999) Secteur brassicole - Caractéristiques technico-économiques. *Techniques de l'ingénieur*. 16. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/filiere-de-production-produits-d-origine-vegetale-42433210/secteur-brassicole-f6210/> Accessed 23 July 2021
- Gamache PA, Gamache, BJ, Gamache, SJ (2003) Patent N° US PP14,127 P2: Hop Plant Names “VGXP01”
- Gargani E, Faggioli F, Haegi A (2018) A survey on pests and diseases of Italian Hop crops. *Italus Hortus*. <https://doi.org/10.26353/j.itahort/2017.2.117>
- Gent DH, Ocamb CM, Farnsworth JL (2010) Forecasting and management of hop downy mildew. *Plant Dis* 94:425–431. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-4-0425>
- Gent DH, Grove GG, Nelson ME et al (2014) Crop damage caused by powdery mildew on hop and its relationship to late season management. *Plant Pathol* 63:625–639. <https://doi.org/10.1111/ppa.12123>
- Gent DH, Massie ST, Twomey MC, Wolfenbarger SN (2017) Adaptation to Partial Resistance to Powdery Mildew in the Hop Cultivar Cascade by *Podosphaera macularis* *Plant Dis* 101:874–881. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1753-RE>
- Gingrich C, Hart J, Christensen N (2000) Hops. *Fertilizer Guide* 79
- Giovenzana V, Beghi R, Guidetti R (2014) Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *J Food Eng* 142:80–86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.017>
- Goese M, Kammhuber K, Bacher A et al (1999) Biosynthesis of bitter acids in hops. A (13)C-NMR and (2)H-NMR study on the building blocks of humulone. *Eur J Biochem* 263:447–454. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00518.x>
- Gómez G, Pallás V (2007) Mature monomeric forms of Hop stunt viroid resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J* 51:1041–1049. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03203.x>
- Goettsch E (1991) Spice germplasm in Ethiopia. In: Engels JMM, Hawkes JG, Melaku W (eds) *Plant genetic resources of Ethiopia*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 123–130
- Grabowska-Joachimik A, Sliwinska E, Pigu M, Skomra U, Joachimik AJ (2006) Genome size in *Humulus lupulus* and *H. japonicus* siebold & zucc. (Cannabaceae). *Acta Soc Bot Pol* 75(3):8
- Grillakis MG (2019) Increase in severe and extreme soil moisture droughts for Europe under climate change. *Sci Total*

- Environ 660:1245–1255. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.001>
- Guimarães BP, Nascimento PGBD, Ghesti GF (2021) Intellectual property and plant variety protection: Prospective study on Hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. World Patent Inf 65:102041. <https://doi.org/10.1016/j.wpi.2021.102041>
- Gupta PK, Kumar J, Mir RR, Kumar A (2010) Marker-assisted selection as a component of conventional plant breeding. In: Janick J (ed) Plant Breeding Reviews. Wiley, Hoboken, pp 145–217
- Hadonou AM, Walden R, Darby P (2004) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for assessment of genetic variation of hops (*Humulus lupulus* L.). Mol Ecol Notes 4:280–282. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00641.x>
- Hoek AC, Hermans-Lokkerbol AC, Verpoorte R (2001) An improved NMR method for the quantification of alpha-acids in hops and hop products. Phytochem Anal 12:53–57
- Hao J, Speers RA, Fan H et al (2020) A Review of cyclic and oxidative bitter derivatives of alpha, Iso-alpha and beta-hop acids. J Am Soc Brew Chem 78:89–102. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1712641>
- Haunold A, Nickerson GB (1979) Hop yield stimulation by triploid males under field conditions. Crop Sci 19:27–31. <https://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183X001900010007x>
- Haunold A (1981) Hop Production, Breeding, and Variety Development in Various Countries. J Am Soc Brew Chem 39:27–34. <https://doi-org.ressources-electroniques.univ-lille.fr/>; <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-39-0027>
- Haunold A (1991) Cytology and Cytogenetics of Hops. In: Tsuchiya T, Gupta PK (eds) Developments in Plant Genetics and Breeding. Elsevier, 551–563. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-88260-8.50034-3>
- Hay FS (2009) Black Root Rot, Compendium of Hop Diseases, The American Phytopathological Society, Mahaffee W, Pethybridge SJ and Gent DH (ed), St Paul, Minnesota, USA, pp. 16–17. ISBN 978-0-89054-376-4
- Hejnák V, Hnilíčková H, Hnilička F (2016) Physiological response of juvenile hop plants to water deficit. Plant Soil Environ 61:332–338. <https://doi.org/10.17221/279/2015-PSE>
- Henning J, Steiner J, Hummer KE (2004) Genetic diversity among world hop accessions grown in the USA. Crop Sci. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0411>
- Henning JA, Townsend MS (2005) Field-based estimates of heritability and genetic correlations in hop. Crop Sci 45:1469–1475. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0360>
- Henning JA, Pethybridge SJ, Gent DH (2009) Hop cultivars and breeding. In: The American Phytopathological Society, St Paul, MN
- Henning JA, Townsend MS, Gent DH et al (2011) QTL mapping of powdery mildew susceptibility in hop (*Humulus lupulus* L.). Euphytica 180:411–420. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0403-4>
- Henning JA, Coggins J, Peterson M (2015) Simple SNP-based minimal marker genotyping for *Humulus lupulus* L. identification and variety validation. BMC Res Notes 8:542. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1492-2>
- Henning JA, Gent DH, Twomey MC et al (2015) Precision QTL mapping of downy mildew resistance in hop (*Humulus lupulus* L.). Euphytica 202:487–498. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1356-9>
- Henning J, Hill S, Darby P, Hendrix D (2017) QTL examination of a bi-parental mapping population segregating for “short-stature” in hop (*Humulus lupulus* L.). Euphytica 213:77. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1848-x>
- Henning JA, Gent DH, Townsend MS et al (2017) QTL analysis of resistance to powdery mildew in hop (*Humulus lupulus* L.). Euphytica 213:98. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1849-9>
- Hieronymus S (2012) Growing Hops. In: For the Love of Hops. pp 87–112
- Higgins D, Hausbeck M (2021) Susceptibility of hop cultivars and rootstock to downy mildew caused by *Pseudoperonospora humuli* HortScience 56(5):543–550. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15580-20>
- Hill ST, Sudarsanam R, Henning J, Hendrix D (2017) HopBase: a unified resource for *Humulus* genomics. Database. <https://doi.org/10.1093/database/bax009>
- Hnilíčková H, Novák V (2000) Accumulation of energy by non-irrigated and irrigated hop plants (*Humulus lupulus* L.). Rostl Výroba 46:465–469
- Hong K, Wang LM, Johnpaul A et al (2021) Key enzymes involved in the synthesis of hops phytochemical compounds: from structure, functions to applications. Int J Mol Sci 22:17. <https://doi.org/10.3390/ijms22179373>
- Hough JS, Briggs DE, Stevens R, Young TW (1982) The chemistry of hop constituents. In: Hough JS, Briggs DE, Stevens R, Young TW (eds) Malting and Brewing Science: Volume II Hopped Wort and Beer. Springer, Boston, pp 422–455
- Huber DM, Watson RD (1974) Nitrogen Form and Plant Disease. Annu Rev Phytopathol 12:139–165. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.12.090174.001035>
- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Guideline Q2(R1) (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ICH Secretariat, c/o IFPMA, Geneva
- IHGC (2021) International hop grower’s convention. Economic Commission. Summary reports. November 2020. http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2020_NOV_IHGC_EconCommReport.pdf. Accessed 23 July 2021
- IOVW (2016) International Organisation of Vine and Wine. <https://www.oiv.int/fr/statistics/research>. Accessed 20 Aug 2021
- Intelmann D, Haseleu G, Hofmann T (2009) LC-MS/MS quantitation of hop-derived bitter compounds in beer using the ECHO technique. J Agr Food Chem 57:1172–1182. <https://doi.org/10.1021/jf803040g>
- International Plant Name Index (IPNI) (2021). <https://www.ipni.org/>. Accessed 23 July 2021
- Jakš J, Kindlhofer K, Javornik B (2001) Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. Genome 44:773–782. <https://doi.org/10.1139/g01-071>
- Jakš J, Javornik B (2001) High throughput isolation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Mol Biol Rep 19:217–226. <https://doi.org/10.1007/BF02772893>
- Jakš J, Bandelj D, Javornik B (2002) Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.). Mol Ecol Notes

- 2:544–546. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00309.x>
- Jakše J, Satovic Z, Javornik B (2004) Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). Genome. <https://doi.org/10.1139/g04-054>
- Jakše J, Luthar Z, Javornik B (2008) New polymorphic dinucleotide and trinucleotide microsatellite loci for hop *Humulus lupulus* L. Mol Ecol Resour 8:769–772. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2007.02053.x>
- Jakše J, Radisek S, Pokorn T et al (2015) Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. Plant Pathol 64:831–842. <https://doi.org/10.1111/ppa.12325>
- Jaeger SR, Worch T, Phelps T et al (2020) Preference segments among declared craft beer drinkers: Perceptual, attitudinal and behavioral responses underlying craft-style vs. traditional-style flavor preferences. Food Quality Preference. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103884>
- Jelínek L, Sneiderger M, Karabin M, Dostalek P (2010) Comparison of Czech hop cultivars based on their contents of secondary metabolites. Czech J Food Sci 28:309–316. <https://doi.org/10.17221/65/2010-CJFS>
- Jelínek L, Dolečková M, Karabin M et al (2012) Influence of growing area, plant age, and virus infection on the contents of hop secondary metabolites. Czech J Food Sci 30:541–547. <https://doi.org/10.17221/50/2012-CJFS>
- Johnson DA, Engelhard B and Gent DH (2009). Downy Mildew. In Mahaffee W, Pethybridge SJ and Gent DH (Eds.), St. Paul, Minnesota: the American Phytopathological Society Compendium of Hop Diseases and Pests, 18–22
- Kaminski D, Gaweda K, Arczewska M et al (2017) A kinetic study of xanthohumol cyclization to isoxanthohumol - A role of water. J Mol Struct 2239:10–16. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.03.027>
- Karabín, M, Hudcova T, Jelínek L, Dostalek Pavel (2015) Bio-transformations and Biological Activities of Hop Flavonoids. Biotechnology Advances, BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss Biotechnology Symposium, 33 (6, Part 2): 1063–1090. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.009>
- Karabín M, Hudcová T, Jelínek L, Dostálek P (2016) Biologically active compounds from hops and prospects for their use. Compr Revi Food Sci Food Saf 15:542–567. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>
- Karlov GI, Danilova TV, Horlemann C, Weber G (2003) Molecular cytogenetics in hop (*Humulus lupulus* L.) and identification of sex chromosomes by DAPI-banding. Euphytica 132:185–190
- Karlsson Strese E-M, Lundström M, Hagenblad J, Leino MW (2014) Genetic diversity in remnant swedish hop (*Humulus lupulus* L.) yards from the 15th to 18th century. Econ Botany 68(3):231–245. <https://doi.org/10.1007/s12231-014-9273-8>
- Kenny ST (1990) Identification of U.S.-grown hop cultivars by hop acid and essential oil analyses. J Am Soc Brew Chem 48:3–8. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-48-0003>
- Killeen DP, Andersen DH, Beatson RA et al (2014) Vibrational spectroscopy and chemometrics for rapid, quantitative analysis of bitter acids in hops (*Humulus lupulus*). J Agric Food Chem 62:12521–12528. <https://doi.org/10.1021/jf5042728>
- Killeen DP, Watkins OC, Sansom CE (2017) Fast sampling, analyses and chemometrics for plant breeding: bitter acids, Xanthohumol and terpenes in Lupulin glands of hops (*Humulus lupulus*). Phytochem Anal 28(1):50–57. <https://doi.org/10.1002/pca.2642>
- Kishimoto T, Teramoto S, Fujita A, Yamada O (2021) Evaluation of components contributing to the international bitterness unit of wort and beer. J Am Soc Brew Chem 80:53–61. <https://doi.org/10.1080/03610470.2021.1878684>
- Koelling J, Coles MC, Matthews PD, Schwekendiek A (2012) Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus*. Mol Breeding 30:479–484. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9637-z>
- Koie K, Inaba A, Okada Y, et al (2005) Construction of the genetic linkage map and QTL analysis on hop (*Humulus lupulus*). Acta Hort 59–66. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.668.7>
- Korbecka-Glinka G, Skomra U, Olszak-Przybys H (2016) Cultivar identification in dry hop cones and pellets using microsatellite loci. Eur Food Res Technol 242:1599–1605. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2715-z>
- Koren J (2007) Influence of plantation row spacing on quality and yield of hops. Plant Soil Environ 53:276–282. <https://doi.org/10.17221/2219-PSE>
- Korpelainen H, Pietiläinen M (2021) Hop (*Humulus lupulus* L.): Traditional and Present Use, and Future Potential. Econ Bot. <https://doi.org/10.1007/s12231-021-09528-1>
- Krofta K, Ježek J (2010) The effect of time of cutting on yield and the quality of the hop hybrid varieties Harmonie, Rubin and Agnus. Plant Soil Environ 56:564–569. <https://doi.org/10.17221/187/2010-PSE>
- Krofta K (2011) Comparison of quality parameters of Czech and foreign hop varieties. Plant Soil Environ 49:261–268. <https://doi.org/10.17221/4123-PSE>
- Kučera J, Krofta K (2009) Mathematical model for prediction of alpha acid contents from meteorological data for “Saaz” aroma variety. Acta Hort 131–140. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.848.14>
- Kunej U, Mikulič-Petkovšek M, Radišek S, Štajner N (2020) Changes in the Phenolic Compounds of Hop (*Humulus lupulus* L.) Induced by Infection with Verticillium nonalfalfae, the Causal Agent of Hop Verticillium Wilt. Plants 9:841. <https://doi.org/10.3390/plants9070841>
- Lachenmeier DW, Frank W, Humpfer E et al (2004) Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. Eur Food Res Tech 220:215–221. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1070-7>
- Lafontaine S, Shellhammer TH (2019) How Hoppy Beer Production Has Redefined Hop Quality and a Discussion of Agricultural and Processing Strategies to Promote It. TQ 56:1–12. <https://doi.org/10.1094/TQ-56-1-0221-01>
- Lafontaine S, Varnum S, Roland A et al (2019) Impact of harvest maturity on the aroma characteristics and chemistry of Cascade hops used for dry-hopping. Food Chem 278:228–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.148>
- Lewis WJ, van Lenteren JC, Phatak SC, Tumlinson JH (1997) A total system approach to sustainable pest management. Proc Natl Acad Sci U S A 94:12243–12248

- Li H, Takahashi Y, Kumagai M et al (2009) A Chemometrics approach for distinguishing between beers using near infrared spectroscopy. *J near Infrared Spectroscop* 17:69–76. <https://doi.org/10.1255/jnirs.830>
- Li L (2007) *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* on hop. *EPPO Bulletin* 8
- Likens ST, Nickerson GB, Zimmermann CE (1970) An index of deterioration in hops (*Humulus lupulus*). *Am Soc Brew Chem*, 68–74
- Liu Z, Wang L, Liu Y (2018) Rapid differentiation of Chinese hop varieties (*Humulus lupulus*) using volatile fingerprinting by HS-SPME-GC-MS combined with multivariate statistical analysis. *J Sci Food Agric* 98:3758–3766. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8889>
- Lorencová EK, Loučková B, Vačkář D (2014) Perceptions of climate change: Hop growers in the Czech Republic I BASE. In: BASE. <https://base-adaptation.eu/perceptions-climate-change-hop-growers-czech-republic>. Accessed 23 May 2021
- Lorenzana A, Hermoso-de-Mendoza A, Seco MV, Casquero PA (2013) Population dynamics and integrated control of the damson-hop aphid *Phorodon humuli* (Schrank) on hops in Spain. *Span J Agric Res* 11:505–517
- Machado M, Nunes Gomes E, Francisco F et al (2018) Micro-propagation and establishment of *Humulus Lupulus* L. plantlets under field conditions at southern Brazil. *J Agric Sci* 10:275. <https://doi.org/10.5539/jas.v10n7p275>
- MacKinnon D, Pavlovič V, Čeh B et al (2020) The impact of weather conditions on alpha-acid content in hop (*Humulus lupulus* L.) cv. Aurora. *Plant Soil Environ* 66:519–525. <https://doi.org/10.17221/344/2020-PSE>
- Mafakheri M, Kordrostami M, Rahimi M, Matthews PD (2020) Evaluating genetic diversity and structure of a wild hop (*Humulus lupulus* L.) germplasm using morphological and molecular characteristics. *Euphytica* 216:58. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02592-z>
- Mahaffee WF, Pethybridge SJ, Gent DH (2009) Compendium of hop diseases and pests. Compendium of hop diseases and pests
- Marceddu R, Carrubba A, Sarno M (2020) Cultivation trials of hop (*Humulus lupulus* L.) in semi-arid environments. *Heliyon* 6:e05114. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05114>
- Marquez-Molins J, Gomez G, Pallas V (2021) Hop stunt viroid: A polyphagous pathogenic RNA that has shed light on viroid–host interactions. *Mol Plant Pathol* 22:153–162. <https://doi.org/10.1111/mpp.13022>
- Martins ZE, Machado JC, Cunha SC et al (2020) A chemometric approach to compare Portuguese native hops with worldwide commercial varieties. *J Chemom*. <https://doi.org/10.1002/cem.3285>
- Matsui H, Inui T, Oka K, Fukui N (2016) The influence of pruning and harvest timing on hop aroma, cone appearance, and yield. *Food Chem* 202:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.058>
- McAdam EL, Freeman JS, Whittock SP et al (2013) Quantitative trait loci in hop (*Humulus lupulus* L.) reveal complex genetic architecture underlying variation in sex, yield and cone chemistry. *BMC Genom* 14:360. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-360>
- McCallum JL, Nabuurs MH, Gallant ST et al (2019) Phytochemical characterization of wild hops (*Humulus lupulus* ssp. *lupuloides*) germplasm resources from the Maritimes region of Canada. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01438>
- Medusa (2021) <https://www.neomexicanus.com/documents/medusa-fact-sheet.pdf>. Accessed 23 July 2021
- Meier U (1997) Phenotypical growth stages and BBCH-identification keys of hop (*Humulus lupulus* L.). In: Growth Stages of Mono- and Dicotyledonous Plants, Blackwell Wissenschafts-Verlag. Open Agrar Repository, Berlin, Wein, pp 97–101
- Mishra AK, Kocábek T, Nath VS et al (2020) Dissection of dynamic transcriptome landscape of leaf, bract, and lupulin gland in hop (*Humulus lupulus* L.). *Int J Mol Sci* 21:233. <https://doi.org/10.3390/ijms21010233>
- Molyneux RJ, Wong YI (1975) Nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of alpha- and beta-acid homolog composition in hops. *J Agric Food Chem* 23:1201–1204. <https://doi.org/10.1021/jf60202a012>
- Mongelli A, Rodolfi M, Ganino T et al (2016) Italian hop germplasm: Characterization of wild *Humulus lupulus* L. genotypes from Northern Italy by means of phytochemical, morphological traits and multivariate data analysis. *Ind Crops Prod* 70:16–27. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.036>
- Morcol TB, Wysocki K, Sankaran RP et al (2020) UPLC-QToF-MS^E metabolomics reveals changes in leaf primary and secondary metabolism of hop (*Humulus lupulus* L.) plants under drought stress. *J Agric Food Chem* 68:14698–14708. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05987>
- Morcol TB, Matthews PD, Kennelly EJ (2021) Differences in Leaf Chemistry and Glandular Trichome Density between Wild Southwestern American Hop (*Humulus neomexicanus*) and Commercial Hop Cultivars. *J Agric Food Chem* 69:7798–7814. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02710>
- Mozny M, Tolasz R, Nekovar J et al (2009) The impact of climate change on the yield and quality of Saaz hops in the Czech Republic. *Agric Forest Meteorol* 149:913–919. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2009.02.006>
- Murakami A, Darby P, Javornik B et al (2006) Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus* L. *Heredity* 97:66–74. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800839>
- Nakawuka P, Peters TR, Kenny S, Walsh D (2017) Effect of deficit irrigation on yield quantity and quality, water productivity and economic returns of four cultivars of hops in the Yakima Valley, Washington State. *Ind Crops Prod* 98:82–92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.037>
- Natsume S, Takagi H, Shiraishi A et al (2015) The Draft Genome of Hop (*Humulus lupulus*), an Essence for Brewing. *Plant Cell Physiol* 56:428–441. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu169>
- Nelson GC, Rosegrant M, Koo J, et al (2009) Climate change: Impact on agriculture and costs of adaptation. Washington D.C
- Nesvadba V (2016) Breeding Process Aimed at Dwarf Hops. *Kvasný Průmysl* 62:166–172. <https://doi.org/10.18832/kp2016022>
- Neve RA (1958) Sex Chromosomes in the Hop *Humulus lupulus* Nature. <https://doi.org/10.1038/1811084b0>

- Neve RA (1991) Hops. Springer, Netherlands, p 266
- Nickerson GB, Likens ST (1979) Hop storage index. *J Am Soc Brew Chem* 37:184–187. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-37-0184>
- Nikolić D, van Breemen RB (2013) Analytical methods for quantitation of prenylated flavonoids from hops. *Curr Anal Chem* 9:71–85
- O’Neal S (2015) Pest Management Strategic Plan. Clarke D., U.S. Hops. Editor, University of California (Davis):112
- Padgitt-Cobb LK, Kingan SB, Henning JA (2020) Genomic analysis of powdery mildew resistance in a hop (*Humulus lupulus* L.) bi-parental population segregating for “R6-locus.” *Euphytica* 216:10. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2543-x>
- Padgitt-Cobb LK, Kingan SB, Wells J et al (2021) A draft phased assembly of the diploid Cascade hop (*Humulus lupulus*) genome. *Plant Genome* 14. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20072>
- Palmer JJ (2006) How to brew: everything you need to know to brew beer right for the first time. Brewers Publications, Boulder
- Palmioli A, Alberici D, Ciaramelli C, Airoidi C (2020) Metabolomic profiling of beers: Combining 1H NMR spectroscopy and chemometric approaches to discriminate craft and industrial products. *Food Chem* 327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127025>
- Papet Y, Brunet B, Mura P (2010) *Headspace* (HS) et micro-extraction en phase solide (SPME). *Théorie Et Applications Ann Toxicol Anal* 22:75–79. <https://doi.org/10.1051/ata/2010022>
- Parker JS, Clark MS (1991) Dosage sex-chromosome systems in plants. *Plant Sci* 80:79–92. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(91\)90274-C](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90274-C)
- Patzak J, Nesvadba V, Krofta K et al (2010) Evaluation of genetic variability of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Canada and the Caucasus region by chemical and molecular methods. *Genome* 53:545–557. <https://doi.org/10.1139/G10-024>
- Patzak J (2011) Characterization of Czech hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes by molecular methods. *Plant Soil Environ* 48:343–350. <https://doi.org/10.17221/4378-PSE>
- Patzak J, Henychova A, Kro K (2012) Study of Molecular Markers for Xanthohumol and DMX Contents in Hop (*Humulus lupulus* L.) by QTLs Mapping Analysis. *Brew Sci* 65:96–102
- Patzak J, Krofta K, Henychová A, Nesvadba V (2015) Number and size of lupulin glands, glandular trichomes of hop (*Humulus lupulus* L.), play a key role in contents of bitter acids and polyphenols in hop cone. *Int J Food Sci Technol* 50:1864–1872. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12825>
- Peacock VE, McCarty P (1992) Varietal identification of hops and hop pellets. *MBAA* 29(3):81–85
- Peredo EL, Angeles Revilla M, Reed BM et al (2010) The influence of European and American wild germplasm in hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. *Genet Resour Crop Evol* 57:575–586. <https://doi.org/10.1007/s10722-009-9495-2>
- Pethybridge SJ, Wilson CR, Hay FS et al (2002) Effect of viruses on agronomic and brewing characteristics of four hop (*Humulus lupulus*) cultivars in Australia. *Ann Appl Biol* 140:97–105. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2002.tb00161.x>
- Pethybridge SJ, Hay FS, Barbara DJ et al (2008) Viruses and viroids infecting hop: significance, epidemiology, and management. *Plant Dis* 92:324–338. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-3-0324>
- Pistelli L, Ferri B, Cioni PL et al (2018) Aroma profile and bitter acid characterization of hop cones (*Humulus lupulus* L.) of five healthy and infected Polish cultivars. *Ind Crops Prod* 124:653–662. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.009>
- Pitra N, Matthews P, Coles M (2013) Next Generation Sequencing for a Plant of Great Tradition: Application of NGS to SNP Detection and Validation in Hops (*Humulus lupulus* L.) - Hop Special. *Brew Sci* 66:185–191
- Plants of the world online (2021) <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30027247-2>. Accessed 23 July 2021
- Pokrivčák J, Supeková SC, Lančarič D et al (2019) Development of beer industry and craft beer expansion. *J Food Nutr Res* 58:13
- Polley A, Ganai MW, Seigner E (1997) Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. *Genome* 40:357–361. <https://doi.org/10.1139/g97-048>
- Prat R, Rubinstein J-P (2016) Arbres et arbustes: le houblon (*Humulus lupulus*). Biologie et Multimédia - Sorbonne Université - UFR des Sciences de la Vie
- Prencipe FP, Brighenti V, Rodolfi M et al (2014) Development of a new high-performance liquid chromatography method with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection for the metabolite fingerprinting of bioactive compounds in *Humulus lupulus* L. *J Chrom A* 1349:50–59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.097>
- Probst C, Nelson ME, Grove GG et al (2016) Hop powdery mildew control through alteration of spring pruning practices. *Plant Dis* 100:1599–1605. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1127-RE>
- Progar V, Jakše J, Štajner N et al (2017) Comparative transcriptional analysis of hop responses to infection with *Verticillium nonalfalfae*. *Plant Cell Rep* 36:1599–1613. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2177-1>
- Purayannur S, Gent DH, Miles TD et al (2021) The hop downy mildew pathogen *Pseudoperonospora humuli*. *Molecular Plant Pathol* 22:755–768. <https://doi.org/10.1111/mpp.13063>
- Purdy V, Kebede B, Beaston R et al (2021) Differences in New Zealand hop cultivars based on their unique volatile compounds: an integrated fingerprinting and chemometrics approach. *Foods* 10:414. <https://doi.org/10.3390/foods10020414>
- Rahman A, Góngora-Castillo E, Bowman MJ et al (2019) Genome Sequencing and Transcriptome Analysis of the Hop Downy Mildew Pathogen *Pseudoperonospora humuli* Reveal Species-Specific Genes for Molecular Detection. *Phytopathol* 109:1354–1366. <https://doi.org/10.1094/PHTO-11-18-0431-R>
- Ramírez A, Viveros JM (2021) Brewing with *Cannabis sativa* vs. *Humulus lupulus*: a review. *J Inst Brew jib*.654. <https://doi.org/10.1002/jib.654>

- Raut S, von Gersdorff GJE, Münsterer J et al (2020) Impact of process parameters and bulk properties on quality of dried hops. *Processes* 8:1507. <https://doi.org/10.3390/pr8111507>
- Rígr A, Faberová I (2000). *Klasifikátor descriptor list Genus Humulus L.* Praha: N.p
- Riccioni C, Belfiori B, Sileoni V et al (2021) High genetic and chemical diversity of wild hop populations from Central Italy with signals of a genetic structure influenced by both sexual and asexual reproduction. *Plant Sci* 304. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110794>
- Rodda LN, Gerostamoulos D, Drummer OH (2013) The rapid identification and quantification of iso- α -acids and reduced iso- α -acids in blood using UHPLC-MS/MS: validation of a novel marker for beer consumption. *Anal Bioanal Chem* 405:9755–9767. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7413-0>
- Rodolfi M, Silvanini A, Chiancone B et al (2018) Identification and genetic structure of wild Italian *Humulus lupulus* L. and comparison with European and American hop cultivars using nuclear microsatellite markers. *Gen Res Crop Evol* 65:1405–1422. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0622-9>
- Rodolfi M, Chiancone B, Liberatore CM et al (2019) Changes in chemical profile of Cascade hop cones according to the growing area. *J Sci Food Agric* 99:6011–6019. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9876>
- Rossbauer G, Buhr L, Hack H, et al (1995) Pheanologische Entwicklungsstadien von KulturHopfen (*Humulus lupulus* L.). In: *Growth Stages of Mono- and Dicotyledonous Plants*. pp 249–252
- Rossini F, Virga G, Loreti P et al (2021) Hops (*Humulus lupulus* L.) as a novel multipurpose crop for the Mediterranean region of Europe: challenges and opportunities of their cultivation. *Agriculture* 11:484. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060484>
- Royle DJ (1968) Hop Black Root-rot (*Phytophthora citricola* Sawada) in England. *Plant Pathol* 17:36–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1968.tb00413.x>
- Salanță L-C, Tofană M, Socaci S et al (2016) Determination of volatiles in hops from Romania by solid phase Fiber microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Lett* 49:477–487. <https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1075129>
- Salmon ES, Beard FH, Hatton RG (1943) The merits of the new varieties of hops. *J Instit Brew* 49:29–33. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1943.tb01208.x>
- Santagostini L, Caporali E, Giuliani C et al (2020) *Humulus lupulus* L. cv. Cascade grown in Northern Italy: morphological and phytochemical characterization. *Plant Biosyst* 154:316–325. <https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1610111>
- Srećec S, Rezić T, Šantek B et al (2008) Influence of hops pellets age on α -acids, utilization and organoleptic quality of beer. *Agric Consp Sci* 73:103–107
- Schindler R, Sharrett Z, Perri MJ, Lares M (2019) Quantification of α -acids in fresh hops by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *ACS Omega* 4:3565–3570. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00016>
- Schönberger C, Kosteletzky T (2011) 125th anniversary review: the role of hops in brewing. *J Instit Brew* 117:259–267. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x>
- Seefelder E, Schweizer S (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hop *Humulus lupulus* as determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. *Plant Breed* 119:146–152. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00500.x>
- Seefelder S, Ehrmaier H, Schweizer G, Seigner E (2000) Male and female genetic linkage map of hops, *Humulus lupulus* Plant Breed 119:249–255. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00469.x>
- Seigner E, Lutz A, Oberhollenzer K, et al (2009) Breeding of hop varieties for the future. *Acta Hort* 49–58. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.848.4>
- Shephard HL, Parker JS, Darby P, Ainsworth CC (2000) Sexual development and sex chromosomes in hop. *New Phytol* 148:397–411. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00771.x>
- Sinotô Y (1929) Chromosome studies in some dioecious plants, with special reference to the allosomes. *Cytologia* 1:109–191. <https://doi.org/10.1508/cytologia.1.109>
- Sirrine R, Rothwell N, Lizott E, et al (2010) Sustainable Hop Production in the Great Lakes Region. Michigan States University
- Skendzic S, Zovko M, Zivkovic IP et al (2021) The impact of climate change on agricultural insect pests. *Insects* 12:440. <https://doi.org/10.3390/insects12050440>
- Slavík L (2000) Utilization of trickle irrigation and microsprinkling of hop irrigation. *Rostlin Vyroba* 46:457–463
- Small E (1978) A Numerical and nomenclatural analysis of Morpho-geographic taxa of *Humulus*. *Syst Bot* 3:37. <https://doi.org/10.2307/2418532>
- Small E (1981) A numerical analysis of morpho-geographic groups of cultivars of *Humulus lupulus* based on samples of cones. *Can J Bot* 59:311–324. <https://doi.org/10.1139/b81-044>
- Solberg SØ, Brantestam AK, Kylin M et al (2014) Genetic variation in Danish and Norwegian germplasm collections of hops. *Biochem Syst Ecol* 52:53–59. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.12.014>
- Stajner N, Jakše J, Kozjak P, Javornik B (2005) The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus Lupulus* L.). *Plant Sci* 168(1):213–221. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.031>
- Statista (2020) Beer Report 2020. <https://www.statista.com/study/48816/beer-report/>. Accessed 23 July 2021
- Statista (2021) Global market size of non-alcoholic beer 2016–2024. <http://www.statista.com/statistics/1091389/non-alcoholic-beer-market-size-worldwide/>. Accessed 22 May 2021
- Stavri M, Schneider R, O'Donnell G et al (2004) The antimycobacterial components of hops (*Humulus lupulus*) and their dereplication. *Phytother Res* 18:774–776. <https://doi.org/10.1002/ptr.1527>
- Stevens JF, Page JE (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* 65:1317–1330. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>
- Steenackers B, De Cooman L, De Vos D (2015) Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process:

- a review. *Food Chem* 172:742–756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.139>
- Sturm B, Raut S, Kulig B et al (2020) In-process investigation of the dynamics in drying behavior and quality development of hops using visual and environmental sensors combined with chemometrics. *Comput Electron Agric* 175. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105547>
- Su X, Yin Y (2021) Aroma characterization of regional Cascade and Chinook hops (*Humulus lupulus* L.). *Food Chem* 364:130410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130410>
- Sullivan DM, Hart JM, Christensen NW (1999) Nitrogen Uptake and Utilization by Pacific Northwest Crops. 19
- Svoboda P, Hniličková H, František Hnilička (2008) Changes in yield and quality of hop depending on the irrigation. Conference: VII. Alps-Adria Scientific Workshop. *Cereal Res Comm* 36: supplementum part II. <https://doi.org/10.13140/2.1.1407.6801>
- Tanaka Y, Yanagida A, Komeya S et al (2014) Comprehensive separation and structural analyses of polyphenols and related compounds from bracts of hops (*Humulus lupulus* L.). *J Agric Food Chem* 62:2198–2206. <https://doi.org/10.1021/jf405544>
- Taniguchi Y, Matsukura Y, Ozaki H et al (2013) Identification and quantification of the oxidation products derived from α -acids and β -acids during storage of hops (*Humulus lupulus* L.). *J Agric Food Chem* 61:3121–3130. <https://doi.org/10.1021/jf3047187>
- Tembrock LR, Mc Aleer JM, Giligan TM (2016) A revision of native North American *Humulus* (Cannabaceae). *J Bot Res* 10(1):11–30
- Townsend MS, Henning JA (2005) Potential heterotic groups in hop as determined by AFLP analysis. *Crop Sci* 45:1901–1907. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.0688>
- Trojak-Goluch A, Skomra U (2018) Breeding of triploid common hop cultivars (*Humulus lupulus* L.). *Polish J Agron* 34:3–10. <https://doi.org/10.26114/PJA.IUNG.357.2018.34.01>
- Trojak-Goluch A, Skomra U (2020) Ploidy variation and agronomic performance of F1 hybrids of tetraploid and diploid forms of *Humulus lupulus* L. *Breed Sci* 70:176–182. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.19102>
- Tsurumaru Y, Sasaki K, Miyawaki T et al (2012) HIPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops. *Biochem Biophys Res Comm* 417:393–398. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.125>
- Turechek WW, Mahaffee WF, Ocamb CM (2001) Development of management strategies for hop powdery mildew in the Pacific Northwest. *Plant Health Progress*. <https://doi.org/10.1094/PHP-2001-0313-01-RS>
- Turner SF, Benedict CA, Darby H et al (2011) Challenges and opportunities for organic hop production in the united states. *Agron J* 103:1645–1654. <https://doi.org/10.2134/agronj2011.0131>
- Tyrrell E, Archer R, Skinner GA et al (2010) Structure elucidation and an investigation into the *in vitro* effects of hop acids on human cancer cells. *Phytochem Lett* 3:10–23. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2009.10.006>
- Undas AK, Weihrauch F, Lutz A et al (2018) The use of metabolomics to elucidate resistance markers against damson-hop aphid. *J Chem Ecol* 44:711–726. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0980-y>
- Uštar-Vozlič J, Javornik B (1999) Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. *Plant Breed* 118:175–181. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.1999.118002175.x>
- UPOV (2006) International Union for the Protection of New Varieties of Plants: Hop. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability
- USDA (2021) <https://plants.usda.gov/>. Accessed 21 July 2021
- Van Cleemput M, Cattoor K, De Bosscher K et al (2009) Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *J Nat Prod* 72:1220–1230. <https://doi.org/10.1021/np800740m>
- Van Holle A, Landschoot AV, Roldán-Ruiz I et al (2017) The brewing value of Amarillo hops (*Humulus lupulus* L.) grown in northwestern USA: A preliminary study of terroir significance. *J Inst Brew* 123:312–318. <https://doi.org/10.1002/jib.433>
- Van Holle A, Muylle H, Ruttink T et al (2019) Single Nucleotide Polymorphisms and Biochemical Markers As Complementary Tools To Characterize Hops (*Humulus lupulus* L.) in Brewing Practice. *J Agric Food Chem* 67:3761–3771. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00816>
- Vázquez Loureiro P, Hernández Jiménez I, Sendón R et al (2019) Determination of Xanthohumol in Hops, Food Supplements and Beers by HPLC. *Foods* 8:435. <https://doi.org/10.3390/foods8100435>
- von Bingen H, Throop P (1998) Hildegard von Bingen's Physica: the complete English translation of her classic work on health and healing. Healing Arts Press, Rochester
- Walsh DB, O'Neal SD, George AE et al (2016) Evaluation of pesticide residues from conventional, organic, and non-treated hops on conventionally hopped, late-hopped, and wet-hopped beers. *J Am Soc Brew Chem* 74:53–56. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2016-1115-02>
- Weihrauch F (2005) Evaluation of a damage threshold for two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), in hop culture. *Ann Appl Biol* 146:501–509. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.040163.x>
- Weihrauch F, Baumgartner A, Laupheimer S, et al (2019) Hop-flea beetle revisited: In search for attractants. Proceedings of the Scientific-Technical Commission I.H.G.C. Bischoffsheim, Alsace, France, 07–11 July 2019, 70 - 70
- Winge Ö (1929) On the nature of sex chromosome in *Humulus*. *Hereditas* 12:53–63. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1929.tb02497.x>
- Wolfenbarger SN, Eck EB, Gent DH (2014) Characterization of resistance to powdery mildew in the hop cultivars newport and comet. *Plant Health Progr* 15:55–56. <https://doi.org/10.1094/PHP-BR-13-0129>
- World Flora Online (WFO) 2021. <http://www.worldfloraonline.org>. Accessed on 19 July 2021
- Yamauchi H, Mukouzaka Y, Taniguchi T et al (2014) Newly developed SNP-based identification method of hop varieties. *J Am Soc Brew Chem* 72:239–245. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2014-1006-01>
- Zanolli P, Zavatti M (2008) Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 116:383–396. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>

- Zattler F, Jehl J (1962) On the influence of atmospheric conditions on yield and quality of the hops in the Hallertau in the period 1926–1961. *Hopfen-Rundschau* 13:61–64
- Zhang D, Easterling KA, Pitra NJ et al (2017) Non-Mendelian single-nucleotide polymorphism inheritance and atypical meiotic configurations are prevalent in hop. *Plant Genome*. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.04.0032>
- Zurbier KWM, Fung S-Y, Scheffer JJC, Verpoorte R (1998) In-vitro prenylation of aromatic intermediates in the

biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus* *Phytochemistry* 49:2315–2322. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00179-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00179-4)

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Partie B. Concepts théoriques et outils techniques pour l'investigation de la diversité sauvage

Cette partie bibliographique aborde les concepts théoriques et techniques des différents champs disciplinaires développés au cours de ce travail de recherche, en génétique des populations, en phytochimie, en analyse sensorielle et enfin en mathématiques appliquées.

A. ANALYSE ET CARACTÉRISATION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

1. Outils d'analyse de la diversité génétique

1.1. Notion de polymorphisme

Comme l'a théorisé Darwin dès 1859 dans son ouvrage *L'origine des espèces*, dans lequel il détaille ses observations et ses déductions permettant de mettre en lumière l'évolution biologique, la biodiversité varie au cours du temps (Darwin 1859). Elle résulte d'une histoire passée dirigée par différentes forces évolutives qui permettent aux espèces de s'adapter aux modifications environnementales par le biais de l'évolution. La variabilité constitue le fondement de l'évolution. La reproduction est non seulement source de multiplication, mais également source de diversification des individus. La fréquence des allèles transmis au cours de ces processus et leur répartition spatiale changent au cours du temps. Il en résulte un polymorphisme génétique au sein des populations, qui constituent un véritable réservoir d'allèles. A chaque génération, l'environnement opère un tri au sein de cette diversité allélique, ce qui a été théorisé par Darwin comme étant la sélection naturelle (Darwin 1859 ; Peycru et al. 2014).

La génétique des populations permet d'étudier ces variations de la séquence nucléotidique, dit « polymorphisme ». Pour comprendre la structuration génétique d'une population, il s'agit donc de caractériser sa structuration génétique pour un locus. La structure génotypique d'une population correspond à l'ensemble des fréquences génotypiques. La fréquence génotypique du génotype AA, notée $f(AA)$ est la proportion d'individus avec le génotype AA. Il s'exprime par la formule (Peycru et al.

$$2014b) : f(AA) = \frac{\text{nombre d'individus avec le génotype AA}}{\text{nombre d'individus total}}.$$

À l'échelle de la population, la structure génétique correspond à la fréquence des différents génotypes, ou des fréquences alléliques pour différents locus. Le polymorphisme allélique résulte de différents mécanismes évolutifs (recombinaison, mutation). La composition génétique des populations est liée à des processus intra- et inter-population, telles que la sélection naturelle, la dérive génétique, la reproduction et la migration (Peycru et al. 2014a).

La relation entre le phénotype P et le génotype G d'un individu est souvent conceptualisée par l'équation $P = G + E$, où E représente l'effet de l'environnement sur le phénotype, considéré la plupart du temps comme aléatoire (Kawecki et Ebert 2004). Ces variations définissent le polymorphisme génétique, qui peut être étudié en utilisant des marqueurs.

1.2. Les marqueurs génétiques

Plusieurs types de marqueurs moléculaires ont été développés pour étudier le houblon dans le cadre d'études de génétique des populations, d'identification d'espèces, d'études de polymorphisme ou de cartographies génétiques. Un marqueur moléculaire est un locus qui donne des informations sur le génotype de l'individu qui le porte. Un bon marqueur doit être (Idrees et Irshad 2014) :

- neutre : ses différents allèles n'ont pas d'effet sur le phénotype de l'individu ;
- polymorphe : possède de nombreux allèles (multiallélique) permettant de caractériser les différents individus ;
- codominant : l'individu hétérozygote peut être distingué car il présente simultanément les caractères des ses parents homozygotes ;
- monocus : être situé sur une seule partie du génome ;
- distribué régulièrement le long du génome : plus la couverture du génome en marqueurs est dense et bien répartie, meilleure sera l'évaluation de la région à approfondir.

Le nombre de ces marqueurs est en théorie illimité. Grâce à eux, il est possible d'établir l'empreinte génétique d'une plante, c'est-à-dire de caractériser des individus et des variétés en vue de leur protection et de leur classification. Ils permettent également de mettre en évidence et de suivre les gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt agronomique (Idrees et Irshad 2014). Ils sont également utiles à la gestion des ressources génétiques *ex-situ* dans le but d'étudier la diversité et la conservation des espèces menacées (van Tienderen et al. 2002).

1.2.1. *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)*

Cette méthode permet de mettre en évidence un polymorphisme par digestion spécifique de l'ADN génomique par des enzymes de restriction. Des adaptateurs sont ensuite liés aux extrémités des fragments de restriction générés puis amplifiés par PCR (Vos et al. 1995). La révélation du polymorphisme est du type présent/absent, et est réalisée avec fluorochrome ou par coloration au nitrate d'argent. C'est une technique complexe à mettre en œuvre mais néanmoins très informative et reproductible. Elle est multi-locus et ne nécessite pas de connaissance du génome. En revanche, l'analyse ne porte que sur les polymorphismes dominants.

1.2.2. *Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)*

L'analyse du polymorphisme peut être réalisée grâce à l'amplification aléatoire de fragments d'ADN par des amorces de 10 paires de bases dont la séquence a été définie arbitrairement. Elle ne cible donc pas de région particulière (Williams et al. 1990). C'est une méthode multi-locus simple à mettre en œuvre, qui ne nécessite pas de connaissance du génome, et qui permet une meilleure détection du polymorphisme que le RFLP. En revanche, cette technique est très faiblement reproductible et ne permet de détecter que des marqueurs dominants (Lynch et Milligan 1994).

1.2.3. *Les microsatellites*

Les microsatellites, également appelés SSR (*Single Sequence Repeat*) ou STS (*Sequence Tagged Site*), sont des séquences d'ADN composées de motifs de 2 à 6 nucléotides répétés en tandem un grand nombre de fois, pouvant aller jusqu'à plusieurs mégabases (Charlesworth, Sniegowski, et Stephan, 1994) et pouvant être classées en fonction du type de répétition (Urquhart et al. 1994). Ces séquences en tandem sont abondantes et réparties au hasard dans les régions non codantes des génomes des eucaryotes. Les marqueurs microsatellites présentent un fort polymorphisme en raison de la variation du nombre de répétitions du motif qui les composent (**Figure 32**). Ils présentent des propriétés de transmission mendélienne et de codominance. La possibilité d'automatiser les analyses font de ces marqueurs des outils particulièrement utilisés (Stajner et al. 2005 ; Peredo et al. 2005). En revanche, il est nécessaire de connaître le génome de l'organisme afin de concevoir les amorces spécifiques, qui correspondent aux séquences d'ADN bordant le microsatellite. Le développement de cette méthode peut être long et complexe. Les microsatellites amplifiés peuvent ensuite être détectés par électrophorèse sur gel d'agarose ou par électrophorèse capillaire. Cette technique est très sensible, non subjective et facilement automatisable (Peredo et al. 2005). C'est pourquoi, nous avons fait le choix d'utiliser cette méthode dans le cadre de notre étude.

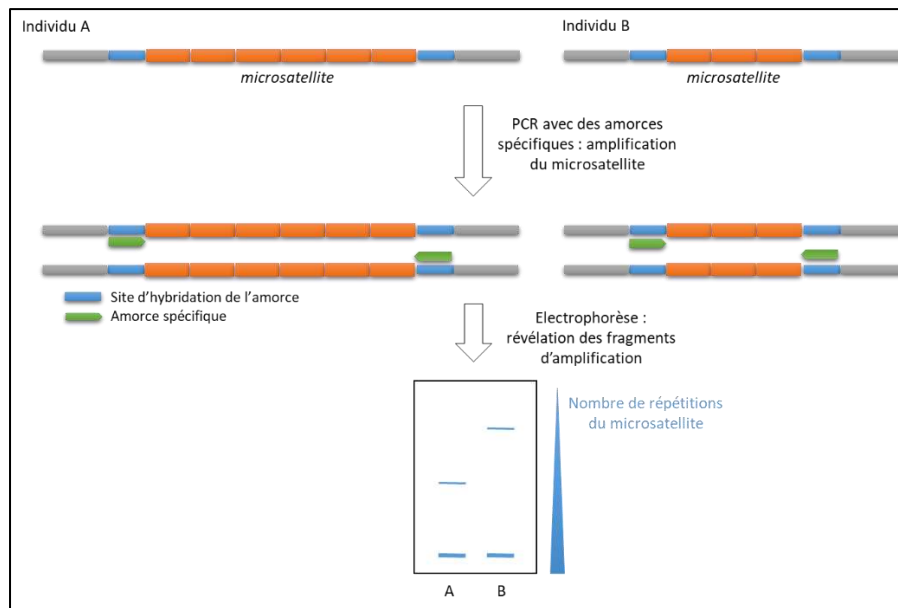


Figure 32. Technique de marquage par microsatellites (d'après le GNIS, 2019).

1.2.4. Polymorphisme nucléotidique (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)

Le polymorphisme nucléotidique (SNP) correspond à la variation d'une seule paire de bases entre individus d'une même espèce avec une fréquence allélique $> 1\%$ dans la population. Ils correspondent à la forme la plus abondante de variations dans les génomes. Ils peuvent se situer dans des régions codantes ou non codantes (Mammadov et al. 2012). Dans les exons, un SNP « synonyme » n'entraîne pas de modifications sur la protéine, notamment grâce à la redondance du code génétique. En revanche, des SNPs « non synonymes » peuvent affecter la composition en acides aminés via des mutations non-sens ou faux sens, et donc la fonction de la protéine. La majorité des SNPs sont bialléliques (2 variants nucléotidiques) mais des formes tri- voire tétra-alléliques ont également été observées. Les SNPs sont actuellement les marqueurs les plus utilisés dans la détection du polymorphisme des plantes car ils permettent de discriminer efficacement les différents génotypes (Ganal et al., 2009). De par son potentiel de détection (automatisation par puce ou par *tilling*) et la possibilité de générer des génotypages à haut-débit, cette technique est la plus utilisée actuellement. Le marquage SNP permet d'obtenir des résultats précis pour différencier des allèles entre individus. Cependant, elle nécessite des outils qui lui sont adaptés et c'est pourquoi cette technique n'a pas pu être utilisée lors de nos analyses.

1.3. Biais possibles en génétique des populations

1.3.1. Sources d'erreurs

Pompanon et al. (2005) ont défini 4 types d'erreurs majeurs en génotypage : (i) les erreurs liées à la séquence d'ADN, (ii) les erreurs liées à la qualité ou à la quantité d'ADN, (iii) les erreurs liées à des artefacts biochimiques, et enfin (iv) celles liées à des erreurs de manipulations (**Tableau 6**).

Tableau 6. Classification des principales causes des erreurs de données de marqueurs microsatellites d'après Pompanon et al. 2005.

Allèle nul : allèle non amplifié due à une mutation dans la séquence de l'amorce.

Allèle perdu : conséquence d'une amplification aléatoire d'un allèle sur deux pour un hétérozygote.

Allèle erroné : allèle qui ne correspond pas au véritable allèle

<i>Cause de l'erreur</i>	<i>Mécanisme d'apparition de l'erreur</i>	<i>Conséquence sur le génotype</i>
Interactions entre les molécules d'ADN		
Séquence d'ADN flanquante au marqueur	Pas ou peu d'amplification à cause d'une mutation dans la séquence de l'amorce	Allèle nul
	Insertion / déletion dans le fragment amplifié	Homoplasie de différents allèles
	Pour les individus hétérozygotes, amplification préférentielle d'un allèle (du à un faible contenu en bases guanine ou cytosine : dénaturation favorisée)	Perte d'un allèle sur deux
Qualité de l'échantillon		
Faible qualité ou quantité d'ADN	Amplification d'un allèle pour les hétérozygotes	Perte d'un allèle sur deux, ou allèle le plus court favorisé
Contamination de l'ADN extrait	Amplification d'allèles contaminants	Allèle erroné
Extraction de faible qualité	Pas / moins d'amplification due à des inhibiteurs	Allèle nul
Artefacts biochimiques et techniques		
Faible qualité des réactifs	Détection faible du fragment	Allèle erroné et/ou perdu
Erreurs de Taq Polymerase	Glissement lors de la première étape de la PCR	Mauvais allèle
Manque de spécificité	Amplification de produits non spécifiques	Allèle erroné
Artefact sur l'électrophorèse	Déformation de la taille de l'allèle par des facteurs qui modifient la migration (par exemple, concentration élevée des produits de la PCR).	Homoplasie de différents allèles ; allèle erroné
Facteur humain		
Manipulation de l'échantillon	Confusion entre les tubes	Allèle erroné
Erreur expérimentale	Contamination par un ADN exogène, contamination croisée entre échantillons	Allèle erroné
Erreur expérimentale	Protocole non suivi : réactif non ajouté ; T _A , amorces ou concentration des réactifs incorrects	Perte d'allèles ; allèles erronés
Manipulation des données	Mauvaise lecture des résultats, données et profils, erreur dans les traitements de données	Allèle erroné

Enfin, des erreurs peuvent également survenir lors de la lecture des résultats (identification de faux homozygotes, signal trop faible, doute dans l'identification de la taille du fragment...).

1.3.2. Limitation de ces biais

En ayant conscience de l'existence de ces biais, plusieurs points de vigilance permettent de minimiser voire d'éviter ces biais lors de la réalisation d'une étude en génétique des populations.

Tout d'abord, l'échantillonnage est un point crucial dans toute démarche scientifique. Il doit être le plus exhaustif possible tant sur le nombre de sites d'échantillonnage que sur le nombre d'individus par site. Un échantillonnage représentatif de la biodiversité permet de réduire les biais d'interprétation, mais il peut néanmoins être compliqué à mettre en place en pratique.

Les biais d'interprétation peuvent également être réduits en multipliant les loci analysés. Une approche multiloci permet de séparer les effets propres aux loci (tels que sélection, mutation, recombinaison) et ceux qui affectent l'ensemble du génome de manière identique comme la dérive génétique, l'histoire démographique des populations, la migration et la consanguinité (Black et al. 2001). En réduisant la variance liée aux processus généalogiques de chaque locus et aux effets de biais générés par les différents processus de sélection, les paramètres tels que la taille efficace des populations, les taux de migration et les distances génétiques entre populations sont ainsi mieux estimés.

2. Analyse des structures génétiques

2.1. Indicateurs de la diversité

La diversité génétique au sein d'une population peut être analysée à deux niveaux : la variabilité intra-population et la variabilité inter-population. Différents paramètres permettent de caractériser la variabilité des sous-populations et leur proximité génétique.

2.1.1. Diversité génétique intra-population

2.1.1.1. Nombres moyen et effectif d'allèles

Le nombre moyen d'allèles par locus N_A traduit la richesse en allèles d'une population, il est calculé selon la formule : $N_A = \frac{1}{K} \sum a$, avec a le nombre moyen d'allèles à un locus et K le nombre de loci étudiés (Ahmed et al. 2010).

2.1.1.2. Taux d'hétérozygotie

Taux d'hétérozygotie observée H_O . L'hétérozygotie observée H_O correspond à la proportion d'individus hétérozygotes au locus K comme dans la formule : $H_{Ok} = \sum_{i,j=1}^{a_k} p_{i,j}$ ($i \neq j$) avec $p_{i,j}$ l'estimation de la fréquence du génotype ij au locus k et a_k le nombre d'allèles au locus k . Si on considère K loci, le taux d'hétérozygotie observé (H_O) correspond à la moyenne de H_{Ok} suivant l'équation : $H_O = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K H_{Ok}$ (Ahmed et al. 2010).

Taux d'hétérozygotie théorique H_E . Un taux d'hétérozygotie attendu (H_E) peut être calculé, sous l'hypothèse d'équilibre de Hardy-Weinberg⁶ (HW) à partir des fréquences alléliques déterminées pour chaque locus selon la formule : $H_E = 1 - \sum p_k^2$, avec p_k la fréquence du $k^{\text{ième}}$ allèle à ce locus. Le taux moyen d'hétérozygotie est l'indice le plus satisfaisant de la diversité génétique. Sa valeur numérique dépend du nombre de loci polymorphes et de la structure génotypique de chacun d'eux. En comparant H_E et H_O on peut ainsi savoir si les populations respectent les conditions de HW si $H_E = H_O$ ou non ($H_E < H_O$ ou $H_E > H_O$).

Estimation non biaisée uH_E (*unbiased expected heterozygoty*). Nei (1978) propose d'utiliser un estimateur non biaisé (uH_E) de la diversité génétique lorsque le nombre d'individus testés est faible. Celle-ci est définie comme étant la probabilité de tirer, au hasard, deux allèles différents à un même locus. L'estimation non biaisée est calculée selon la formule : $uH_E = \frac{2n(1-\sum p_k^2)}{2n-1}$, avec n le nombre d'individus étudiés (Ahmed et al. 2010).

L'indice de fixation F_{IS} . Cet indice, également appelé l'écart à la panmixie (ou *inbreeding coefficient*) a été défini la mesure de l'écart entre la population d'individus trouvés à l'état hétérozygote H_O et le taux d'hétérozygotes attendus H_E . Il se calcule selon la formule $F_{IS} = \frac{H_E - H_O}{H_E}$ (Peakall et Smouse 2009). Il présente ainsi des valeurs allant de -1 à +1. Les valeurs proches de zéro traduisent un appariement aléatoire ; les valeurs significativement positives indiquent une consanguinité ou des allèles nuls non détectés ; les valeurs négatives indiquent un surplus d'hétérozygotie, dû à un appariement négatif, ou à une sélection en faveur des hétérozygotes.

2.1.2. Diversité génétique inter-populations

2.1.2.1. F-statistiques

Dans une population subdivisée en sous-populations, on peut distinguer 3 niveaux de complexité allant de l'individu, à la sous-population et à la population totale. La structure génétique inter-populationnelle est généralement mesurée par l'éloignement génétique entre paires de populations, basée sur la variation des fréquences alléliques entre deux populations ou sur la probabilité d'identité par descendance des allèles (c'est-à-dire la probabilité qu'un allèle présent chez deux individus soit issu d'un même ancêtre commun). Cette différenciation génétique est souvent mesurée par l'index de fixation F_{ST} (Wright, 1943, 1950). Cet indice exprime la diminution de

⁶ Le **principe de Hardy-Weinberg** est une théorie de génétique des populations qui permet, selon ce modèle de base considéré comme valide par défaut et en connaissant la structure génétique d'une population, d'envisager son évolution au cours des générations. Ce modèle repose sur trois conditions théoriques : (i) la panmixie : le choix des reproducteurs et des gamètes est aléatoire ; (ii) la population est de taille infinie, ce qui permet d'appliquer la loi des grands nombres : la fréquence d'un événement est égale à sa probabilité ; (iii) du fait de l'effectif infini, les effets de mutation (sélection ou migration) sont négligeables (Peycru et al. 2014b).

l'hétérozygotie liée à la divergence entre la sous-population et la population totale. Un F_{ST} égal ou très proche de 0 signifie qu'il y a de nombreux échanges génétiques entre les populations (peu de différenciation génétique). A l'inverse, un F_{ST} proche de 1 traduit une forte différenciation génétique entre les populations, suggérant très peu voire aucun flux de gènes entre les populations. D'après Wright (1978), un F_{ST} compris entre 0 et 0.05 révèle une différenciation faible ; un F_{ST} compris entre 0.05 et 0.15 traduit une différenciation modérée ; un F_{ST} entre 0.15 et 0.25 suggère une différenciation importante et au-delà de 0.25, le F_{ST} illustre une différenciation très importante. D'autres indices de mesure de la différenciation entre populations ont ensuite été proposés (**Tableau 7**). Les indices de fixation indiquent le potentiel de fixation d'allèles différents par une population, tandis que les indices de différenciation mesurent à quel point les populations sont proches pour ne fixer aucun allèle (Bird et al. 2011). Le choix de l'indice dépend des caractéristiques des marqueurs génétiques et de leur nombre d'allèles. Ces différents indices de fixation et de différenciation peuvent être calculés grâce au logiciel Genalex (Peakall et Smouse 2012).

Tableau 7. Indices de fixation et de différenciation génétique utilisés dans le cadre de cette étude (d'après Dalongeville, 2017). Avec n : le nombre de sous-populations ; p : la fréquence d'un allèle dans l'ensemble de la population ; $V(p)$: la variance de la fréquence p dans la sous-population ; H_T l'hétérozygotie de la population totale ; H_S l'hétérozygotie moyenne des sous-populations ; σ^2_A et σ^2_B les variances des distances haplotypiques entre populations et intra-populationnelles respectivement ; S et S_w : deux fois la variance et la moyenne, respectivement, de la taille d'allèles dans les sous-populations ; σ^2_{GP} et σ^2_{GI} : la variance génétique d'un trait entre sous-population, ou au sein d'une sous population respectivement.

Indices	Description	Formule	Référence
Indices de fixation			
F_{ST}	Indice de fixation des allèles dans plusieurs sous-populations pour un locus bi-allélique.	$\frac{V(p)}{p(1-p)}$	Wright, 1950
G_{ST}	Analogue du F_{ST} pour les locus multi-alléliques. Varie entre 0 et 1.	$\frac{H_T - H_S}{H_T}$	Nei, 1973
Φ_{ST}	Analogue du F_{ST} corrigé par la fréquence des haplotypes, l'apparementement et la phylogénie. Estimé à partir d'une AMOVA ⁷ .	$\frac{\sigma^2_a}{\sigma^2_a + \sigma^2_b}$	Excoffier et al., 1992
R_{ST}	Analogue du F_{ST} supposant un modèle de mutation « stepwise ».	$\frac{\bar{S} - S_w}{\bar{S}}$	Kimura et Ohta, 1978 ; Slatkin, 1995
Q_{ST}	Indice basé sur la différenciation d'un trait.	$\frac{\sigma^2_{GP}}{\sigma^2_{GP} + 2\sigma^2_{GI}}$	Spitze, 1993
Indices de différenciation			
G'_{ST}	Analogue du G_{ST} standardisé en fonction du G_{STmax} pour le rééchelonner entre 0 et 1.	$\frac{G_{ST}}{G_{STmax}} = \frac{G_{ST}(n-1+H_S)}{(n-1)(1-H_S)}$	Hedrick, 2005
Jost's D (D_{est})	Indice de différenciation entre sous-populations à un locus.	$\frac{H_T - H_S}{1 - H_S} \frac{n}{n-1}$	Jost, 2008

2.1.2.2. Indice d'hétérozygotie de Nei I

L'indice de diversité de Nei (I) se calcule avec p_{kx} et p_{ky} les fréquences du k -ième allèle dans les

⁷ L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA), est un modèle statistique pour le calcul de l'algorithme moléculaire dans une seule espèce, classiquement utilisé en biologie. Le nom et le modèle sont inspirés de l'ANOVA (Excoffier et al. 1992).

sous-populations x et y selon la formule : $I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{(J_x J_y)}}$, avec $J_{xy} = \sum_{i=1}^K p_{kx} p_{ky}$, $J_x = \sum_{i=1}^K p_{kx}^2$ et $J_y = \sum_{i=1}^K p_{ky}^2$ (Peakall et Smouse 2009). Pour les loci multiples, J_{xy} , J_x et J_y sont calculés en additionnant tous les loci et allèles et en divisant par le nombre de loci. Ces valeurs moyennes sont ensuite utilisées pour calculer I . La distance de Nei D_{Nei} se calcule avec la formule : $D_{Nei} = -\ln(I)$. L'identité génétique de Nei I variant entre 0 à 1 ; la distance génétique de Nei D_{Nei} varie donc entre 0 et $+\infty$.

2.1.2.3. Index de Shannon H'

L'indice de diversité de Shannon (Shannon 1948) a été largement employé en écologie mais également en génétique des populations (Sherwin et al., 2006), en mesurant l'information biologique à de multiples échelles, des gènes à l'environnement. Selon Sherwin et al. (2006), l'indice de Shannon se calcule pour un locus spécifique k dans une population donnée A , selon la formule : $H'_A = -\sum p_k \log_2 p_k$. Pour ce locus spécifique dans plusieurs populations, nous considérons chaque combinaison par paire de populations à tour de rôle, en calculant H' pour chacune des deux populations : $H'_{A1} = -\sum p_{k1} \log_2 p_{k1}$ et $H'_{A2} = -\sum p_{k2} \log_2 p_{k2}$, où p_k correspond à la fréquence allélique du k -ième allèle au locus et dans la population considérée (Peakall et Smouse 2009).

L'indice total de Shannon entre deux populations est calculé avec la formule : $H'_U = -\sum \bar{p}_k \log_2 \bar{p}_k$, où \bar{p}_k est la fréquence moyenne pondérée du k -ième allèle pour chaque paire de populations : $\bar{p}_k = p_{k1} \times wt_1 + p_{k2} \times wt_2$, avec $wt_1 = \frac{ct_1}{ct_1+ct_2}$ et $wt_2 = \frac{ct_2}{ct_1+ct_2}$, et ct le nombre total d'allèles au locus k (multiplié par 2 pour les diploïdes) pour les populations respectives. Finalement, l'indice de Shannon est calculé pour chaque paire de populations selon la formule (Peakall et Smouse 2009) : $H'_{UA} = H'_U - wt_1 H'_{A1} - wt_2 H'_{A2}$.

2.1.2.4. Flux de gènes entre sous-populations

La différenciation génétique entre populations est favorisée par la dérive et limitée par les flux génétiques entre les populations. Le nombre de migrants effectifs par génération (N_m) est relié à la différenciation génétique F_{ST} par la relation : $N_m = \frac{(1-F_{ST})}{4F_{ST}}$ (Ahmed et al. 2010). Dans la présente étude, les flux de migration entre sous-populations seront reconstruits en utilisant le logiciel Div-Migrate (Sundqvist et al. 2016). Pour les espèces diploïdes avec une grande taille de population effective estimée, H'_{UA} peut être converti en une estimation de N_m : $N_m = \left(\frac{0,156}{H'_{UA}}\right)^2$ (Peakall et Smouse 2009).

2.2. Arbre phylogénétique

L'étude de la proximité génétique d'individus est historiquement basée sur la construction d'arbres phylogénétiques. Dès les années 1960, des modèles phylogénétiques décrivant des structures de populations, basés sur des fréquences alléliques sont proposés, en utilisant notamment les méthodologies décrites par Cavalli-Sforza et Edwards (1967) ou Felsenstein (1973). Dans les années 80, le développement de l'informatique a permis d'améliorer considérablement la puissance des calculs. L'algorithme proposé par Felsenstein (1981) calcule pour un grand nombre de taxons leur vraisemblance à partir de leurs séquences nucléotidiques. Actuellement, les arbres phylogénétiques sont principalement construits grâce à l'algorithme de neighbor-joining, proposé par Saitou et Nei (1987). Ces arbres sont construits à partir d'une matrice de distances génétiques inter-individus, calculées à l'aide des distances de Nei et al. (1983) ou de Reynolds et al. (1983). Afin de distinguer différents groupes génétiques, l'arbre peut être « coupé » à un certain niveau. Dans le cadre de cette étude, la phylogénie sera reconstruite en utilisant l'approche Neighbour Joining (N-J) à l'aide du logiciel Darwin version 5.0. (Perrier et Jacquemoud-Collet 2006).

2.3. Méthode bayésienne

Cette approche consiste à supposer que les données génétiques peuvent être expliquées par un modèle probabiliste dont les paramètres sont inconnus. Pritchard et al. (2000) ont proposé l'une des premières méthodes basées sur un modèle explicite permettant de détecter la structure génétique, implémentée dans le logiciel STRUCTURE. Ce modèle suppose que le génome de chaque individu est la combinaison de morceaux de génomes provenant de K groupes génétiques (clusters). Ces K groupes génétiques sont non prédéfinis et caractérisés à chaque locus par un ensemble de fréquences alléliques. L'algorithme du logiciel STRUCTURE utilise une approche de regroupement bayésien en appliquant une estimation par la méthode de Monte Carlo à chaîne de Markov (MCMC). Ce processus MCMC commence par l'affectation aléatoire des individus à K groupes (K prédéterminé), puis les fréquences des variantes sont estimées dans chaque groupe et les individus sont affectés en fonction de ces estimations de fréquence. Cette opération est répétée de nombreuses fois, dans le processus de « burnin » qui aboutit à une convergence progressive vers des estimations fiables des fréquences alléliques dans chaque population et des probabilités d'appartenance des individus à une population (Porras-Hurtado et al. 2013). Chaque population devrait se trouver à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Le logiciel STRUCTURE cherche donc à créer des populations afin de minimiser l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg au sein de chacune d'elles.

1.2. Extraction des composés volatils

Les composés volatils contenus dans les huiles essentielles sont classiquement obtenus par distillation (hydrodistillation, distillation à vapeur saturée, hydrodiffusion) ou par des solvants. Cependant ces procédés d'obtention des huiles essentielles sont longs à mettre en œuvre et du fait de leurs très faibles rendements (en général entre 0,1 et 2%) demandent des quantités importantes de matières premières (Bruneton 2016).

Ainsi, d'autres procédés d'obtention des composés volatils se sont développés ces dernières années, comme l'hydrodistillation générée par les micro-ondes, l'hydrodiffusion par micro-ondes, l'extraction par les gaz supercritiques. Enfin, des techniques de sorption des composés volatils sur des phases solides permettent leur captation facilitant leur extraction avant analyse. Nous avons fait le choix de cette approche dans le cadre de ma thèse.

1.2.1. Échantillonnage de l'espace de tête

1.2.1.1. Principe

L'échantillonnage de l'espace de tête est une technique de préconcentration des composés volatils contenus dans l'espace de gaz au-dessus de l'échantillon sur une phase solide. Cette méthode d'extraction des composés volatils, permettant une analyse qualitative ou quantitative, est non destructrice et ne nécessite pas d'extraction ou de préparation de l'échantillon en amont.

1.2.1.2. Micro-extraction en phase solide (SPME)

La microextraction sur phase solide (SPME, *Solid phase microextraction*) est une technique d'extraction en phase solide développée au début des années 1990 par Arthur et Pawliszyn (Arthur et Pawliszyn 1990). Nous avons employé cette technique pour l'extraction des composés volatils issus des différents houblons étudiés. Il s'agit d'une technologie de préparation d'échantillons sensible et sans solvant, s'appuyant sur le principe de l'adsorption/absorption et de la désorption. Cette technique utilise une fibre enrobée d'un polymère (phase d'extraction) sur laquelle les composés volatils et semi-volatils contenus dans l'espace de tête sont adsorbés (**Figure 34**). La fibre est contenue au sein d'une aiguille creuse qui se déploie ou se contracte en activant un piston.

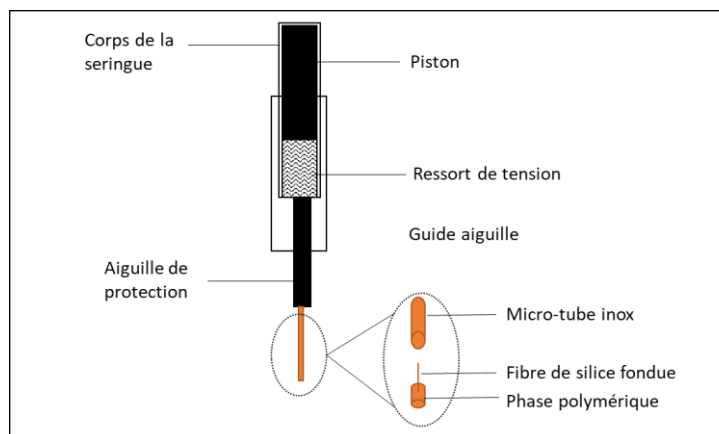


Figure 34. Schéma du dispositif SPME (d'après Papet et al. 2010).

Les analytes sont adsorbés progressivement sur la fibre lors du temps d'équilibration. Le temps et la température d'extraction varient selon le revêtement polymérique. L'analyse SPME peut être dite *headspace* (HS) lorsque la sorption des composés volatils se fait dans l'espace de tête au-dessus de la biomasse à analyser. Le chauffage permet d'extraire l'ensemble des composés volatils à analyser. La fibre peut aussi être directement immergée dans le liquide à analyser, on parle alors d'immersion directe (DI-SPME). A la fin de ce temps d'équilibration, un équilibre de partage s'est établi entre la fibre (phase solide) et la phase analysée (gazeuse ou liquide). La fibre est ensuite rétractée dans l'aiguille et retirée de l'échantillon. Les analytes sont alors désorbés thermiquement ou avec des solvants organiques pour être analysés. La fibre SPME peut ensuite être régénérée pour être réutilisée, jusqu'à une centaine de fois.

Il existe différents types de revêtement polymérique selon les analytes recherchés (**Tableau 8**).

Tableau 8. Caractéristiques des différents sorbants greffés sur les fibres SPME (d'après Burgot 2019).

Nature de la phase stationnaire	Épaisseur (µm)	Polarité	Température maximale de désorption (°C)	Application analytique	Composés extraits
Polydiméthylsiloxane (PDMS)	30 ou 100	Apolaire	340	GC / HPLC	Volatils, semi-volatils
Polyacrylate (PA)	85	Polaire	320	GC / HPLC	Semi-volatils
Polydiméthylsiloxane / Divinylbenzène (PDMS/DVB)	60	Bipolaire	270	GC	Volatils polaires
Carboxen / Divinylbenzène (CAR/PDMS)	75	Bipolaire	320	GC	Volatils
Divinylbenzène / Carboxène / Polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS)	50 ou 30	Bipolaire	270	GC	Volatils, semi-volatils

Cette méthode présente plusieurs avantages tels que la réduction du temps d'extraction, son faible coût, sa sélectivité et sa sensibilité, la faible quantité de biomasse nécessaire (quelques grammes) ainsi que la possibilité d'automatisation et de couplage avec la chromatographie en phase gazeuse (GC). Après extraction, les analytes captés sur la fibre sont transférés vers la chromatographie en phase gazeuse par désorption thermique pour analyse. La SPME permet donc de faire avec un seul

dispositif la collecte, la concentration et la dérivation (si nécessaire) puis l'injection des composés volatils. Elle permet de réduire le temps d'analyse et limite les pertes et les erreurs par comparaison avec les processus d'échantillonnage en plusieurs étapes (Rettberg et Garbe 2018).

Cependant, la SPME ne peut pas être considérée comme une technique quantitative. La quantification des composés volatils par SPME reste possible avec un contrôle précis de l'échantillonnage et l'injection de standards pour la calibration. Cette quantification est toutefois difficile à mettre en œuvre compte-tenu de la présence de composés avec une large gamme de constantes de distribution.

1.2.2. Extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE)

La technique SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*) est une méthode d'extraction sur phase solide de petits analytes. Comme pour la SPME précédemment développée, les analytes sont adsorbés en fonction de leur polarité à la surface d'un barreau aimanté recouvert de polydiméthylsiloxane (PDMS), un polymère apolaire (**Figure 35**). Nous avons choisi cette approche pour l'analyse des composés volatils dans les bières étudiées car la littérature montre une meilleure efficacité (Castro et Ross 2015).

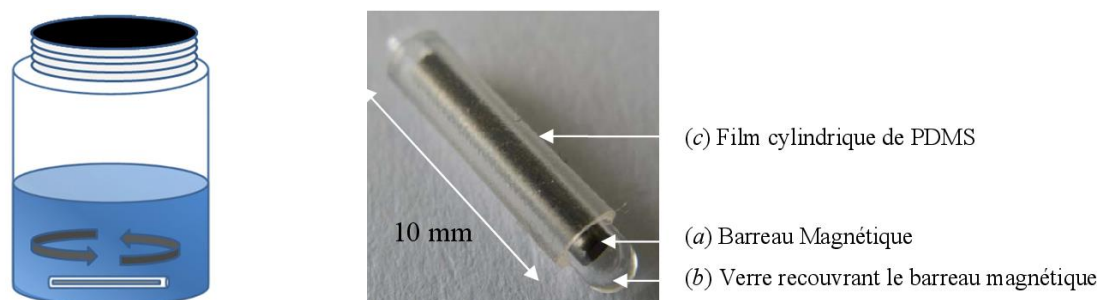


Figure 35. Illustration de l'extraction par barreau SBSE immergé (d'après Prieto et al. 2010 et Malandain 2012).

L'agitation du barreau aimanté favorise le transfert de masse et ainsi l'extraction des composés d'intérêt. L'extraction des composés volatils par SBSE repose sur la partition des analytes entre la matrice de l'échantillon et le PDMS selon un coefficient de partition K proportionnel au coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{ow}$), selon les équations suivantes (Baltussen et al. 1999) : $K \approx K_{ow} = \frac{C_{PDMS}}{C_{aq}} = \frac{m_{PDMS}}{m_{aq}} \cdot \frac{V_{aq}}{V_{PDMS}} = \beta \cdot \frac{m_{PDMS}}{m_{aq}}$, avec C_{PDMS} et C_{aq} les concentrations en analytes dans le PDMS et dans l'eau ; m_{PDMS} la masse d'analyte absorbée dans le PDMS et m_{aq} la masse d'analyte dissoute dans l'eau ; V_{PDMS} et V_{aq} les volumes des phases PDMS et aqueuses et β le rapport entre ces volumes. La technique de SBSE étant basée sur un équilibre, la concentration de l'analyte adsorbée sur le PDMS dépend donc du temps d'extraction, et se calcule suivant l'équation suivante (Seethapathy et Górecki 2012) : $C_{PDMS}(t) = C_{aq,t=0} \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t})$.

Pour les analytes à forte polarité, l'ajout de sel (NaCl) peut permettre de diminuer leur solubilité par *salting out* (par précipitation saline). Ils vont donc précipiter autour du barreau aimanté, permettant ainsi de capter un plus grand nombre d'analytes, en diminuant le temps d'extraction.

Les analytes échantillonnés sur le barreau SBSE sont ensuite désorbés thermiquement puis directement analysés par chromatographie en phase gazeuse (GC) pour analyser les composés volatils, voire par chromatographie liquide pour analyser les composés non volatils. Un barreau de SBSE est réutilisable entre 10 et 50 fois. Cependant, du fait de son importante capacité d'absorption le PDMS peut donner au barreau aimanté un effet mémoire difficile à éliminer.

1.3. Analyse des composés volatils

La technique la plus utilisée pour l'analyse des composés volatils est la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse permettant la détection et l'identification des composés volatils séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) (Figure 36).

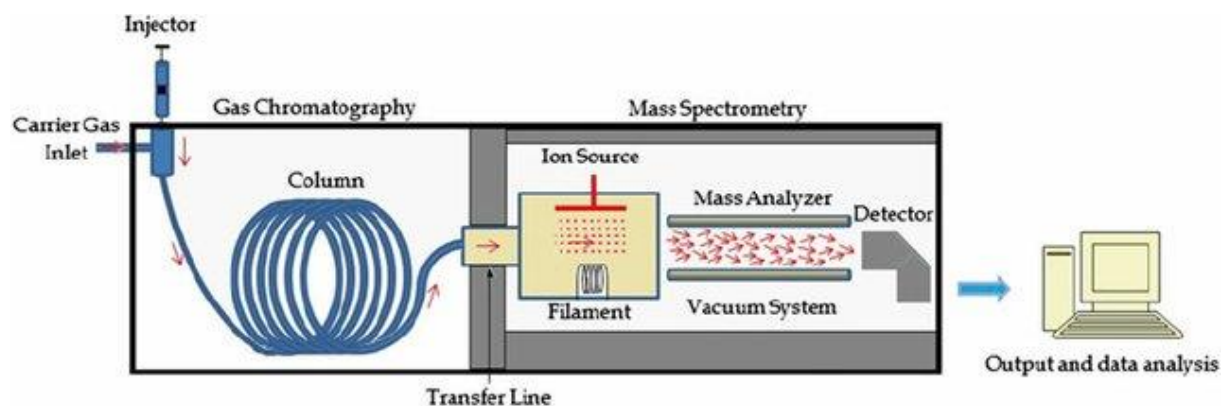


Figure 36. Schéma des principaux composants d'une GC/MS (d'après Emwas et al. 2015).

1.3.1. La chromatographie en phase gazeuse

Les composés sont injectés dans la GC puis entraînés *via* la phase mobile (un gaz inerte, souvent de l'hélium) vers la colonne. L'injection peut se faire en mode *split* (avec division de flux) ou en mode *splitless* (sans division de flux). Le couplage HS-SPME/GC ou SSBE/GC permet d'injecter les analytes par désorption thermique. Les analytes captés sur l'ad/absorbant sont thermiquement libérés et concentrés dans un piège à froid par cryofocus, puis transférés vers la colonne par une ligne de transfert.

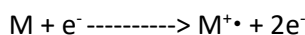
Dans la colonne, les analytes migrent à des vitesses différentes selon leur interaction avec la phase stationnaire et leur volatilité. Les composés sont ainsi séparés dans le temps. La colonne est placée dans un four permettant la régulation de la température de la colonne.

Les analytes sont ensuite détectés en sortie de colonne, et caractérisés par leur temps de rétention. Il existe différents types de détecteurs, mais le spectromètre de masse tend à être le plus

utilisé car il permet d'obtenir des informations structurales sur les molécules séparées par chromatographie. Pour la plupart des GC-MS standards, l'ionisation des composés en sortie de GC se fait par impact électronique (EI), et les ions qui en résultent sont fractionnés en fonction de leur rapport m/z grâce à un analyseur quadripolaire.

1.3.2. Ionisation par impact électronique (EI)

L'EI est une source d'ionisation dite « dure », c'est-à-dire qu'elle produit plusieurs ions fragments. Elle est souvent utilisée en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Cette technique se compose d'un filament chauffé qui émet des électrons, accélérés vers une anode *via* une différence de potentiel, et entrant en interaction avec les molécules gazeuses de l'échantillon analysé introduit dans la source. Avec un niveau d'énergie cinétique des électrons entre 10 et 100 eV, l'ionisation se fait par arrachage d'un électron à la molécule M :



$M^{+\bullet}$ est l'ion moléculaire. Il s'agit d'un cation-radical, c'est-à-dire qu'il porte une charge positive et un électron célibataire. Selon le niveau d'énergie utilisé pour la fragmentation, il y aura plus ou moins de fragmentation. En général, l'énergie du faisceau d'électron est fixée à -70 eV, permettant ainsi d'avoir une ionisation des molécules organiques la plus efficace et d'obtenir les mêmes spectres de masse d'un laboratoire à un autre.

Le détecteur conduit au spectre de fragmentation de chaque composé. Les chromatogrammes d'ions totaux (TIC) sont obtenus et fournissent des informations sur le temps de rétention de chaque composé ainsi que les spectres de masses contenant les rapports m/z des ions détectés.

1.3.3. Identification des composés

Afin d'identifier les composés volatils, des suggestions d'identification peuvent être obtenues à partir de bibliothèques de spectres de masse, telles que celles de Wiley ou de NIST. Cette première identification peut être validée par une comparaison des indices de rétention des composés calculés à partir de l'injection d'un mélange d'alcane avec les données de la littérature. Une identification complète peut enfin être réalisée avec l'injection de standards et en comparant les spectres de masse et les temps de rétention des composés.

Les indices de rétention permettent de convertir les temps de rétention en constantes indépendantes du système et des conditions chromatographiques, tel que l'a décrit le chimiste Erin Kovats (Kováts 1958). Ainsi, l'indice de rétention RI d'un composé peut être normalisé par le temps de rétention des alcanes (n) et (n+1) qui lui sont adjacents. Pour un composé (x) élué entre les deux alcanes (n) et (n+1), son indice de rétention RI est calculé selon la formule : $RI = 100 \times \left(n + \frac{t_r(x) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right)$, avec $t_r(x)$: le temps de rétention du composé étudié x, $t_r(n)$: le temps de rétention de

l'alcane (n) le plus proche qui précède le composé x, $t_{(n+1)}$: le temps de rétention de l'alcane (n+1) qui suit le composé x et n : le nombre d'atome de carbone dans l'alcane n.

2. Caractérisation d'extraits végétaux et quantification des composés phénoliques

2.1. Séparation et détection des composés par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

2.1.1. Principe de séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une technique analytique permettant la séparation des composés d'un échantillon en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et en particulier de leur polarité. Différentes phases stationnaires peuvent être utilisées en HPLC (C_{18} , C_8 , Shield RP18) mais la plupart des analyses portant sur la caractérisation d'extraits utilisant l'HPLC se font sur une phase inverse, un gel de silice sur lequel sont greffées des chaînes linéaires à 18 carbones. Les temps de rétention de ces phases peuvent être modifiés en utilisant des greffons spécifiques (Theodoridis et *al.*, 2012). Deux modes d'analyse peuvent être utilisés : le mode « gradient », c'est-à-dire que la composition de la phase mobile change au cours de l'analyse, ou le mode « isocratique » utilisé lorsque la phase mobile reste inchangée.

Chaque analyte est caractérisé par un temps de rétention et l'amplitude de son pic à la base. Ces éléments permettent de décrire la qualité d'une séparation selon 3 paramètres :

- i. son efficacité : plus une séparation est efficace, plus les pics sont fins ;
- ii. sa capacité : déterminée par le facteur de rétention (k) calculé avec la valeur du volume mort (V_0) nécessaire pour éluer un composé d'intérêt et du volume de rétention V_R , $k = (V_R/V_0) - 1$;
- iii. sa sélectivité α : ce paramètre évalue la capacité de la méthode à séparer deux composés A et B de facteurs de rétention k_A et k_B : $\alpha = k_A/k_B$. La sélectivité est mauvaise si elle est proche de 1.

La résolution combine les effets de la sélectivité, de la capacité et de l'efficacité de la méthode. Plusieurs paramètres peuvent être modifiés afin d'améliorer la capacité d'une méthode, tels que la longueur et le diamètre de la colonne, le débit, le volume d'injection, le gradient ou encore le choix de la phase mobile.

L'UHPLC (chromatographie liquide à ultra-haute performance) fonctionne sur le même principe que l'HPLC. Cependant, la granulométrie de la phase stationnaire est inférieure à 2 μm , ce qui permet

de limiter la perte de charge, et donc de travailler à des pressions plus élevées qu'en HPLC tout en conservant une bonne efficacité (De Villiers et al. 2006). Cela permet ainsi de réduire les temps d'analyse, de travailler avec des volumes d'analytes plus faibles et de consommer moins de solvants, tout en augmentant la résolution chromatographique (Saussereau et Imbert 2016). Dans le cadre de cette étude, pour l'ensemble des analyses chromatographiques en phase liquide réalisées, la phase stationnaire utilisée a été une colonne en phase inverse C₁₈Acquity BEH (*Bridged Ethyl Hybrid*) de chez Waters.

2.1.2. Méthode de détection des molécules séparées par UHPLC

Dans le cadre des analyses réalisées pour la présente étude, les analytes séparés par UHPLC ont été détectés par spectroscopie d'absorption en ultraviolet (UV)-visible par un détecteur à barrette de diodes (DAD) ou bien par spectrométrie de masse (MS).

2.1.2.1. Détection par spectroscopie en UV

Les composés d'un chromatophore absorbent naturellement la lumière émise dans le domaine des longueurs d'onde appartenant au domaine de l'UV-Visible (entre 200 nm et 650 nm). La détection par spectroscopie en UV repose sur cette capacité d'absorption de la lumière à une longueur d'onde fixe, selon la loi de Beer-Lambert. Pour chaque composé, le détecteur renvoie une valeur d'absorbance proportionnelle à sa concentration, permettant également une quantification des analytes dans l'échantillon (Swartz 2010). La détection est effectuée par une barrette de diodes (DAD pour *Diode Array Detector*), un détecteur d'absorption spectrophotométrique permettant d'accéder à l'ensemble du spectre UV-visible. La source polychromatique est généralement constituée d'une lampe au deutérium pour le proche UV (190-350 nm) et d'une lampe tungstène pour le visible (400-700 nm). La détection permet ainsi d'acquérir les spectres UV dans plusieurs canaux sur une large gamme dynamique.

2.1.2.2. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique permettant de fournir des informations qualitatives et quantitatives sur les analytes après leur ionisation. Elle repose sur la séparation et la détection d'ions provenant de la molécule à analyser et formés dans la source d'ions.

Les analytes sont d'abord ionisés pour acquérir des charges positives ou négatives, puis se déplacent jusqu'à l'analyseur de masse où ils sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (noté m/z où z est la charge, et m la masse moléculaire de l'ion). Ils arrivent ensuite sur les différentes parties du détecteur, le courant ionique est converti en courant électrique, puis les signaux sont acquis par un spectromètre de masse (**Figure 37**) (Menet 2011).

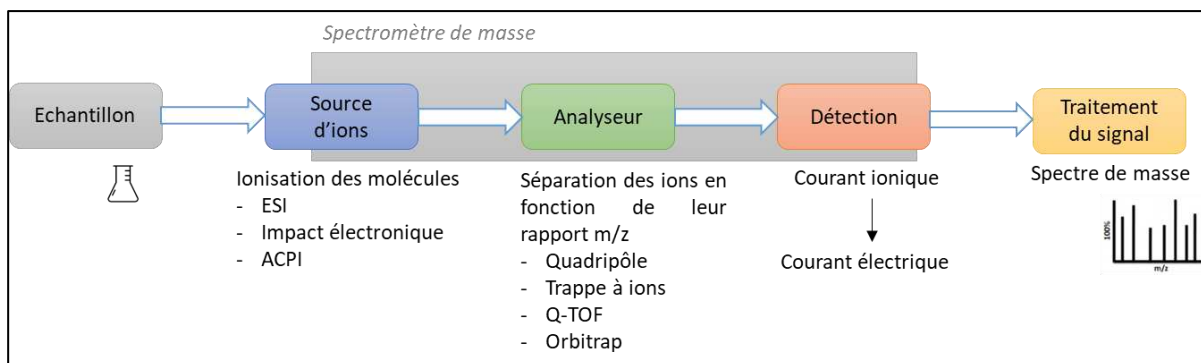


Figure 37. Représentation schématique du principe de la technique de spectrométrie de masse (d'après Menet 2011).

Ionisation. Il existe plusieurs techniques d'ionisation selon la nature de l'échantillon et les propriétés des analytes. L'impact électronique a été détaillé précédemment. L'électrospray est une source d'ionisation dite « douce », c'est-à-dire qu'on obtient majoritairement l'ion moléculaire. Une ionisation douce permet l'identification de métabolites inconnus ou encore l'étude d'interactions supramoléculaires. Initialement réservé à l'étude de protéines, son utilisation est désormais étendue à l'étude de polymères et de petites molécules. C'est une des techniques les plus utilisées en spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie liquide. L'électrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit. Les charges s'accumulent à la sortie en surface du liquide, formant ainsi de fines gouttelettes hautement chargées. Le solvant est évaporé, ce qui rétrécit la taille des gouttelettes. Les charges électriques à la surface de celles-ci sont alors suffisantes pour provoquer la désorption des ions monochargés en mode positif ou négatif, ou multichargés suivant la taille de la molécule (Forcisi et al. 2013). C'est cette source d'ionisation qui a été utilisée dans le cadre des analyses de métabolomique non ciblée (**Études II et III**).

Analyseurs. L'analyseur permet de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z . Cette séparation se fait de manière différente selon l'analyseur utilisé. Même si de nombreux types d'analyseurs existent (e.g. TOF, ion-trap, quadripôle), leur fonctionnement repose à chaque fois sur l'utilisation de champs magnétiques et/ou électriques appliqués aux particules chargées pour les séparer (Mesmin 2012). Ces instrumentations diffèrent en termes de prix, de taille, de résolution, de gammes de masse et de leur capacité à faire des analyses de masse en tandem (MS^2) ou séquentielles (MS^n). En effet, des configurations hybrides permettent de gagner en résolution ; le premier analyseur fonctionnant comme un dispositif de focalisation qui guide les ions vers le détecteur suivant. Les performances d'un analyseur peuvent être évaluées par les paramètres suivants :

- la résolution, indiquant la capacité d'un analyseur à séparer deux ions de rapport m/z différents mais proches. Elle se calcule avec la formule $R = \frac{m/z}{\Delta(m/z)}$, avec m/z la valeur observée et $\Delta(m/z)$ la largeur du pic m/z à une certaine hauteur du signal. Les analyseurs

peuvent ainsi être classés en spectromètres de masse de très haute résolution ($R > 100\,000$), de haute résolution ($R > 10\,000$), moyenne résolution ($5\,000 < R < 10\,000$) ou basse résolution ($\Delta(m/z) = 1$) (Rondeau 2017).

- la précision en masse représente l'erreur entre la masse exacte de l'ion calculée à partir des masses théoriques ($m/z_{théo}$) des isotopes et la masse mesurée par l'analyseur (m/z_{exp}). Elle est souvent exprimée sous forme d'erreur de mesure de masse en partie par million (ppm), et calculée avec la formule $\delta ppm = \frac{m/z_{exp} - m/z_{théo}}{m/z_{théo}} \times 10^6$.
- la vitesse de balayage, soit le nombre de spectres qu'il est possible d'acquérir par unité de temps.
- la gamme dynamique, c'est-à-dire le rapport entre le plus grand et le plus petit signal détectable pour un ion. C'est un paramètre important, notamment dans la détection des ions minoritaires.
- la gamme m/z , déterminant les limites des rapports m/z détectables par l'instrument.

On abordera ici les analyseurs de type quadripôle, à temps de vol et notamment le tandem quadripôle-temps de vol (Q-TOF), et de mobilité ionique qui sont les trois types d'analyseurs utilisés dans ces travaux de thèse.

i. Quadripôle (Q). Le quadripôle Q est un analyseur de basse résolution, constitué de 4 électrodes parallèles (**Figure 38**). C'est ce type d'analyseur qui a été utilisé pour les analyses de quantification pour les **Études I et III du Chapitre 3**. Un potentiel (U) de courant continu est appliqué à deux de ces électrodes ; les autres deux autres sont reliées à un potentiel alternatif (V) de radiofréquence (ω), créant ainsi un champ quadripolaire entre les électrodes. Les ions, formés dans la chambre d'ionisation, sont propulsés vers le quadripôle selon l'axe z par un champ électrique de l'ordre de 5 Kv. Les ions subissent ainsi une oscillation complexe suivant les valeurs de V, U, et ω . À un instant donné, seuls les ions avec un rapport m/z sont capables d'avoir une trajectoire stable et atteignent ainsi le détecteur. Les ions dont la trajectoire n'est pas stable sont éjectés avant d'atteindre l'extrémité du détecteur et ne se donc pas détectés (El-Aneed et al. 2009). Ce type d'analyseur est classiquement utilisé du fait de son coût relativement limité, de son faible encombrement, de sa facilité d'entretien et de la robustesse des résultats obtenus. Néanmoins, il présente une capacité limitée par rapport à la gamme de masse, pour pouvoir réaliser des analyses MS/MS. Il peut cependant être couplé à d'autres analyseurs, tels qu'un TOF (Q-TOF) pour permettre de réaliser des identifications structurales.

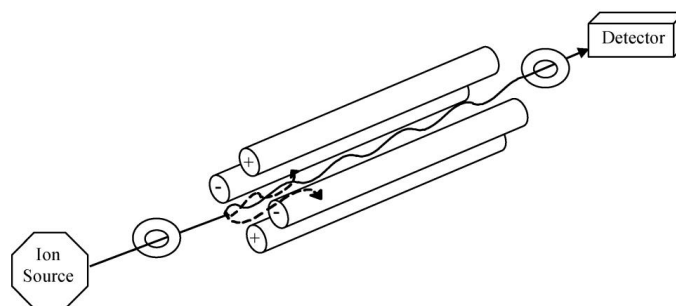


Figure 38. Représentation d'un analyseur de masse quadripolaire (d'après El-Aneed et al. 2009).

Quatre électrodes parallèles avec des potentiels variables de courant continu et de radiofréquence alternative. Une seule valeur m/z empruntera la "bonne" trajectoire et survivra au trajet pour atteindre le détecteur (ligne continue). Les autres entreront en collision avec les électrodes et seront éjectées (lignes pointillées).

ii. *Analyseur à temps de vol (TOF)*. L'analyseur à temps de vol TOF est un analyseur haute résolution, breveté par E. Stephens en 1952 dans lequel les ions sont accélérés par un champ électrique de valeur connue. Il résulte de cette accélération que les ions de même charge électrique acquièrent la même quantité de mouvement. L'énergie cinétique des ions E_c , dépendant du rapport masse sur charge $E_c = z \times U$ (1). Or E_c est également calculée par la formule $E_c = \frac{1}{2} m \times v^2$ (2). Le TOF mesure le temps de vol t_f mis par un ion pour atteindre le détecteur situé à une distance connue D . Or $t_f = \frac{D}{v}$, en injectant cette expression de t_f dans l'équation (2), et sachant que les équations (1) et (2) sont équivalentes, on a alors $t^2 = \frac{m D^2}{z 2U}$. Le temps de vol t_f est ainsi directement relié au rapport m/z de l'ion, sachant que les valeurs de D et U sont des constantes. La mesure du temps de vol permet alors une détection différentielle des espèces ayant un rapport m/z différent (Menet 2011). L'analyseur hybride Q-TOF combine une série de quadripôles (Q_0 qui guide les ions, Q_1 qui les sépare, Q_2 qui est utilisé comme chambre de collision) avec un TOF, on parle alors de Q-TOF (**Figure 39**). Dans cette configuration en tandem, le quadripôle agit comme un guide d'ions (en mode MS) ou comme un filtre d'ions (en mode MS/MS) ; le TOF permet de mesurer les masses exactes des ions. Après avoir traversé l'analyseur quadripolaire, les ions filtrés sont fragmentés par dissociation induite dans une cellule de collision gazeuse puis transmis au TOF où leurs masses sont mesurées.

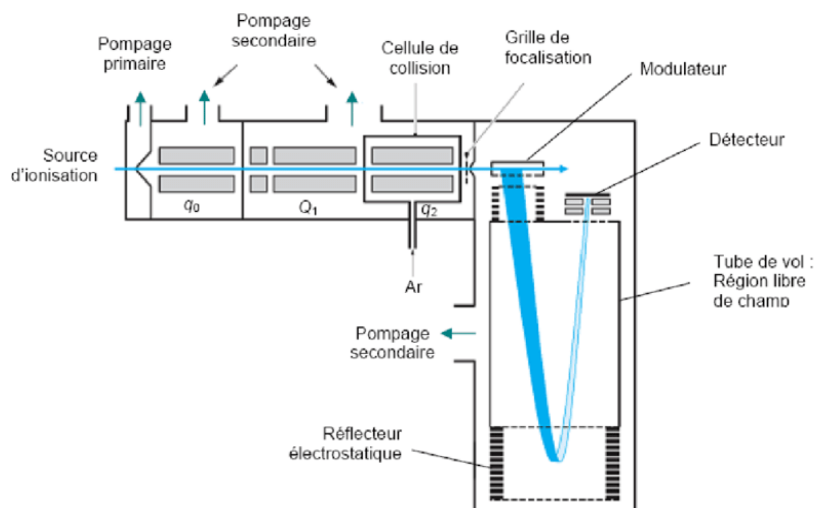


Figure 39. Schéma d'un analyseur hybride constitué d'un hexapôle de focalisation (q_0), d'un quadripôle (Q_1), d'une cellule de collision (q_2) et d'un tube de vol orthogonal (d'après Mesmin 2012).

Cette configuration de couplage permet d'obtenir des données avec une grande résolution et une bonne sensibilité (puisque tous les ions générés sont conservés pour la détection, contrairement aux filtres quadripolaires qui n'en conservent qu'un à chaque instant). Les systèmes hybrides, comportant un premier filtre de masse Q , permettent l'identification de molécules par sélection (éventuellement automatique) d'ions parents intenses, fragmentation et identification des formules atomiques les plus probables pour les fragments générés, en fonction de leur masse exacte (Marquet 2005). Le Q-TOF générant des informations sur la masse avec exactitude et précision, ces informations peuvent ensuite être utilisées pour des identifications de formules chimiques par exemple. Le Q-TOF a été utilisé pour l'**Étude I du Chapitre 3**.

iii. Mobilité ionique (IMS). La spectrométrie par mobilité ionique (IMS) est une technique de séparation des molécules ionisées en phase gazeuse dans laquelle les ions sont séparés en fonction de leurs mobilités relatives, déterminées par leur masse et leur charge et de leur interaction avec le gaz, dépendant de la structure tridimensionnelle (Armenta et al. 2011). Les molécules sont ionisées (par exemple par ESI) puis arrivent dans le tube de dérive soumis à un champ électrique E . Les ions s'accélèrent mais entrent en collision les uns avec les autres, les faisant alors ralentir. Lorsque les collisions sont suffisamment nombreuses pour que les forces de friction équilibrent la force électrique, un état stationnaire est atteint et les ions se déplacent à une vitesse moyenne constante appelée vitesse de dérive (v_d) (Gabelica 2021). Les ions arrivent ensuite vers des grilles de blindage qui permettent d'améliorer la transmission des ions vers le détecteur, et donc la résolution de l'appareil. Une fois arrivés au détecteur, la collision des ions crée un courant ensuite amplifié et traduit en un signal (Borsdorf et Eiceman 2006). La vitesse de dérive des ions est proportionnelle à la mobilité de l'ion (K) et au champ électrique, tel que $v_d = K.E$. Cette mobilité ionique K est une donnée supplémentaire permettant l'identification de composés connus à partir d'une base de données ou la caractérisation structurale de composés inconnus (Gabelica 2021). L'IMS est utilisée pour la séparation

de composés volatils et semi-volatils. Elle possède une faible limite de détection et permet les analyses d'échantillons de l'ordre du nanogramme (Armenta et al. 2011). La combinaison ESI-IMS-TOF-MS permet une séparation d'isomères d'hydrates de carbone (Armenta et al. 2011), et a été utilisée dans le cadre des analyses de métabolomique non-ciblée de l'**Étude III**.

En spectrométrie de masse tandem, un spectre MS est réalisé et analysé informatiquement afin de repérer les ions présentant les signaux les plus intenses (généralement 3 à 10 ions). Ces ions majoritaires sont ensuite séquentiellement sélectionnés et fragmentés en MS/MS (mode DDA : *data-dependant acquisition*). Il est ainsi possible d'obtenir à la fois la masse de l'ion précurseur et celle de chacun de ces ions produits (Mesmin 2012). En MS^E, tous les ions avec une énergie de collision basse sont analysés en MS¹, et les ions sélectionnés dans une plage *m/z* définie sont fragmentés à haute énergie de collision dans le module MS² (Plumb et al. 2006).

2.2. Mise en place et validation d'une méthode de quantification

L'acquisition des données obtenues par UHPLC-UV permet la quantification de composés dans un échantillon, au moyen d'une méthode de quantification préalablement mise en place, et avec des critères de validation recommandés par l'ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*). Ces recommandations évaluent plusieurs critères détaillés ci-dessous permettant la validation des méthodes analytiques mises au point (EMA 2011). Dans les travaux de recherche de cette thèse, le xanthohumol, les acides α et les acides β ont été quantifiés grâce à une gamme de calibration mise en place à partir de standards purifiés au laboratoire, et dont le protocole développé antérieurement est détaillé dans la **partie expérimentale (5.2.3)**.

2.2.1. Identification des métabolites : sélectivité et spécificité

Une méthode est dite « sélective » si elle permet d'identifier et de quantifier sans ambiguïté les composés d'intérêt dans un mélange complexe d'analytes, sans interférence avec les autres composés présents dans la matrice, les impuretés, *etc.* (Kruve et al., 2015). Dans le cadre de notre étude, les composés d'intérêt ont été identifiés par leur temps de rétention t_R . L'identification a été confirmée par l'analyse de la masse.

2.2.2. Précision

La précision caractérise le degré de concordance entre les valeurs mesurées obtenues par des mesures répétées sur les objets identiques ou similaires dans des conditions spécifiées. Trois critères permettent d'évaluer la précision d'une méthode (EMA 2011) :

- la précision intra-jour (répétabilité) en analysant des répliquats d'échantillons de même concentration, préparés indépendamment un même jour par le même manipulateur, avec le même équipement, analysés sur le même appareil de mesure, dans les mêmes conditions analytiques.
- la précision inter-jour : vérifiée en injectant des répliquats d'échantillons de même concentration préparés dans des conditions d'expérience différentes de celles qui ont permis d'évaluer la précision intra-jour ;
- la reproductibilité de la mesure est l'analyse d'un même échantillon par plusieurs laboratoires. Ce dernier paramètre ne sera pas évalué dans la présente étude.

Les précisions intra- et inter-jour sont mesurées avec le coefficient de variation (% CV), qui ne doit pas excéder 15 %, sauf pour la LOQ (*limit of quantification*), pour laquelle le seuil est fixé à 20 % (EMA 2011).

2.2.3. Justesse

La justesse caractérise l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée comme valeur réelle conventionnelle ou comme valeur de référence acceptée, et la valeur mesurée expérimentalement – qui correspond à la valeur moyenne obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois. Elle traduit l'erreur systématique de la mesure expérimentale par rapport à la mesure vraie. La justesse de la méthode est évaluée par au minimum 5 niveaux de concentrations injectés pour au moins 4 niveaux de concentration différents, en fonction du pourcentage de déviation. Un écart moyen de 15 % est toléré, sauf pour la LOQ qui tolère un écart de 20 % (EMA 2011).

2.2.4. Robustesse

La robustesse définit la capacité de résilience de la méthode analytique face à des variations induites par la modification de certains paramètres expérimentaux, tels que le pH de la phase mobile ou la qualité du lot de solvant utilisé. Elle traduit la fiabilité de la méthode analytique sur le long terme. La robustesse est contrôlée lors de la mise au point de la méthode en s'assurant que la quantification reste fiable lorsqu'on introduit des variations planifiées de paramètres.

2.2.5. Limites de détection et de quantification

L'ICH définit la limite de détection (LOD) comme la plus faible concentration du composé d'intérêt pouvant être détectée mais non quantifiée comme une valeur exacte. La limite de quantification (LOQ) définit quant à elle la sensibilité de la méthode. Elle est associée à la plus petite concentration en molécules cibles pouvant être détectées et quantifiées. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées afin de déterminer la valeur de ces limites :

- **visuellement** : la détermination de la LOD et de la LOQ se fait selon l'appréciation de l'expérimentateur, lorsqu'il estime pouvoir confirmer la présence d'un pic. Cette méthode de détermination de la LOD et de la LOQ est donc très subjective ;
- par le **calcul du rapport « signal / bruit »** : cette méthode est la plus couramment utilisée. Les LOD et LOQ sont déterminées comme les concentrations d'analytes permettant d'obtenir un pic avec respectivement une intensité 3 fois ou 10 fois supérieure à celle du bruit de fond.
- par **régression linéaire** : en analysant la dispersion des paramètres de régression linéaire obtenus lors de la calibration. Avec une relation de réponse linéaire du type $y = ax + b$, alors la LOD et la LOQ sont calculées selon : $LOD = 3 \cdot \sigma_b / a$ et $LOQ = 10 \cdot \sigma_b / a$ (σ_b étant l'écart-type de l'ordonnée à l'origine et a le coefficient directeur de la droite de calibration).

2.2.6. Modèle de régression

Il est également recommandé de valider la linéarité de la droite de calibration, c'est-à-dire la capacité d'une méthode à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon (Kruve et al. 2015). L'ICH recommande d'évaluer la relation de réponse pour 5 niveaux de concentration au minimum, sur trois jours et d'effectuer par conséquent trois séries indépendantes de ces 5 niveaux de concentrations et ce, à raison d'une série par jour (EMA 2011). La linéarité est validée en fonction de l'adéquation au modèle mathématique et du coefficient de détermination (R^2).

2.3. Analyse de métabolomique non ciblée

La métabolomique est un ensemble de techniques intégratives permettant d'analyser le métabolome, l'ensemble des molécules de poids moléculaire inférieur à 1 500 Da, d'un système vivant, permettant ainsi de comprendre le fonctionnement des organismes dans leur globalité (Lv 2013). Le terme de « métabolome » a été utilisé pour la première fois par Oliver en 1998 (Oliver et al. 1998) en référence au génome et autres approches omiques comme la génomique. L'étude du métabolome apporte une information fonctionnelle sur les processus métaboliques qui ont eu lieu au sein de l'organisme étudié. Les données générées par la métabolomique reflètent à la fois l'expression du génome, du transcriptome, et du protéome (**Figure 40**), et constituent donc le reflet le plus proche de

la fonctionnalité et du phénotype d'une cellule ou d'un organisme. L'analyse métabolomique se positionne ainsi comme l'outil ultime pour décrypter la réponse d'un organisme à des modifications génétiques, environnementales... On peut ainsi parler de « phénotypage biochimique » (Ménard et al. 2013).

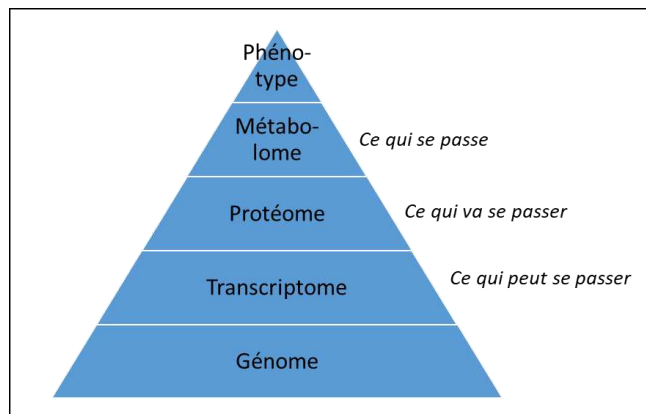


Figure 40. Niveau d'intervention de la métabolomique dans l'échelle d'organisation moléculaire du vivant.

On distingue deux types d'approches métabolomiques :

- l'approche globale, ou non ciblée, est utilisée pour l'analyse du métabolome dans son ensemble, c'est-à-dire l'analyse complète de tous les métabolites mesurables dans un échantillon (y compris des signaux provenant d'analytes non encore caractérisés) que l'on pourra chercher à identifier.
- l'approche ciblée quant à elle se focalise sur un nombre limité de métabolites connus et prédéfinis avant l'analyse en elle-même afin de déterminer avec précision leurs concentrations (relatives ou absolues) (Roux et al. 2011a).

La métabolomique permet d'appliquer ces deux démarches, pour vérification d'une hypothèse de travail en ciblant une liste de molécules, mais également pour acquérir des profils métabolomiques avec des molécules non identifiées. D'un point de vue technique, la métabolomique combine l'utilisation d'outils de chimie analytique, de statistiques et de bioinformatique, utilisés séparément ou ensemble pour effectuer (i) la préparation des échantillons, (ii) l'acquisition des empreintes métaboliques, (iii) la détection automatique des ions, (iv) les analyses statistiques et (v) l'identification (**Figure 41**) (Roux et al. 2011a).

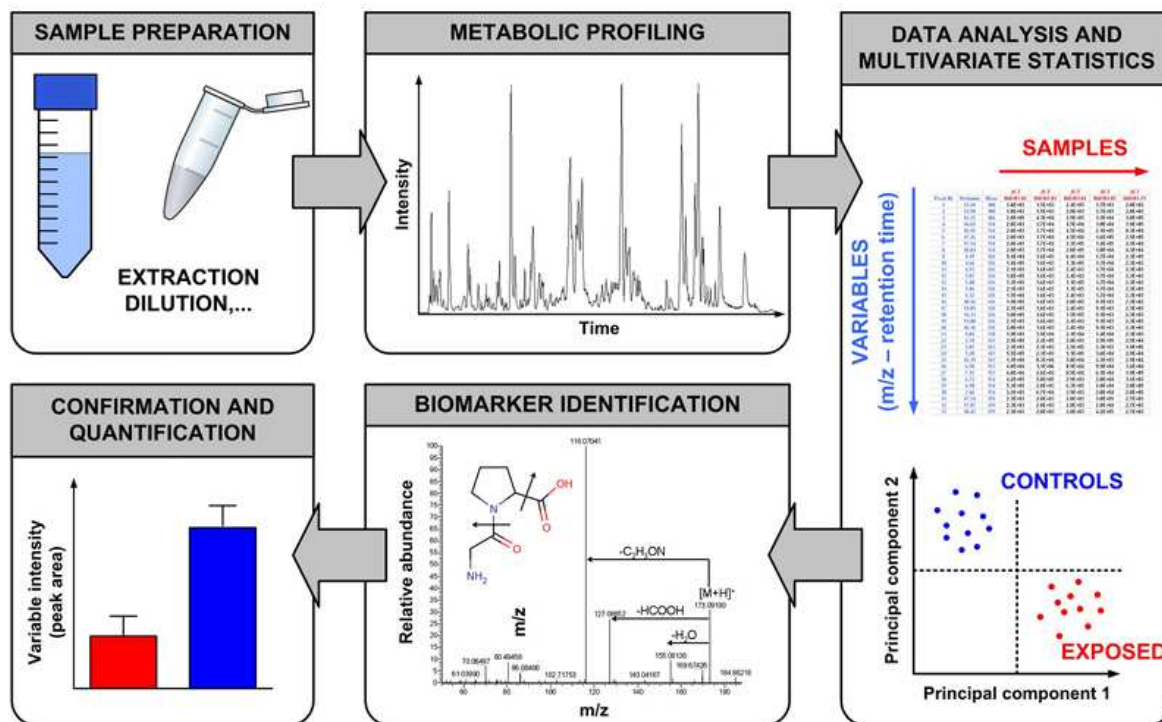


Figure 41. Workflow de déroulement d'analyses métabolomiques (d'après Roux et al. 2011a).

De nombreuses méthodes ont été appliquées à des études métabolomiques, dont la spectrométrie de masse, qui offre plusieurs avantages. Elle est tout d'abord sensible et permet la détection d'espèces à des concentrations de l'ordre du μM , ce qui permet de détecter des classes de métabolites à leurs concentrations physiologiques. Elle permet également d'identifier les métabolites par l'obtention de leur masse moléculaire ainsi que par l'étude de leurs spectres de fragmentation qui fournissent des informations structurales et qui peuvent être comparés avec celui d'un composé de référence. Il est ainsi possible de réaliser des identifications de composés qui ne sont pas décrits dans les bases de données et d'atteindre une plus grande certitude dans l'identification des composés déjà décrits.

Le métabolome contenant des composés appartenant à des classes chimiques très variées, et les analyser tous simultanément est difficilement envisageable avec une seule méthode d'analyse. C'est pourquoi il peut être envisagé de combiner plusieurs techniques analytiques afin de détecter le maximum de métabolites.

C. ANALYSES SENSORIELLES

1. Définition

L'évaluation sensorielle des produits alimentaires est une méthode permettant de décrire qualitativement et quantitativement les propriétés organoleptiques de produits en ayant recours aux cinq sens d'un panel de dégustateurs (Labbe et al. 2004). Comme dans toute démarche scientifique, cette discipline nécessite de la rigueur afin d'obtenir des résultats fiables et robustes. Néanmoins, la particularité de l'analyse sensorielle repose sur l'instrument de mesure utilisé, l'être humain. Ceci interroge sur la répétabilité et la reproductibilité de l'expérimentation. Les protocoles d'analyse sensorielle sont encadrés par différentes normes AFNOR (l'association française de normalisation) et ISO (l'organisation internationale de normalisation).

On distingue deux grands types d'informations en analyse sensorielle. D'une part, les caractéristiques objectives des produits (salé, sucré, amer, lisse). Ces mesures sont dites « objectives » car elles se font en fonction de références, par un jury entraîné : tous les juges (en général 10 à 12) sont entraînés et perçoivent les caractéristiques des produits analysés de la même façon. D'autre part, les données d'évaluation hédoniques font quant à elles appel à la notion de plaisir lors de l'appréciation du produit. Ce sont donc des données subjectives, liées au sujet (souvent entre 50 et 100 consommateurs naïfs) (Actia 2014).

2. Etablissement d'un profil sensoriel par un panel qualifié

Du fait des différences interindividuelles de sensibilité ou d'acceptabilité, l'évaluation sensorielle demande toujours de faire appel à plusieurs sujets. Le nombre de sujets est fonction à la fois de l'objectif recherché et de la précision attendue (Depledt et Sauvageot 2002). Une fois le panel constitué, il doit être entraîné afin de qualifier les sujets avant de procéder aux tests de dégustation en eux-mêmes.

2.1. Qualification des sujets

La sélection des sujets porte sur leur disponibilité et leurs motivations, puis sur leurs capacités d'expression sensorielle. D'une façon générale, la formation requise pour les sujets dépend de l'objectif de l'étude, du type d'essai ainsi que du produit. On distingue ainsi plusieurs niveaux de compétences :

- *sujet initié* : individu qui a déjà participé à au moins un essai sensoriel discriminatif de même nature que celui auquel il participe ; les sujets initiés participent aux essais de discrimination,
- *sujet qualifié* : individu choisi en fonction de sa capacité à effectuer un essai sensoriel et dont

les performances ont été contrôlées ; les sujets qualifiés ont des aptitudes sensorielles relatives à l'espace produit considéré ; elles sont validées lors de la sélection, développées par un entraînement, puis contrôlées ; les sujets qualifiés participent à tous les types d'essais analytiques,

- *sujet expert* : individu qualifié qui a une excellente acuité sensorielle ; il est entraîné à l'utilisation des méthodes d'évaluation sensorielle ; les sujets experts ont des aptitudes sensorielles relatives à un produit déterminé ; elles sont validées lors de la sélection, développées par un entraînement spécifique, puis contrôlées pour s'assurer de leur répétabilité ; les sujets experts participent à tous les types d'essais analytiques, ils sont spécifiquement adaptés lorsqu'une grande précision ou une grande constance des performances dans le temps sont recherchées.

2.2. Entraînement, contrôle et suivi du panel

La formation d'un groupe de sujets suit des normes AFNOR (**Tableau 9**). La fréquence d'entraînement requise dépend des tests et du niveau d'acuité sensorielle souhaitée. La bonne formation du panel est une étape essentielle pour obtenir des profils sensoriels des produits fiables (Labbe et al. 2004).

Tableau 9. Normes à respecter lors de l'entraînement, du contrôle et du suivi d'un groupe de sujets (d'après Actia 2014).

ENTRAÎNEMENT, FORMATION D'UN GROUPE DE SUJETS HOMOGENE	
Normes	NF ISO 8586-1 : 1993 NF ISO 8586-2 : 1994
Sujets	Nombre : à partir de 10 à 20 « sujets initiés » pour obtenir un groupe de 10 à 12 sujets entraînés
Séances d'entraînement	Nombre : 10 au minimum, proches dans le temps Mise en oeuvre de différents essais réalisés sur des produits spécifiques : <ul style="list-style-type: none"> - détection et reconnaissance des odeurs et saveurs : <ul style="list-style-type: none"> • produits de référence • échantillons complexes (boissons, aliments) - entraînement à la quantification d'un stimulus - entraînement à la description de produits spécifiques à l'espace produit concerné
Contrôle des performances des sujets	Évaluation des performances de chaque sujet, basée sur l'évaluation répétée des mêmes échantillons (<i>variance intra-individuelle</i>) : <ul style="list-style-type: none"> - analyse de la variance des données individuelles - répétabilité des réponses quantitatives - capacité de discrimination - corrélations entre les résultats individuels et les résultats moyens du groupe <ul style="list-style-type: none"> • profils : 4 à 6 produits x 3 évaluations x n sujets (au minimum 80 % du jury) • 3 évaluations distinctes dans le temps, intervalle de temps à définir selon les pratiques habituelles du jury et la durée de vie du produit testé Évaluation des performances du groupe (<i>répétabilité, discrimination, cohérence au sein du groupe</i>) : <ul style="list-style-type: none"> - analyse de variance sur des notes moyennes - ACP pour les profils - interaction produit / sujet & produit / séance
Suivi du jury	Motivation : <ul style="list-style-type: none"> - relation de confiance entre l'animateur et les sujets - indications sur les résultats des travaux - gratifications ou rétributions Contrôles périodiques des performances : <ul style="list-style-type: none"> - minimum tous les 2 ans pour les qualifiés - minimum tous les ans pour les experts - baisse des performances → nouvel entraînement Maintien de l'effectif du groupe : <ul style="list-style-type: none"> - entraînement de nouveaux sujets (2 ou 3), intégration progressive

2.3. Conditions de dégustation

Les exigences relatives aux conditions d'évaluation des produits visent à minimiser les biais et les perturbations que peuvent subir les dégustateurs pendant l'évaluation des produits :

- les essais se déroulent dans un laboratoire conforme à la norme NF 8589 :2007 (**Figure 42**) ;
- les produits peuvent être présentés de manière monadique séquentielle (les produits sont présentés un par un), tous simultanément, laissant ainsi la possibilité au juge de revenir sur un produit, ou bien par paire afin d'étudier la notion de plaisir ;
- les juges doivent respecter des consignes avant la séance de dégustation, telles que ne pas consommer de produits fortement aromatiques (chewing-gum, café, cigarette...), ne pas porter de produits fortement aromatiques (parfum...), prévenir en cas d'absence ou de

perturbation physiologique (rhume, soin dentaire...), ne pas arriver en retard...

- les panélistes ne doivent pas communiquer entre eux ;
- les sujets doivent respecter un temps d'attente minimum entre deux échantillons de produits. Ils ont également de l'eau et une biscotte, des aliments capables d'atténuer les caractéristiques sensorielles du produit précédent





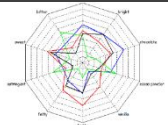
Figure 42. Salle de dégustation de Junia ISA conforme à la norme NF 8589 :2007.

Le nombre de produits à déguster est limité, mais difficile à fixer, notamment dans le cas des produits alcoolisés. Selon le type de produit 12 produits peuvent être dégustés (en général 6 dans le cas d'un profil). Les conditions de dégustation doivent être rigoureusement les mêmes d'une séance à une autre.

2.4. Tests sensoriels : établissement d'un profil sensoriel

Il existe en analyse sensorielle différents tests avec chacun une méthodologie qui leur est propre. Ainsi, parmi les essais analytiques, on distingue les tests discriminatifs, les tests de positionnement et enfin les essais descriptifs avec les profils sensoriels (**Tableau 10**). On détaillera ici seulement la réalisation d'un profil sensoriel, qui sera utilisé dans la suite des travaux de recherche.

Tableau 10. Tableau de synthèse des tests sensoriels pouvant être utilisés suivant l'objectif de l'étude (d'après ACTIA 2014).

	Question	Type d'essai	Type de réponse
Essais discriminatifs - <i>différence</i> - <i>similitude</i>	Existe-t-il des différences ?	- Triangulaire	Produits identiques
	- Suivi de production - Temps de stockage - Changement de : • matière première • technologie • fournisseur...	- Duo-trio - 2 sur 5	
Essais de positionnement (sur une seule caractéristique)	Intensité d'une caractéristique ?	- Comparaison par paires	
	- Taux de matière première - Concentration d'arôme - Intensité d'amertume	- Classement - Notation	
Essais de positionnement global	Ressemblances globales entre produits ? - Positionnement par rapport à la concurrence - Développement produit	- Tri libre - Napping® - Positionnement sensoriel polarisé	
Essais descriptifs (un ensemble de caractéristiques)	Carte d'identité du produit ? - Formuler, développer, - Contretyper - Suivre l'évolution d'un produit	Profil sensoriel	
Essai hédonique, mesure de plaisir	Quel est le produit préféré ?	- Comparaison par paires - Classement - Notation	

Le profilage sensoriel est utilisé afin de décrire et d'évaluer en intensité et en qualité un ensemble de caractéristiques sensorielles perçues sur un ou plusieurs produits. Les sujets ont au minimum la formation de sujets qualifiés. Ce sont des tests complexes, qui nécessitent au minimum 10 sujets rigoureux dans leurs analyses, motivés et disponibles, et *a priori* compétents.

Différentes méthodes permettent de décrire un produit, en employant différentes techniques quant au choix du vocabulaire descriptif (libre ou imposé) et sur le mode de notation (note d'intensité ou fréquence de perception). Dans le cas de la présente étude, on utilisera un profil sensoriel descriptif quantitatif. Le profil sensoriel descriptif quantitatif repose sur la recherche et la quantification de descripteurs appropriés aux produits à analyser.

2.5. Formation des sujets

La formation des sujets est spécifique à un produit donné, même pour un sujet habitué à la technique du profil. 10 séances d'entraînement, à raison d'une séance par semaine sont recommandées pour des sujets n'ayant pas d'expérience du produit, mais ce nombre doit être adapté en fonction de la performance constatée ou attendue pour le groupe. Les sujets dégustent l'ensemble des produits et utilisent l'ensemble des descripteurs et des références issues de la génération de descripteurs. À la fin de l'entraînement, on mesure la répétabilité et la capacité de discrimination du groupe de sujets pour l'espace produit.

Des contrôles de performance réguliers (norme AFNOR NF EN ISO 8 586) permettent de vérifier l'homogénéité du groupe ainsi que sa stabilité au cours du temps pour les études de longue durée. Le contrôle des performances sujet par sujet porte sur l'étude de la répétabilité de l'accord avec le groupe et de la capacité de discrimination de chaque sujet (analyse de variance par sujet), au moment de l'entraînement comme de l'évaluation. Le contrôle des performances du groupe porte sur l'étude de la répétabilité et de la capacité de discrimination du groupe ainsi que de son homogénéité.

2.6. Réalisation du profil sensoriel

Enfin, la dernière étape de l'essai consiste en la réalisation du profil sensoriel descriptif quantitatif. Lors des séances de dégustation, les échantillons sont présentés soit simultanément, soit de manière monadique. Dans les deux cas, les essais se déroulent selon un plan d'expérience équilibré permettant d'annuler les effets d'ordre de présentation et les effets de report de premier ordre. Il est construit de manière à obtenir au minimum 10 réponses indépendantes par produit. La séance peut être entièrement répétée afin de tester la reproductibilité des résultats. Des produits témoins peuvent être introduits lors de l'évaluation, si l'étude a pour objectif un positionnement des produits par rapport à un produit de référence ou pour contrôler la stabilité des réponses du groupe de sujets.

Chaque descripteur est quantifié sur une échelle. L'analyse des résultats d'un profil sensoriel repose sur différents tests statistiques (**Tableau 11**).

Tableau 11. Tests statistiques utilisés en analyse sensorielle (d'après ACTIA 2014).

Test	Objectif	Type de données
ANOVA	Étude de la discrimination entre produits et de la répétabilité des sujets par la mesure des effets : <ul style="list-style-type: none"> - produits - sujets - interactions sujets / produits - séances - interaction produits / séances 	Tableau produits / sujets et répétitions (lorsque la comparaison porte sur plus de 2 produits ou plus de 2 séances)
Analyse en Composante Principale (ACP)	Visualiser les proximités entre produits Expliquer les particularités de regroupements de produits définis <i>a posteriori</i>	- Le tableau des résultats bruts, - Le tableau des moyennes produits / descripteurs
Analyse factorielle discriminante (AFD)	Expliquer les particularités des regroupements de produits définis <i>a priori</i>	- Le tableau des résultats bruts, - Le tableau des moyennes produits / descripteurs
Analyse des Correspondances Multiples (ACM)	Expliquer les particularités de regroupements de produits définis <i>a posteriori</i>	Tableau des notes moyennes sujets / produits
Analyse Factorielle des Correspondances (AFC)	Expliquer les particularités de regroupement de produits définis <i>a posteriori</i>	- Le tableau des résultats bruts qualitatifs, - Le tableau des fréquences de citation des descripteurs / produits
Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)	Établir des groupes de descripteurs ou de produits	Tableau des notes moyennes

D. ANALYSES MULTIVARIÉES

1. Objectifs

Chaque jeu de données acquis lors d'une série d'analyses s'intéressant à un type de variable peut être analysé indépendamment. En particulier, lors des analyses des données sensorielles détaillées précédemment, quelques tests ont déjà été évoqués, tels que l'ANOVA permettant de discriminer les produits en fonction des scores de réponses des panélistes pour chaque descripteur ou le test de Student pour s'assurer de la répétabilité inter-bouteille des produits dégustés par les panélistes. Pour les analyses de la quantification, le test de Tukey (HSD) a permis une comparaison multiple entre les échantillons pour déterminer si les teneurs moyennes des échantillons en composés dosés sont significativement différentes les unes des autres, pour chaque composé étudié séparément.

Ainsi, il existe différents types de variables : les variables qualitatives (couleur...), semi-quantitatives (par exemple en analyse sensorielle), quantitatives discrètes (nombre de feuilles) ou continue (dans le cadre d'un dosage par exemple). Une analyse peut alors porter sur plusieurs variables. Les analyses multivariées s'intéressent à des lois de probabilité à plusieurs variables. Elles permettent de synthétiser et de visualiser rapidement une grande quantité d'informations, ceci en projetant les données initiales dans un espace de dimensions réduites qui permet une visualisation aisée de l'ensemble des données (Roux 2011b). Il en existe de différents types selon l'objectif recherché, la nature des variables et la mise en œuvre formelle. On différencie notamment :

- les analyses statistiques descriptives, telles que l'analyse en composante principale (ACP) ou l'analyse factorielle multiple (AFM), qui ne nécessitent pas d'information « *a priori* » sur la nature des échantillons. Elles permettent de décrire des données et de visualiser la répartition spontanée des échantillons.
- les analyses statistiques explicatives qui visent à expliquer une ou plusieurs réponses (Y). Dans ce cas, des informations sont données sur la nature des échantillons. Parmi les méthodes explicatives, on trouve notamment la régression PLS.

En outre, au cours de cette étude, différents jeux de données composés de plusieurs variables (observations) ont été acquis pour un même ensemble d'individus (population). L'originalité de ce travail a donc consisté à comparer ces différents jeux de données, leur structure et leurs potentielles interactions par le biais de différents outils mathématiques.

2. Exemple d'analyses multivariées

2.1. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

2.1.1. Principe

La CAH organise les n individus caractérisés par k variables quantitatives classées dans un tableau de données en les regroupant sous forme d'arborescence (**Figure 43**). Cette structuration permet de mettre en évidence les liens hiérarchiques entre individus ou groupes d'individus, et de détecter le nombre de classes « naturel » au sein de la population. Différentes méthodes peuvent être utilisées afin de mesurer la ressemblance entre individus, et notamment la distance euclidienne ou le calcul d'indices de similarité. Pour mesurer la ressemblance entre des groupes d'individus, on peut utiliser le saut minimum ou lien simple (plus petite distance), ou au contraire le lien complet (plus grande distance), ou bien encore les critères de Ward. Cette méthode développée par Ward (Ward 1963) permet de construire une classification ascendante hiérarchique afin d'agréger les individus de sorte à ce que l'augmentation de l'inertie interclasse soit maximale, c'est-à-dire à ce que l'augmentation de l'inertie intraclasse soit minimum.

2.1.2. Dendrogramme

Les liens hiérarchiques d'une CAH sont souvent représentés à l'aide d'un dendrogramme. En définissant un seuil de coupure, on partitionne alors les individus en différentes classes (**Figure 43**).

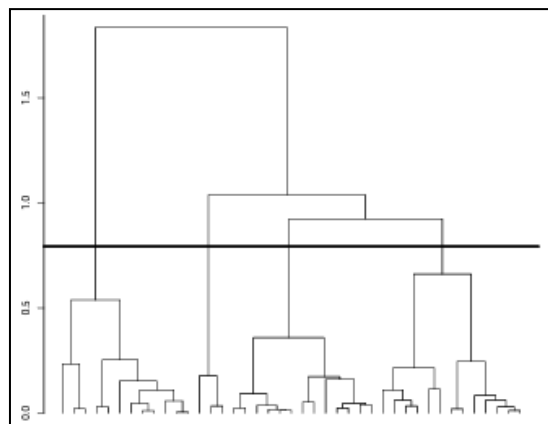


Figure 43. Exemple de dendrogramme, avec un seuil de coupure définissant 4 classes.

2.1.3. Qualité d'une partition

Une partition est de bonne qualité si (i) deux individus d'une même classe se ressemblent, c'est-à-dire s'il y a une petite variabilité intra-classe ; (ii) les individus de deux classes différentes sont éloignés, c'est-à-dire s'il y a une grande variabilité inter-classe.

Il faut donc choisir un compromis entre une petite variabilité intra-classe et une grande variabilité inter-classe. Ainsi, le ratio inertie inter sur inertie totale constitue un indicateur de la qualité d'une partition. Il varie entre 0 et 1 et se rapproche de 1 quand la partition est bonne. S'il est égal à 1,

cela signifie que tous les individus à l'intérieur d'une classe sont identiques. En revanche, lorsqu'il se rapproche de 0, cela signifie que pour chaque variable toutes les classes ont la même moyenne, signifiant ainsi que la partition ne permet pas de séparer les classes. Cependant, ce critère dépend du nombre d'individus et du nombre de classes. En diminuant le nombre de classes, on diminue la variabilité. Il faut donc relativiser ce critère par rapport au nombre d'individus et au nombre de classes.

2.1.4. Illustration par une heatmap

Une *heatmap* (ou carte de chaleur) consiste en une représentation tridimensionnelle d'une matrice de données, où la première dimension est constituée des observations (échantillons), la deuxième des variables et la troisième de l'intensité des caractéristiques des variables. Ce modèle de visualisation des données permet d'observer et d'interpréter la présence/absence et l'abondance des différents métabolites dans les différents échantillons et groupes d'échantillons, ce qui peut être traduit en analyses qualitatives et quantitatives. En outre, des dendrogrammes peuvent être associés à une *heatmap* pour différents objectifs :

- afin de regrouper les observations et/ou les variables ;
- afin de visualiser les similitudes entre les échantillons permettant de rassembler les échantillons ayant des profils similaires ;
- afin d'assembler les variables présentant des comportements similaires dans les différents échantillons.

2.2. Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'ACP est une méthode classique en analyse de données multivariées permettant de réduire le nombre de variables. Les données pour une ACP sont constituées de n observations et p variables quantitatives et continues. L'ACP vise à décrire cet ensemble de données par de nouvelles variables en nombre restreint. Ces nouvelles variables sont construites à partir des p variables initiales par combinaison linéaire. Cette méthode de classification est dite non supervisée car elle ne tient pas compte de l'appartenance des échantillons à des groupes préexistants.

La représentation graphique de l'ACP permet de visualiser les relations entre individus par l'évaluation de leurs ressemblances, ainsi que les relations entre variables par l'évaluation de leurs liaisons. Deux individus se ressemblent, ou sont proches, s'ils possèdent des valeurs proches pour l'ensemble des variables. Pour ce qui est de la visualisation des données, les données sont présentées, sous forme de « *score plot* » ou carte factorielle du poids des individus, c'est-à-dire la projection des échantillons dans le nouveau repère généré par l'ACP, ou sous forme de « *loading plot* » ou carte factorielle du poids des variables qui représente la projection des variables initiales sur les nouvelles composantes (**Figure 44**).

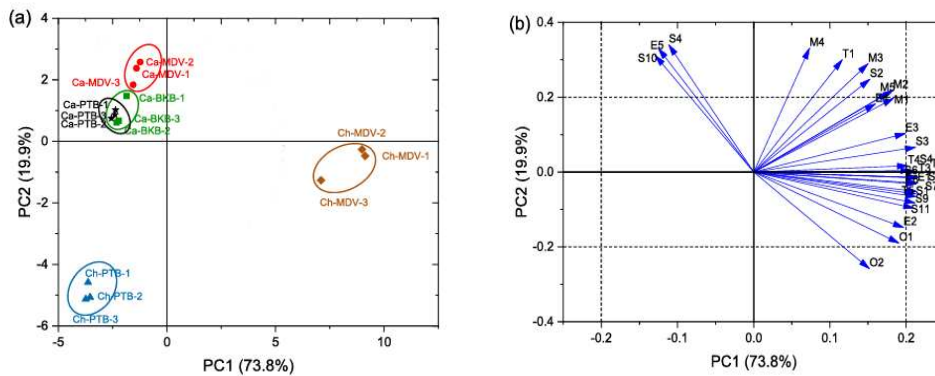


Figure 44. Présentation des données traitées par ACP. A : Carte factorielle du poids des individus ; B : Carte factorielle du poids des variables (d'après Su et Yin 2021).

L'analyse en coordonnée principale (PCoA) et l'ACP sont assez proches puisque la PCoA permet aussi de représenter des individus dans un espace de dimension réduite avec des axes optimaux en termes de variabilité. La PCoA est une méthode dont le but est de représenter les individus pour lesquels on dispose d'une matrice de proximité. C'est pourquoi, la PCoA appliquée à la matrice des distances euclidiennes entre les individus. Cette distance peut se définir comme la distance orthodromique entre 2 points.

Une analyse factorielle de données mixtes (AFMD ou PCAmix) peut être vue comme une combinaison entre l'ACP permettant d'analyser un tableau d'observations qualitatives, et l'ACM (Analyse des Correspondances Multiples) permettant l'analyse d'un tableau d'observations qualitatives.

2.3. Analyse Factorielle Multiple (AFM)

2.3.1. Principe

L'AFM est une méthode factorielle permettant l'étude de tableaux dans lesquels un ensemble d'individus est décrit par un ensemble de variables quantitatives et/ou qualitatives structurées en groupes (**Figure 45**).

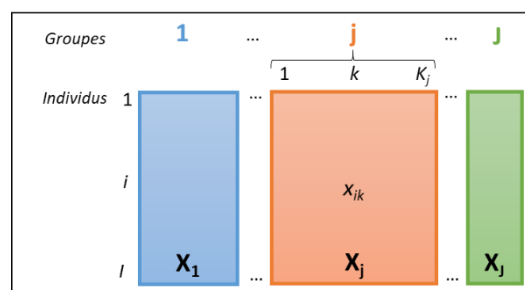


Figure 45. Structuration des jeux de données pour une AFM (d'après Husson).

Cette méthode d'analyse permet d'analyser des problèmes complexes mettant en jeu plusieurs sources d'informations, en prenant en compte :

- les ressemblances entre individus du point de vue de l'ensemble des variables
- les relations entre variables
- la structuration en groupes, en étudiant les ressemblances et les différences entre groupes (voir les spécificités de chaque groupe)
- les ressemblances et les différences entre groupes du point de vue individuel : est-ce qu'un individu est décrit de la même manière par tous les groupes, ou bien est-ce qu'un groupe le décrit de manière très spécifique ?
- comparer la typologie des individus obtenue par chaque groupe, cela revient à construire des ACP séparées à partir des données de chaque tableau.

Un point crucial dans l'analyse multi-tableaux est celui de l'équilibre de l'information. On veut chercher à équilibrer les groupes de variables pour éviter que certains groupes aient une contribution trop importante dans le calcul des distances entre individus.

2.3.2. Construction de l'AFM

Pour équilibrer les groupes, ce n'est pas l'inertie totale qui est utilisée comme pour une ACP, mais l'inertie maximum d'une dimension. Ainsi, on évite qu'un groupe unidimensionnel ait trop d'importance dans l'analyse mais on ne restreint pas la richesse d'un groupe multidimensionnel. Pour construire un tel équilibre, on divise les valeurs d'une variable par la plus grande valeur propre du groupe auquel elle appartient. Cette pondération revient à utiliser, pour chaque variable, un poids égal à l'inverse de la première valeur propre du groupe auquel elle appartient. La première étape de l'analyse consiste donc à calculer la première valeur propre de chaque groupe. Ensuite, pour pondérer chaque variable par l'inverse de l'inertie de la première valeur propre du groupe auquel elle appartient on divise chaque variable par la racine carré de la première valeur propre de son groupe (λ_1^j), tel que

$\left[\frac{x_1}{\sqrt{\lambda_1^1}} ; \frac{x_2}{\sqrt{\lambda_1^2}} ; \dots ; \frac{x_j}{\sqrt{\lambda_1^j}} \right]$. Dans la présente notation, X_j correspond au tableau j centré ou bien centré

réduit, suivant si les variables du groupe j sont normées ou non. Enfin, il suffit de procéder à l'ACP de ce tableau qui juxtapose les variables (pondérées) de tous les tableaux (Husson).

La pondération étant la même pour toutes les variables d'un groupe. Cela permet de préserver la structure du groupe, préservant ainsi l'équilibre des variables au sein d'un groupe (*i.e.* le ratio $\frac{\lambda_1}{\lambda_2}$ reste le même). Plus précisément, la pondération donne à chaque groupe une première valeur propre égale à 1. La principale dimension de variabilité a la même variabilité d'un groupe à l'autre. Ainsi, un seul groupe ne peut pas générer à lui seul la première dimension de l'AFM, même si ce groupe a beaucoup de variables et est très structuré. Enfin, la pondération ramène à 1 la principale dimension

de variabilité et les valeurs propres suivantes sont diminuées de façon proportionnelle. Un groupe multidimensionnel contient plus d'informations donc il est normal qu'il contribue à plus de dimensions (après équilibre, son inertie globale est plus grande) (Husson, 2015).

L'AFM pouvant être considérée comme une ACP sur le tableau pondéré qui juxtapose les données de tous les groupes. Elle permet d'obtenir, comme pour une ACP, un graphe des individus et un graphe des variables.

2.3.3. Relations entre les tableaux : coefficients L_g et RV

Enfin, les relations entre les tableaux peuvent également être évaluées. Pour cela, on peut tout d'abord utiliser le coefficient $L_g(K_j, v_1)$ qui est une mesure de liaison entre un groupe de variables et une variable. Il permet de mesurer l'inertie projetée de toutes les variables du groupe K_j sur la variable v_1 . La représentation graphique de ces coefficients permet de comparer synthétiquement les groupes et d'étudier leur position relative. Le groupe j a pour coordonnées $L_g(K_j, v_1)$ et $L_g(K_j, v_1)$.

La première composante principale de l'AFM est la variable qui maximise la liaison avec tous les groupes au sens du L_g . L_g peut être également être étendue à la liaison entre deux groupes de variables en calculant le coefficient entre un groupe et lui-même, ou bien comme un indice de dimensionnalité d'un groupe.

Cependant, le coefficient L_g entre 2 groupes est un critère qui n'est pas borné. Si on normalise le coefficient L_g entre 2 groupes par la dimensionnalité de chacun des groupes, on définit le coefficient RV , calculé par la formule : $RV(K_j, K_m) = \frac{L_g(K_j, K_m)}{\sqrt{L_g(K_j, K_j)} \sqrt{L_g(K_m, K_m)}}$. Ce coefficient RV varie entre 0 et 1 et

il est plus facile de savoir si 2 groupes sont liés ou non puisque le coefficient est borné par 1. Lorsque RV est égal à 0, les variables de K_j et K_m sont non-corrélées ; avec RV égal à 1, les deux nuages de points sont homothétiques (Robert et Escoufier 1976).

2.4. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA)

L'analyse discriminante OPLS a été introduite en 2002 par les chimométriciens suédois Johan Trygg et Svante Wold (Trygg et Wold 2002). Elle a été développée sur la base de l'algorithme NIPALS (Nonlinear Iterative Partial Least Squares). Il s'agit d'un modèle statistique multivarié supervisé explicatif qui vise à explorer et à évaluer la discrimination entre deux (ou plusieurs) groupes définis d'échantillons (Boccard et Rutledge 2013 ; Trygg et Wold 2002). Comme dans l'ACP, ce modèle s'appuie sur les combinaisons linéaires des variations associées aux variables, et permet d'identifier les combinaisons linéaires donnant la meilleure explication de la variance des données corrélées à un facteur expérimental défini (**Figure 46**).

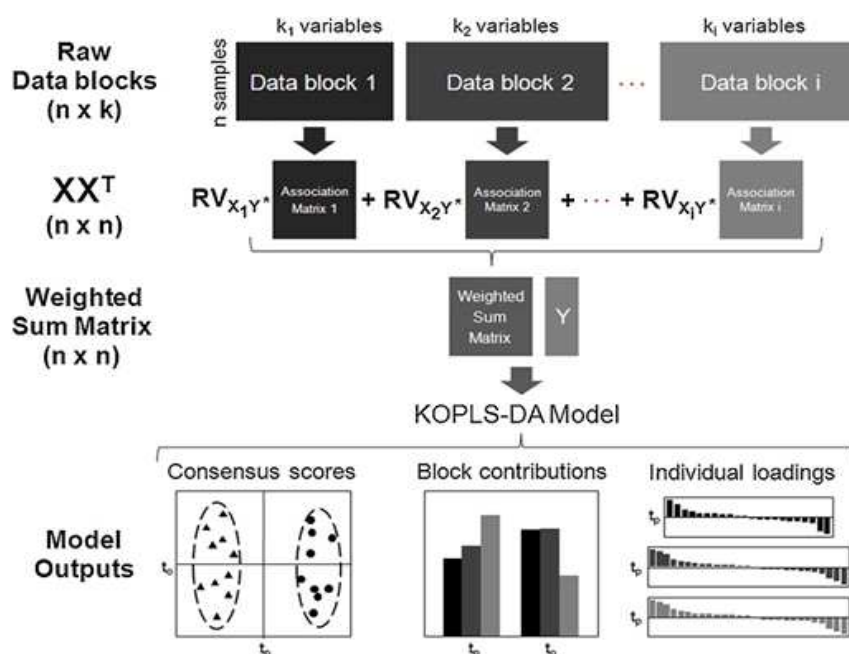


Figure 46. OPLS-DA workflow (d'après Boccard et Rutledge 2013).

Le modèle OPLS est composé de 2 sources de variation modélisées : une composante prédictive p et une composante indépendante orthogonale o (**Figure 47**). L'OPLS peut être utilisée à des fins de discrimination, on parle dans ce cas d'OPLS-DA (Trygg et al. 2007). Elle sépare alors la variation prédictive (axe horizontal), représentant la variation qui est corrélée avec le facteur défini (la composante prédictive p), des variations orthogonales (axe vertical) représentant certaines variations systématiques qui sont non corrélées (orthogonales) au facteur défini (les composantes orthogonales $o(n)$) (Trygg et Wold 2002 ; Boccard et Rutledge 2013). Les variations inter-classe et intra-classe sont séparées sur les deux composantes en OPLS-DA, ce qui facilite beaucoup l'interprétation du modèle.

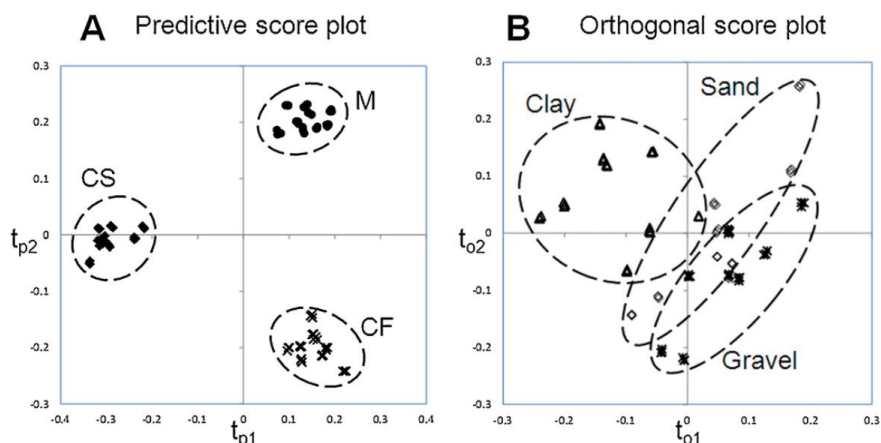


Figure 47. Exemple de graphiques des scores prédictifs OPLS-DA consensuels. A : diagramme de score prédictif t_{p1} vs. t_{p2} ; B : diagramme de score orthogonal t_{o1} vs. t_{o2} (d'après Boccard et Rutledge 2013).

L'étude porte sur le contenu en polyphénols de 27 échantillons de vin par RMN. CS : Cabernet Sauvignon ; CF : Cabernet Franc ; M : Merlot noir, cultivés sur trois types de sols : argile, sable et gravier.

La méthode OPLS-DA peut être appliquée à toute expérimentation impliquant plusieurs jeux de données pour caractériser un ensemble donné d'observations (Boccard et Rutledge 2013). Le principal avantage de l'OPLS-DA réside dans sa capacité à révéler les variations exclusivement corrélées avec le facteur étudié, en filtrant toutes les variations orthogonales et aléatoires qui pourraient influencer la discrimination des groupes comparés. L'investigation des variations orthogonales systématiques expliquées par la composante o permet d'évaluer la confiance dans la discrimination. En effet, elle peut révéler des variations inconnues qui pourraient influencer les analyses, telles que des dérives instrumentales, des problèmes d'échantillonnage, des variations biologiques, ou d'autres facteurs importants qui n'ont pas été pris en compte lors du design expérimental (par exemple le moment de la récolte, etc.). En revanche, si ces variations orthogonales dominent l'ensemble des données, elles risquent de masquer les effets étudiés ou fausser l'interprétation des variations liées aux facteurs (FUN MOOC 2020).

CHAPITRE 3. RESULTATS

CHAPITRE 3. RESULTATS

Cette étude vise donc à investiguer la diversité des houblons sauvages de la région Hauts-de-France d'un point de vue agronomique, morphologique, génétique, chimique et organoleptique après brassage, en s'appuyant sur les différents outils méthodologiques qui viennent d'être développés. Pour cela, 50 accessions sauvages ont été collectées sur différents sites de la région Hauts-de-France, et seront comparées à 10 variétés commerciales cultivées en région et 3 variétés anciennes.

Les résultats présentés ci-contre abordent donc les différents aspects de cette diversité sur notre collection de houblons aussi bien en conditions *in-situ* que *ex-situ*.

L'**Étude I** compare ces accessions sauvages collectées en conditions *in-situ* avec nos références commerciales et anciennes, aux points de vue chimiques et génétique. L'ensemble des différents jeux de données obtenus à fait l'objet d'une analyse multi-factorielle afin d'évaluer les liens qui les relient, et les structures sous-jacentes à l'organisation des individus. L'**Étude II** porte sur caractérisation phénotypique des accessions sauvages collectés en conditions *in-situ*. L'**Étude III** quant à elle porte s'intéresse à l'analyse des houblons sauvages replantés *ex-situ* dans notre houblonnière expérimentale. Une première analyse s'intéresse au suivi des populations de ravageurs sur les pieds ; une deuxième partie porte sur la diversité chimique des nos accessions, en lien avec les caractéristiques physico-chimique et organoleptiques de certaines accessions après brassage. Ces données ont été reliées entre elles par analyse OPLS-DA.

Étude I. Analyses multivariées pour l'identification et la caractérisation de la diversité des houblons sauvages des Hauts-de-France collectés *in situ*

Au regard du contexte développé dans le **Chapitre 1**, les houblons sauvages apparaissent comme une source de diversité potentiellement valorisable pour un développement variétal pour répondre à la demande des brasseurs en région.

Ainsi, ce volet vise à explorer la diversité génétique et chimique des pieds femelles de houblons sauvages collectés *in situ* sur différents sites de la région Hauts-de-France. 50 accessions de houblon ont été collectés sur différents sites de la région Hauts-de-France, présentant un intérêt écologique et/ou ethnobotanique. Ils ont été comparés à 3 variétés anciennement cultivées dans la région, et 10 variétés commerciales cultivées actuellement par la Coop'hounord.

Les objectifs du travail de cette présente partie sont les suivants :

- caractériser la diversité des sites de collectes d'un point de vue pédologique ;
- investiguer la diversité génétique des houblons sauvages de la région Hauts-de-France, *via* l'utilisation de marqueurs microsatellites, afin de comprendre la structuration génétique des différentes populations étudiées et les liens phylogénétiques existants entre elles ;
- explorer la diversité chimique des houblons sauvages de la région, par une analyse de leur composition en composés phénoliques prénylés et en composés volatils, ainsi que par une étude de métabolomique non ciblée ;
- évaluer les corrélations entre génotype et chémotype, en prenant en compte la diversité pédologique du biotope d'origine, afin de comprendre la structuration des individus et leur répartition au travers des différents jeux de données obtenus par une analyse multifactorielle.

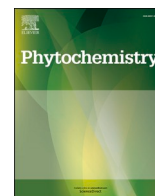
L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude a fait l'objet d'une publication acceptée sous réserve de modifications dans *Phytochemistry* (Facteur d'impact = 4,004).

Anne-Sophie Paguet, Ali Siah, Gabriel Lefèvre, Sophie Moureu, Jennifer Samaillie, Thierry Cadalen, Franck Michels, Barbara Deracinois, Christophe Flahaut, Harmony Alves Dos Santos, Audrey Etienne-Debaecker, Caroline Rambaud, Sylvie Chollet, Roland Molinié, Jean-Xavier Fontaine, Christophe Waterlot, Marie-Laure Fauconnier, Sevser Sahpaz, Céline Rivière. « *Multivariate analysis of chemical and genetic diversity of wild hop (*Humulus lupulus* L.) collected in situ in Northern France* ».

Résumé de l'article :

Le houblon (*Humulus lupulus* L.) est une plante connue depuis plusieurs siècles pour ses usages tant brassicoles que médicinaux, en raison notamment de sa composition chimique originale. Ces dernières années, la culture du houblon qui était en déclin connaît un renouveau pour plusieurs raisons, notamment un engouement pour les bières aromatiques fortement houblonnées. Dans ce contexte, le présent travail vise à étudier la diversité génétique et chimique de cinquante houblons sauvages collectés sur différents sites du Nord de la France. Ces houblons sauvages ont été comparés à dix variétés commerciales et trois variétés anciennes cultivées dans la même zone géographique échantillonnée. L'analyse génétique basée sur un génotypage utilisant des marqueurs microsatellites a montré un niveau élevé de diversité avec une structure de population significative. La caractérisation phytochimique du houblon a été basée sur l'analyse des composés volatils, la quantification des principaux composés phénoliques prénylés ainsi que la métabolomique non ciblée. Cette étude a révélé un niveau élevé de diversité chimique parmi les accessions sauvages évaluées. Une analyse des échantillons de sol a également été réalisée afin d'obtenir une classification pédologique de ces différents sites de collecte. Les résultats de l'analyse statistique multivariée suggèrent que le houblon sauvage constitue un important réservoir de diversité chimique et génétique de cette espèce.

Mots-clés : *Humulus lupulus* L. ; houblons sauvages ; marqueurs SSR ; analyse de sol ; HS-SPME GC-MS ; UHPLC-UV-MS ; métabolomique non ciblée ; analyse multifactorielle.



Multivariate analysis of chemical and genetic diversity of wild *Humulus lupulus* L. (hop) collected in situ in northern France

Anne-Sophie Paguet^a, Ali Siah^a, Gabriel Lefèvre^a, Sophie Moureu^a, Thierry Cadalen^a, Jennifer Samaillie^a, Franck Michels^a, Barbara Deracinois^a, Christophe Flahaut^a, Harmony Alves Dos Santos^a, Audrey Etienne-Debaecker^a, Caroline Rambaud^a, Sylvie Chollet^a, Roland Molinié^a, Jean-Xavier Fontaine^a, Christophe Waterlot^b, Marie-Laure Fauconnier^a, Sevser Sahpaz^a, Céline Rivière^{a,*}

^a Joint Research Unit 1158 BioEcoAgro, Univ. Lille, JUNIA, UPJV, Univ. Liège, INRAE, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte D'Opale, ICV—Institut Charles Viollette, F-59650 Villeneuve D'Ascq, France

^b Univ. Lille, Institut Mines-Télécom, Univ. Artois, JUNIA, ULR 4515 – LGCGE, Laboratoire de Génie Civil et Géo-Environnement, F-59000 Lille, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Humulus lupulus L.
Cannabaceae
Wild hops
SSR fingerprinting
Soil analysis
HS-SPME GC-MS
UHPLC-UV-MS
Untargeted metabolomics
Multiple factor analysis

ABSTRACT

The hop plant (*Humulus lupulus* L.) has been exploited for a long time for both its brewing and medicinal uses, due in particular to its specific chemical composition. These last years, hop cultivation that was in decline has been experiencing a renewal for several reasons, such as a craze for strongly hopped aromatic beers. In this context, the present work aims at investigating the genetic and chemical diversity of fifty wild hops collected from different locations in Northern France. These wild hops were compared to ten commercial varieties and three heirloom varieties cultivated in the same sampled geographical area. Genetic analysis relying on genome fingerprinting using 11 microsatellite markers showed a high level of diversity. A total of 56 alleles were determined with an average of 10.9 alleles per locus and assessed a significant population structure (mean pairwise $F_{ST} = 0.29$). Phytochemical characterization of hops was based on volatile compound analysis by HS-SPME GC-MS, quantification of the main prenylated phenolic compounds by UHPLC-UV as well as untargeted metabolomics by UHPLC-HRMS and revealed a high level of chemical diversity among the assessed wild accessions. In particular, analysis of volatile compounds revealed the presence of some minor but original compounds, such as aromadendrene, allo-aromadendrene, isoldene, β -guaiene, α -ylangene and β -pinene in some wild accessions; while analysis of phenolic compounds showed high content of β -acids in these wild accessions, up to 2.37% of colupulone. Genetic diversity of wild hops previously observed was hence supported by their chemical diversity. Sample soil analysis was also performed to get a pedological classification of these different collection sites. Results of the multivariate statistical analysis suggest that wild hops constitute a huge pool of chemical and genetic diversity of this species.

1. Introduction

Humulus lupulus L. (hop) is a dioecious ($2n = 20$) climbing perennial plant belonging to the Cannabaceae family, widely distributed throughout the Northern Hemisphere including Europe, Asia and North America (Small, 1978; Neve, 1991). Traditionally, only female plants of *H. lupulus* are cultivated because of the use of their inflorescences, commonly referred to as hop cones or hops. This part of the plant

imparts to the beer several organoleptic and physical qualities such as bitterness, aroma, flavor, foam stability and microbial protection linked to its unique combination of secondary metabolites (Schönberger and Kostecky, 2011). Actually, from a biogenetic point of view, hop synthesizes original phenolic compounds, including prenylated chalcones as xanthohumol and desmethylxanthohumol and acylphloroglucinol derivatives (α -acids and β -acids) (Bocquet et al., 2018a) (Fig. 1). Hop essential oil is also rich in terpenes and sesquiterpenes (α -humulene,

* Corresponding author. Céline Rivière Joint Research Unit 1158 BioEcoAgro, University of Lille, Faculty of Pharmacy, 3 rue du Professeur Laguesse, BP 83, 59000 Lille, France. celine.riviere@univ-lille.fr

E-mail address: celine.riviere@univ-lille.fr (C. Rivière).

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113508>

Received 29 July 2022; Received in revised form 23 October 2022; Accepted 4 November 2022

Available online 10 November 2022

0031-9422/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

β -myrcene, *trans*-caryophyllene and farnesene) (Fig. 2). These volatile compounds give beer its aromatic qualities, while α -acids are isomerized during the boiling of beer wort in iso- α -acids, which impart to the beer its bitterness (Kishimoto et al., 2021). As far as β -acids are concerned, they are known for their antimicrobial potential (Bocquet et al., 2018b, 2018c, 2019), and seem to have some effect in invertebrate pest control (Naraine and Small, 2017; Korpelainen and Pietiläinen, 2021). This chemical composition is strongly impacted by genetics but also by the terroir (Morcol et al., 2020). Northern France is a lowland region, bordered on the west by the English Channel and in fact the western part is rather exposed to wind. Northern France is a hop-producing region which shares a historical past with Belgium, its border country. Its production of 1220 ha in 1907 has declined to 35 ha but has slowly begun to increase again to around 40 ha (Ducloux et al., 1910; Bart-Haas Group, 2021). Nowadays, Northern France remains the second area for hop production in France, after Alsace in Eastern France. Ten varieties are cultivated by 9 hop growers. In the current context of development of local microbreweries (Statista, 2021) and the search for local ingredients from sustainable agriculture, these surface areas are increasing in order to meet this new demand (Paguet et al., 2022). Brewers and consumers are indeed looking for locally sourced hops that present

original and exotic aromatic notes such as citrus or pineapple notes. The current cultivated varieties therefore need to be more adapted to the terroir and more aromatic than bittering in order to be more in line with new market expectations. The varietal development of hops adapted to the pedo-climatic conditions of Northern France, with good aromatic and gustative qualities in brewing could respond to these challenges.

In this context, this project aimed to investigate the chemical and genetic diversity of wild hops collected in the North of France. Indeed, wild diversity may constitute a huge pool of genetic diversity for breeding or other applications (Murakami et al., 2006; Paguet et al., 2022). As mentioned in our previous review (Paguet et al., 2022), several studies have been dedicated to exploring the diversity of hop collections, based on the genetic structure of populations using different types of genetic markers, such as AFLP markers (Solberg et al., 2014), SSR (Mongelli et al., 2016; Rodolfi et al., 2018; Mafakheri et al., 2020; Dabbous-Wach et al., 2021), SNPs (Yamauchi et al., 2014; Zhang et al., 2017; Jiang et al., 2018; Van Holle et al., 2019; Driskill et al., 2022; Machado et al., 2022) or DaRT (Čerenak et al., 2019). Microsatellite DNA fingerprints have a high level of accuracy, co-dominant, multi-allelic and independent from lab and thus became a favored technique for genotyping (Nybom, 2004). Jakse et al. (2002, 2008) and Stajner

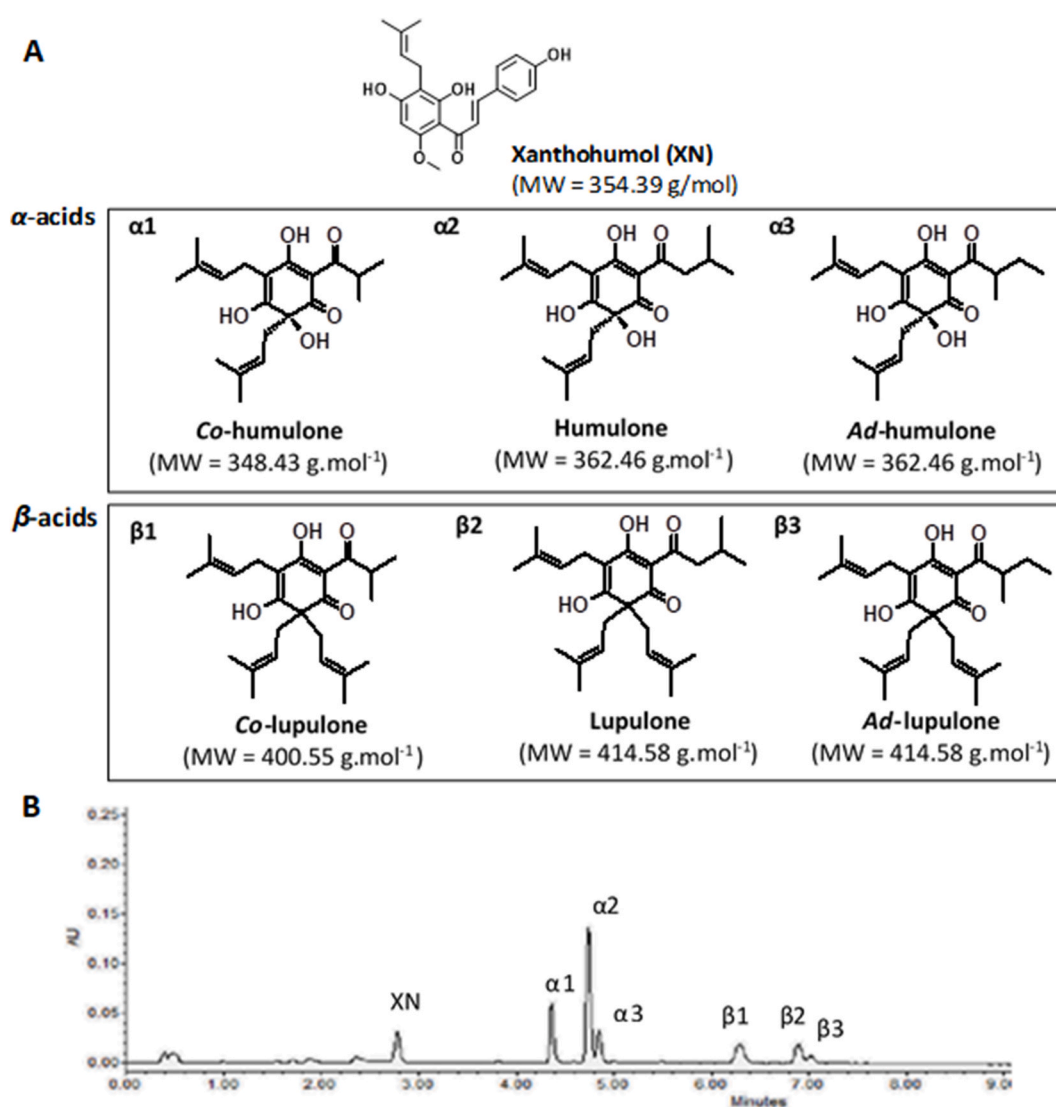


Fig. 1. Main hop prenylated phenolic compounds **A.** Chemical structure of major chalcones and acylphloroglucinols produced by hops and their molecular weight. **B.** Chromatogram of a crude hydro-ethanolic extract of hops (cultivar Nugget) at 330 nm. XN: xanthohumol; α 1: *co*-humulone; α 2: humulone; α 3: *ad*-humulone; β 1: *co*-lupulone; β 2: lupulone; β 3: *ad*-lupulone.

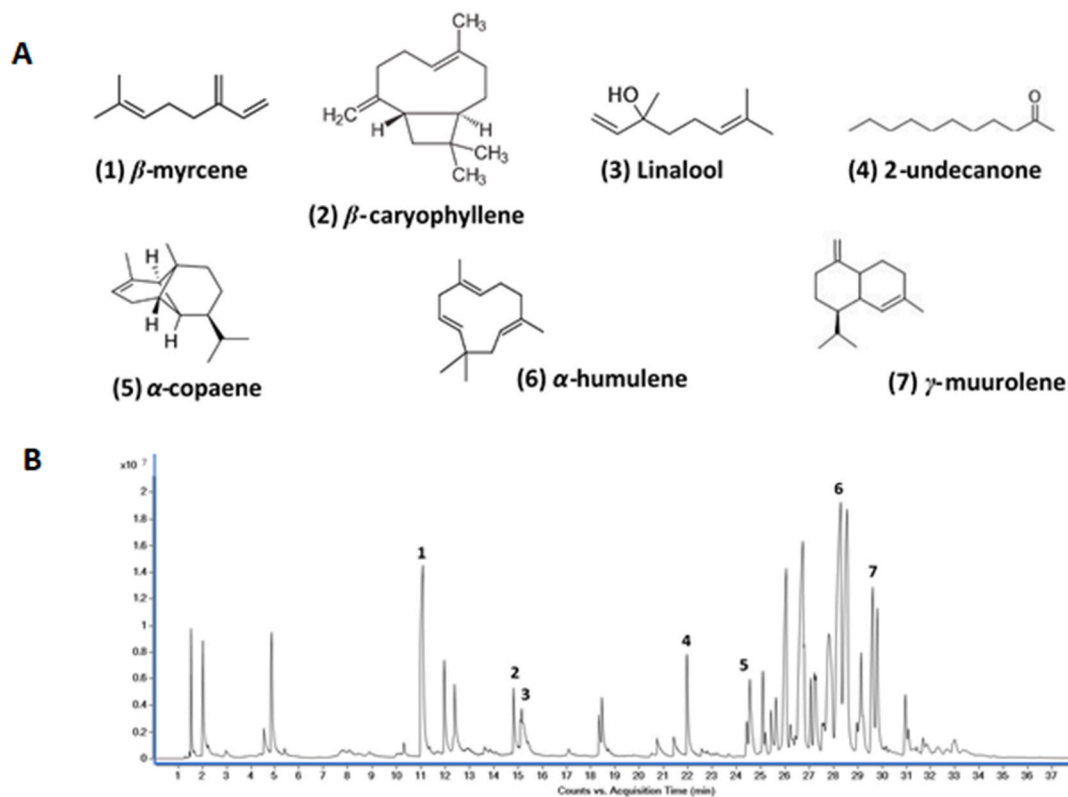


Fig. 2. Analysis of volatile compounds in hop cones by GC-MS. A. Chemical structure of main volatile compounds found in hop cones. B. GC-MS total ion chromatogram of a hop cone sample (cv. Nugget). Compounds identified correspond to the following compounds: (1) β -myrcene; (2) β -caryophyllene; (3) linalool; (4) 2-undecanone; (5) copaene; (6) α -humulene; (7) γ -murolene.

et al. (2005) isolated and characterized several microsatellites in the hop genome and submitted their sequences to the NCBI GenBank. The characterization of hops can also be based on morphological analysis (Srećec et al., 2010; Solberg et al., 2014; Mafakheri et al., 2020; Santagostini et al., 2020; Hong et al., 2022), chemical characterization on volatile compound (Solberg et al., 2014; McCallum et al., 2019; Martins et al., 2020; Dabbous-Wach et al., 2021; Hong et al., 2022), and non-volatile compound analysis (Srećec et al., 2010; Mongelli et al., 2016; McCallum et al., 2019; Santagostini et al., 2020; Hong et al., 2022). Most of the time, data are compared by statistical tests such as ANOVA (Analysis of the Variance), Principal Component Analysis (PCA) (Mongelli et al., 2016; Martins et al., 2020) or Partial Least-Square Discriminant Analysis (PLS-DA) (Hong et al., 2022). However, in a multidisciplinary approach, it may be interesting to correlate the different datasets to identify data structuring and to evaluate their interrelationship among the different parameters. To our knowledge, such work has never been done to characterize hop accessions. Multiple Factor Analysis (MFA) makes it possible to analyze several tables of variables simultaneously, and to obtain results, particularly charts, that allow us to study the relationship between observations, variables, and tables (Escofier and Pagès, 2008).

Our study is the first on the diversity of wild hop from the North of France. Actually, hop plants can be found in various locations throughout this territory, without knowing if they are wild or relics from earlier cultivations. The specimens collected could be wild or former cultivars whose identity is lost, local or naturalized clones, and even populations. Since the identity and properties of these accessions were unknown, plants have been collected and maintained in clonal archives for further characterization and evaluation.

Hence, our study was focused on 50 wild hop accessions (Fig. 3 and Table 1) compared to 10 commercial varieties cultivated in Northern France (Brewers Gold, Cascade, Challenger, Fuggle, Goldings, Magnum,

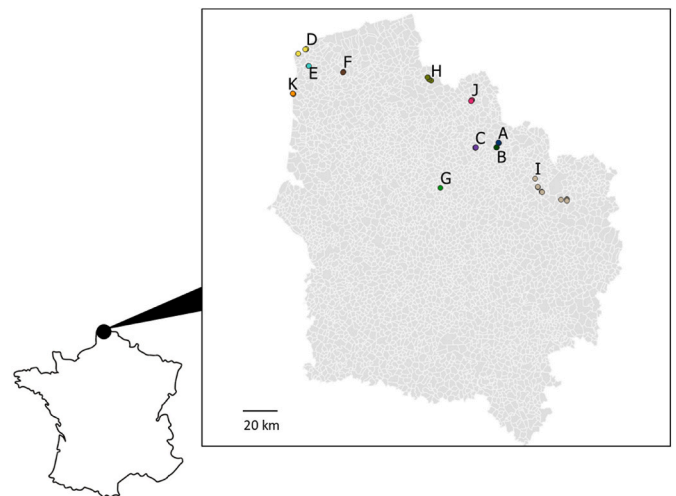


Fig. 3. Geographical repartition of the fifty accessions of wild hop (*Humulus lupulus* L.) collected on the 11 locations A to K in the North of France.

Northern Brewer, Nugget, Strisselspalt and Target) and 3 heirloom varieties formerly grown in the region (Groene Bel, Star and Coigneau). These heirloom varieties were cultivated in the region until the middle of the 20th century. Coigneau, a variety developed in Belgium during the 18th century, was named for its breeder and appreciated for its good yields and resistance to pests. This variety was cultivated until around 1910. At that time, Groene Bel progressively replaced Coigneau (Bart-Haas Report, 1930). Groene Bel is a variety with a light green stem coming from Belgian clonal selection in the late 19th century and known for its high levels in humulene. Star is an old Belgian variety, no longer

Table 1

List of the 50 accessions of wild hops collected in the Northern France (Hauts-de-France region). N: number of samples belonging to a location site. The GPS coordinates corresponds to the barycenter of the location of the N samples collected on the same collection site.

Location code	N = 50	Localities, city (departmental code)	GPS coordinates	Ecological particularities
A	5	Pré des Nonnettes, Scarpe-Escaut Regional Natural Park Marchiennes (59)	N 50° 24' 59.7419" E 3° 15' 18.8099"	Regional nature reserve in the North of France Former estate cultivated by abbey of Marchiennes Wet meadow and megaphorbiaies
B	5	Tourbière de Vred, Scarpe-Escaut Regional Natural Park Vred (59)	N 50° 23' 37.5" E 3° 14' 34.5"	Regional nature reserve in the North of France Alkaline bog Formerly exploited for peat
C	5	Douai (59)	N 50° 23' 28.793" E 3° 4' 9.131"	Hedge of the agricultural domain of the Lycée de Wagnonville Edge of the Wagnonville marsh Regional nature reserve in the North of France
D	4	Cap Blanc Nez, Regional Natural Park of the Caps et Marais d'Opale Wissant (62)	N 50° 53' 49.973" E 1° 40' 53.423"	White dune sand at stream outlet Hedge along a pond
E	2	Marquise (62) Regional Natural Park of the Caps et Marais d'Opale	N 50° 48' 33.4260" E 1° 42' 10.6679"	Hedge Border of pastures
F	2	Audrehem (62) Regional Natural Park of the Caps et Marais d'Opale	N 50° 46' 53.945" E 1° 59' 13.164"	Hedge Megaphorbiaies along a river
G	2	Moyeneville (60)	N 50° 10' 59.375" E 2° 47' 10.631"	Hedge Edge of gardens, village area
H	4	Flanders, Métères (59)	N 50° 44' 21.521" E 2° 42' 22.368"	Hills of Flanders Hedges on the edges of cultivated fields Forest edge
I	10	Regional Natural Park of Avesnois Avesnes-sur-Helpe (59)	N 50° 9' 24.1826" E 3° 41' 27.106"	Hedge at the edge of the meadow Regional natural park of Avesnois
J	6	Citadel of Lille, Lille (59)	N 50° 38' 2.2140" E 3° 2' 4.620"	Urban area Ditches of Vauban citadel of Lille Deûle riversides
K	5	Dunes d'Ecault, Saint-Etienne-au-Mont (62)	N 50° 39' 51.4679" E 1° 34' 37.3260"	Grove, backshore dunes Creek banks

grown commercially, characterized by low vigor and low yield, but excellent storage stability and a continental-like aroma for home-brewing (Damseaux, 1911). As regards wild hops, some accessions were collected on sites which are of undisputed ecological value (seaside, peat bog). Others were taken from sites with ethnobotanical interest, where former hop fields may have been abandoned leaving potentially remnant hops. Hops were gathered in eleven locations presenting the same ecological characteristics (Table 1). The objectives of this research work were to (1) investigate the intraspecific genetic diversity of native *H. lupulus* in Northern France; (2) further explore the secondary metabolite profiles of these accessions; (3) search for any correlation between genetic characteristics and geographical, pedological or chemical data. The analysis of these different datasets provided a solid framework for the investigation of this diversity for diverse applications including varietal improvement research.

2. Results and discussion

2.1. Soil characterization

The analysis of collected soil samples close to root environment of the hop accessions emphasized the wide pedo-geographical diversity of the hop collection sites. These analyses were based on soil pH and conductivity measurements as well as the dosage of the elements Ca, Na, K and Mg. The data analysis through a heatmap associated with hierarchical cluster analysis (N = 8) represented as a dendrogram highlighted the pedological originality of some biotopes (Fig. 4 A and B). For example, Location B formed a very separate cluster (Cluster 1), characterized by high amounts of organic matter, a low ionic content, an acid pH and high conductivity. This can be explained by the fact that Location B is a peatland (the Tourbière de Vred, Vred, 59), a wetland with

very high organic matter content. Locations D and K also constituted separate clusters (Clusters 6 and 7 respectively), globally characterized by low ionic contents (except for a high Na content for Cluster 7), low organic matter content, low conductivity but a basic pH. These two locations are both located on the seashore in the dunes (Fig. 3 and Table 1), around the Cap Blanc Nez (Wissant, 62), and in the Ecault Dunes (Saint-Étienne-au-Mont, 62), respectively. Other soil samples do not follow any particular trend. Indeed, the other clusters can include some soil samples from different locations, as is for example the case for the soil samples found in Cluster 8. This strong difference among soil samples was also confirmed by the visual aspect of soils. Actually, soils from locations B and C displayed a sandy texture while the peat soil in location A was rich in organic debris (Fig. 4C).

2.2. Genetic diversity and population structure

2.2.1. Genetic diversity

A collection of 63 hop genotypes including: (i) ten commercial varieties (Nugget, Strisselspalt, Northern Brewer, Target, Fuggle, Golding, Challenger, Magnum, Cascade, and Brewers Gold); (ii) three heirloom varieties (Groene Bel, Star, and Coigneau); (iii) fifty wild hops sampled from eleven different locations in Northern France (Hauts-de-France region) presenting different ecological characteristics (Table 1 and Fig. 3), was assessed for genetic diversity. This genetic characterization and the analysis of the population structure was carried out using eleven microsatellite markers (Supplementary material Table S6). All markers were polymorphic in all examined collections. A total of 56 different alleles was scored over the eleven tested loci. The number of amplified alleles per locus ranged from 5 (HL-AGA1 locus) to 16 (GT1-K1-4 locus), with an average of 10.9 alleles per locus. The average number of different alleles per locus ranged from 1.636 (Location F) to 4.909

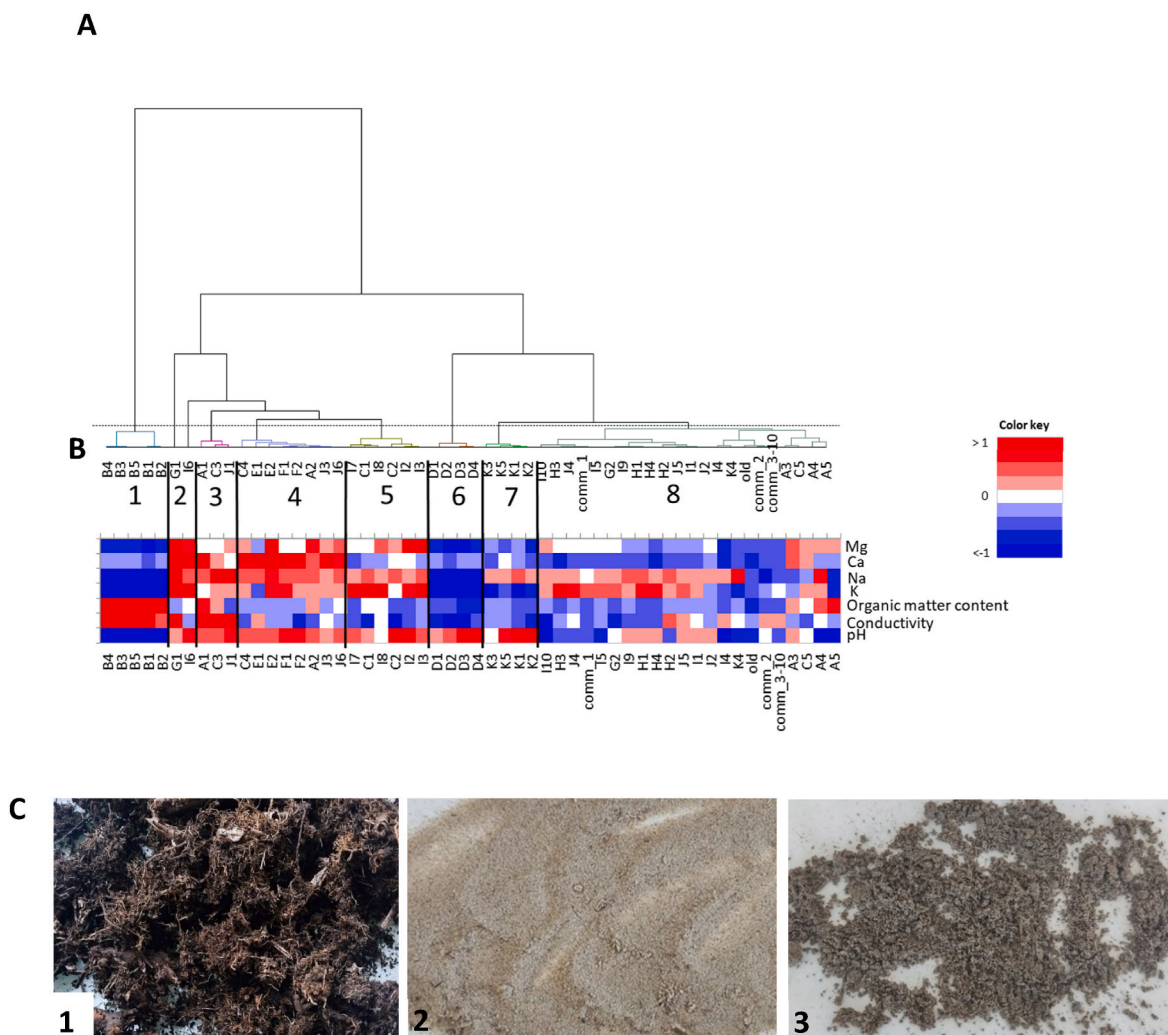


Fig. 4. Results of characterization of soil samples collected close to the root environment of the 63 hops studied. These 63 hops samples are represented by ten commercial varieties: Nugget comes from « comm_1 »; Strisselspalt comes from « comm_2 » and other commercial cultivars come from the same field « comm_3–10 »; three heirloom varieties coming from the same field identified as « old »; and fifty wild hops identified according to Table 1. The characterization of soil samples was based on pH and conductivity measurements, on organic matter content determined by loss of ignition as well as on dosage of the sodium, potassium, calcium and magnesium elements. **A.** Dendrogram including hierarchical cluster analysis ($N = 8$) among soil samples determined by soil characterization. **B.** Heatmap associated to the dendrogram. The 8 clusters of the hierarchical clustering were reported on the heatmap. **C.** Pictures of soil samples from locations B (Tourbière de Vred, Vred) (1), D (Cap Blanc nez, Wissant) (2) and K (Dunes d'Ecault) (3).

(commercial varieties), with an average of 2.95 alleles per locus across locations (Supplementary material Table S7). The average expected heterozygosity (H_E) and observed heterozygosity (H_O) values were 0.45 and 0.52, respectively (Supplementary material Table S7). Allele diversity analysis also revealed high and close levels of gene diversity among the studied sub-collections. Nei's gene diversity index was 0.53 on average for the whole collection, with very slight variations among each sub-collection (Supplementary material Table S7). The values of unbiased gene diversity index (standardized for sample size) were overall slightly higher than those of Nei's index, but globally displayed a similar extent of gene diversity when compared to the values of Nei's index (Supplementary material Table S7). Surprisingly, despite hop capacity of vegetative propagation and natural and human spread, it appeared from these data that all samples are genetically discrete, absolutely no clones were found. In the studies of Karlsson Strese et al. (2014) and Rodolfi et al. (2018), clonality was found within locations. This lack of clonality could be explained by the fact that we collected the wild accessions far enough apart to avoid sampling the same parent plant twice. Indeed, the accessions collected are at least 300 m from each other, thus underlying that the leaves collected for genotyping come

from two different parent plant. The lack of clonality could also be due to the high level of gamete mixing, which may be explained by the strong winds from the ocean front of the region, which easily pushed pollen from one accession to another, thus dispersing the genetic resources and avoiding the identification of clones among the accessions in the collection. However, this hypothesis needs to be confirmed.

2.2.2. Population structure

F_{ST} calculated was equal to 0.29, which attested a significant structuration of the collection (>0.25). Comparison of F_{ST} and Φ_{ST} pairwise revealed significant genetic differentiation between all sampled locations, with F_{ST} and Φ_{ST} values among locations ranging from 0.06 to 0.28 and from 0.002 to 0.19, respectively (Supplementary material Table S8). The value range of both fixation indexes was overall similar among all locations and all F_{ST} and Φ_{PT} comparisons were significant at $P = 0.01$, except for commercial and heirloom varieties, Location B/Locations A, C, D, I, J and K, Location F/Location G, H, I, Location I/Locations J, K and Location J/Location K (Supplementary material Table S8). Some locations, such as E, F or H, seem to be very apart from the others, presenting for the whole of the pairwise F_{ST} , a value higher than

5%. Nonetheless for the commercial lines, the only pairwise F_{ST} value lower than 5% is for the cross with “heirloom” lines ($F_{ST} = 0.015$). This result hence revealed the strong link between “Commercial” and “Heirloom” which may assert the phylogenetic link between former and current varieties, because current cultivars derive from heirloom varieties (Darby, 2005). This hypothesis was also confirmed by the not significantly different Φ_{PT} . The pairwise F_{ST} higher than 5% for whole of the cross of commercial and heirloom lines with wild population suggested that the wild accessions are genuine wild genotypes and not remnant hops derived from commercial or heirloom lines. Bayesian analysis implemented within STRUCTURE version 2.3.4 supported the occurrence of genetic differentiation among locations and showed that

several haplotypes had mixed origins (Fig. 5A). The measures of ΔK calculated from $\ln P(D)$ revealed that $K = 13$ was the most likely number of clusters (highest ΔK value = 5.87). Nevertheless, in Fig. 5A, we preferred to analyze the structure of the population with $K = 6$ clusters, corresponding to a plateau, in order to better highlight the structural differences of the genotypes within a location. The six identified clusters revealed a high genetic structuration among studied hops, notably in Fig. 5B. Strong variations were hence visible in the genetic structuration of some populations, such as that of Location H, mainly dominated by the yellow, or Locations F and G mainly dominated by turquoise (Fig. 5B). Furthermore, structuration of commercial and ancient lines was very close, dominated by the color red and widely different from the

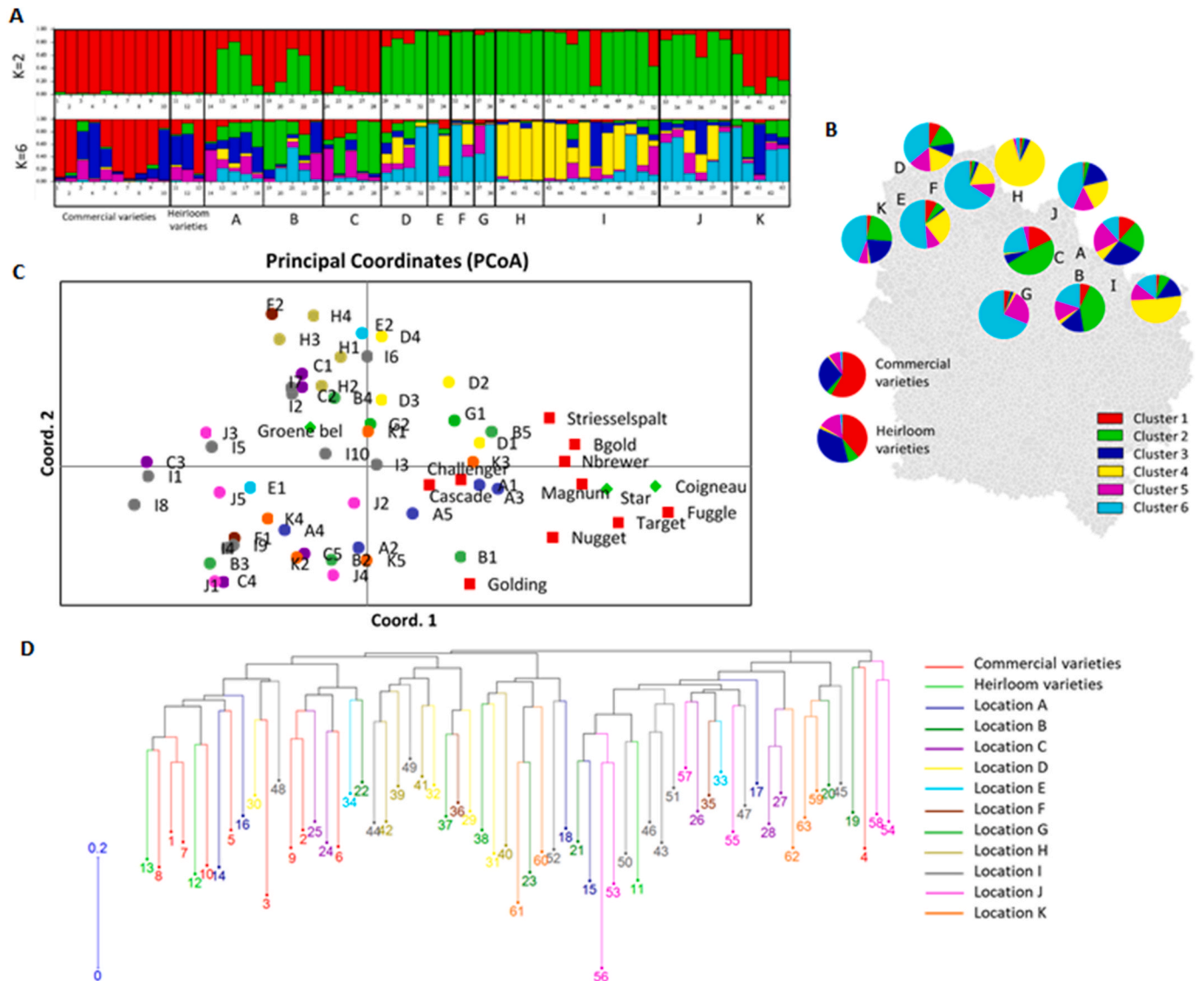


Fig. 5. Identification of population genetic structure of the 63 accessions of *Humulus lupulus* L. sampled in Northern France (Hauts-de-France region) using 11 microsatellites. **A.** Bar plot showing the distribution of individual assignments estimated for $K = 2$ and $K = 6$ clusters, from Bayesian inference cluster analysis performed with the 53 *Humulus lupulus* haplotypes sampled from the 14 locations (from A to K). Each vertical line represents an individual and the length of each colored line corresponds to the membership coefficient (scale at the left of the bar plot) for each cluster. Individuals are grouped according to their sampling locations. **B.** Frequencies of the 6 clusters (represented by colors) within each sampled location. Colors are same than on Fig. 5A. **C.** Principle Component Analysis (PCoA) based on genetic distances between each accession. Individuals were colored according to their sample site collection. **D.** Dendrogram underlying genetic clustering of the 63 hop accessions, including 10 commercial varieties (samples 1 to 10), 3 heirloom varieties (samples 11 to 13) and 50 wild sampled from 11 geographical locations (cf Table 1). 1: Nugget, 2: Strisselspalt, 3: Golding, 4: Challenger, 5: Brewers Gold, 6: Cascade, 7: Magnum, 8: Northern Brewer, 9: Target, 10: Fuggle, 11: Groene Bel, 12: Star, 13: Coigneau, Location A: 14 to 18; Location B: 19 to 23; Location C: 24 to 28; Location D: 29 to 32; Location E: 33 and 34; Location F: 34 and 35; Location G: 37 and 38; Location H: 39 to 42; Location I: 43 to 52; Location J: 53 to 58; Location K: 59 to 63. The tree was constructed using the unweighted neighbor-joining method based on genetic dissimilarity among the haplotypes according to microsatellite markers. Each branch corresponds to a hop genotype and the colors of branches indicate locations from which the genotypes were sampled. The color code is the same as the one on Fig. 5C.

wild lines. This was also simply confirmed by the bar plot with $K = 2$ clusters (Fig. 5A), on which commercial and heirloom lines were only composed of the red cluster, while wild lines were mostly composed of the green cluster. This observation hence confirmed the previous observations based on pairwise F_{ST} , according to which commercial and ancient lines may have a common background. Interestingly, the dendrogram constructed using the unweighted neighbor-joining method (Fig. 5D) clearly showed a greater diversity among wild hops compared to commercial varieties (in red) or heirloom varieties (in bright green). Only Challenger and Groene Bel (respectively accessions numbers 4 and 11) seem to be more genetically distant from other commercial and heirloom varieties. Overall, hops collected from the same area (characterized by the same color) were globally genetically close to each other. The analysis by principal components (PCoA) (Fig. 5C) supported this analysis underlying the global proximity of commercial lines (in red), compared to the wide diversity of wild accessions. Haplotype clustering on the dendrogram was consistent with genetic differentiation highlighted by the *STRUCTURE* program, with several common cluster features (Fig. 5A and D). Locations H and K, identified previously with a dominating color (green and yellow respectively) hence generated separate clusters with these two different approaches. These different features seem to assert the close parentage of commercial varieties, which may contain genetic material of ancient varieties, except for the ancient variety Groene Bel, which appears to be genetically closer to the wild accessions. Overall, these observations converged to show the proximity of the commercial accessions to each other and indeed to the diversity of the wild accessions in our collection. This observation

may be linked to the relative proximity of our commercial lines that contain large amounts of North American genetic material. For instance, Northern Brewer, Magnum, Nugget and Target are progeny of Brewers Gold, itself containing half of north American *H. lupulus* ssp. *Lupuloides* (Turner et al., 2011).

Location H corresponds to the current location of hop fields where commercial varieties are currently cultivated in the North of France, in particular in the Monts de Flandres, near Bailleul and Meteren, (59, Hauts-de-France). We also previously noted the original genetic structure of hops collected in Location H, with insignificant pairwise F_{ST} , which suggests that wild hops from Location H were real wild hops and not remnant hops or scattered plants. AMOVA (Supplementary material Table S14) revealed that 5% of the genetic variation could be explained by differences among sub-collections (locations) whereas 95% was detected within sub-collections, although variation among populations was highly significant ($P < 0.001$).

Our results provided a first investigation of the genetic diversity of hops collected in Northern France (Hauts-de-France region) with a high level of polymorphism. In other parts of the world, for example in Iran or in Italy, previous studies conducted on the identification of genetic structure of wild hops have already underlined a high level of diversity (Rodolfi et al., 2018; Mafakheri et al., 2020). In these two studies, genetic analysis with *STRUCTURE* software revealed a clusterization by collection site, which may be explained by the great distance between them. In our study, our observations were less contrasted among wild accessions but it must be put in perspective with the relatively small collection area (12,414 km² for the Hauts-de-France region). Our results

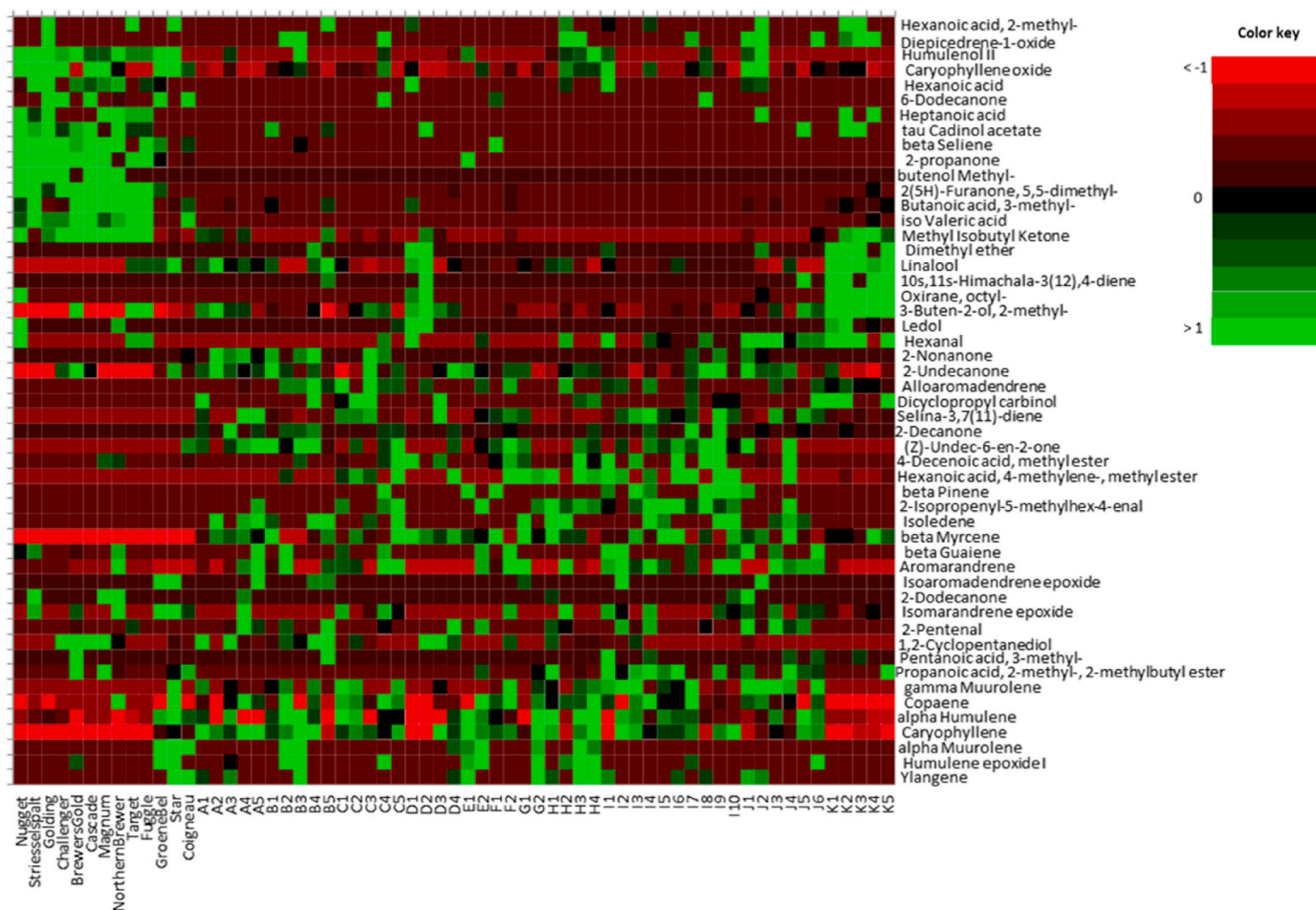


Fig. 6. Heatmap highlighting variation of volatile compounds across the 63 hop accessions from Northern France. This heatmap has been generated with normalized data for the top 51 molecules responsible for differences between the chemical profiles. Red and green colors indicate lowest and highest performance of the traits, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

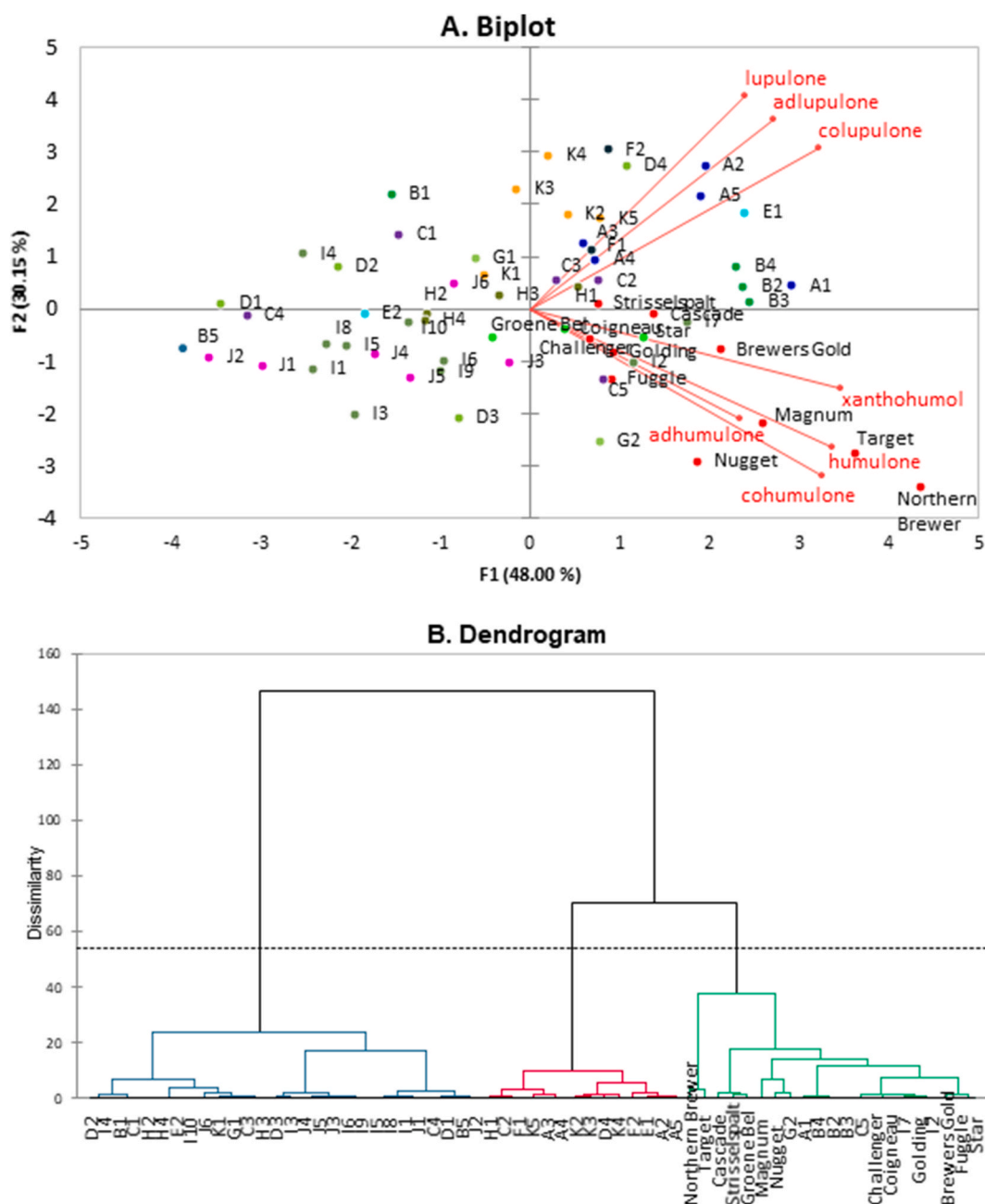


Fig. 7. Results of the statistical treatment of data for the quantitation of xanthohumol, *co-*, *n-*, *ad-*humulone and *co-*, *n-*, *ad-*lupulone. This quantitation has been performed on the 63 crude hydro-ethanolic extracts of hop cone powder from Northern France, including 10 commercial varieties, 3 heirloom varieties and 50 wild hops (Fig. 1, Table 2). **A.** PCA biplot of quantitation data with score plot and loading plot of variables. Individuals were colored by collection site for a given observation. Variable contribution to component was represented by arrows length. **B.** Dendrogram of the hierarchical cluster analysis among the 63 hops based on the quantitation similarity (Ward's method, distance scale) ($N = 3$).

also underlined that our wild samples, by their genetic diversity compared to commercial varieties, could be accessions resulting from migrations through Europe, and not from human behavior. These results confirmed the hypotheses of Murakami et al. (2006).

2.3. Phytochemical characterization

Phytochemical characterization analyses were done on the powder of cones collected *in-situ* of the same accessions as previously genetically characterized.

2.3.1. Volatile compounds analysis

The identification of volatile compounds by HS-SPME GC-MS revealed the presence of 101 different compounds, present in at least 1% of relative content (relative peak area), in all of the studied hops (Fig. 2 and Supplementary material Table S15). The profiles were composed of a large diversity of oxygenated (alcohols, aldehydes, ketones, carboxylic acids) and non-oxygenated terpenes and sesquiterpenes. Hop samples contained a greater or lesser diversity of volatile compounds. The sample with the greater diversity of volatile compounds was accession I1 (44 volatile compounds identified), while the sample with the lowest number of volatile compounds was accession E1 (13 volatile compounds

identified). Among these 101 volatile compounds, some were identified more frequently than others. The heatmap (Fig. 6) summarizes the relative abundance of the 51 volatile compounds more frequently identified in the samples, that is to say, identified in at least 15 hop samples on the 63 studied. Hence, the main volatile compounds of hops, including non-oxygenated monoterpenes (β -myrcene), non-oxygenated

sesquiterpenes (β -caryophyllene, α -humulene, α -copaene, γ -muurolene), oxygenated monoterpenes (linalool) and 2-undecanone (methyl nonyl ketone) were found in all hops studied (Fig. 2). These compounds are known as the main volatile compounds found in hop cones and therefore they do not constitute a particular chemical originality' (Vázquez-Araújo et al., 2013). They are known for their woody,

Table 2

Data of the quantitation of the main phenolic compounds (xanthohumol, *co*-, *n*-, *ad*-humulone and *co*-, *n*-, *ad*-lupulone) in the 10 commercial varieties, the 3 old varieties and the 50 wild accessions (Locations A to K), expressed in % of drdry weight, quantified by UHPLC-UV.

	Xanthohumol		Cohumulone		Humulone		Adhumulone		Colupulone		Lupulone		Adlupulone	
Nugget	0.58%	ab	2.35%	a-d	6.78%	ab	0.39%	b-g	1.21%	a-e	1.04%	c-f	0.30%	c-p
Strisselspalt	0.27%	b-d	0.74%	d-f	1.86%	b-g	0.58%	ab	1.75%	a-e	1.86%	a-f	0.19%	d-p
Golding	0.34%	b-d	1.03%	b-f	3.23%	b-g	0.24%	b-g	1.25%	a-e	1.53%	a-f	0.19%	c-p
Challenger	0.38%	b-d	0.97%	c-f	2.94%	b-g	0.44%	a-e	1.63%	a-e	1.76%	a-f	0.26%	c-p
Brewers Gold	0.41%	bc	2.08%	a-c	2.86%	b-g	0.20%	c-g	1.43%	ab	1.03%	b-f	0.26%	b-p
Cascade	0.25%	b-d	0.73%	b-f	1.30%	b-g	0.28%	a-d	1.45%	a-e	1.28%	a-f	0.13%	d-p
Magnum	0.27%	b-d	1.71%	a-e	5.23%	a-c	0.68%	a	1.60%	a-e	1.90%	a-f	0.19%	d-p
Northern Brewer	0.76%	a	2.27%	ab	6.43%	a	0.33%	a-g	1.51%	a-e	1.42%	a-f	0.19%	d-p
Target	0.73%	a	2.71%	a	4.30%	a-e	0.10%	d-g	1.78%	a-e	0.81%	c-f	0.24%	c-p
Fuggle	0.38%	ab	1.09%	b-f	2.56%	b-g	0.15%	c-g	1.00%	a-e	0.87%	b-f	0.19%	c-p
Groene Bel	0.17%	b-d	0.32%	d-f	0.66%	d-g	0.32%	a-c	1.09%	a-e	0.84%	a-f	0.07%	k-p
Star	0.31%	ab	0.94%	b-f	2.02%	b-g	0.11%	c-g	1.07%	a-e	0.88%	a-f	0.21%	a-l
Coigneau	0.20%	b-d	0.50%	c-f	1.82%	b-g	0.20%	b-g	0.94%	a-e	0.83%	a-f	0.18%	a-p
A1	0.16%	b-d	0.66%	b-f	2.58%	a-c	0.17%	a-g	1.06%	a-e	1.16%	a-f	0.21%	a-c
A2	0.16%	b-d	0.38%	d-f	1.31%	b-g	0.11%	c-g	2.60%	a	1.42%	a-d	0.25%	ab
A3	0.13%	b-d	0.31%	d-f	1.55%	b-g	0.08%	d-g	0.95%	a-e	1.20%	a-f	0.14%	a-o
A4	0.15%	b-d	0.50%	d-f	2.79%	b-g	0.14%	c-g	1.08%	a-e	1.82%	a-e	0.22%	a-l
A5	0.21%	b-d	0.42%	d-f	1.92%	b-g	0.12%	c-g	1.27%	a-e	1.84%	ab	0.26%	a-c
B1	0.06%	cd	0.10%	f	0.41%	fg	0.02%	fg	0.92%	a-e	1.17%	a-f	0.17%	a-m
B2	0.13%	b-d	0.39%	d-f	1.40%	a-g	0.10%	b-g	0.67%	a-e	0.82%	a-f	0.11%	a-j
B3	0.16%	b-d	0.65%	d-f	2.18%	a-f	0.15%	b-g	0.97%	a-e	1.07%	a-f	0.17%	a-i
B4	0.21%	b-d	0.83%	d-f	1.99%	b-g	0.17%	b-g	1.31%	a-e	1.39%	a-f	0.22%	a-d
B5	0.03%	d	0.16%	ef	0.18%	g	0.01%	g	0.17%	e	0.19%	f	0.03%	op
C1	0.09%	b-d	0.17%	f	0.63%	d-g	0.06%	d-g	0.62%	a-e	1.14%	a-f	0.18%	a-m
C2	0.15%	b-d	0.50%	c-f	1.32%	b-g	0.11%	b-g	1.11%	a-e	0.96%	a-f	0.12%	a-p
C3	0.17%	b-d	0.49%	c-f	1.88%	b-g	0.14%	c-g	1.18%	a-e	1.19%	a-f	0.19%	a-p
C4	0.16%	b-d	0.15%	f	0.84%	e-g	0.05%	efg	0.92%	a-e	1.08%	c-f	0.11%	m-p
C5	0.22%	b-d	1.16%	b-f	3.38%	b-g	0.29%	a-g	1.01%	a-e	0.90%	b-f	0.25%	a-n
D1	0.07%	cd	0.08%	f	0.44%	g	0.01%	g	0.59%	b-e	0.75%	c-f	0.08%	l-p
D2	0.06%	b-d	0.08%	f	0.47%	d-g	0.03%	d-g	0.42%	a-e	0.64%	a-f	0.08%	d-p
D3	0.19%	b-d	1.01%	b-f	3.71%	b-g	0.30%	b-g	0.80%	a-e	0.76%	d-f	0.13%	j-p
D4	0.29%	b-d	0.46%	ef	1.43%	c-g	0.16%	c-g	2.37%	a-c	2.08%	a-f	0.47%	a
E1	0.08%	b-d	0.21%	b-f	0.56%	b-g	0.04%	c-g	0.51%	ab	0.54%	a-c	0.07%	a-f
E2	0.28%	b-d	0.67%	ef	2.44%	c-g	0.20%	d-g	1.59%	a-e	1.70%	b-f	0.30%	d-p
F1	0.22%	b-d	0.82%	c-f	2.46%	b-g	0.20%	c-g	2.33%	a-d	2.08%	a-f	0.25%	c-p
F2	0.12%	b-d	0.25%	ef	1.22%	b-g	0.07%	d-g	1.28%	a-e	2.45%	a	0.21%	a-e
G1	0.14%	b-d	0.35%	ef	1.24%	b-g	0.14%	c-g	1.07%	a-e	1.29%	a-f	0.21%	a-m
G2	0.27%	b-d	1.36%	b-f	4.51%	a-d	0.35%	a-f	0.89%	a-e	1.16%	b-f	0.12%	j-p
H1	0.18%	b-d	0.71%	c-f	2.24%	b-g	0.18%	b-g	1.57%	a-e	1.77%	a-f	0.12%	g-p
H2	0.26%	b-d	0.36%	ef	1.42%	b-g	0.11%	d-g	0.83%	a-e	1.02%	b-f	0.18%	c-p
H3	0.33%	b-d	0.74%	d-f	2.94%	b-g	0.29%	b-g	1.87%	a-e	2.29%	a-f	0.29%	c-p
H4	0.21%	b-d	0.45%	d-f	1.20%	c-g	0.13%	c-g	0.97%	a-e	0.92%	b-f	0.13%	d-p
I1	0.20%	b-d	0.39%	ef	1.57%	b-g	0.12%	d-g	0.58%	c-e	0.72%	d-f	0.08%	n-p
I2	0.25%	b-d	0.78%	b-f	2.53%	b-g	0.25%	a-g	0.87%	b-e	1.07%	a-f	0.17%	c-p
I3	0.14%	b-d	0.86%	c-f	2.90%	b-g	0.19%	c-g	0.51%	de	0.67%	def	0.07%	p
I4	0.18%	b-d	0.10%	f	0.56%	g	0.02%	g	1.09%	a-e	1.77%	a-f	0.23%	d-p
I5	0.12%	b-d	0.37%	d-f	1.41%	b-g	0.08%	d-g	0.50%	c-e	0.68%	c-f	0.10%	h-p
I6	0.20%	b-d	0.77%	c-f	2.24%	b-g	0.19%	b-g	0.98%	a-e	0.88%	c-f	0.15%	e-p
I7	0.29%	b-d	1.16%	b-f	3.40%	b-g	0.34%	a-g	1.95%	a-e	1.76%	a-f	0.24%	b-p
I8	0.23%	b-d	0.71%	d-f	1.96%	b-g	0.16%	d-g	1.20%	a-e	1.09%	c-f	0.18%	i-p
I9	0.26%	b-d	0.83%	d-f	3.65%	b-g	0.32%	b-g	0.98%	a-e	1.39%	b-f	0.19%	f-p
I10	0.18%	b-d	0.57%	d-f	2.03%	b-g	0.15%	c-g	1.01%	a-e	1.27%	a-f	0.17%	d-p
J1	0.09%	bcd	0.21%	ef	0.59%	d-g	0.06%	d-g	0.35%	c-e	0.29%	f	0.04%	p
J2	0.04%	cd	0.11%	f	0.30%	e-g	0.03%	d-g	0.19%	e	0.18%	f	0.03%	p
J3	0.15%	b-d	0.98%	b-f	2.71%	b-g	0.27%	b-g	1.12%	a-e	0.97%	b-f	0.19%	c-p
J4	0.19%	b-d	0.78%	d-f	2.05%	b-g	0.25%	b-g	1.05%	a-e	0.89%	d-f	0.20%	c-p
J5	0.12%	b-d	0.71%	c-f	1.60%	b-g	0.18%	b-g	0.70%	a-e	0.48%	ef	0.13%	c-p
J6	0.13%	b-d	0.23%	ef	0.96%	b-g	0.14%	b-g	0.63%	a-e	0.72%	b-f	0.20%	a-i
K1	0.12%	b-d	0.27%	d-f	1.02%	b-g	0.06%	d-g	0.76%	a-e	0.93%	a-f	0.10%	d-p
K2	0.17%	b-d	0.35%	d-f	1.29%	b-g	0.12%	c-g	1.28%	a-e	1.50%	a-f	0.24%	a-g
K3	0.14%	b-d	0.07%	f	0.40%	e-g	0.08%	c-g	1.02%	a-e	1.14%	a-f	0.16%	a-k
K4	0.13%	b-d	0.06%	f	0.28%	e-g	0.02%	e-g	0.90%	a-c	0.85%	a-f	0.14%	a-d
K5	0.22%	b-d	0.48%	d-f	1.90%	b-g	0.04%	e-g	1.35%	a-e	1.63%	a-f	0.25%	a-h

The value reported is the mean of the technical triplicate.

Different letters indicate significant differences between treatments according to ANOVA followed by Tukey's test at $p \leq 0.05$.

herbaceous or spicy aromatic potential after brewing (The Chemical Sources Association, 2010). Other terpenes such as aromadendrene, allo-aromadendrene, isodendrene, β -guaiene, α -ylangene and β -pinene were also putatively identified to a lesser extent in some samples (in samples 44, 25, 18, 17, 17 and 10 respectively) and constituted a chemical originality in the composition of volatile compounds of these wild hop samples. Nevertheless, these volatile compounds in hop samples have already been identified in some hop samples, as reported in different publications (Vázquez-Araújo et al., 2013). Lastly, some scarcer volatile compounds, and especially some terpenes, were putatively identified in some hop samples, and constituted an originality in the chemical fingerprint of some wild hops (Supplementary material Table S15). For example, β -panasinene and aristolene were only identified in 2 samples. α -copaene and γ -cadinene were even more rarely identified in hop samples (Bocquet et al., 2018a), just like α -bergamotene, a compound with aromatic tea and woody characteristics (The Chemical Sources Association, 2010). β -panasinene has already been identified as a major volatile compound in the Perle hop variety (Tofana et al., 2009). To our knowledge, aristolene had never been found in hop samples, but is not known to have particular aromatic characteristics. In some cases, we also noticed the presence of oxidized compounds, such as caryophyllene oxide, humulene I epoxide, humulenol II or humulene oxide II. This strong presence of oxidized compounds, especially in some wild hop samples, was probably due to the ripening of cones of some wild accessions at the time of collection. Indeed, for logistical reasons, the collection of wild hops was spread over the month of September 2019. Thus, some cones of wild hops had already reached an advanced phenotypical stage, which may explain the presence of these degradation compounds (Uemoto et al., 2022). This phenomenon may disappear under *ex-situ* conditions in experimental hop fields. The dendrogram associated with the heatmap (Fig. 6) grouped together the commercial varieties. In the same way, it also underlined a relative proximity in volatile compound composition between the 3 heirloom varieties Groene Bel, Star and Coigneau. As was stated previously regarding the genetic features, commercial lines share an important part of their genetic heritage. Furthermore, they also come from the same localities and have been exposed to the same biotic and abiotic pressures. As chemotype can be considered as the result of the influence of the environment

and the genotype, this proximity of commercial and heirloom varieties was not really surprising. Wild hop samples collected at Location K were also clustered together, the singularity of their volatile compounds could be the consequence of the influence of their environment, in this case very sandy and highly exposed to westerly winds.

2.3.2. Main phenolic compound composition

UHPLC analysis revealed the presence of 7 main peaks at retention times 2.76, 4.35, 4.73, 4.83, 6.26, 6.87 and 7.00 min (Fig. 1) attributed to xanthohumol (XN), α -acids *co*, *n*-, *ad*-humulone (α 1, α 2, α 3) and β -acids *co*-, *n*-, *ad*-lupulone (β 1, β 2, β 3) respectively. This attribution was based both on their retention times compared with those of the standards purified in the laboratory and on their mass spectra (Bocquet et al., 2019). Xanthohumol and *co*-, *n*- and *ad*-humulone, and *co*-, *n*- and *ad*-lupulone were then quantified in the 63 crude extracts of cone samples using the quantitation method set up by UHPLC-UV. Acceptable linearity was observed for each compound over the concentration range used for calibration. Evaluation of the recovery data of the quantitation method showed acceptable intra and inter-day precisions for xanthohumol (RSD % = 16.9, 15.78), *co*-humulone (RSD % = 17.91, 19.59), humulone (RSD % = 15.55, 16.75), *co*-lupulone (RSD % = 14.12, 12.51) and lupulone (RSD % = 13.95, 12.39). Quantitation data for *ad*-humulone and *ad*-lupulone were obtained by extrapolation of dosing equation of humulone and lupulone respectively. Results were expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Statistical analysis with Tukey's test revealed significant differences among hop samples in term of phenolic compound composition (Table 2). The higher content in xanthohumol, *co*-, *n*-, *ad*-humulone and *co*-, *n*-, *ad*-lupulone were obtained for the Northern Brewer (0.76%), Target (2.71%), Northern Brewer (6.43%), Magnum (0.68%), A2 (2.60%), F2 (2.45%) and D4 (0.47%) samples respectively. While the lower content measured in xanthohumol, *co*-, *n*-, *ad*-humulone and *co*-, *n*-, *ad*-lupulone were obtained for the B5 (0.03%), K4 (0.06%), B5 (0.18%), B5/D1 (0.01%), B5 (0.17%), J2 (0.18%) and B5/J2 (0.03%) samples respectively. The output process of the quantification in the form of PCA (Fig. 7A) revealed a good explanation for the variable's distribution, with 83.46%, and a contribution of PC1 and PC2 equal to 48.00% and 30.15% respectively. Moreover, Fig. 7A clearly revealed a good separation between α -acids contents on one side and β -acids on the

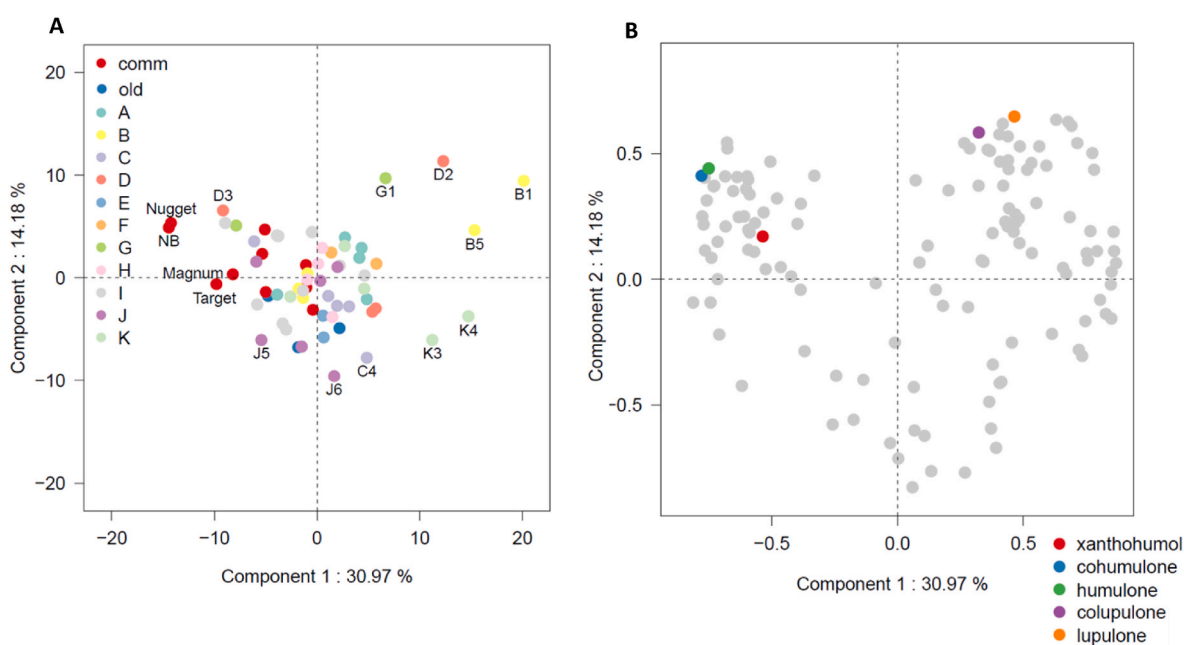


Fig. 8. Untargeted metabolomic analysis A. Principle component analysis of the 63 chemotypes of hop studied. Each symbol represents a single plant from the different accessions. Commercial varieties (10 accessions), heirloom varieties (3 accessions), wild hops collected on different locations (50 accessions, Fig. 3). B. Principle component analysis of the chemical markers.

other side. Hops are traditionally classified according to their content in α -acids (Palmer, 2006). Depending on the biplot (Fig. 7A), commercial varieties (in red) had globally higher content of α -acids (including *co*-, *n*- and *ad*-humulone) and of xanthohumol. On the contrary, wild hops (Locations A to K) had higher β -acid content (*co*-, *n*- and *ad*-lupulone). Fig. 7A thus revealed a relatively low bitterness potential of wild hops compared to commercial varieties. However, some exceptions were noted for the wild hops G2 (1.36%), I7 (1.16%), C5 (1.16%), D3 (1.01%) and J3 (0.98%) that showed *co*-humulone content relatively close to that of dual-purpose Challenger hops (0.97%). These wild hops can further provide a softer bitterness due to a slightly lower *co*-humulone content by comparison with Target (2.71%) or Nugget (2.35%) (Table 2). The volatile compounds analysis of these four accessions revealed a high content of the most common volatile compounds of hop (α -humulene, β -myrcene, β -caryophyllene, α -copaene, γ -muurolene) (Fig. 6) and highlighted the presence of some original volatile compounds such as ylangene (A1, B3, G2) or aromarandrene (A1, B2). The B2, B3 and G2 accessions stand out for their originalities in volatile compounds, with the presence of β -guaiene, longifolene, α -muurolene, α -cubebene in the B2 accession, α -copaene, α -muurolene, β -selinene in the B3 accession, and α -muurolene and γ -muurolene in G2. These volatile compounds may offer some potential for brewing. Actually, allo-aromarandrene, α -copaene, β -guaiene, longifolene are for example known for their woody aromatic potential (The Chemical Sources Association, 2010). These results also underlined that wild hops were richer in β -acids known for their properties in brewing, in particular as a bitterness stabilizer and preservation enhancer, as well as their biological activities, particularly sought after by pharmaceutical or agro-food companies (Bocquet et al., 2018a). This high content of β -acids in wild accessions has already been reported by (McCallum et al. (2019) on samples collected in Canada. On the biplot (Fig. 7A), wild hops seemed to be globally unified by collection site (by color). This observation was partially confirmed by the dendrogram of the hierarchical ascending clustering (HAC, Euclidean distance, Ward's agglomeration, dissimilarity, N = 3) (Fig. 7B), where wild hops collected on the same site nearly belong to the same branch. For example, wild hops from Location I were in the green cluster, whereas hops from Location J (except J6), were in the pink cluster. Furthermore, this dendrogram clearly confirmed the opposition between commercial lines (containing North American germplasm) and heirloom varieties, mostly gathered in the three same clusters (in purple), and wild accessions dispersed through other clusters. Wild accessions lying within this pink cluster (G2, A1, B4, B2, B3, C5, I7, I2) may contain North American genetic material, due to outcrossing events.

In particular, we have already showed in Fig. 5 the genetic proximity of accessions I2 and I7 with commercial genotypes, which is also in line with this hypothesis. Actually, hop pollen can travel more than 10 km on the wind, and North American hops may possess chemicals helpful in resisting against local pests and pathogens.

These results were then very informative about the bitterness potential of wild hops from Northern France, and their aromatic potential if we consider the results previously detailed. Nevertheless, as we mentioned the degradation of volatile compounds, α - and β -acids are very prone to oxidation (Taniguchi et al., 2013). Even if we had paid particular attention during the storage of the powder and the realization of the samples, it remains nevertheless a parameter to be kept in mind in these quantification results.

2.3.3. Untargeted metabolomics analysis

From the Progenesis matrix where 270 signals were detected, the cleaning allowed only 132 compounds to be kept. The data of this final matrix were processed by PCA (Fig. 8). The first two principle components explained 45.15% of the total variance (30.97% for the PC1 and 14.18% for the PC2). Among the 132 compounds we were able to identify the five markers quantified previously, namely xanthohumol, *co*- and *n*-humulone, *co*- and *n*-lupulone (Fig. 8A). It may be very

interesting to further this observation by identifying markers that explain the distribution of the individuals regarding this feature. The untargeted metabolomics analysis underlined a great diversity among wild hops compared to commercial varieties (Fig. 8B). These results confirmed the results obtained with the quantification of xanthohumol, α - and β -acids. This strong difference in the phytochemical composition between the 50 wild hops and the 13 varieties (including heirloom varieties and commercial varieties), may be explained by genetic difference or terroir influence. Nevertheless, it may also be influenced by the treatment of the samples post-harvest.

2.4. Comparison of the different data sets by multifactorial analysis

The five datasets previously obtained were compiled to obtain a global matrix of 393 variables, distributed in the five tables as follows: soil characterization: 5 variables; genetic characterization: 63 variables; volatile compounds analysis: 188 variables; quantification analysis: 5 variables and untargeted metabolomics: 132 variables. As noted later in the materials and methods section, all data were considered quantitative variables, except data of volatile compound analysis which were considered qualitative variables (presence/absence of the compound). To identify specific patterns in these five data matrices, MFA was applied (Fig. 9 and Supplementary material Table S17). MFA performed individual PCAs on the data matrices obtained from the characterizations. Fig. 9a presents the scores plot of the MFA containing the results of all the datasets. The first and the second principal components explained 10.02% and 7.51% of the variation, respectively. It was not a very high percentage of explained variance, but it was satisfactory, considering the large number of variables (393). Fig. 9a confirms the wider diversity of wild hops compared to commercial varieties from a genetic and chemical point of view. Fig. 9b presents the connections among the different data sets. It shows that the first dimension separates on the one hand the soil characterization and on the other hand the chemical and the genetic characterization. The second dimension separates the genetic characterization, and the analysis of volatile compounds. Fig. 9c illustrates in the form of dendrogram the result of the HAC (Ward's method, N=7) on the results of the MFA. It was interesting to observe the distribution of hop accessions among the seven clusters. Varieties (commercial and heirloom) belonged mostly to the same cluster (in red, 2). Only "Groene Bel" and "Challenger" were included in two other clusters (Clusters 5 and 6, respectively). The genotype Groene Bel was already separated from other accessions on the dendrogram processed according to the genetic results (Fig. 5D). Furthermore, within the same cluster, we globally found wild hops coming from the same location. For example, Cluster 1 was globally dominated by wild hops from Location B (3 hops B2, B3, B4); and the remaining two hops from Location B (B1 and B5), belonged to the same green cluster (3). Cluster 4 (pink) contained three of the four wild hops from Location D, and as well as two wild hops from Location K. Cluster 6 contained wild hops from six locations (of eleven) including four wild hops from Location C (C1, C2, C3, C4). It also contained the two wild hops from Location F (F1 and F2), three wild hops from Location K (K1, K2, K5), as well as some wild hops from Location A (A3, A4), Location I (I4 and I6) and Location J (J2 and J6). Lastly, Cluster 7 contained seven wild hops from Location I (I1, I2, I5, I7, I8, I9, and I10) out of 10 total; it also had three of the four wild hops from Location H (H1, H3, H4). This "terroir effect" is well known and well documented (Moore et al., 2014). However, even if some authors mention and discuss a possible terroir effect on the hops and their chemical composition (Morcol et al., 2020; Dabbous-Wach et al., 2021), no demonstration has yet been made to our knowledge. Lg coefficient measured the extent to which the tables are linked two by two (Supplementary Material Table S17). RV coefficients corresponded to a normalization of the Lg coefficients; their values were then between 0 and 1. The stronger the linkage, the more all the variables in one table are linked to the second. These results highlight that the strongest link was observed between the datasets of the quantification of phenolic

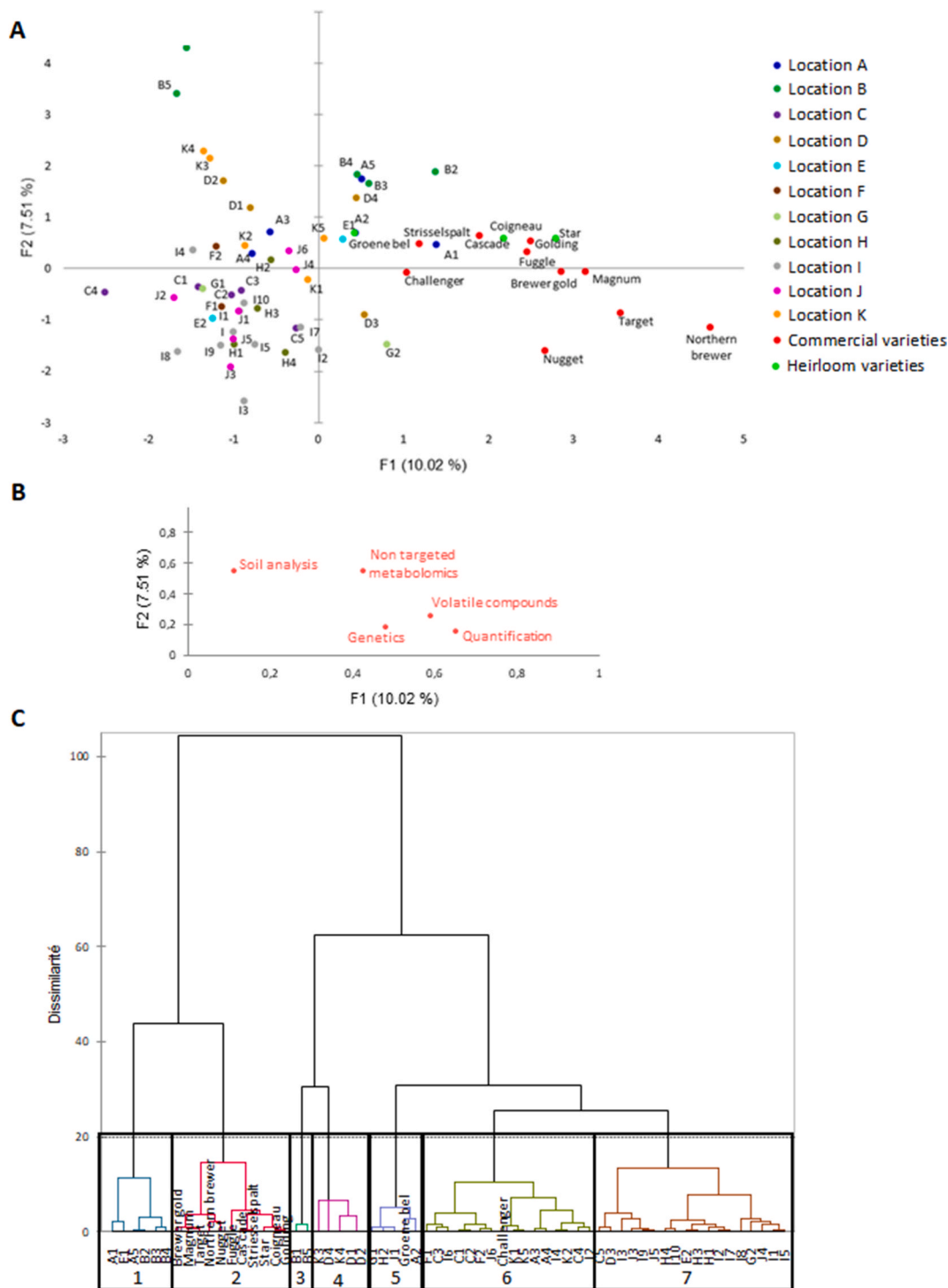


Fig. 9. Identification of the common structures of the variable blocks by multifactorial analysis. This multifactorial analysis has been done on the five datasets of this study: the soil analysis, the genetic characterization and the phytochemical analysis (volatile compounds analysis, quantitation of main prenylated phenolic compounds and untargeted metabolomic analysis) of the 63 hops samples (10 commercial varieties, 3 heirloom varieties and 50 wild hops). **A.** Multiple factor analysis scores plot **B.** Table coordinate plot **C.** Hierarchical clustering Ward’s method (distance scale) (N = 7).

compounds and that of untargeted metabolomics ($RV = 0.382, p = 0.95$). By contrast the lower linkage was underlined between the datasets of the soil characterization and the quantification ($RV = 0.047, p = 0.95$). Untargeted metabolomics was the closest dataset of the global configuration ($RV = 0.76, p = 0.95$), while soil characterization was the most distant dataset ($RV = 0.454, p = 0.95$). It could have been interesting to modulate the weighting of the different tables used to process this AFM in order to ponder each dataset. Actually, in our study, all the

datasets were considered with the same weighting, but we can suggest that the weighting of the genetic characterization could be stronger than those of the phytochemical characterization. This last parameter can effectively contain different analytical and technical biases. Furthermore, the biotope characterization was only partial; we could have taken into account the meteorological factors or the analysis of the microfauna of the soil. On this point, meteorological data (like sunshine, rainfall, average temperatures ...) during the cone-ripening period could

have constituted a supplementary data set to integrate into the MFA in order to better characterize the biotopes. However, this dataset could not be constituted because sample locations of wild hops were close, and it was not possible to get one weather record per location.

3. Conclusions

This study constitutes the first identification and characterization of wild hop diversity in Northern France using molecular methods and phytochemical tools. Different datasets were acquired and revealed the great chemical and genetic diversity of the 50 collected wild hops. Genetic statistical analysis and Bayesian methods highlighted a clear distinction between the wild hop populations collected in Northern France and hop commercial varieties. These data suggest that the accessions identified as wild are not remnant hops. Moreover, the diversity among wild hops seems to be more related to the terroir than to their genotype. Nonetheless, the underlying philosophy of terroir encompasses the interaction of the soil, micro, and mesoclimate with the genetics of a variety, combining to create unique organoleptic quality. Since our wild accessions are not genetically identical, multivariate analysis does not allow us to determine which factors (genetic vs. environmental) are at play to explain the chemical diversity of our collection. Furthermore, data from several growing seasons are generally necessary to be able to make robust conclusions about terroir effects. Hence, these first *in-situ* investigations have to be consolidated with *ex-situ* analysis in order to disregard the observed potential terroir effect. This will be also the opportunity to carry out crop monitoring and to evaluate the agronomic performances of these accessions in order to select the best genotypes to be utilized as a base for breeding programs.

4. Materials and methods

4.1. Hop genotypes and sampling

4.1.1. Materials collection

A collection of 63 female *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae) (hop) accessions was obtained, divided as follows: (1) 10 commercial varieties. They were selected among the ten most relevant varieties, including so-called “top” hops used by craft brewers, such as Brewers Gold, Cascade, Challenger, Fuggle, Goldings, Magnum, Northern Brewer, Nugget, Strisselspalt and Target. Commercial hops were provided by the Northern France Hops Cooperative, the CoopHounord. (2) 3 heirloom varieties. Three genebank clones representing former Flanders cultivars were included: Groene Bell, Coigneau, and Star, from Belgium (J. Cambié, Poperinge). (3) 50 wild hops. These wild hops were collected by Drs C. Rivière and G. Lefèvre on various sites in Northern France (Hauts-de-France region) in collaboration with several natural site managers (department of Nord, EDEN 62, regional natural parks) or on private lands in accordance with their owners (Table 1). Wild hops were collected according to ecological or ethnobotanical criteria. A location gathered several sample sites with the same ecological characteristic (Table 1). In Table 1, the GPS coordinates of the barycenter of each location are defined as the gravity center of the sample points of this location, and calculated as the mean of the different sample site coordinates of the same location.

These samples were collected in accordance with the rules of the Nagoya Protocol and the French biodiversity law of 2017 (decision of June 9, 2020 issued by the Ministry of Ecological and Inclusive Transition; NOR: TREL2002508 S/284). Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Faculty of Pharmacy (University of Lille). Global Positioning System (GPS) coordinates were used on the QGIS software to generate a map of these wild hop collection sites (Fig. 1). Cones were sampled during the month of September 2019 at their maturity and used for phytochemical analysis. Rhizomes of these wild accessions were collected and replanted into an experimental hop collection at the Douai-Wagnonville High School (France) to have a conservatory for

these genetic resources. Samples from younger leaves and stems were used for genetic and plant biotechnology studies the following year in *ex-situ* conditions. Finally, soil samples were taken close to the root environment of the hop accessions in the A horizon, and then air-dried and sieved to 250 μm . Different types of analyses were performed on these samples to characterize the original biotope of hops studied.

4.1.2. Vitroplants

As the genotyping analyses were more efficient on young leaves whereas the collection had taken place in September in order to obtain mature cones, the majority of the DNA extractions were performed on the leaves once rhizome fragments had been transplanted to our experimental hop field at the Douai-Wagnonville High School (France). Nevertheless, some accessions did not recover from this transplant and in these cases, we used leaves from our collection of vitroplants. *In vitro* cultures of hop were established from plants from the experimental hop collection. Herbaceous stems of hop were surface sterilized with 80 g.L^{-1} calcium hypochloride (60% active chlorine) for 10 min, followed by three washes with sterile water, then stems were cut into nodal fragments and placed in 160 \times 24 mm glass tubes with transparent plastic covers, containing a half-strength medium (MS medium) (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 100 mg.L^{-1} myo-inositol, 30 g.L^{-1} glucose and 6 g.L^{-1} agar, pH 5.6. Nodal fragments develop to give vitroplants which are maintained by regular transfers (every 2 months) of stem cuttings (nodal segments) in fresh media. The vitroplant cultures were grown at 22 $^{\circ}\text{C}$ under a 16 h light photoperiod provided by cool-white fluorescent lamps (40 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

4.1.3. Characterization of the biotopes and soil analysis

(1) *Measure of dry weight and organic matter content.* Approximately 3 g of sieved soil sample, weighed with a Denver Instrument balance scale were taken in a tared crucible and placed in an oven at 105 $^{\circ}\text{C}$ for 16 h. A weighing was carried out, to measure the moisture content of the samples. Calcination of the soil sample at high temperature (>400 $^{\circ}\text{C}$) resulted in the calcination of all the organic matter that it contained. The difference in mass between this remaining mineral fraction and that of the initial sample is the loss on ignition (LOI). It can be equated to the amount of organic matter contained in the sample when the sample is low in carbonate (Heiri et al., 2001). The LOI protocol was then carried out as follows: (i) 1 h of temperature rise to 650 $^{\circ}\text{C}$, (ii) 3 h at 650 $^{\circ}\text{C}$, (iii) once cooled, crucibles were weighed, and organic matter content was then calculated by comparison with the dry weight. (2) *Measure of pH.* A volume of 6 mL of soil was placed in lidded jars with 30 mL of distilled water, shaken for 1 h at 750 rpm with a magnet bar on the shaking table and then left to stand for 2 h. The pH was measured directly with a calibrated pH meter (pHmeter Knick™, Berlin, Germany). (3) *Measure of conductivity.* The electrical conductivity of the soil was measured by mixing 4 g of soil with 20 mL of bidistilled water in Falcon tubes. The mixture was shaken for 2 h on a rotary shaker at 180 rpm, before being centrifuged at 1000 G for 10 min. Conductivity was measured with a calibrated pH/conductometer (Metrohm, Herisau Switzerland). (4) *Sample mineralization and dosage of Ca, Na, K and Mg.* 300 mg of soil sample were added to a mix containing 4.5 mL of 37% HCl and 1.5 mL of 70% HNO₃. The resulting suspension was heated at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 90 min in a digester (HotBlock™ Environmental Express®SC100, Charleston, USA). Ultra-pure water was then added to reach a total volume of 25 mL. The solution was then filtered over an acetate Millipore membrane (0.45 μm porosity). Before analysis, 1 mL of mineralized soil solution was diluted 10 times in lanthanum chloride (LaCl₃). The concentrations of calcium (Ca), sodium (Na), potassium (K) and magnesium (Mg) elements were measured by flame atomic absorption spectrometry (FAAS, AA-6800 Shimadzu, Tokyo, Japan) following recommendations described in the literature (Waterlot and Hechelski, 2019). The calibration curves were established for each mineral to be dosed in the linearity range of the apparatus to avoid potential spectral interferences. Details on the characteristics of the light source and the method of quantification were

given in Waterlot and Hechelski (2019). A lanthanum chloride blank and technical blank were also injected. Data obtained from this assay, expressed as mg.L^{-1} , were first converted into mg.kg^{-1} , based on the mass of soil analyzed. Data were then expressed as mg.kg^{-1} dry weight based on the moisture content of the sample, measured previously. Data of soil analysis were summarized into an Excel file and analyzed with a heat map and an HAC ($N = 8$) generated with XLSTAT® software version 2020- 3.1. HAC combined similar individuals or variables into clusters and arranged these clusters into a hierarchy.

4.2. DNA extraction and microsatellite-based DNA fingerprinting

4.2.1. Plant material and DNA isolation

DNA was extracted from young leaves collected in early spring for the 63 genotypes studied. These samples were collected directly from the hop growers for the 10 commercial varieties (cooperative Coopounord) and the 3 heirloom varieties (farm of Joris Cambié). For wild hops, samples were taken directly in the Douai high school experimental hop field or on vitroplants. The leaves, after grinding in liquid nitrogen, were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. DNA extraction was performed following the NucleoSpin Plant II protocol mini kit for DNA from plants (Macherey-Nagel, Germany). The concentration and the quality of each DNA sample were assessed by NanoDrop measure (NanoDrop One, ThermoScientific, Wilmington, USA) and 1% agarose gel electrophoresis.

4.2.2. Microsatellite assay

All isolates were fingerprinted using eleven microsatellite markers: HI-ACA3, HI-GA27, HI-AGA1, HI-GT14, HI-GT16, HI-AGA35, HI-GA36 (Stajner et al., 2005) and GT1-K1-4, GA4-P11-9, GA8-K15-4 and GA7-I6-16 (Jakse et al., 2008) (Supplementary material Table S6). These markers were chosen due to their high allelic polymorphism during the preliminary experiments. PCR reactions were performed in a 50 μL reaction volume containing 8.0 μL of 25 mM MgCl_2 , 5.0 μL of 10X buffer B, 4.0 μL of 2.5 mM dNTP (Thermo Fischer Scientific, USA), 1 μL of each primer (20 μM) (Thermo Fischer Scientific, USA), 1 U of Taq DNA polymerase (Thermo Fischer Scientific, USA) and 5 μL of hop DNA (1 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ final DNA concentration). The amplifications were carried out on a thermal cycler (C1000 Touch, Bio-Rad, Hercules, CA) under the following PCR cycling conditions: initial denaturation at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min; followed by 40 cycles of $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, 30 s at the annealing temperature (depending on the primer pair used), and $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min; with a final extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min. After the final step, samples were stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The separation was performed using capillary array electrophoresis in multiplex after pooling the amplicons into five pools of two amplicons per pool and one pool of one amplicon (Supplementary material Table S6). Within each pool, the primer pair used to amplify each marker was labeled with a fluorescent dye (Applied Biosystem, CA), with either blue (6-FAM) or green (HEX) fluorochrome, for better resolution of the capillary system. Mixtures were performed by using 1 μL of each pool-PCR product mixed with 10 μL of formamide (Sigma-Aldrich, France) and 0.15 μL of GeneScan 500 LIZ Size standard (Applied Biosystem, CA). After a denaturation step at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, the pooled-PCR products were analyzed on a 3130 xl Genetic analyzer DNA sequencer (Applied Biosystem, CA). Fluorescent peaks were standardized using the Genescan Analysis software v. 3.7.1 Genotyper (Applied Biosystem, CA). The conversion into alleles and the determination of allele size were performed using the software Genotyper (Applied Biosystem, CA). Alleles scored with each microsatellite marker were summarized in an Excel sheet before undergoing statistical analysis.

4.2.3. Statistical analysis

Indices per locus, such as the number of alleles (N_a), expected (H_e) and observed (H_o) heterozygosity and the inbreeding coefficient (F_{is}) were calculated utilizing the GenAlEx v. 6.501 (Peakall and Smouse,

2012). Genetic structure was tested according to different approaches. (1) First, the magnitude of genetic differentiation among sub-collections, according to each locus, was assessed based on several fixation indices: a) Wright's F_{ST} index (F_{ST}) implemented in GenAlEx version 6.501, b) Nei's G_{ST} index, a multiallelic analog of F_{ST} that is suitable for haploids as well as diploids (Nei, 1973), implemented in POPGENE version 1.32.3 (Yeh et al., 2000) new standardized estimators of genetic structure, including Hedrick's standardized fixation index G''_{ST} (Meirmans and Hedrick, 2011) and Jost's standardized fixation index Jost's D_{ST} (Jost, 2008), implemented in GenAlEx version 6.501. These different indices were calculated because the literature mentions and discusses the utility of these different statistic tools for measuring genetic differentiation between or among populations (Jost, 2008). (2) In addition, the program GenAlEx version 6.501 (Peakall and Smouse, 2012) was run to calculate F_{ST} and Φ_{ST} indices to highlight the amount of population differentiation among pairs of sub-collections (locations). Sources of genetic structure in each collection were investigated using hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) implemented in GenAlEx version 6.501, by the estimation of the degree of genetic differentiation within and among sub-collections using 1000 permutations. This software also allowed the distance matrix between the 63 accessions to be obtained, then processed by PCoA. (3) Hop population structure was also analyzed using STRUCTURE version 2.3.4, a model-based clustering program that uses a Bayesian approach to estimate the number of clusters and to assign individuals probabilistically to populations (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003). The analysis was performed without prior information on the sub-collections to which the individuals belonged. 10 replicated runs, obtained with 50,000 iterations of the Markov Chain Monte Carlo method (MCMC) used as 'burn-in' and then followed by 500,000 MCMC iterations were produced to compare the log probability $\text{Pr}(K)$, of each model, where K is the number of clusters. The data were analyzed with K ranging from 1 to 20, with 10 repeat runs for each K . Values were computed and plotted by the software Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2012). The best estimate of K was based on ΔK values calculated from $\ln P(D)$, as described in Evanno et al. (2005). (4) Furthermore, a dendrogram estimating genetic clustering of the haplotypes was produced using the unweighted neighbor-joining method based on the dissimilarity matrix (10,000 bootstraps), as implemented in the DARwin version 6.0.014 software (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006). (5) In addition, directional relative migration on network among the 11 locations and the 13 varieties of the region scale was determined using the divMigrate-online software using N_m as a measure of genetic differentiation (Sundqvist et al., 2016). This approach provides network plots, which facilitates the viewing of patterns of directional relative migration between locations.

4.3. Phytochemical characterization

All the hop cones used for this phytochemical characterization come from the collection gathered in September 2019. Cones were dried in an oven at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, ground and then stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until experimentation.

4.3.1. Volatile compound analysis quantification with HS-SPME GC-MS

Volatile compounds analyses were performed using HS-SPME GC-MS. The SPME fiber divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB, CAR, PDMS, 50/30 μm) (Supelco, Darmstadt, Germany) was selected because it was the most suitable to analyze terpenes. Prior to use, the fiber was conditioned 10 min at injection temperature according to the recommendations of the manufacturer. Extractions were performed on 1 g of hop cone powder placed in a 5 mL glass vial. For each sample, the incubation was initiated with a temperature of $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, then the extraction lasted 30 min at the same temperature. The analyses were performed on an Agilent 7890 A gas chromatograph coupled to an Agilent 5975C mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an MPS auto-sampler. Then, injections were performed in splitless mode at $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. An HP-5 MS

capillary column (30 m × 250 µm × 0.25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used, with helium employed as the carrier gas at a flow rate of 1.2 mL.min⁻¹. The separation conditions were as follows: initial column temperature of 40 °C for 2 min; then it was increased by 4 °C.min⁻¹ to 200 °C; then increased by 20 °C.min⁻¹ to 300 °C, where it was maintained for 5 min. The mass spectrometer was set to have a temperature of the ion source at 230 °C and was programmed with SCAN acquisition mode. The mass spectra were acquired within a range of 35–500 Da *m/z* (mass-to-charge ratio). All main peaks corresponding to volatile compounds were integrated using the software Agilent MassHunter Unknowns Analysis software and general volatile compound profiles were established through a chromatographic deconvolution process (Fig. 2). Putative identification of volatile compounds was performed by comparing their mass spectra to those of commercial databases National Institute of Standards and Technology (NIST17) and Wiley 7. Additionally, experimental retention index (RI) of the compounds was calculated following the injection of a mixture of *n*-alkanes C₈–C₂₀ (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) and compared with those of compounds referenced in the NIST online database (<https://webbook.nist.gov/chemistry/cas-ser.html>, accessed on November 5, 2021). Data were analyzed in Excel to provide a heatmap and an HAC generated by a general analysis on XLSTAT® software version 2020- 3.1.

4.3.2. Non-volatile compounds analysis

4.3.2.1. Metabolite extraction and sample preparation for UHPLC-DAD-MS and UHPLC-hrms-qtof analysis. Hydro-ethanolic extracts of the 63 studied hops were performed in triplicate using 50 mg of dried cone powder with 1 mL of ethanol-water mixture (9:1, v/v). A 1-h maceration session was carried out in an ultrasonic bath. Afterwards, tubes were centrifuged at 4000 rpm at 20 °C for 5 min. Supernatant was then transferred into a tared tube. The exhausted matrix was then re-extracted two further times following the same protocol, and the supernatants were pooled with the first extract. At the end of the three maceration sessions, the solvent extraction was then evaporated in a Genevac™ centrifugal concentrator to obtain a crude hydro-ethanolic extract.

4.3.2.2. UHPLC-UV-MS analysis and quantification of main phenolic compounds. Quantification of xanthohumol, *co*-, *n*- and *ad*-humulone and *co*-, *n*- and *ad*-lupulone in each hydro-ethanolic extract was performed on an Acquity UPLC®H-Class Waters® system (Waters, Guyancourt, France) coupled to a Diode Array Detector (DAD) and a QDan ESI-Quadrupole Mass Spectrometer (Fig. 1). Separation was achieved using a Waters® Acquity BEH C18 column (pore size 300 Å, particle size 1.7 µm, 2.1 × 150mm, Waters, Milford MA) connected to a 0.2 µm in-line filter. Solvent A (water with 0.1% formic acid (v/v)) and solvent B (acetonitrile with 0.1% formic acid (v/v)) were used as the mobile phase. Compounds were eluted using the following chromatographic conditions: the flow rate was 0.3 mL.min⁻¹; the column temperature was set at 40 °C; the injection volume was 2 µL. The gradient elution (total analysis time of 13 min) was performed using eluent A and eluent B: initial condition in 0–1 min isocratic mode at 50% B, 1–3 min linear gradient to reach 75% B, 3–5 min isocratic mode at 75% B, 5–7 min linear gradient to reach 100% B, 7–9 min isocratic mode at 100% B, 9–13 min return to 50% B to rebalance the column. Chromatograms were acquired at 330 and 370 nm. Parameters for mass spectrometry were as follows: negative ionization mode, cone voltage at 10 V, capillary voltage at 0.8 kV, probe temperature at 600 °C, MS-Scan mode from 100 to 1000 Da. Xanthohumol and acylphloroglucinol derivatives were quantified in crude extracts according to the International Conference for Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use guideline Q2-R1 (ICH, 2005). Quantification was carried out in UV at 370 nm for xanthohumol and 330 nm for acylphloroglucinols. The quantitation method was set up using standards purified in the

laboratory according to the protocol detailed by Bocquet et al. (2019). Stock solutions of xanthohumol, *co*- and *n*-humulone and *co*- and *n*-lupulone were elaborated at a concentration of 1 mg.mL⁻¹ in methanol in triplicate and stored at –20 °C prior to use for quantification. Fifteen working solutions (from 100 µg.mL⁻¹ to 2.5 ng.mL⁻¹) were then prepared from these stock solutions. Calibration curves were established by plotting peak area (*y*) as a function of the nominal concentration for each calibration level (*x*) and then fitted by weighted (1/*x*) least square linear regression. Linearity and sensitivity of the method were determined and are reported in the Supplementary material section (Table S18). For these reference compounds, the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were experimentally determined as the lowest concentration with signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. The precision of the chromatographic system was tested by performing intra- and inter-day multiple injections of the hop extract and then checking the RSD % of retention times and peak areas. Five injections were performed each day for three consecutive days (*n* = 3, *k* = 3). Xanthohumol and α - and β -acids were identified based on the retention time of purified standards and their mass spectra and were quantified using the quantitation method previously set up on the Empower software (Bocquet et al., 2019). Data were exported from Empower to Excel. Data were converted from µg.mL⁻¹ to % of dry weight using the total extract volume and the dry weight, and assessed by analysis of variance (ANOVA) considering the 63 hop accessions as factors and xanthohumol, α -acids, β -acids as dependent variables. Post-hoc pairwise testing among all accessions or between types was performed using Tukey's test (with a *P* < 0.05) on R using the Agricolae package (Mediburu, 2021). Data were then processed on a PCA, associated to an HAC on XLSTAT® software version 2020- 3.1. PCA is a technique used to reduce dimensionality of the data by finding linear combinations.

4.3.2.3. Untargeted metabolomics using UHPLC-hrms-qtof. Analyses for untargeted metabolomics were performed on the hydro-ethanolic crude extracts, diluted at 1 mg.mL⁻¹ using methanol (Carlo Erba) and chromatographically separated on an ACQUITY UHPLC system (Waters, Guyancourt, France). The column was a Waters® Acquity BEH C18 column (2.1 × 50 mm, 1.7 µm) connected to a 0.2 µm in-line filter. The mobile phase was composed of water (A) and acetonitrile (B) both acidified with 0.1% of formic acid. Elution was performed at a flow rate of 300 mL.min⁻¹ with the following gradient program (total analysis time: 10 min): initial condition in 0–0.2 min isocratic mode at 10% B, 0.2–7.5 min linear gradient to reach 100% B, 7.5–8 min isocratic mode at 100% B, 8.1–10 min linear gradient to rebalance the column at 10% B. The column temperature was set at 40 °C and 10 µL of hop extract was injected. The UHPLC eluent was then directly electrosprayed at the end of the column at a voltage of 3 kV, using a desolvation gas (N) at a flow of 600 L.h⁻¹, a nebulizer gas flow of 6.5 bar, and a temperature of 300 °C. The UHPLC was coupled to a SYNAPT-G2-Si mass spectrometer (Waters, Guyancourt, France) previously calibrated using a sodium formate solution. Mass spectrometry measurements were made in high resolution negative-mode using MassLynx software (version 4.1, Waters). Raw data from MassLynx was imported into Progenesis where a list of compound peaks (retention time, *m/z* molecular ion and peak intensity) contained in the extract was generated. A matrix was then created to obtain the samples per row and the different variables per column for statistical processing and was finally exported. As the samples were analyzed in triplicate, the average of each intensity for the three repetitions was considered. Ions with a maximum intensity lower than 1000 were eliminated. PCA were obtained using R software with the package FactoMineR (R Core Team, 2021).

4.4. Multivariate analysis of metabolites, genetic traits, and soil characteristics

Hop data of the different data sets including soil analysis, genetic characterization using the distance matrix used to construct PCoA and phytochemical analysis (volatile compounds analysis, quantitation of main prenylated compounds and non-targeted metabolomics) were compiled into an input file on an Excel spreadsheet. An MFA, as described by Escofier and Pagès (2008), followed by an HAC were performed to compare the different datasets obtained as mentioned before. Matrices of soil analysis, quantification of main phenolic compounds, untargeted metabolomics and genetic characterization were kept as quantitative datasets, while volatile compound results were considered a qualitative dataset. If variables are structured in different datasets with the same observation number, MFA may be considered to be an extension of the PCA for quantitative variables or an extension of the multiple correspondence analysis for qualitative variables. MFA allows the analysis and visualization of multiple data matrices as a whole. MFA was run using XLSTAT® software version 2020- 3.1 as a nonsupervised method to identify key traits with the largest effect on the overall variability and to evaluate the effect of genetic background on the chemical profiles among different accessions. HAC was performed with Ward's method, and were visualized as a dendrogram (N = 7).

Fundings

This work has been carried out in the framework of the FEADER project 2021–2024 (action 16.02.01 “assistance with pilot projects and the development of new products, practices, processes and technologies” n°35/2020) which is financed by the European Union and the Region of Hauts-de-France (France). The authors gratefully thank the Region of Hauts-de-France and the European Union (Feder), the University of Lille (I-Site) and the “Fondation de la brasserie et de la malterie françaises” for the funding of PhD fellow Anne-Sophie Paguet.

Author contributions

ASP: Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft; AS: Methodology, Supervision (genetical part), Project administration, Formal analysis, Writing – review & editing; GL: Conceptualization, Harvests, Writing; SM, JS, TC, FM, BD: Methodology and Investigation (chemistry and genetics); CF: Responsible for mass spectrometry platform; CRA: Supervision (vitro-plants); AHDS, AED: Methodology (vitroplants); SC: Formal analysis (statistical analysis); RM, JXF: Formal analysis (untargeted metabolomics); MLF: Supervision (volatile compound analysis); CW: Supervision (soil characterization); SS: Project administration; CRi: Conceptualization, Harvests, Methodology, Validation, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Investigation (NMR), Formal analysis, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors wish to thank the hop growers of CoopHounord (Berthen, France), in particular Yvon Pruvot, Paul Pruvot, Christophe Gombert, Nicolas Daneels, Riquier Thévenin, Julien Hennon, Denis Beck, Thierry Beck, as well as Joris Cambie (Poperinge, Belgium) for

supplying commercial and heirloom varieties of hop. We also warmly thank the natural park managers for their help in identifying collection sites of wild hops. We thank in particular Hubert Brabant and Dominique Derout (Eden 62), Sébastien Mézière and François Charlet (Parc Naturel Régional des Caps et Marais d'Opale), Yann Dulondel and Gérald Duhayon (Parc Naturel Régional Scarpe-Escaut), Yvon Brunelle and Stéphane Marache (Parc Naturel Régional de l'Avesnois) and the Nord department. Our thanks also go to those who advised us or gave their authorization to collect on their private lands: Claude Delasalle and his family, Christophe Noyon, David Lutun, Norman Degardin, Riquier Thévenin. Our great thanks to David Lutun and Fabrice Henry at the Douai-Wagnonville high school for the preservation of our collection of wild hops and to the Hauts-de-France regional chamber of agriculture for their support in this project, in particular Anne-Hélène Martin and Aurélien Honoré. We also thank Richard Boucherie (CRRG) for some historical data on hop production in the North of France and Edouard Rousset, organic hop grower, for our discussions on hops. Many thanks also to Charles Dermont for the initiation of volatile compound analysis, Jean-Louis Hilbert for his great support, as well as Cassandra Harvey for English grammar corrections. Finally, we thank the BRGM (Bureau de Recherches Géologiques et Minières) for their kind permission to use the geological maps. Authors are also grateful to LARMN and to REALCAT platforms for access to equipment.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113508>.

References

- Bart-Haas Report, 1930. Hop Report for 1929-30. Nuremberg, Bavaria, July 18th 1930. https://www.barthhaas.com/fileadmin/user_upload/downloads/barth-berichte-broschueren/barth-berichte/englisch/1920-1930/barth-report-1929-1930.pdf.
- Bart-Haas Group, 2021. In: Bart-Haas Report.
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Hilbert, J.L., Rambaud, C., Rivière, C., 2018a. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry Rev.* 17, 1047–1090. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y>.
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Rivière, C., 2018b. An Overview of the Antimicrobial Properties of Hop. Springer International Publishing AG, Sustainable Development and Biodiversity Book Series, pp. 31–54.
- Bocquet, L., Rivière, C., Dermont, C., Samaillie, J., Hilbert, J.-L., Halama, P., Siah, A., Sahpaz, S., 2018c. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Ind. Crop. Prod.* 122, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.061>.
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Bonneau, N., Beaufay, C., Mahieux, S., Samaillie, J., Roumy, V., Jacquin, J., Bordage, S., Hennebelle, T., Chai, F., Quetin-Leclercq, J., Neut, C., Rivière, C., 2019. Phenolic compounds from *Humulus lupulus* as natural antimicrobial products: new weapons in the fight against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* strains. *Molecules* 24 (6), E1024 pii.
- Čerenak, A., Kolenc, Z., Sehur, P., Whittock, S.P., Koutoulis, A., Beatson, R., Buck, E., Javornik, B., Škof, S., Jakše, J., 2019. New male specific markers for hop and application in breeding program. *Sci. Rep.* 9, 14223 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50400-z>.
- Dabbous-Wach, A., Rodolfi, M., Paolini, J., Costa, J., Ganino, T., 2021. Characterization of wild Corsican hops and assessment of the performances of German hops in Corsican environmental conditions through a multidisciplinary approach. *Appl. Sci.* 11, 3756. <https://doi.org/10.3390/app11093756>.
- Damseaux, A., 1911. *Plantes de la grande culture*, Troisième édition. Amat, Namur, p. 491.
- Darby, P., 2005. Brewery History [WWW Document]. Brewery history. URL: <http://www.breweryhistory.com/journal/archive/121/bh-121-094.htm>. accessed 6.2.21.
- Driskill, Mandie, Pardee, Katie, Hummer E, Kim, Zurn D, Jason, Amundsen, Keenan, Wiles, Annette, Wiedow, Claudia, Patzak, Josef, Henning A, John, Bassil V, Nahla, 2022. Two fingerprinting sets for *Humulus lupulus* based on KASP and microsatellite markers. *PLoS ONE* 17 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257746>.
- Ducloux, A., Hédiard, L., Vallez, T., 1910. In: Baillièrre, J.B., éditeurs, fils (Eds.), *Les productions agricoles du Nord de la France* (Paris, France).
- Earl, D.A., vonHoldt, B.M., 2012. Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
- Escofier, B., Pagès, J., 2008. *Analyses factorielles simples et multiples*. In: *Objectifs méthodes et interprétation*, Sciences Sup. Dunod.

- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies - PubMed. *Genetics* 164, 1567–1587.
- Heiri, O., Lotter, A.F., Lemcke, G., 2001. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. *J. Paleolimnol.* 25, 101–110. <https://doi.org/10.1023/A:1008119611481>.
- Hong, K., Xu, Z., Wang, L., Johnpaul, A., Cheng, Y., Lv, C., Ma, C., 2022. Varietal differences in the phytochemical components' accumulation and aroma profile of three *Humulus lupulus* cultivars. *Food Control* 132, 108499. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108499>.
- ICH, 2005. International conference on harmonisation of technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use. In: *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*. Brill, Nijhoff, pp. 1041–1053. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897>.
- Jakše, J., Bandelj, D., Javornik, B., 2002. Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.). *Mol. Ecol. Notes* 2, 544–546. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00309.x>.
- Jakše, J., Luthar, Z., Javornik, B., 2008. New polymorphic dinucleotide and trinucleotide microsatellite loci for hop *Humulus lupulus* L. *Mol Ecol Resour* 8, 769–772. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2007.02053.x>.
- Jiang, P., Song, T., Jiang, W., Wang, D., Pu, B., Luan, C., 2018. SNP-based competitive allele specific PCR (KASPTM) method for the qualification and quantification of hop varieties. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 76 (3), 185–189. <https://doi.org/10.1080/03610470.2018.1483702>.
- Jost, L., 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol. Ecol.* 17, 4015–4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>.
- Karlsson Strese, E.M., Lundström, M., Hagenblad, J., Leino, M., 2014. Genetic diversity in remnant Swedish hop (*Humulus lupulus* L.) yards from the 15th to 18th century. *Econ. Bot.* 68, 231–245. <https://doi.org/10.1007/s12231-014-9273-8>.
- Kishimoto, T., Teramoto, S., Fujita, A., Yamada, O., 2021. Evaluation of components contributing to the international bitterness unit of wort and beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* <https://doi.org/10.1080/03610470.2021.1878684>.
- Korpeläinen, H., Pietiläinen, M., 2021. Hop (*Humulus lupulus* L.): traditional and present use, and future potential. *Econ. Bot.* 75 (3), 302–322. <https://doi.org/10.1007/s12231-021-09528-1>.
- Machado, J., Faria, M., Barata, A.M., da Silva, I.G., Cerenak, A., Ferreira, I., 2022. Portuguese wild hop diversity assessment by fast SNP genotyping using high-resolution melting. *J. Appl. Genet.* 63 (1), 104–114. <https://doi.org/10.1007/s13353-021-00668-7>.
- Mafakheri, M., Kordrostami, M., Rahimi, M., Matthews, P.D., 2020. Evaluating genetic diversity and structure of a wild hop (*Humulus lupulus* L.) germplasm using morphological and molecular characteristics. *Euphytica* 216, 58. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02592-z>.
- Martins, Z.E., Machado, J.C., Cunha, S.C., Barata, A.M., Ferreira, I.M., 2020. A chemometric approach to compare Portuguese native hops with worldwide commercial varieties. *J. Chemom.* <https://doi.org/10.1002/cem.3285>.
- McCallum, J.L., Nabuurs, M.H., Gallant, S.T., Kirby, C.W., Mills, A.A.S., 2019. Phytochemical characterization of wild hops (*Humulus lupulus* ssp. *lupuloides*) germplasm resources from the maritimes region of Canada. *Front. Plant Sci.* 10 <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01438>.
- Mediburu, F. de, 2021. *Agricola: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R Package Version 1, pp. 3–5.
- Meirmans, P.G., Hedrick, P.W., 2011. Assessing population structure: F(ST) and related measures. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 5–18. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x>.
- Mongelli, A., Rodolfi, M., Ganino, T., Marieschi, M., Dall'Asta, C., Bruni, R., 2016. Italian hop germplasm: characterization of wild *Humulus lupulus* L. genotypes from Northern Italy by means of phytochemical, morphological traits and multivariate data analysis. *Ind. Crop. Prod.* 70, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.036>.
- Moore, B., Andrew, R., Külheim, C., Foley, W., 2014. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytol.* 201, 733–750. <https://doi.org/10.1111/nph.12526>.
- Morcol, T.B., Negrin, A., Matthews, P.D., Knelly, E.J., 2020. Hop (*Humulus lupulus* L.) terroir has large effect on a glycosylated green leaf volatile but not on other aroma glycosides. *Food Chem.* 321, 126644 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126644>.
- Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M.S.S., Seigner, E., Lutz, A., Svoboda, P., 2006. Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus* L. *Heredity* 97, 66–74. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800839>.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum* 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Naraine, S., Small, E., 2017. Germplasm sources of protective glandular leaf trichomes of hop (*Humulus lupulus*). *Genet. Resour. Crop Evol.* 64, 1491–1497. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0540-2>.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 3321–3323. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>.
- Neve, R.A., 1991. *Hops*. Chapman and Hall.
- Nybom, H., 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13, 1143–1155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x>.
- Paguet, A.S., Siah, A., Lefèvre, G., Sahpaz, S., Rivière, C., 2022. Agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding. *Phytochemistry Rev.* <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09813-4>.
- Palmer, J.J., 2006. *How to Brew: Everything You Need to Know to Brew Beer Right for the First Time*. Brewers Publications, Boulder, Colo.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- Perrier, X., Jacqemoud-Collet, J.P., 2006. DARwin Software.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>.
- R Core Team, 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing [WWW Document]. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL. <https://www.R-project.org/>.
- Rodolfi, M., Silvanini, A., Chiancone, B., Marieschi, M., Fabbri, A., Bruni, R., Ganino, T., 2018. Identification and genetic structure of wild Italian *Humulus lupulus* L. and comparison with European and American hop cultivars using nuclear microsatellite markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 65, 1405–1422. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0622-9>.
- Santagostini, L., Caporali, E., Giuliani, C., Bottoni, M., Ascriczi, R., Araneo, S.R., Papini, A., Flamini, G., Fico, G., 2020. *Humulus lupulus* L. cv. Cascade grown in Northern Italy: morphological and phytochemical characterization. *Plant Biosyst.* 154, 316–325. <https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1610111>.
- Schönberger, C., Kosteletzky, T., 2011. 125th anniversary review: the role of hops in brewing. *J. Inst. Brew.* 117, 259–267. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x>.
- Small, E., 1978. A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*. *Syst. Bot.* 3, 37. <https://doi.org/10.2307/2418532>.
- Solberg, S.Ø., Brantestam, A.K., Kylin, M., Björn, G.K., Thomsen J, M.G., 2014. Genetic variation in Danish and Norwegian germplasm collections of hops. *Biochem. Systemat. Ecol.* 52, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.12.014>.
- Srećec, S., Zechner-Krpan, V., Petradić-Tominac, V., Cerenak, A., Liber, Z., Šatović, Z., 2010. Phenotypic and alpha-acid content diversity of wild hop populations in Croatia. *Plant Soil Environ.* 37–42. <https://doi.org/10.17221/130/2009-PSE>.
- Stajner, N., Jakše, J., Kozjak, P., Javornik, B., 2005. The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Sci.* 168, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.031>.
- Statista, 2021. Craft Beer: Production Volume by Brewery Type U.S. 2020 [WWW Document]. Statista. URL. <http://www.statista.com/statistics/732171/craft-beer-production-by-brewery/>. accessed 5.22.21.
- Sundqvist, L., Keenan, K., Zackrisson, M., Prodöhl, P., Kleinhans, D., 2016. Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecol. Evol.* 6, 3461–3475. <https://doi.org/10.1002/ece3.2096>.
- Taniguchi, Y., Matsukura, Y., Ozaki, H., Nishimura, K., Shindo, K., 2013. Identification and quantification of the oxidation products derived from α -acids and β -acids during storage of hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 61, 3121–3130. <https://doi.org/10.1021/jf3047187>.
- The Chemical Sources Association, 2010. *The Good Scents Company* ([WWW Document]).
- Tofana, M., Socaci, S., Socaci, C., Mihaiescu, D., Semeniciu, C., Truta, D., 2009. Optimization of HS/GC-MS method for the determination of volatile compounds from some indigenous hop varieties. *Bulletin UASVM Agriculture* 66, 500–505.
- Turner, S., Benedict, C., Darby, H., Hoagland, L., Simonson, P., Sirrine, R., Murphy, K., 2011. Challenges and Opportunities for Organic Hop Production in the United States.
- Uemoto, M., Takoi, K., Tanigawa, A., Takazumi, K., Ogushi, K., Koie, K., Suda, N., 2022. Effect of “late harvest” of hops (*Humulus lupulus* L.) on the contents of volatile thiols in furano beauty, furano magical, and cascade varieties. *J. Agric. Food Chem.* 70, 607–614. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c08210>.
- Van Holle, A., Muylle, H., Ruttink, T., Van Landschoot, A., Haesaert, G., Naudts, D., De Keukeleire, D., Roldán-Ruiz, I., 2019. Single nucleotide polymorphisms and biochemical markers as complementary tools to characterize hops (*Humulus lupulus* L.) in brewing practice. *J. Agric. Food Chem.* 67, 3761–3771. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00816>.
- Vázquez-Araújo, L., Rodríguez-Solana, R., Cortés-Diéguez, S.M., Domínguez, J.M., 2013. Use of hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction to characterize the volatile composition of different hop cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2568–2574. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6078>.
- Waterlot, C., Hechelski, M., 2019. Benefits of ryegrass on multicontaminated soils Part 1: effects of fertilizers on bioavailability and accumulation of metals. *Sustain. Times* 11, 5093. <https://doi.org/10.3390/su11185093>.
- Yamauchi, H., Mukouzaka, Y., Taniguchi, T., Nakashima, K., Furukubo, S., Harada, M., 2014. Newly developed SNP-based identification method of hop varieties. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 72 (4), 239–245. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2014-1006-01>.
- Yeh, F.C., Yang, R., Boyle, T., Ye, Z.H., Mao, J., 2000. POPGENE, version 1.32: the user friendly software for population genetic analysis - ScienceOpen. In: *Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, and CIFOR (Canada)*.
- Zhang, D., Easterling, K., Pitra, N., Coles, M., Buckler, E., Bass, H., Matthews, P., 2017. Non-Mendelian single-nucleotide polymorphism inheritance and atypical meiotic configurations are prevalent in hop. *Plant Genome* 10 (3). <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.04.0032>.

Supplementary data

Table S1. Summary of the ten hop commercial varieties studied

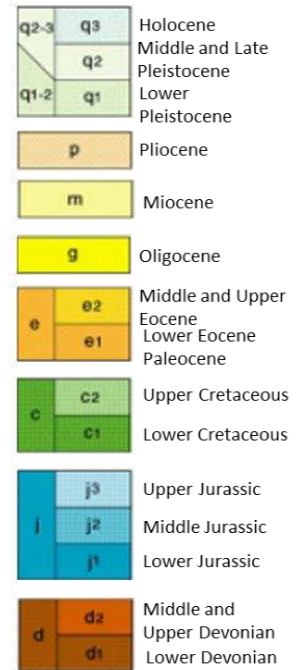
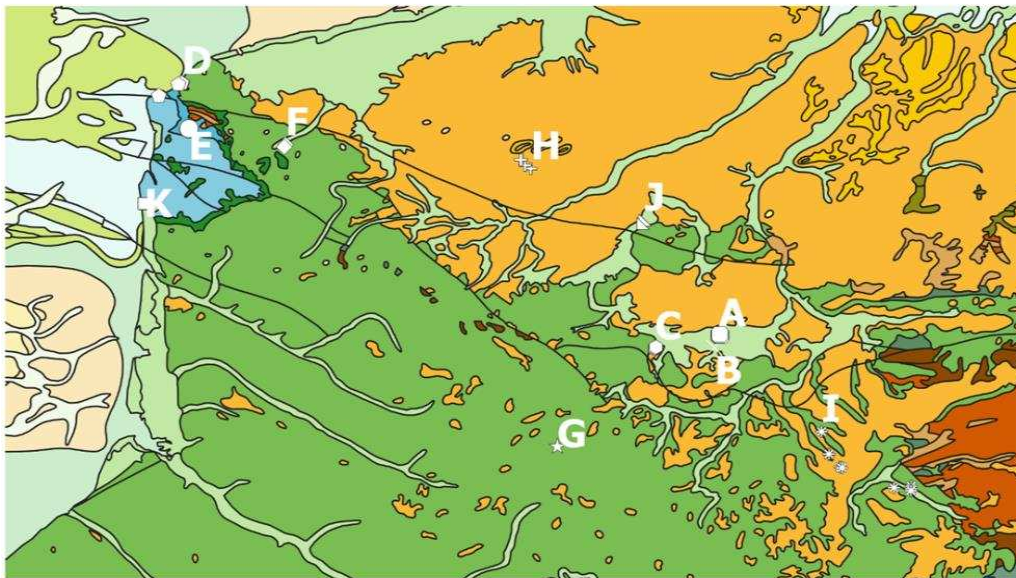
	Grown	Profile	Uses	α -acids composition	β -acids composition	Co-humulone composition	Total Oil Composition	Myrcene Oil Composition	Humulene Oil Composition	Caryophyllene Oil	Farnesene Oil
Bittering Hop Varieties											
Challenger	UK	Strong, fine spicy aroma widely used for English Bitters; A clean bittering hop.	Excellent bittering hop, also used for flavoring and aroma.	6 - 8%	3.2 - 4.5%	20 - 25%	1-1.7 mL/100g	30 - 42%	25 -32%	8 - 10%	1-3 %
Brewer's Gold	UK, US	Poor aroma; Sharp bittering hop.	Bittering for ales	8 - 9%	3.7%-6.8%	41%	1.8 mL/100g	40%	35%	35%	<1%
Northern Brewer	UK, US, Germany (called Hallertauer NB), and other areas (growing region affects profile greatly)	Hallertauer NB has a fine, fragrant aroma; Dry, clean bittering hop	Bittering and finishing for a wide variety of beers	7 - 10%	3.5 - 5 %	27 - 33%	1.6-2.1 mL/100g	25 - 45 %	35 - 50 %	10 - 20 %	<1%
Nugget	US	Heavy, spicy, herbal aroma; Strong bittering hop	Strong bittering, some aroma uses	12 - 14%	4.2 - 5.8%	22 - 30%	1.5-3 mL/100g	48 - 59%	12 - 22%	7- 10%	0 - 1%
Magnum	US, Germany	Clean bittering, light citrus flavor	American Pale Ale, American India Pale Ale, Strong Ale, American Lager	10% - 14%	4.5 - 7%	24 - 30%	1.9-3.0 mL/100g	30 - 35%	34 - 40%	8 - 12%	0 - 1%
Target	UK	Strong herbal aroma can be too strong for lagers; A clean bittering hop.	Widely used bittering and flavoring hop for strong ales.	8 - 10%	5 - 5.5%	29 - 35%	1.6 - 2.6 mL/100g	17 - 22%	8 - 10%	0 - 1%	0 - 1%
Aroma Hop Varieties											

Cascade	US	Strong spicy, floral, citrus (i.e. grapefruit) aroma.	The defining aroma for American style Pale ales. Used for bittering, finishing, and especially dry hopping.	4.5 - 8%	3.6-7.5%	33-40%	0.8-1.5 mL/100g	45-60%	8-16%	4-6%	4-8%
Fuggles	UK, US, and other areas	Mild, soft, grassy, floral aroma	Finishing / dry hopping for all ales, dark lagers	3.5 - 5.5%	2.1%-2.8%	25%-29%	0.44-0.83 mL/100g	43.40%	26.60%	9.10%	4.30%
Golding	US	Delicate English-style aromas, fruit, herbs	Bitter, Pale Ale, Belgian Ale, Belgian IPA, Barley Wine, Imperial Stout, Red Ale, Irish Stout, American Pale Ale	4%-6%	2%-3%	20%	0.4-1.0 mL/100g	25-35%	35%-45%	13%-16%	1%
Striesselspalt	France	Pleasant continental-style aroma, herbal, floral, spicy, citrus, fruit	Lager, Saison, Blonde Ale, Amber Ale, Belgian Ale, Bock, Maibock, Golden Ale, Belgian Pale Ale	1.8%-5.7%	2.5-6%	20-27%	0.6-0.9 mL/100g	35-52%	12-32%	8-10.3%	<1%

Figure S2. Location of wild hop collection sites

Geological map of the North of France (Hauts-de-France region). Sample locations of wild hop accessions are figured.

© BRGM – Carte géologique de la France 1/1 000 000.



0 10 20 km

Figure S3. Picture of wild hop before sampling

(a) accession A2 at the Pré des Nonettes in the Scarpe-Escout Regional Natural Park, Marchiennes (59);
(b) accession B1 at the Tourbière de Vred in the Scarpe-Escout Regional Natural Park, Vred (59); (c)
accession D4 in the Regional Natural Park of the Caps et Marais d'Opale, Tardinghem (62).



Table S4. Meteorological data of the Hauts-de-France region from January 2019 to September 2019 (the growing period of hops in France).

Localities are reported on the map associated to the table.

Source: MétéoFrance.

Month	January	February	March	April	May	June	July	August	September	<i>Period Level</i>
Temperature (°C)										
Boulogne	7	9	10	11	12	16	18	19	17	13.2
Lille	5	9	10	12	14	20	21	21	17	14.3
Douai	5	9	10	12	14	20	21	21	17	14.3
Hazebrouck	5	9	10	12	13	19	20	21	17	14.0
Valenciennes	4	8	10	12	13	19	21	21	17	13.9
Sunshine (hours)										
Boulogne	109	120	177	249	273	291	316	291	219	2045
Lille	66	71	121	172	194	206	211	200	152	1392
Douai	96	109	167	231	257	267	291	272	203	1894
Hazerbrouck	105	115	171	234	264	285	295	273	204	1945
Valenciennes	93	106	167	231	260	270	291	270	200	1890
Wind Speed (km/h)										
Boulogne	28	26	33	22	23	24	24	24	29	26
Lille	18	18	24	17	18	18	17	18	20	19
Douai	19	19	25	18	18	18	17	18	20	19
Hazebrouck	20	19	26	19	20	19	19	19	22	20
Valenciennes	19	19	25	18	17	18	16	18	20	19
Total precipitation for the month (mm)										
Boulogne	85	58	96	42	47	78	39	49	89	583
Lille	13	60	109	54	60	87	42	47	54	526
Douai	34	32	62	28	50	49	26	31	23	335
Hazebrouck	109	89	133	47	61	82	30	27	51	629
Valenciennes	101	87	169	83	115	145	60	81	60	901

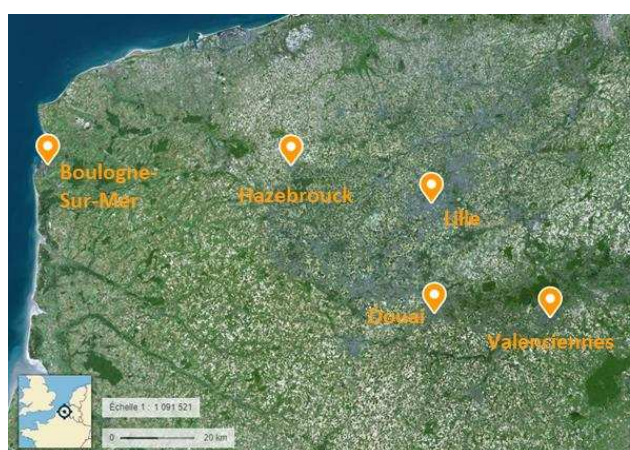


Table S5. Raw data of soil analysis

	pH	Conductivity	Organic matter content	Content in K (mg/kg)	Content in Na (mg/kg)	Content in Ca (mg/kg)	Content in Mg (mg/kg)
comm_1	6.86	228.5	0.0661463	2625.51965	944.14436	2947.29447	2398.24072
comm_2	7.19	366.8	0.05095874	1852.09067	531.077396	3265.79197	1665.04454
comm_3-10	6.765	412.8	0.04405038	1975.57688	712.371306	2905.56125	1633.87965
old	6.72	266.8	0.03744077	1479.77244	749.356106	2574.98521	1333.19509
A1	7.74	673.2	0.36455933	2101.5847	1187.16737	59476.9195	2585.73675
A2	7.61	232	0.23167871	2490.85715	1145.54562	38602.069	4015.21199
A3	7.56	274.2	0.26394259	1690.10625	695.633122	39131.4384	3767.87439
A4	6.41	357.8	0.33890514	2377.47661	1210.29144	15815.8564	2830.92142
A5	6.3	277.8	0.41038405	1316.43956	599.509223	10096.5622	2902.45155
B1	6.01	530.8	0.82237584	252.030033	142.288479	5536.31536	461.498702
B2	6.03	417.5	0.79230136	379.525412	157.935548	12682.0258	980.889015
B3	5.49	843.6	0.82987784	359.724784	463.035029	11545.2714	877.599439
B4	5.69	919.2	0.83488745	524.946246	282.039756	12623.7312	884.75211
B5	5.55	845.1	0.86143237	361.241229	300.54736	10813.861	977.613772
C1	7.41	191.5	0.20926537	3311.78283	1175.73676	10028.9766	2706.10025
C2	8.18	142.4	0.10011775	2135.01373	1125.08678	18716.3737	3244.35924
C3	7.63	739.8	0.24001056	2380.51562	1653.02077	26855.9945	2757.52036
C4	7.65	252.1	0.16457791	2424.2067	1118.48224	91283.0641	3351.3042
C5	7.25	208	0.1949889	2362.65667	796.891872	26263.6442	3254.31851
D1	7.56	195.6	0.08083266	621.938235	77.0484292	11295.7968	651.183499
D2	7.62	137.2	0.04953186	380.331157	67.5997004	5920.19288	418.190303
D3	8.5	87.04	0.01176706	310.970118	100.729798	15570.292	457.757291
D4	8.34	212.2	0.04332825	923.413937	160.626144	12777.9381	902.124138
E1	7.74	374.7	0.13819839	1604.04279	1188.94701	48538.0367	1794.60573
E2	7.74	275.4	0.13257499	2874.11904	1266.79966	51200.5789	5314.09614
F1	7.82	270.2	0.14353344	3007.41567	1170.65519	50354.7429	2594.82806
F2	7.78	186.6	0.13899089	2344.63728	1178.11809	51086.5808	2422.51569
G1	7.55	731.9	0.1404026	4432.61467	1353.81166	48844.9281	14109.7996
G2	7.29	171.1	0.09882056	2534.51973	1065.50911	3900.79075	2600.80335
H1	7.54	233.1	0.06200532	2820.90984	1134.99162	7481.83164	2115.88949
H2	6.9	458.8	0.14728891	2279.37464	1162.47278	4924.14521	1962.03531
H3	6.92	291.6	0.06463558	3148.19209	1036.41797	1466.39474	2313.09271
H4	7.42	214	0.06838124	2852.32974	999.930875	1529.30604	1330.47969
I1	7.37	324.2	0.12679531	2251.06832	1048.89676	8048.16992	2093.65096
I2	8.02	206.2	0.07701346	2945.05278	1038.0172	24022.6837	4813.15236
I3	7.76	256.4	0.10735177	3249.28447	1096.07429	10745.339	4504.42622
I4	6.42	381.4	0.0793907	1594.73729	1024.77404	500.374713	926.190279
I5	6.61	254.4	0.10786738	2525.15255	1072.02999	2625.39647	2337.09165
I6	7.89	271.3	0.1811221	3581.74149	1112.71775	144224.956	4256.16609
I7	7.68	235.8	0.09671236	4383.43036	1015.7032	6586.32988	2740.57601
I8	7.18	338.2	0.17237035	3595.99858	1013.34246	12892.5663	3371.45581
I9	7.43	237	0.13297352	2272.60596	1087.83508	3676.93227	2108.56076

I10	6.48	106.9	0.14179827	2489.86561	1004.23199	3892.64181	3066.55329
J1	7.91	572.4	0.09699855	2441.57399	1415.8975	23028.8397	2948.61276
J2	7.43	284.4	0.13194891	1895.65153	1072.93214	12349.9046	2400.21962
J3	7.52	317.8	0.15650881	2468.10809	1084.50939	46664.5585	3123.45334
J4	6.87	312.4	0.13954825	2981.04243	1080.40004	6208.9861	2290.05038
J5	7.41	389.6	0.14544225	2604.86222	1031.50556	6836.93482	1728.28963
J6	7.74	307	0.18203548	2314.04799	1175.66563	45899.842	3543.56723
K1	8.09	205.3	0.05785901	1017.32846	1119.227	14043.772	1946.84192
K2	8.19	190.3	0.08395736	1299.04594	995.824758	7756.16588	1081.1575
K3	7.24	259.4	0.12676295	925.434082	1029.82504	8736.52856	1734.04972
K4	6.57	321.6	0.12317518	1053.02591	1281.69244	3532.7321	1551.78406
K5	7.79	266.8	0.10946775	1539.34412	1067.10185	23914.5146	1636.27806

Table S6. Characteristics of the eleven pairs of microsatellite primers used in this study

Multiplex pool	Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	Optimal annealing temperature	Fluorescent dye
Pool 1	HI-GT16	(AC) ₂₁ (AT) ₈	F : CCGTGATACAAATCTACCCAAA R : CTCCAGTCAGCAATCTCTCAA	54°C	6-FAM
	GT1-K1-4	(TG) ₁₀ C(GT) ₉	F : ACCATGGATATATGTGTAAGATACC R : GCATGATTTAAGGTTGCCTCA	52 °C	HEX
Pool 2	GA4-P11-9	(GA) ₁₈	F : CCTAGTCTCGATGCGTCACA R : CCTCAGGAATCCACCAAAAA	55°C	6-FAM
	GA8-K15-4	(CT) ₁₉	F : AGCAAAGTCTCCACCCCTTT R : CGGGACATTTTCGTCAATTC	55°C	HEX
Pool 3	HI-GA27	(AG) ₂₃	F : ATGCAAACGAATGAGCCTT R : CCATAACCCAATAATCAAACCA	54°C	6-FAM
	HI-ACA3	(CAA) ₁₅	F : CAAGTTGTTGGTTGATTTACAT R : CTCCTTCTGTGTTCCACCAC	52°C	HEX
Pool 4	GA7-I6-16	(GA) ₁₆	F : CACAGCAAGAATCCACCAAA R : TACTTTCACCTCACTTACTTTCTCT	55°C	6-FAM
	HI-AGA35	(CA) ₂ (CT) ₃ T ₂ (CT) ₄ C ₂ (CT) ₁₀	F : ATTATCTCAAACACTCAACCCC R : AGCAGGCTATAAAAAGAAGTGC	55°C	HEX
Pool 5	HI-AGA1	(CTT) ₁₉	F : CTGAGCCTAGATAGCAGGGT R : TATCGTTGTCTGGACGGTTTGT	53°C	6-FAM
	HI-GT14	(TA) ₃ A ₂ (TA) ₃ CATGC(GT) ₁₂	F : GGCATGGCTAACTCTATATGC R : AAATAGAAGTGCCATAACTGA	54°C	HEX
Pool 6	HI-GA36	(CT) ₁₉	F : CGTTTGACCTAAAACATTGACT R : CAATCTTGACCAAGGGGCA	54°C	6-FAM

Table S7. Genetic diversity based on eleven microsatellites in *Humulus lupulus* L. collections sampled in Northern France

Pop	N ¹	H ²	Na ³	Ne ⁴	I ⁵	Hn ⁶	Ho ⁷	He ⁸	UHe ⁹	F ¹⁰
comm	10	9.273	4.909	3.086	1.174	0.607	0.573	0.572	0.603	-0.008
old	3	2.636	2.727	2.364	0.858	0.656	0.682	0.519	0.670	-0.338
Location-A	5	4.273	3.091	2.702	0.917	0.477	0.523	0.530	0.610	0.010
Location-B	5	4.455	3.091	2.400	0.871	0.514	0.532	0.491	0.554	-0.105
Location-C	5	4.727	3.182	2.613	0.927	0.536	0.509	0.527	0.596	0.043
Location-D	4	3.364	2.636	2.296	0.739	0.517	0.492	0.420	0.495	-0.219
Location-E	2	1.909	1.909	1.745	0.512	0.432	0.409	0.330	0.439	-0.238
Location-F	2	1.636	1.636	1.503	0.417	0.444	0.409	0.273	0.394	-0.511
Location-G	2	1.818	1.818	1.758	0.504	0.500	0.500	0.341	0.485	-0.200
Location-H	4	3.636	2.273	1.849	0.609	0.465	0.455	0.369	0.429	-0.183
Location-I	10	9.000	4.182	2.768	0.959	0.493	0.491	0.483	0.511	-0.030
Location-J	6	5.000	3.636	2.720	1.000	0.627	0.650	0.536	0.601	-0.236
Location-K	5	4.273	3.273	2.364	0.889	0.579	0.577	0.490	0.557	-0.138
Total overall	4.846	4.308	2.951	2.320	0.798	0.527	0.523	0.452	0.534	-0.166

¹N: number of isolates; ²H: number of haplotypes per population; ³Na: average number of alleles over all loci; ⁴Ne: effective number of alleles; ⁵I: Shannon's information index; ⁶Hn: Nei's gene diversity averaged over all loci; ⁷Ho: heterozygosity observed; ⁸He: heterozygosity expected; ⁹uHe: unbiased expected heterozygosity over all loci; ¹⁰F: the inbreeding coefficient (Wright, 1965)

Table S8. Population differentiation measured by F_{ST} (below the diagonal) and Φ_{PT} (above the diagonal) among the 13 of hop collections sampled in Northern France.

	comm	old	Loc-A	Loc-B	Loc-C	Loc-D	Loc-E	Loc-F	Loc-G	Loc-H	Loc-I	Loc-J	Loc-K
comm	-	0.015	0.066	0.068	0.130	0.105	0.133	0.180	0.132	0.194	0.132	0.116	0.094
old	0.109	-	0.058	0.065	0.131	0.078	0.153	0.183	0.084	0.162	0.101	0.089	0.116
Loc-A	0.115	0.114	-	0.015	0.071	0.105	0.132	0.086	0.151	0.131	0.084	0.038	0.079
Loc-B	0.089	0.124	0.072	-	0.005	0.028	0.043	0.023	0.058	0.100	0.030	0.032	0.002
Loc-C	0.103	0.142	0.124	0.071	-	0.147	0.079	0.070	0.176	0.117	0.006	0.044	0.055
Loc-D	0.130	0.153	0.124	0.115	0.140	-	0.013	0.090	0.031	0.065	0.060	0.092	0.081
Loc-E	0.138	0.196	0.174	0.138	0.139	0.117	-	0.129	0.159	0.165	0.061	0.087	0.093
Loc-F	0.224	0.285	0.218	0.195	0.202	0.170	0.213	-	0.002	0.121	0.040	0.097	0.082
Loc-G	0.162	0.187	0.190	0.162	0.169	0.115	0.178	0.232	-	0.179	0.091	0.130	0.077
Loc-H	0.142	0.161	0.139	0.134	0.160	0.122	0.126	0.231	0.196	-	0.067	0.155	0.193
Loc-I	0.124	0.136	0.093	0.087	0.095	0.076	0.090	0.150	0.141	0.068	-	0.011	0.040
Loc-J	0.117	0.168	0.107	0.098	0.099	0.093	0.123	0.144	0.156	0.113	0.061	-	0.029
Loc-K	0.115	0.187	0.142	0.080	0.084	0.172	0.159	0.253	0.193	0.190	0.123	0.102	-

Significant values at $p=0.05$, based on 1,000 permutations using GenALEx version 6.501 software, are highlighted in bold.

Figure S9. Hierarchical analysis of molecular variance in hop accessions sampled in Northern France (Hauts-de-France region). Percentage of molecular variance is indicated in grey within collections (pops) and in black among collections.

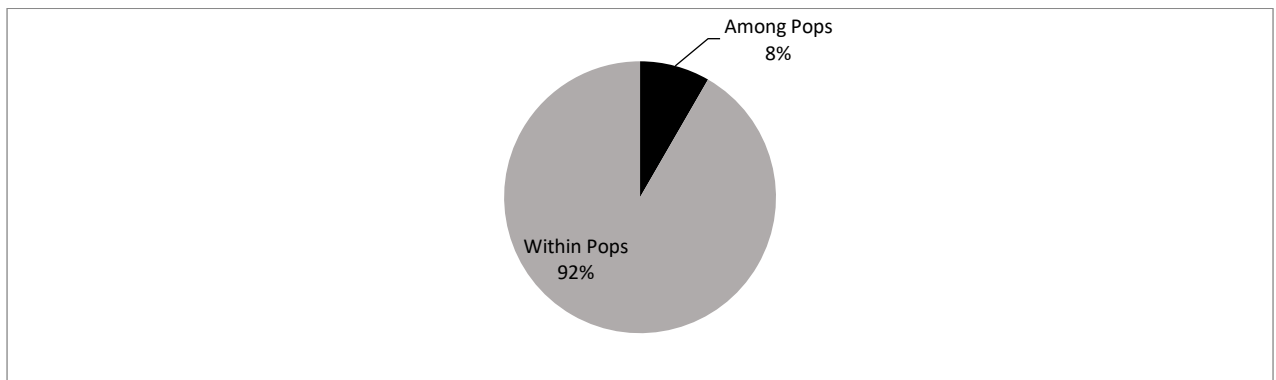


Figure S10. Model probabilities from Bayesian cluster analysis of microsatellites genotypes from 63 accessions with model probabilities, for models for K=1-20, in which K is the number of groups tested

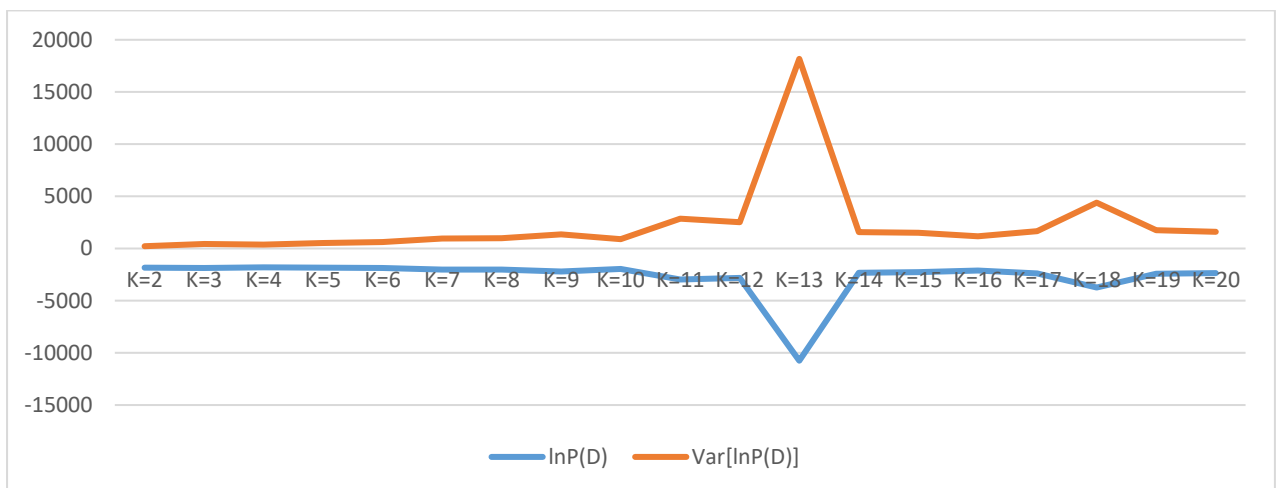


Table S11. Summary of F-statistics calculated with GenAlEx version 6.501.

Genetic structure at eleven microsatellites in *Humulus lupulus* L. subcollections collected in Northern France

Locus	F _{st} ¹	G _{ST} ²	G'' _{ST} ³	D _{EST} ⁴
GA7-I6-16	0.297⁵	0.123	0.420	0.332
GT1-K1-4	0.187	0.051	0.243	0.199
HI-GT 16	0.288	0.185	0.471	0.341
GA8-K15-4	0.320	0.229	0.689	0.588
HI-ACA3	0.191	0.069	0.240	0.179
HI-GA 27	0.291	0.270	0.502	0.302
HI-AGA 35	0.296	0.148	0.212	0.057
HI-GT14	0.284	0.194	0.296	0.110
HI-AGA 1	0.032	0.017	0.038	0.020
HI-AGA7	0.178	0.035	0.192	0.153
HI-GA36	0.176	-0.020	-0.024	-0.002
Total	0.289	0.180	0.282	0.169

¹F_{st}: Wright's index providing a measure of genetic differentiation among populations.

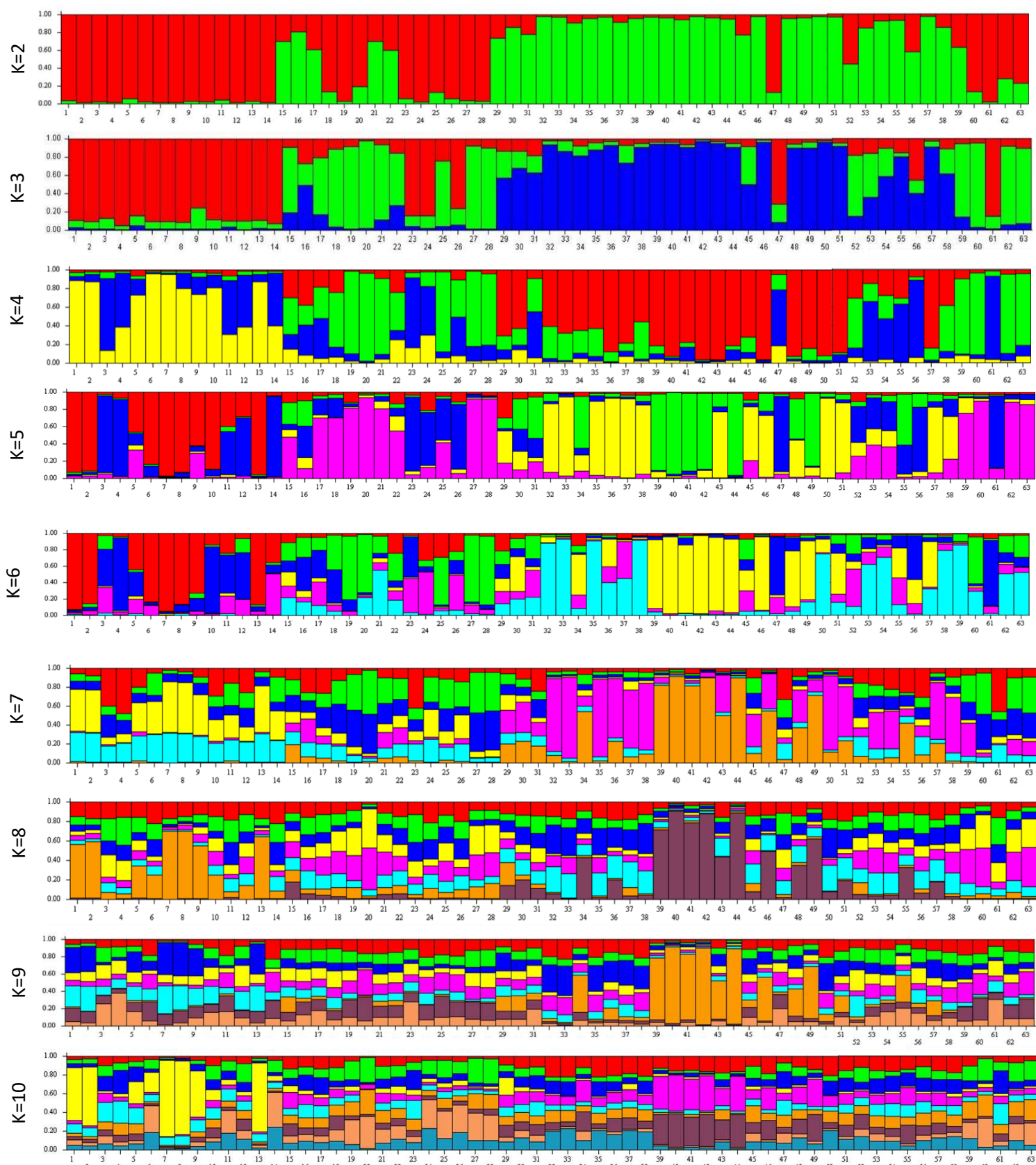
²G_{ST}: Nei's fixation index estimating genetic differentiation among subpopulations.

³G''_{ST}: Hedrick's standardized G_{st}.

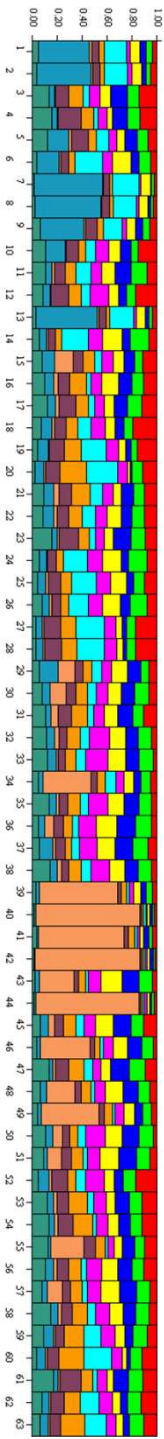
⁴D_{est}: Jost's estimate of differentiation.

⁵Significant values at P= 0.05, based on 1,000 permutations using GenAlEx version 6.501 software, are highlighted in bold.

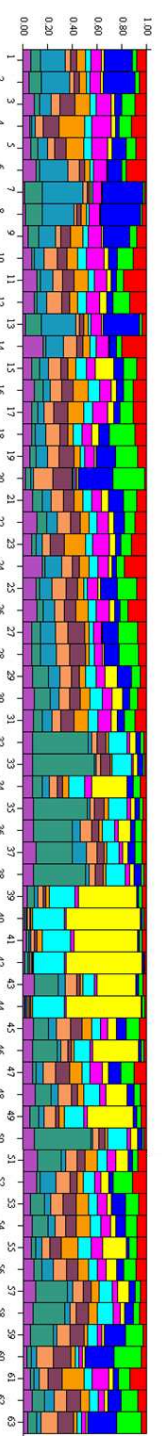
Figure S12. Inferred population structure for K = 2 groups to K = 20, where K is the number of groups tested in each model based on Bayesian cluster analysis of hop chemotypes (63 accessions). Accessions are numerically sequential within each chemotype (see Table 1).



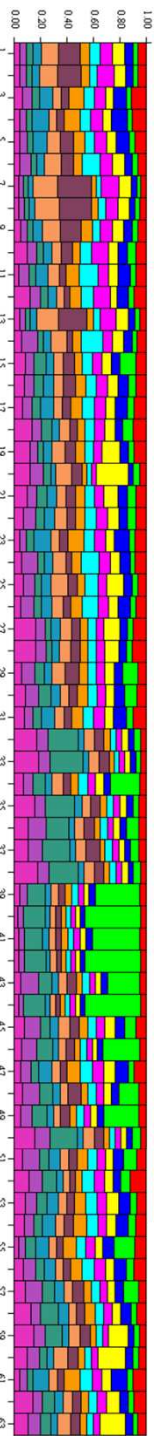
K=11



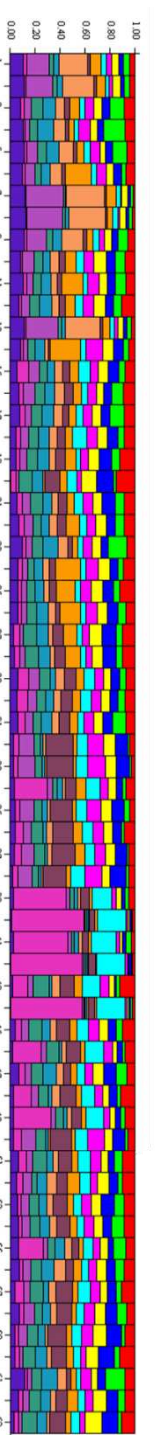
K=12



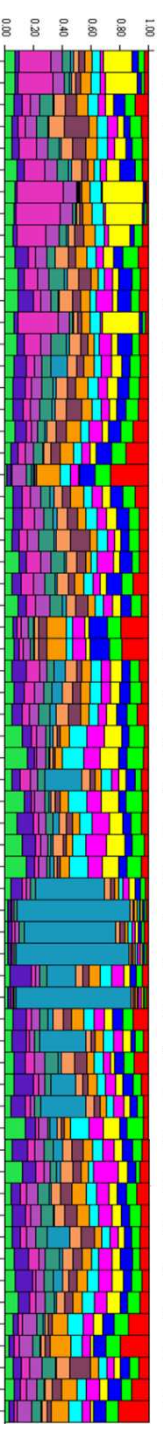
K=13



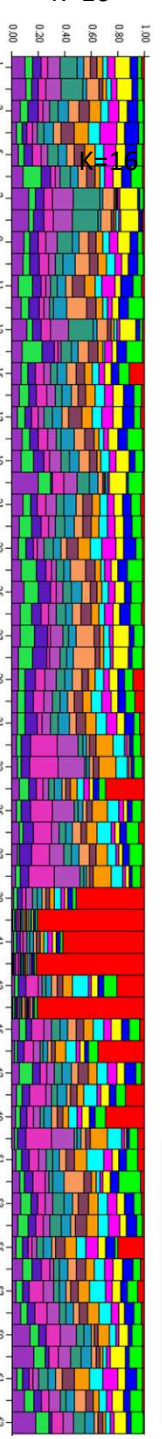
K=14



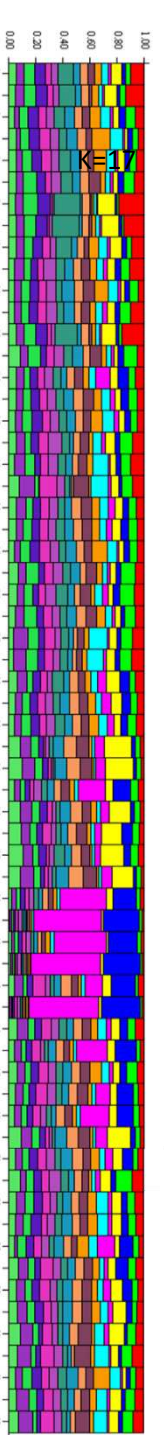
K=15



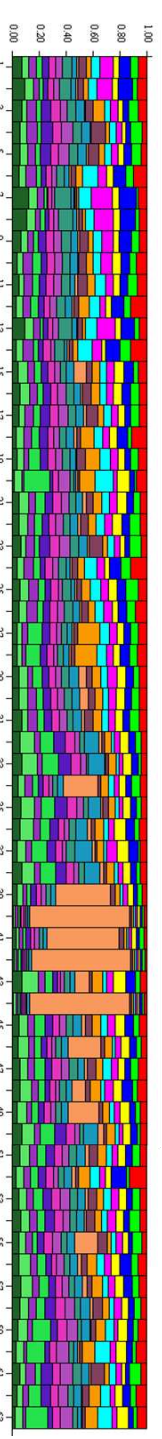
K=16



K=17



K=18



K=19



K=20

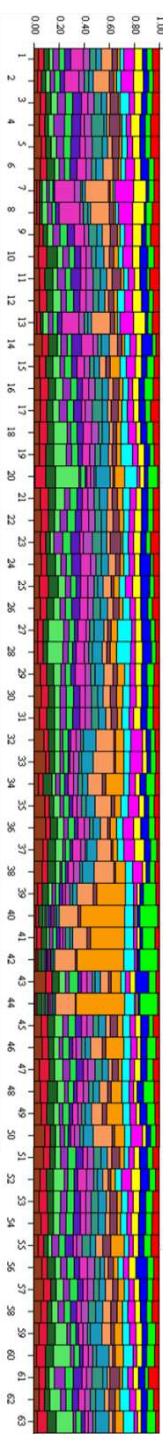


Figure S13. Directional relative migration network among the 14 hop populations (commercial varieties, heirloom varieties and wild hops collected on Locations A to K) sampled in Northern France.

Arrows indicate the direction of gene flow based on Nm as measure performed on divMigrate program. Arrow length, shading, and thickness are determined by the relative strength of gene flow. Numbers show the values of directional migration relative to the highest value (0.76) highlighted in the analysis (from location I to location J).

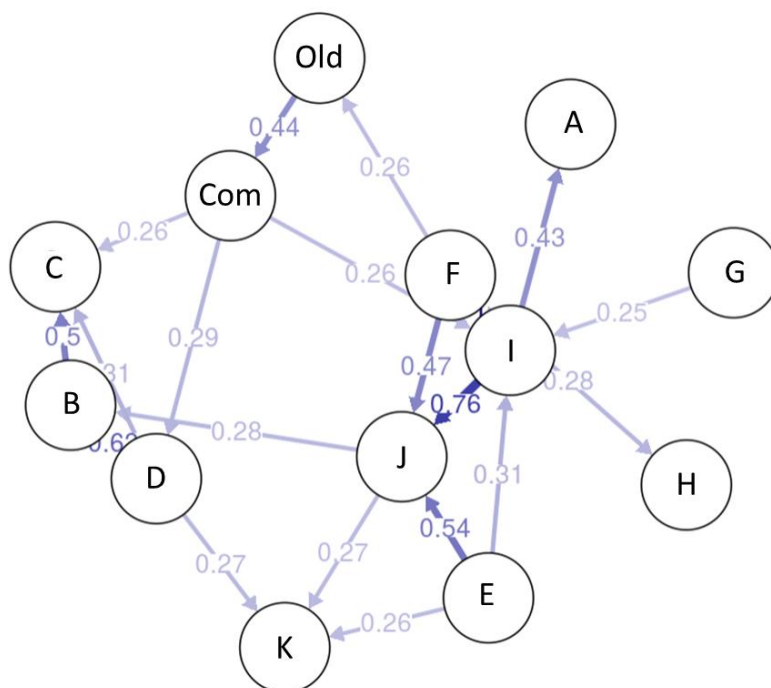


Table S14. Summary of AMOVA significant value results ($p < 0.01$) without a priori assumptions, defined by sample sites.

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%	<i>p</i> -value
Among Pops	12	72.260	6.022	0.237	5%	<0.001
Within Pops	51	248.833	4.879	4.879	95%	
Total	63	321.094		5.116	100%	

df: degrees of freedom; SS: sum of squares; MS: mean of square; Est. Var.: estimated variance; %: percentage of variation.

Table S15. GC-MS results of the putative identification of volatile compounds found in the headspace of hop cones present at least at 1%.

Results are expressed in relative abundance (IN %). For each compound, general information such as its raw formula and its CAS number are indicated. The putative identification is based on the match factor of the identification (%) and the comparison of the retention index calculated with the one of the literature (NIST17). The number of samples containing the compound identified is also indicated, for compounds with less than five occurrences, samples containing them are specified.

	Compounds	Raw formula	CAS number	n samples	Ref Samples	Minimal content	Match factor	RI calculated	RI literature ^a	
MONOTERPENES AND SESQUITERPENES										
1	β -Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	87-44-5	63		23.39%	98%	1420	1420	1,2
2	α -Humulene	C ₁₅ H ₂₄	6753-98-6	63		45.66%	97%	1462	1453	1,2
3	α -Copaene	C ₁₅ H ₂₄	3856-25-5	63		7.14%	93%	1369	1376	1,2
4	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	78-70-6	63		24.16%	91%	1109	1108	1,2
5	γ -Muurolene	C ₁₅ H ₂₄	30021-74-0	63		9.05%	98%	1577	1498	1,2
6	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1139-30-6	50		7.62%	90%	1584	1573	1,2
7	β -Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	123-35-3	50		32.34%	94%	990	989	1,2
8	Aromandendrene	C ₁₅ H ₂₄	489-39-4	44		19.72%	98%	1540	1440	1,2
9	Selina-3,7(11)-diene	C ₁₅ H ₂₄	6813-21-4	38		18.70%	96%	1534	1545	1,2
10	β -Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	88-84-6	38		18.70%	91%	1643	1542	1,2
11	Isoaromadendrene epoxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1000159-36-6	27		3.56%	93%	1764	1807	1,2
12	Alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	25246-27-9	25		10.44%	98%	1540	1459	1,2
13	Humulenol-II	C ₁₅ H ₂₄ O	19888-00-7	25		4.04%	92%	1737	1632	1,2
14	Isolatedene	C ₁₅ H ₂₄	95910-36-4	18		2.02%	93%	1363	1374	1,2
15	Ylangene	C ₁₅ H ₂₄	13833-26-6	17		2.66%	98%	1461	1421	1,2
16	β -Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	88-84-6	17		3.51%	85%	1542	1499	1,2
17	τ -Cadinol acetate	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	149197-48-8	16		1.01%	94%	1620	1640	1,2
18	Humulene epoxide I	C ₁₅ H ₂₄ O	19888-33-6	15		3.15%	96%	1600	1596	1,2
19	β -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	17066-67-0	15		13.84%	97%	1487	1486	1,2
20	Diepicedrene-1-oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1000156-11-0	13		1.87%	92%	1332	1399	1,2
21	α -Muurolene	C ₁₅ H ₂₄	10208-80-7	11		5.26%	90%	1640	1519	1,2
22	β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	195194-80-0	10		1.24%	81.81	971	977	1,2

23	Ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	577-27-5	8		3.92%	88%	1600	1565	1,2
24	10s,11s-Himachala-3(12),4-diene	C ₁₅ H ₂₄	60909-28-6	7		2.88%	94%	1336	1399	1,2
25	Linalyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	115-95-7	6		9.87%	84%	1170	1236	1,2
26	Calarene	C ₁₅ H ₂₄ O	68926-75-0	6		2.69%	97%	1555	1544	1,2
27	cis- β -Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	127-91-3	6		17.88%	93%	1457	1455	1,2
28	Azulene, 1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-(1.alpha.,3a.beta.,4.alpha.,7.beta.)]	C ₁₅ H ₂₄	22567-17-5	5	A4, A5, C5, I3, I7	4.64%	94%	1572	-	1
29	Citronellal	C ₁₀ H ₁₈ O	106-23-0	4	A4, C2, F2, J1	9.94%	88%	1392	1142	1,2
30	Valencene	C ₁₅ H ₂₄	03/07/4630	3	Coigneau, B3, E1	2.11%	96%	1496	1491	1,2
31	cis-Calamenene	C ₁₅ H ₂₂	72937-55-4	3	GBel, Star, Coigneau	5.95%	86%	1526	1522	1,2
32	Valerena-4,7(11)-diene	C ₁₅ H ₂₄	351222-66-7	3	A4, A5, I1	6.69%	97%	1457	1456	1,2
33	Geranyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	105-87-3	2	Challenger, Magnum, A3	8.89%	83%	1392	1383	1,2
34	2-Isopropenyl-4a,8-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphthalene	C ₁₅ H ₂₄	207297-57-2	2	I10, J4	10.25%	98%	1602	1656	1,2
35	Junipene	C ₁₅ H ₂₄	475-20-7	2	GBel, Coigneau	9.37%	95%	1401	1427	1,2
36	β -Panasinsene	C ₁₅ H ₂₄	56684-97-0	2	A2,C3	1.66%	89%	1423	1413	1,2
37	α -Maaliene	C ₁₅ H ₂₄	489-28-1	2	A2, F2	1.21%	87%	1534	1522	1,2
38	β -Bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	489-83-8	2	A2, I8	2.02%	94%	1511	1500	1,2
39	Guaia-3,9-diene	C ₁₅ H ₂₄	17699-14-8	2	B1, J2	1.04%	93%	1436	1492	1,2
40	γ -Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	39029-41-9	2	I8, K4	1.11%	96%	1515	1523	1,2
41	α -Bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	17699-05-7	1	I8	8.05%	97%	1434	1429	1,2
42	Cubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	21284-22-0	1	Challenger	6.59%	82%	1601	1600	1,2
43	Geranyl isovalerate	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	109-20-6	1	H2	4.32%	90%	1690	1613	1,2
44	β -Maaliene	C ₁₅ H ₂₄	495-61-4	1	C4	1.81%	94%	1404	1380	1
45	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-	C ₁₅ H ₂₄	1000062-61-9	1	I3	1.02%	94%	1565	1552	1,2
ALCOHOLS										
46	3-Buten-2-ol, 2-methyl-	C ₅ H ₁₀ O	115-18-4	54		18.17%	88%	629	603	1,2
47	1,2-Cyclopentanediol	C ₅ H ₁₀ O ₂	4065-92-3	31		7.33%	91%	994	976	1,2
48	Dicyclopropyl carbinol	C ₇ H ₁₂ O	14300-33-5	15		7.25%	85%	776	648	1,2
49	Butenol methyl	C ₅ H ₁₀ O	556-82-1	8		15.06%	92%	703	776	1,2

50	2-Nonen-1-ol, 2-methyl-	C ₁₀ H ₂₀ O	91008-40-1	4	D4, I2, I10, J2	3.27%	82%	1095	1105	1,2
51	3,5-Octadien-2-ol	C ₈ H ₁₄ O	69668-82-2	3	B5, I8, K1	6.91%	83%	1167	1038	1,2
52	3-penten-2-ol	C ₅ H ₁₀ O	3899-34-1	3	C4, F2, K3	2.80%	84%	792	774	1,2
53	Prenol	C ₅ H ₁₀ O	556-82-1	2	A2, K3	8.41%	83%	777	753	1,2
54	1,7-Octadien-3-ol	C ₈ H ₁₄ O	30385-19-4	2	B5, J1	6.91%	84%	1090	1095	1,2
55	2-Methylenecyclohexanol	C ₇ H ₁₂ O	4065-80-9	2	H2, J2	1.00%	86%	1162	1186	1
56	Non-2-en-1-ol	C ₉ H ₁₈ O	22194-79-6	1	H2	1.70%	82%	1115	1105	1,2
ALDEHYDES										
57	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	66-25-1	25		16.44%	96%	698	769	1,2
58	2-Pentenal	C ₅ H ₈ O	1576-87-0	21		5.11%	83%	778	725	1,2
59	2-Isopropenyl-5-methylhex-4-enal	C ₁₀ H ₁₆ O	75697-98-2	20		5.04%	86%	1193	1106	1,2
60	Oxirane, octyl-	C ₁₀ H ₂₀ O	2404-44-6	9		4.48%	84%	1110	1230	1,2
61	2-Propenal, 2-methyl-	C ₄ H ₆ O	78-85-3	6		5.25%	89%	552	552	1,2
62	2-Octenal	C ₈ H ₁₄ O	2548-87-0	6		5.53%	94%	1096	1061	1,2
63	Undecanal, 2-methyl-	C ₁₂ H ₂₄ O	110-41-8	4	A1, B2, B5, H4	4.01%	88%	1295	1350	1,2
64	10-Undecen-1-al, 2-methyl-	C ₁₂ H ₂₂ O	1000151-82-1	4	A1, B2, B3, G1	2.64%	83%	1702	1664	1,2
65	4-pentenal, 2-ethyl	C ₇ H ₁₂ O	5204-80-8	4	D1, I1, I8, J2	2.61%	95%	879	1034	1,2
66	4,4-Dimethylpent-2-enal	C ₇ H ₁₂ O	1000195-01-6	2	C4, I1	2.20%	90%	1080	829	1,2
67	2-Butenal, 3-methyl-	C ₅ H ₈ O	107-86-8	2	A2, B1	2.00%	92%	895	755	1,2
CARBOXYLIC ACIDS										
68	Butanoic acid, 3-methyl-	C ₆ H ₁₂ O ₂	556-24-1	31		19.67%	86%	805	867	1,2
69	Propanoic acid, 2-methyl-, 2-methylbutyl ester	C ₉ H ₁₈ O ₂	2445-69-4	23		9.08%	96%	1118	1014	1,2
70	Hexanoic acid, 4-methylene-, methyl ester	C ₈ H ₁₄ O	73805-48-8	22		6.91%	81%	1332	1345	1,2
71	Hexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	142-62-1	14		9.36%	96%	1038	971	1,2
72	iso-Valeric acid	C ₅ H ₁₀ O ₂	503-74-2	12		15.72%	94%	1709	1558	1,2
73	Hexanoic acid, 2-methyl-	C ₇ H ₁₄ O ₂	142-62-1	11		2.67%	95%	1029	1757	1
74	Pentanoic acid, 3-methyl-	C ₆ H ₁₂ O ₂	105-43-1	7		2.12%	85%	1008	947	1,2
75	Hexanoic acid, pentyl ester	C ₁₁ H ₂₂ O	540-07-8	5	I1, J1, J2, J6, K4	2.75%	84%	1286	1279	1,2
76	2-Dodecenoic acid	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	4412-16-2	4	Golding, Cascade, I7, J1	2.88%	83%	1409	1392	1,2

77	Caproic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	142-62-1	4	Strisselspalt, Golding, Cascade, NBrewer	1.80%	95%	993	1085	1,2
78	Octanoic acid, 7-oxo-	C ₈ H ₁₄ O ₃	14112-98-2	4	BGold, Magnum, J2, J5	1.63%	83%	1364	-	1
79	3-Decenoic acid	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	53678-20-9	4	Cascade, Star, 2J, J3	1.13%	86%	1353	1366	1,2
80	Butanoic acid, 3-methylbut-2-enyl ester	C ₉ H ₁₆ O ₂	1000299-11-8	3	Coigneau, D2, I3	1.28%	83%	1158	-	1
81	3-Heptenoic acid	C ₇ H ₁₂ O ₂	29901-85-7	2	K3, K4	1.18%	82%	1162	1110	1,2
82	Succinic acid, tridec-2-yn-1-yl tetrahydrofurfuryl ester	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	1000390-72-9	1	I1	2.71%	81%	3062	3011	1,2
83	cis-Verbenol, 2-methylpropionate	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	1000462-96-7	1	Coigneau	1.66%	82%	1127	1188	1,2
84	2-Heptenoic acid, methyl ester	C ₈ H ₁₄ O ₂	38693-91-3	1	D1	1.26%	81%	1031	1021	1,2
KETONES										
85	2-Undecanone	C ₁₁ H ₂₂ O	112-12-9	63		15.27%	95%	1294	1293	1,2
86	(Z)-Undec-6-en-2-one	C ₁₁ H ₂₀ O	107853-70-3	31		4.07%	88%	1181	1236	1,2
87	Methyl isobutyl ketone	C ₆ H ₁₂ O	108-10-1	28		8.55%	92%	832	733	1,2
88	4-Decenoic acid, methyl ester	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	93979-14-7	22		4.85%	92%	1603	1611	1,2
89	2-Nonanone	C ₉ H ₁₈ O	821-55-6	17		22.29%	88%	1098	1092	1,2
90	2-Decanone	C ₁₀ H ₂₀ O	693-54-9	17		3.75%	92%	1198	1176	1,2
91	2(5H)-Furanone, 5,5-dimethyl-	C ₆ H ₈ O ₂	20019-64-1	14		8.22%	87%	1063	946	1,2
92	6-Dodecanone	C ₁₂ H ₁₈ O	6064-27-3	9		4.43%	97%	1482	1353	1,2
93	2-Dodecanone	C ₁₂ H ₂₄ O	6175-49-1	7		4.44%	82%	1482	1377	1,2
94	2-Pentanone	C ₅ H ₁₀ O	107-87-9	6		1.91%	83%	393	383	1,2
95	2-Pentanone, 4-methyl-	C ₆ H ₁₂ O	108-10-1	6		1.66%	92%	824	836	1,2
96	Octan-2-one, 3,6-dimethyl-	C ₁₀ H ₂₀ O	15869-94-0	4	J3, J5, K1, K2	1.11%	84%	1201	1023	1,2
97	Methyl 4-methylhexa-2-enoate	C ₈ H ₁₄ O ₂	2445-71-8	3	B3, F1, H2	4.28%	84%	1056	1106	1,2
98	Isobutyl isopentanoic acid ester	C ₉ H ₁₈ O ₂	5393-81-7	1	H2	5.56%	97%	1117	1044	1,2
99	Nonadecane	C ₁₉ H ₄₀	629-92-5	1	A2	3.19%	95%	1701	1900	1,2
100	Valeric acid, 3-methylbut-2-enyl ester	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	80039-51-6	1	Coigneau	2.59%	90%	1252	1195	1,2
101	5-Octen-2-one, 6-ethyl-	C ₁₀ H ₁₈ O	51298-28-3	1	A2	1.26%	82%	1298	-	1

^a Retention Index using a HP-5 MS capillary column.

¹ Identification of compounds according to the retention index calculated and compared of retention index published online library (<https://webbook.nist.gov/chemistry/cas-ser.html>). Retentions index are calculated using the following formula:

I_k , Kovats retention index

$$I_k = 100 \times \left(n + \frac{t_r(x) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right),$$

with n : the number of carbon atoms in the alkane; $t_r(x)$: retention time of aimed component; $t_r(n)$ and $t_r(n+1)$: the retention time of alkane with 'n+1' and 'n' carbon atoms
² Identification of the compounds by comparison of the mass spectrum with the NIST database.

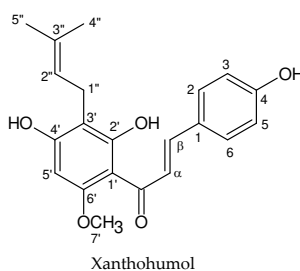
"n samples" indicates the number of samples containing the compound identified. For those identified less than five times, samples in which they are present are indicated in the column "Ref samples". For each compound, the minimal area is indicated in the column "Minimal content".

Identification of samples refers to Table 1. BGold: Brewers Gold; NBrewer: Northern Brewer; GBel: Groene Bel

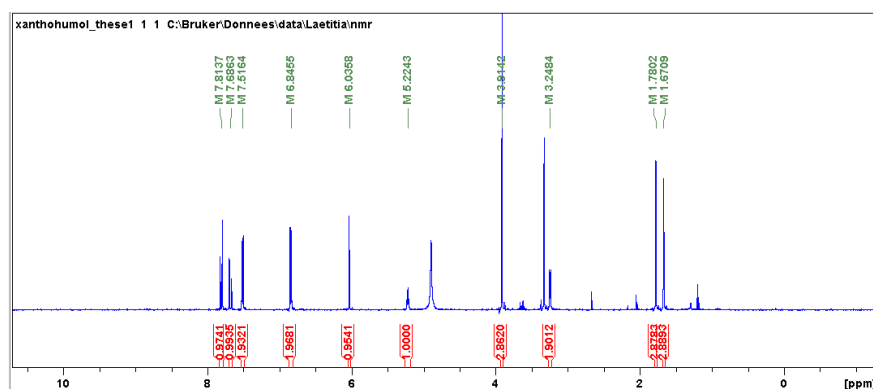
³ Some other volatile compounds have been identified in some samples but are not produced by hop. For example, cyclotetrasiloxane and cyclopentasiloxane derivatives used as surfactants in pesticides, as well as personal care & cosmetics products, were identified in some commercial varieties and wild hops. Similarly, 2-piperidinone, N-[4-bromo-n-butyl]-, derived from an aquatic organism, was identified in cones of wild hops (D1, D2, K5). Its presence in hop cones growing at seaside sites could indicate some kind of windborne contamination by red algae or fungal biomass. Methacrolein, identified in cigarette smoke, was also detected in some samples.

Figure S15. NMR data of xanthohumol, cohumulone, humulone, colupulone, lupulone (purified in the laboratory)

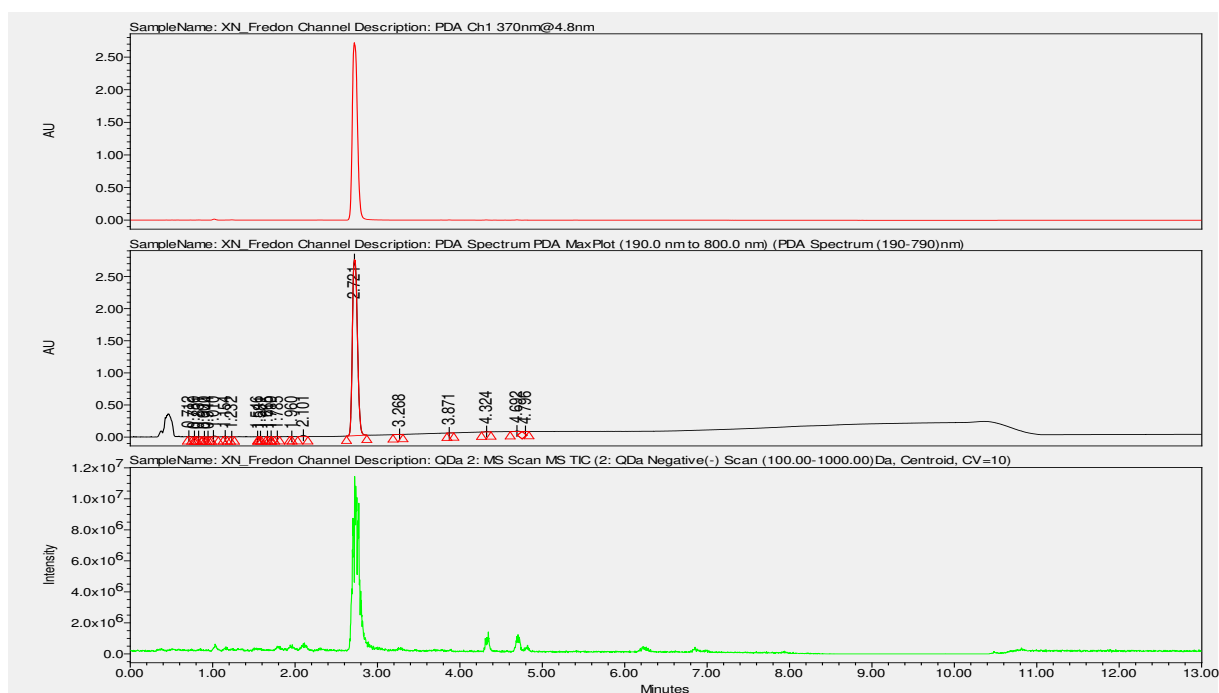
NMR data of xanthohumol (C₂₁H₂₂O₅)



¹H-NMR spectrum (500 MHz, MeOD): δ (ppm) 7.81 (CH, *d*, *J* = 15.4 Hz, H-α), 7.69 (CH, *d*, *J* = 15.4 Hz, H-β), 7.52 (CH, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-2 and H-6), 6.84 (CH, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-3 and H-5), 6.03 (CH, *s*, H-5'), 5.22 (CH, *t*, *J* = 7.3 Hz, H-2''), 3.91 (OCH₃, *s*), 3.25 (CH₂, *d*, *J* = 7.3 Hz, H-1''), 1.78 (CH₃, *s*, H-5''), 1.67 (CH₃, *s*, H-4'') and ¹³C-NMR spectrum (125 MHz, MeOD): 192.5 (C=O), 162.2 (C-4'), 161.3 (C-2'), 160.3 (C-6'), 159.5 (C-4), 142 (C-β), 129.9 (C-3''), 129.9 (C-2), 129.9 (C-6), 127 (C-1), 124 (C-α), 122.8 (C-2''), 114.8 (C-3), 114.8 (C-5), 107.9 (C-3'), 104.2 (C-1'), 89.3 (C-5'), 54.4 (OCH₃), 24.3 (C-4''), 20.5 (C-1''), 16.1 (C-5'')

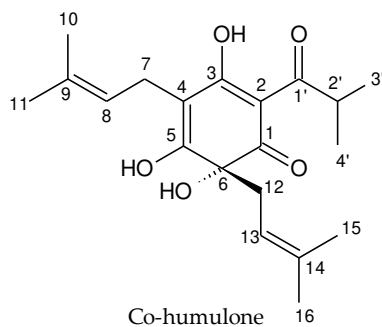


¹H-NMR spectrum of xanthohumol in MeOD (probe TXI)



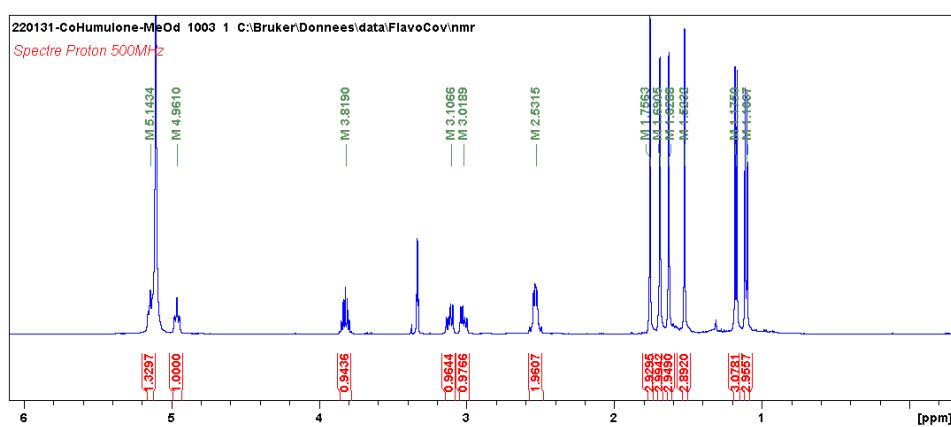
Chromatograms of xanthohumol at 370 nm and with PDA MaxPlot, as well as Total Ion Chromatogram (TIC) in negative mode (degree of purity = 98.02%)

NMR data of co-humulone (C₂₀H₂₈O₅)

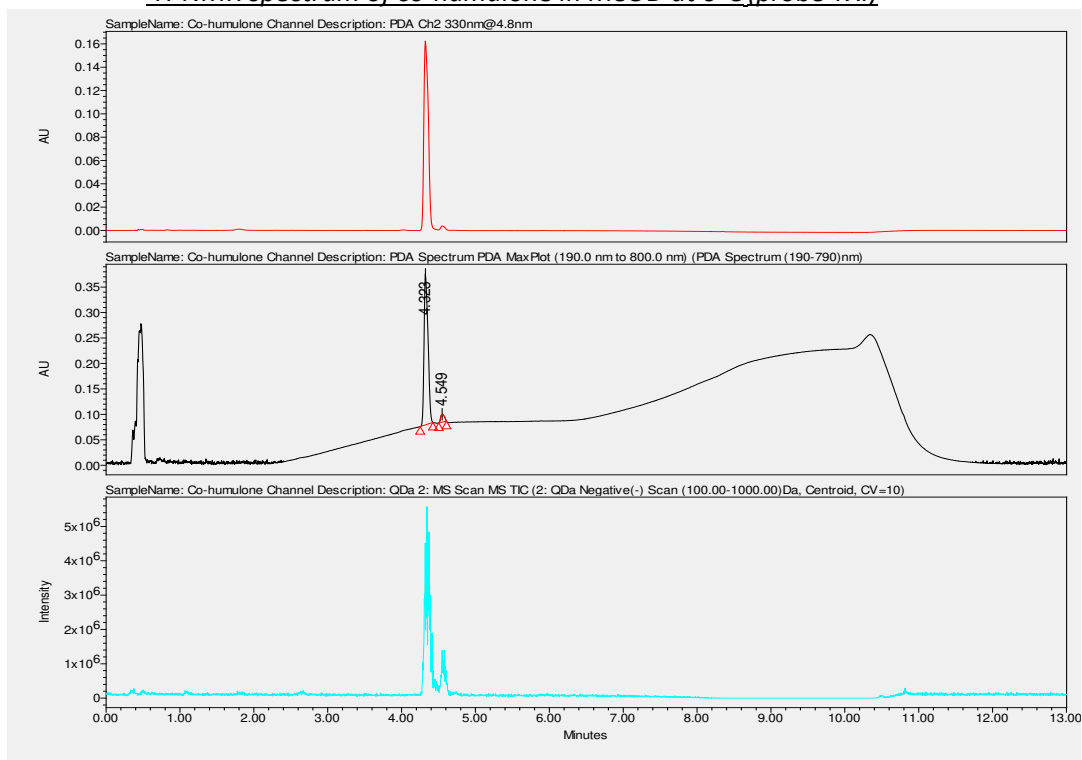


¹H-NMR spectrum (500 MHz, MeOD): 5.14 (CH, *t*, *J* = 7.2, 7.2 Hz, H-8), 4.96 (CH, *t*, *J* = 7.9, 7.9 Hz, H-13), 3.82 (CH, *m*, H-2'), 3.10 (CH_{2a}, *m*, H-7a), 3.02 (CH_{2b}, *m*, H-7b), 2.53 (CH₂, *m*, H-12), 1.76 (CH, *m*, H-11), 1.69 (CH₃, *s*, H-10), 1.63 (CH₃, *s*, H-14), 1.52 (CH₃, *s*, H-15), 1.17 (CH₃, *s*, H-3'), 1.10 (CH₃, *s*, H-4')

and ¹³C-NMR spectrum (125 MHz, CDCl₃): 204.9 (C-1'), 196.0 (C-1), 190.1 (C-3), 171.9 (C-5), 136.1 (C-14), 130.9 (C-9), 121.8 (C-8), 116.3 (C-13), 108.3 (C-4), 104.8 (C-2), 78.3 (C-6), 40.9 (C-12), 34.7 (C-2'), 24.8 (C-11), 24.7 (C-15), 20.5 (C-7), 18.6 (C-3'), 17.5 (C-4'), 16.5 (C-10), 16.5 (C-16)

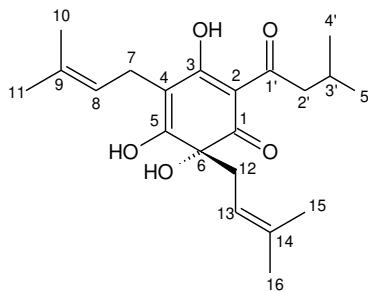


¹H-NMR spectrum of co-humulone in MeOD at 0°C (probe TXI)



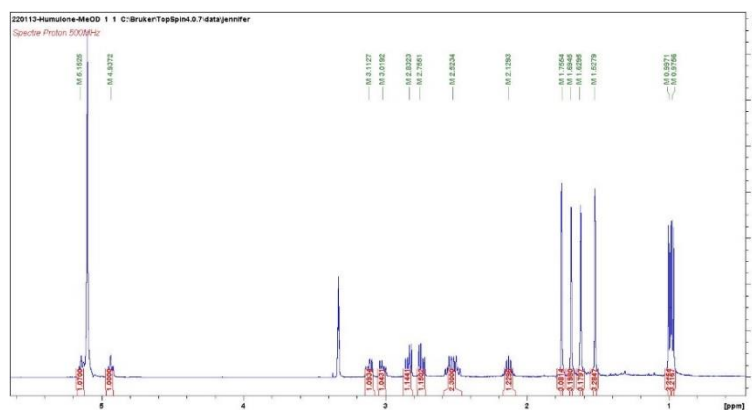
Chromatograms of co-humulone at 370 nm and with PDA MaxPlot, as well as Total Ion Chromatogram (TIC) in negative mode (degree of purity = 95.3 %)

NMR data of humulone (C₂₁H₃₀O₅)

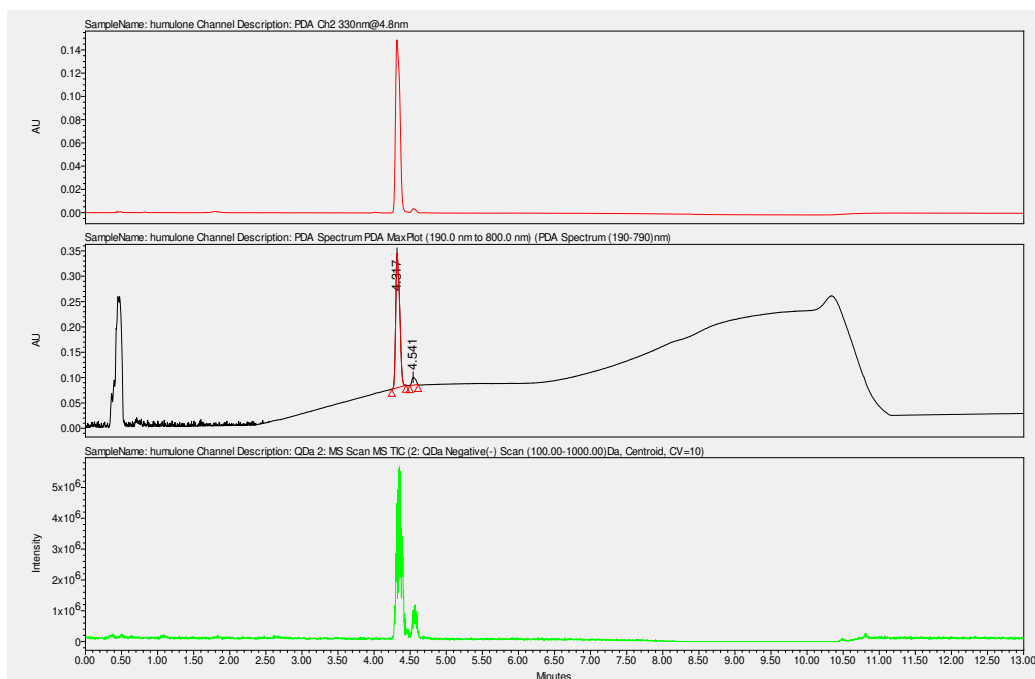


Humulone

¹H-NMR spectrum (500 MHz, MeOD at 0°C): δ 5.15 (CH, t, J = 7.3, 7.3 Hz, H-8), 4.94 (CH, t, J = 7.9, 7.9 Hz, H-13), 3.11 (CH_{2a}, m, H-7a), 3.02 (CH_{2b}, m, H-7b), 2.52 (CH₂, m, H-2'), 2.83 (CH_{2a}, m, H-12a), 2.75 (CH_{2b}, m, H-12b), 2.13 (CH, m, H-3'), 1.75 (CH₃, s, H-10), 1.69 (CH₃, s, H-11), 1.63 (CH₃, s, H-16), 1.53 (CH₃, s, H-15), 0.99 (CH₃, s, H-4'), 0.97 (CH₃, s, H-5') and ¹³C-NMR spectrum (125 MHz, CDCl₃): 200.0 (C-1'), 196.1 (C-1), 190.0 (C-3), 171.7 (C-5), 136.1 (C-14), 130.9 (C-9), 121.8 (C-8), 116.2 (C-13), 108.5 (C-4), 106.2 (C-2), 78.1 (C-6), 47.2 (C-2'), 40.8 (C-12), 25.9 (C-3'), 24.8 (C-11), 24.7 (C-15), 21.8 (C-4'), 21.7 (C-5'), 20.5 (C-7), 16.5 (C-10), 16.5 (C-16)

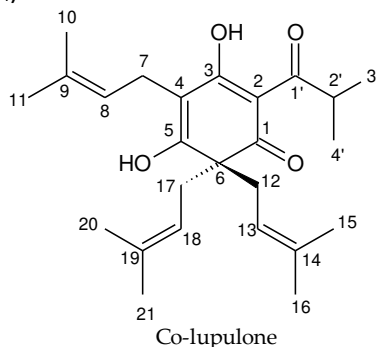


¹H-NMR spectrum of humulone in MeOD at 0°C (sonde TXI)

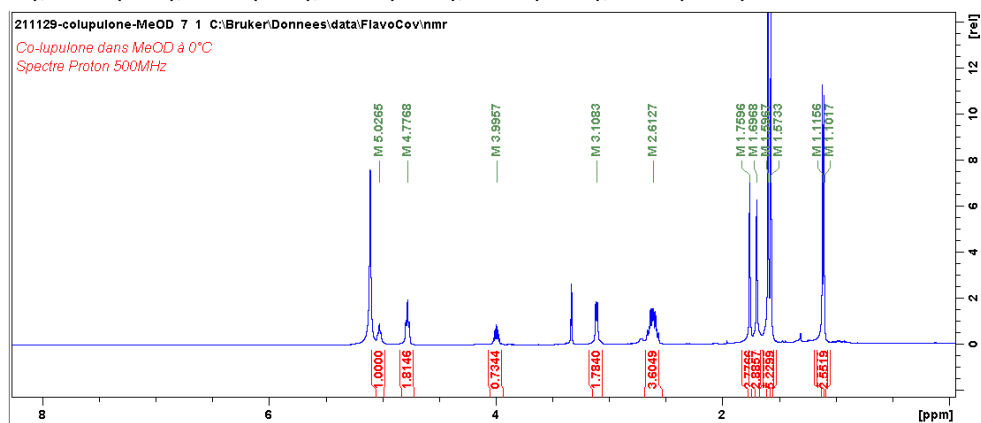


Chromatograms of humulone at 370 nm and with PDA MaxPlot, as well as Total Ion Chromatogram (TIC) in negative mode (degree of purity = 95 %)

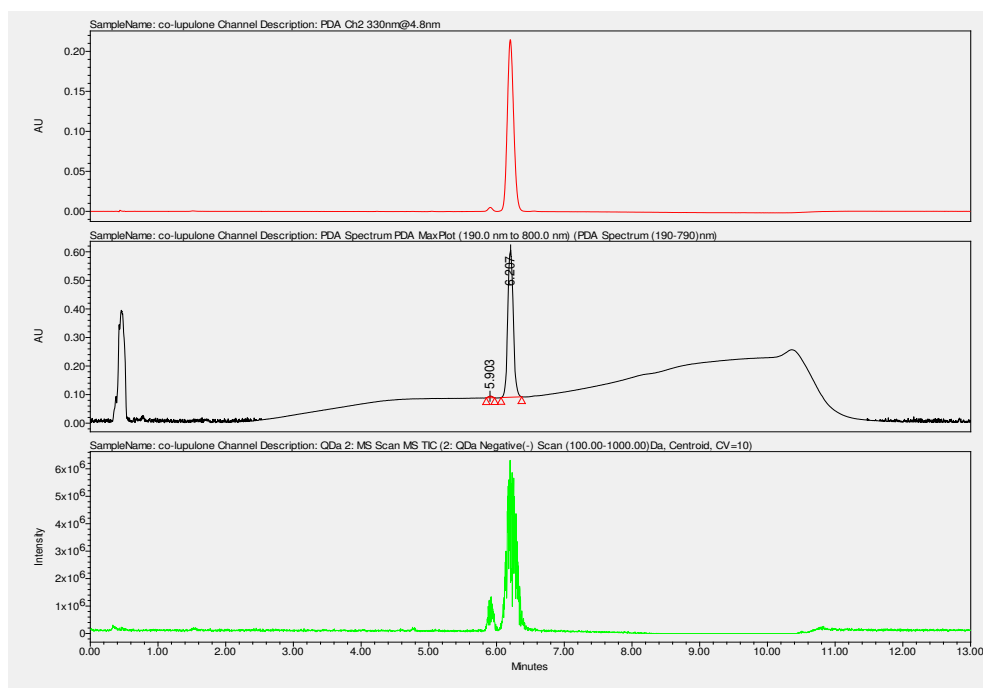
NMR data of co-lupulone (C₂₅H₃₆O₄)



¹H-NMR spectrum (500 MHz, MeOD at 0°C): δ 5.03 (CH, t, J = 6.9, 6.9 Hz, H-8), 4.77 (CH, t, J = 7.4, 6.9 Hz, H-13 et H-18), 3.99 (CH₂, m, H-2'), 3.11 (CH₂, d, J = 6.9 Hz, H-7), 2.61 (CH₂, m, H-12 et H-17), 1.70 (CH₃, s, H-10), 1.69 (CH₃, s, H-11), 1.60 (CH₃, s, H-21 et H-16), 1.57 (CH₃, s, H-20 et H-15), 1.11 (CH₃, s, H-5'), 1.10 (CH₃, s, H-4') and ¹³C-NMR spectrum (125 MHz, CDCl₃): 207.6 (C-1'), 196.6 (C-1), 189.6 (C-3), 173.4 (C-5), 134.3 (C-9), 131.1 (C-14), 131.1 (C-19), 121.9 (C-8), 117.8 (C-13), 117.8 (C-18), 110.7 (C-4), 106.6 (C-2), 57.6 (C-6), 37.5 (C-17), 37.5 (C-12), 35.9 (C-2'), 24.7 (C-20), 24.7 (C-15), 24.7 (C-11), 20.2 (C-7), 17.8 (C-3'), 17.8 (C-4'), 17.8 (C-10), 16.7 (C-21), 16.6 (C-16)

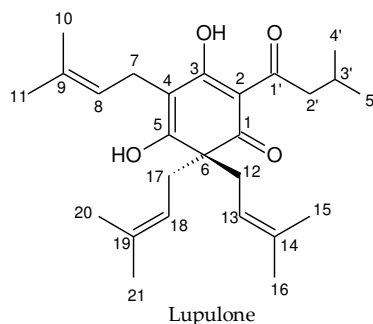


¹H-NMR spectrum of co-lupulone in MeOD at 0°C (sonde TXI)

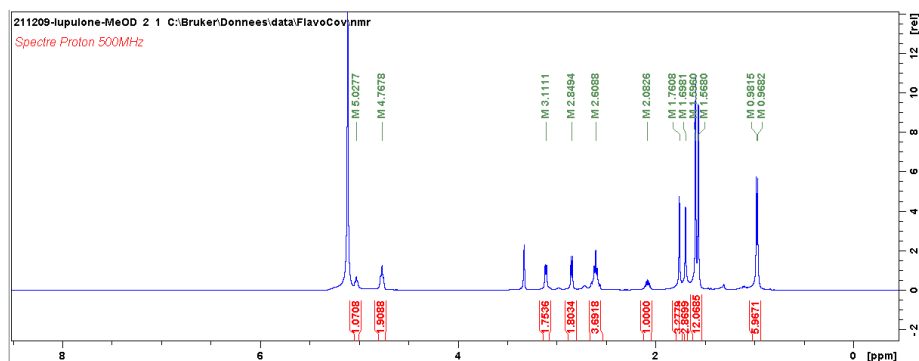


Chromatograms of co-lupulone at 330 nm and with PDA MaxPlot, as well as Total Ion Chromatogram (TIC) in negative mode (degree of purity = 99.2%)

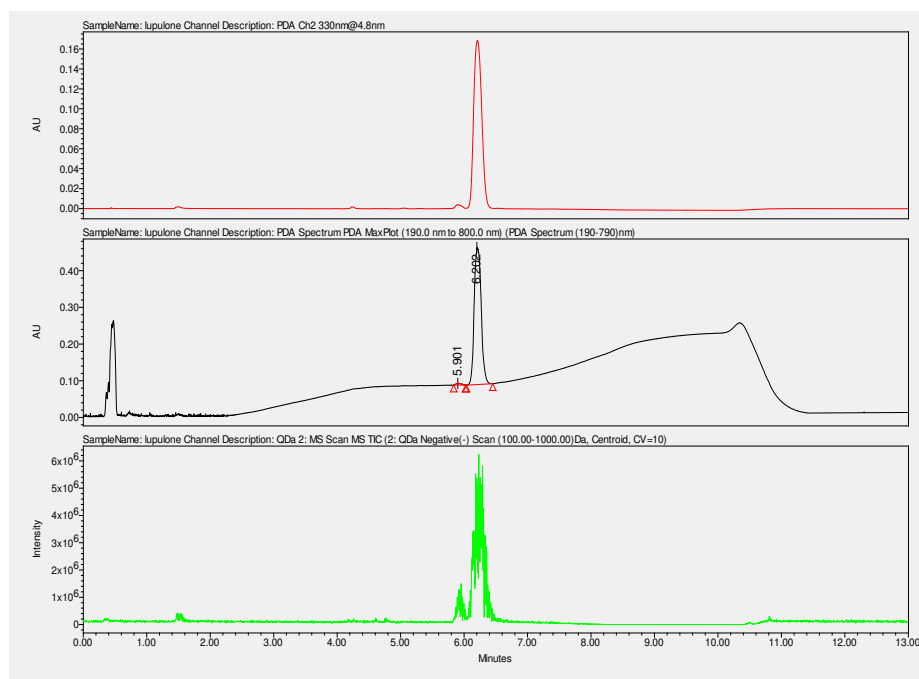
NMR data of lupulone (C₂₆H₃₈O₄)



¹H-NMR spectrum (500 MHz, MeOD at 0°C): δ (ppm) 5.02 (CH, t, J = 6.9, 6.9 Hz, H-8), 4.77 (CH, t, J = 7.4, 6.9 Hz, H-13 et H-18), 3.11 (CH₂, d, J = 6.9 Hz, H-7), 2.85 (CH₂, d, J = 6.9 Hz, H-2'), 2.61 (CH₂, m, H-12 et H-17), 2.08 (CH, m, H-3'), 1.76 (CH₃, s, H-10), 1.70 (CH₃, s, H-11), 1.60 (CH₃, s, H-21 et H-16), 1.57 (CH₃, s, H-20 et H-15), 0.98 (CH₃, s, H-5'), 0.97 (CH₃, s, H-4') and ¹³C-NMR spectrum (125 MHz, CDCl₃): 202.7 (C-1'), 196.9 (C-1), 189.4 (C-3), 173.7 (C-5), 134.3 (C-9), 131.1 (C-14), 131.1 (C-19), 121.9 (C-8), 117.8 (C-13), 117.8 (C-18), 110.8 (C-4), 107.7 (C-2), 57.4 (C-6), 48.9 (C-2'), 37.4 (C-17), 37.4 (C-12), 25.7 (C-3'), 24.7 (C-20), 24.7 (C-15), 24.7 (C-11), 21.8 (C-5'), 21.8 (C-4'), 20.2 (C-7), 16.7 (C-10), 16.6 (C-21), 16.6 (C-16)



¹H-NMR spectrum of lupulone in MeOD at 0°C (sonde TXI)



Chromatograms of lupulone at 330 nm and with PDA MaxPlot, as well as Total Ion Chromatogram (TIC) in negative mode (degree of purity = 99%)

Table S16. Data of the quantitation of the total α - and β - acids in the 10 commercial varieties, the 3 heirloom varieties and the 50 wild accessions (Locations A to K), expressed in g/100G DW %, quantified by UHPLC-UV.

	Total α-acids	Total β-acids
Nugget	9,52%	2,55%
Strisselspalt	3,18%	3,80%
Golding	4,50%	2,97%
Challenger	4,35%	3,65%
Brewers Gold	5,14%	2,72%
Cascade	2,31%	2,86%
Magnum	7,62%	3,69%
Northern Brewer	9,03%	3,12%
Target	7,11%	2,83%
Fuggle	3,80%	2,06%
Groene Bel	1,30%	2,00%
Star	3,07%	2,16%
Coigneau	2,52%	1,95%
A1	3,41%	2,43%
A2	1,80%	4,27%
A3	1,94%	2,29%
A4	3,43%	3,12%
A5	2,46%	3,37%
B1	0,53%	2,26%
B2	1,89%	1,60%
B3	2,98%	2,21%
B4	2,99%	2,92%
B5	0,35%	0,39%
C1	0,86%	1,94%
C2	1,93%	2,19%
C3	2,51%	2,56%
C4	1,04%	2,11%
C5	4,83%	2,16%
D1	0,53%	1,42%
D2	0,58%	1,14%
D3	5,02%	1,69%
D4	2,05%	4,92%
E1	0,81%	1,12%
E2	3,31%	3,59%
F1	3,48%	4,66%
F2	1,54%	3,94%
G1	1,73%	2,57%
G2	6,22%	2,17%

H1	3,13%	3,46%
H2	1,89%	2,03%
H3	3,97%	4,45%
H4	1,78%	2,02%
I1	2,08%	1,38%
I2	3,56%	2,11%
I3	3,95%	1,25%
I4	0,68%	3,09%
I5	1,86%	1,28%
I6	3,20%	2,01%
I7	4,90%	3,95%
I8	2,83%	2,47%
I9	4,80%	2,56%
I10	2,75%	2,45%
J1	0,86%	0,68%
J2	0,44%	0,40%
J3	3,96%	2,28%
J4	3,08%	2,14%
J5	2,49%	1,31%
J6	1,33%	1,55%
K1	1,35%	1,79%
K2	1,76%	3,02%
K3	0,55%	2,32%
K4	0,36%	1,89%
K5	2,42%	3,23%

Table S17. Lg coefficients (in grey) and RV coefficients of the MFA

	Soil analysis	Genetics	Volatile compounds	Quantification	Non targeted metabolomics	MFA
Soil analysis	1.4501	0.2340	0.4140	0.0636	0.2403	1.039
Genetics	0.135	2.085	0.993	0.216	0.289	1.652
Volatile compounds	0.156	0.311	4.877	0.430	0.659	3.191
Quantification	0.047	0.132	0.172	1.281	0.529	1.090
Non targeted metabolomics	0.163	0.164	0.244	0.382	1.493	1.389
MFA	0.454	0.507	0.598	0.601	0.76	

Table S18. Linearity and sensitivity of the quantification method of xanthohumol, *co*- and *n*-humulone, and *co*- and *n*-lupulone using UPLC-UV

	Number of points	Linearity range	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Maximum deviation (%)	Equation	R ²
Xanthohumol (370 nm)	6	2.5 ng/mL - 100 µg/mL	25	100	19.637 (LOQ)	$y = 37\,200x + 260$	0.9997
Co-humulone (330 nm)	6	25 ng/mL - 100 µg/mL	50	250	5.958 (LOQ)	$y = 6\,540x + 162$	0.9996
Humulone (330 nm)	6	25 ng/mL - 100 µg/mL	50	250	-13.724 (LOQ)	$y = 5\,880x + 151$	0.9993
Co-lupulone (330 nm)	6	25 ng/mL - 100 µg/mL	50	250	11.209 (LOQ)	$y = 9\,660x + 160$	0.9994
Lupulone (330 nm)	6	25 ng/mL - 100 µg/mL	50	250	-6.667 (LOQ)	$y = 9\,090x + 138$	0.9994

Table S19. Morphological features of wild hop accessions

	Stem: color	Leaves: number of lobes	Cones : size	Cones: shape	Cones : colour	Stipules orientation	Bracts : length	Opening of bracts	Productivity
A1	Red	Three-lobed	Small	Long oval	Light green	Down	Intermediate	Slight	Low
A2	Red	Three-lobed	Medium	Globular	Light green	Top	Short	Slight	Low
A3	Green	Three-lobed	Medium	Globular	Light green	Down	Intermediate	Strong	Moderate
A4	Green	Three-lobed	Large	Long oval	Light green	Down	Short	Slight	Low
A5	Green	Single-lobed	Large	Globular	Light green	Top	Short	Closed	High
B1	Red	Three-lobed	Small	Medium oval	Light green	Down	Intermediate	Closed	Low
B2	Green	Three-lobed	Small	Globular	Light green	Down	Short	Strong	Low
B3	Red	Single-lobed	Medium	Medium oval	Light green	Top	Short	Closed	Moderate
B4	Green	Three-lobed	Small	Globular	Light green	Top	Short	Strong	Low
B5	Red	Single-lobed	Medium	Medium oval	Light green	Down	Intermediate	Slight	Low
C1	Green	Three-lobed	Large	Elongate	Light green	Top	Intermediate	Intermediate	Moderate
C2	Green	Three-lobed	Small	Circle	Light green	Top	Short	Intermediate	Low
C4	Green	Three-lobed /5	Large	Allongé	Light green	Top	Intermediate	Strong	Low
C3	Red	Three-lobed	Medium	Short oval	Light green	Top	Short	Slight	Low
C5	Green	Three-lobed	Petit	Circle	Light green	Top	Short	Strong	Moderate
D1	Green	Single-lobed	Petit	Short oval	Yellow	Top	Short	Slight	Moderate
D2	Green	Single-lobed	Large	Medium oval	Yellow	Top	Intermediate	Strong	Moderate
D4	Green	Three-lobed	Medium	Long oval	Green medium	Top	Intermediate	Closed	Moderate
E1	Red	Three-lobed	Large	Long oval	Light green	Top	Intermediate	Closed	High
E2	Green	Three-lobed	Medium	Medium oval	Light green	Down	Intermediate	Closed	Moderate
F1	Red	Three-lobed	Medium	Medium oval	Light green	Down	Intermediate	Slight	Moderate
F2	Green	Single-lobed	Petit	Short oval	Light green	Top	Short	Slight	Low

G1	Red	Five-lobed	Small	Circle	Green medium	Down	Short	Strong	Moderate
G2	Green	Five-lobed	Large	Long oval	Green medium	Top	Short	Intermediate	Moderate
H1	Green	Three-lobed	Small	Circle	Light green	Top	Short	Closed	Low
H2	Green	Three-lobed	Small	Circle	Very light	Top	Intermediate	Slight	Moderate
H3	Green	Single-lobed	Medium	Medium oval	Green medium	Top	Intermediate	Slight	Moderate
H4	Green	Three-lobed	Large	Long oval	Light green	Down	Long	Slight	Moderate
I1	Green	Three-lobed	Small	Short oval	Green medium	Down	Intermediate	Closed	High
I2	Green	Three-lobed	Large	Long oval	Light green	Down	Long	Closed	Moderate
I3	Green	Three-lobed	Small	Circle	Light green	Top	Short	Slight	Moderate
I4	Red	Three-lobed	Medium	Long oval	Light green	Top	Short	Slight	Moderate
I5	Green	Single-lobed	Medium	Medium oval	Very light	Top	Short	Slight	High
I6	Red	Five-lobed	Medium	Medium oval	Green medium	Top	Short	Slight	Very high
I7	Green	Single-lobed	Small	Short oval	Light green	Top	Intermediate	Slight	Low
I8	Red	Five-lobed	Medium	Short oval	Light green	Top	Short	Slight	Low
I9	Red	Three-lobed	Medium	Short oval	Green medium	Top	Long	Closed	Moderate
I10	Red	Three-lobed	Small	Circle	Light green	Top	Intermediate	Closed	Moderate
J1	Red	Three-lobed	Small	Circle	Light green	Down	Intermediate	Intermediate	High
J2	Green	Three-lobed	Large	Rounded	Light green	-	Short	Intermediate	Moderate
J3	Green	Three-lobed	Medium	Long oval	Light green	Top	Intermediate	Intermediate	Moderate
J4	Green	Three-lobed	Medium	Medium oval	Light green	Top	Short	Intermediate	Moderate
J5	Red	Three-lobed	Small	Circle	Light green	Top	Short	Closed	Moderate
K1	Green	Five-lobed	Medium	Medium oval	Light green	-	Short	Closed	High
K2	Red	Five-lobed	Medium	Medium oval	Light green	Top	Intermediate	Slight	Low
K3	Green	Three-lobed	Small	Circle	Very light green	Down	Short	Intermediate	Low
K4	Green	Three-lobed	Small	Circle	Green medium	Top	Short	Intermediate	Low
K5	Green	Three-lobed	Medium	Medium oval	Light green	-	Intermediate	Intermediate	Low

Étude II. Caractérisation de la diversité phénotypique des houblons sauvages des Hauts-de-France

1. Introduction

Notre collection de houblons sauvages a ainsi été caractérisée génétiquement et chimiquement et comparée à des variétés anciennes et commerciales. Notre étude montre que les houblons sauvages se différencient nettement des variétés commerciales d'un point de vue génétique et ne sont donc pas uniquement des échappées de culture. Cette collection montre également une originalité chimique qui nécessite une exploration encore plus approfondie. Il nous a semblé également pertinent de s'intéresser aux caractéristiques phénotypiques de ces houblons.

L'UPOV (Union pour la protection des obtentions végétales) a suggéré une liste de descripteurs spécifiques pour le houblon portant sur les caractéristiques de la plante entière, les tiges, feuilles, inflorescences, strobiles et bractées, ainsi que sur les caractéristiques agronomiques comme la maturation précoce ou tardive et le rendement (UPOV 2006).

Les houblons sauvages sont source de diversité et présentent des traits intéressants dans le cadre d'un développement variétal. Dans ce cadre, plusieurs études portent sur l'investigation de la diversité des houblons sauvages, et notamment sur leurs caractéristiques morphologiques (Solberg et al. 2014, Mongelli et al. 2016, Mafakheri et al. 2020, Dabbous-Wach et al. 2021). Cette étude préliminaire vise à caractériser la diversité morphologique des houblons sauvages collectés *in situ* sur différents sites de la région Hauts-de-France, présentant un intérêt écologique ou ethnobotanique. Ces résultats constitueront une base pour la caractérisation du houblon du Nord de la France pour un potentiel développement variétal.

2. Matériel et méthodes

Comme décrit dans l'étude précédente, 50 accessions de houblons sauvages ont été collectées sur onze sites de la région Hauts-de-France (**Tableau 1, Étude I**). Lors des collectes, un échantillonnage en herbier a été réalisé. Les exemplaires de référence ont été déposés à la Faculté de pharmacie (Université de Lille).

Les caractéristiques morphologiques des houblons sauvages collectés ont été évaluées sur les échantillons conservés en herbier en utilisant les descripteurs de l'UPOV (2006) et de Rigr et Faberova 2000. Pour cela, la largeur et la longueur des cônes ont été mesurées ainsi que celles des bractées. D'autres descripteurs qualitatifs ont également été considérés, tels que la coloration anthocyanique des pousses, la forme des feuilles, la taille et la forme des cônes, l'intensité de la couleur verte des cônes, le degré d'ouverture des bractées et le niveau de production de chaque plante. Pour chaque paramètre mesuré sur les feuilles, un minimum de 5 mesures a été réalisé afin d'avoir des mesures les plus représentatives possibles. Les caractéristiques des cônes ont été évaluées lors de la collecte, afin de ne pas altérer les mesures du fait de leur conservation. Les données quantitatives sont traitées statistiquement par une ANOVA suivie d'un test de Tukey ; les variables avec la plus forte explication de la variance ont fait l'objet d'une AFMD sur le logiciel XLStats (Addinsoft, Paris, France).

3. Résultats

Les variations morphologiques des houblons étudiés sont illustrées par la **Figure 48** et reportées dans le **Tableau 12** pour les caractères qualitatifs, et dans le **Tableau 13** pour les caractères quantitatifs.

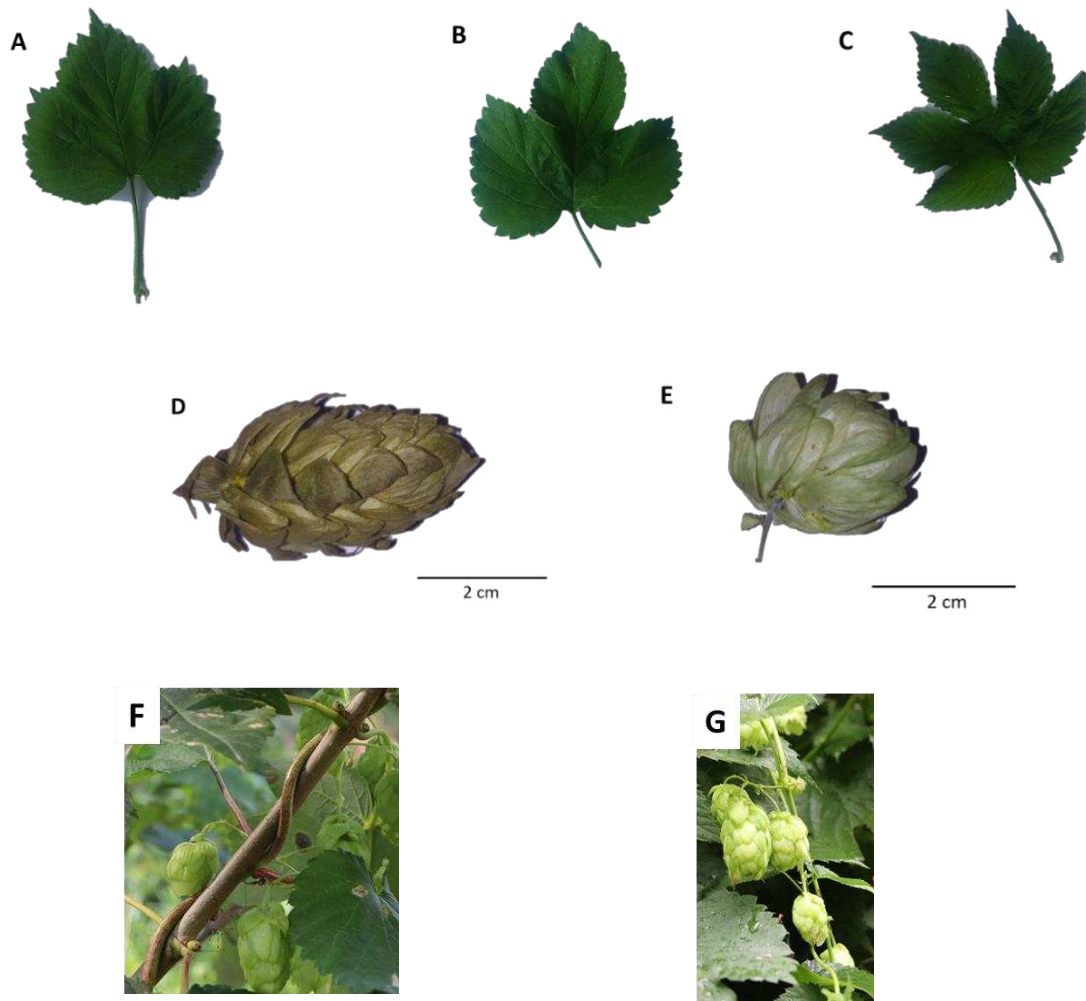


Figure 48. Exemples de variabilité morphologique parmi les houblons sauvages étudiés. (A) Feuille monlobée (D2) ; (B) Feuille trilobée (H1) ; (C) Feuille pentalobée (G1) ; (D) Grand cône (D4) ; (E) Petit cône (H3) (F) Tige rouge (C3) ; (G) Tige verte (A3).

Tableau 12. Descripteurs morphologiques qualitatifs (tiges, feuilles, cônes) des houblons sauvages caractérisés.

	Tige : couleur	Feuille : nombre de lobes	Cônes : taille	Cônes : forme	Cônes : couleur	Orientati on des stipules	Bractées : longueur	Ouverture des bractées	Productivité
A1	Rouge	Trilobée	Petit	Oval allongé	Vert clair	Bas	Moyenne	Légère	Faible
A2	Rouge	Trilobée	Moyen	Globulaire	Vert clair	Haut	Courte	Légère	Faible
A3	Verte	Trilobée	Moyen	Globulaire	Vert clair	Bas	Moyenne	Forte	Modérée
A4	Verte	Trilobée	Gros	Oval allongé	Vert clair	Bas	Courte	Légère	Faible
A5	Verte	Monolobée	Gros	Globulaire	Vert clair	Haut	Courte	Fermée	Élevée
B1	Rouge	Trilobée	Petits	Oval moyen	Vert clair	Bas	Moyenne	Fermée	Faible
B2	Verte	Trilobée	Petits	Globulaire	Vert clair	Bas	Courte	Forte	Faible
B3	Rouge	Monolobée	Moyen	Oval moyen	Vert clair	Haut	Courte	Fermée	Modérée
B4	Verte	Trilobée	Petits	Globulaire	Vert clair	Haut	Courte	Forte	Faible
B5	Rouge	Monolobée	Moyen	Ovale moyen	Vert clair	Bas	Moyenne	Légère	Faible
C1	Verte	Trilobée	Gros	Allongé	Vert clair	Haut	Moyenne	Moyenne	Modérée
C2	Verte	Trilobée	Petit	Ronds	Vert clair	Haut	Courte	Moyenne	Faible
C4	Verte	Trilobée /5	Gros	Allongé	Vert clair	Haut	Moyenne	Forte	Faible
C3	Rouge	Trilobée	Moyen	Ovale court	Vert clair	Haut	Courte	Légère	Faible
C5	Verte	Trilobée	Petit	Rond	Vert clair	Haut	Courte	Forte	Modérée
D1	Verte	Monolobée	Petit	Ovale court	Jaune	Haut	Courte	Légère	Modérée
D2	Verte	Monolobée	Gros	Ovale moyen	Jaune	Haut	Moyenne	Forte	Modérée
D4	Verte	Trilobée	Moyen	Ovale allongé	Vert moyen	Haut	Moyenne	Fermée	Modérée
E1	Rouge	Trilobée	Grand	Ovale allongé	Vert clair	Haut	Moyenne	Fermée	Élevée
E2	Verte	Trilobée	Moyen	Ovale moyen	Vert clair	Bas	Moyenne	Fermée	Modérée
F1	Rouge	Trilobée	Moyen	Ovale moyen	Vert clair	Bas	Moyenne	Légère	Modérée
F2	Verte	Monolobée	Petit	Ovale court	Vert clair	Haut	Courte	Légère	Faible
G1	Rouge	5	Petit	Rond	Vert moyen	Bas	Courte	Forte	Modérée
G2	Verte	5	Grand	Ovale allongé	Vert moyen	Haut	Courte	Moyenne	Modérée
H1	Verte	Trilobée	Petit	Rond	Vert clair	Haut	Courte	Fermée	Faible
H2	Verte	Trilobée / 5	Petit	Rond	Très clair	Haut	Moyenne	Légère	Modérée
H3	Verte	Monolobée	Moyen	Ovale moyen	Vert moyen	Haut	Moyenne	Légère	Modérée
H4	Verte	Trilobée	Gros	Ovale allongé	Vert clair	Bas	Longue	Légère	Modérée
I1	Verte	Trilobée	Petit	Ovale court	Vert moyen	Bas	Moyenne	Fermée	Élevée
I2	Verte	Trilobée	Gros	Ovale allongé	Vert clair	Bas	Longue	Fermée	Modérée
I3	Verte	Trilobée	Petit	Rond	Vert clair	Haut	Courte	Légère	Modérée
I4	Rouge	Trilobée	Moyen	Ovale allongé	Vert clair	Haut	Courte	Légère	Modérée
I5	Verte	Monolobée	Moyen	Ovalemoyen	Vert très clair	Haut	Courte	Légère	Élevée
I6	Rouge	5 lobes	Moyen	Ovale moyen	Vert moyen	Haut	Courte	Légère	Très élevée
I7	Verte	Monolobée	Petit	Ovale court	Vert clair	Haut	Moyenne	Légère	Faible
I8	Rouge	5 lobes	Moyen	Ovale court	Vert clair	Haut	Courte	Légère	Faible
I9	Rouge	Trilobée	Moyen	Ovale court	Vert moyen	Haut	Grande	Fermée	Modérée
I10	Rouge	Trilobée	Petit	Rond	Vert clair	Haut	Moyenne	Fermée	Modérée

J1	Rouge	Trilobée	Petit	Rond	Vert clair	Bas	Moyenne	Moyenne	Élevée
J2	Verte	Trilobée	Grand	Arrondi	Vert clair	-	Courte	Moyenne	Modérée
J3	Verte	Trilobée	Moyen	Ovale allongé	Vert clair	Haut	Moyenne	Moyenne	Modérée
J4	Verte	Trilobée	Moyen	Ovale moyen	Vert clair	Haut	Courte	Moyenne	Modérée
J5	Rouge	Trilobée	Petit	Rond	Vert clair	Haut	Courte	Fermée	Modérée
K1	Verte	5 lobes	Moyen	Ovale moyen	Vert clair	-	Courte	Fermée	Élevée
K2	Rouge	5 lobes	Moyen	Ovale moyen	Vert clair	Haut	Moyenne	Légère	Faible
K3	Verte	Trilobée	Petit	Rond	Vert très clair	Bas	Courte	Moyenne	Faible
K4	Verte	Trilobée	Petit	Rond	Vert moyen	Haut	Courte	Moyenne	Faible
K5	Verte	Trilobée	Moyen	Ovale moyen	Vert clair	-	Moyenne	Moyenne	Faible

Tableau 13. Moyenne et ANOVA des traits morphologiques des houblons sauvages caractérisés.

Les lettres différentes représentent l'indice d'une statistique significative avec un intervalle de confiance de 0,95 (test de Tukey).

	Limbe : largeur	Limbe : longueur	Pédoncule : longueur	Pétiole : longueur
A1	1.580 ^e	1.060 ^e	5.181 ^{a-l}	7.117 ^{a-e}
A2	2.485 ^{cd}	1.554 ^{b-e}	4.655 ^{a-p}	5.875 ^{b-g}
A3	2.522 ^{cd}	1.550 ^{b-e}	3.626 ^{c-p}	5.854 ^{b-g}
A4	1.600 ^e	1.086 ^e	3.937 ^{c-p}	4.658 ^{d-g}
A5	3.350 ^a	1.788 ^{ab}	4.387 ^{b-p}	4.992 ^{c-g}
B1	1.991 ^{c-e}	1.345 ^{c-e}	3.283 ^{d-p}	4.638 ^{d-g}
B2	1.929 ^{c-e}	1.343 ^{c-e}	3.200 ^{d-p}	5.350 ^{b-g}
B3	2.720 ^{a-c}	1.560 ^{b-e}	3.193 ^{d-p}	9.625 ^{ab}
B4	2.020 ^{c-e}	1.360 ^{c-e}	3.290 ^{d-p}	6.289 ^{b-g}
B5	1.500 ^e	1.000 ^e	4.309 ^{c-p}	10.540 ^a
C1	2.300 ^{c-e}	1.241 ^{de}	3.964 ^{c-p}	3.320 ^{e-g}
C2	2.400 ^{c-e}	1.450 ^{b-e}	4.091 ^{c-p}	6.513 ^{a-g}
C3	2.450 ^{cd}	1.557 ^{b-e}	7.058 ^{a-c}	8.900 ^{a-c}
C4	1.872 ^{c-e}	1.239 ^{de}	7.898 ^{ab}	3.860 ^{e-g}
C5	1.982 ^{c-e}	1.259 ^{de}	4.822 ^{a-o}	3.120 ^{fg}
D1	2.715 ^{a-c}	1.823 ^{ab}	5.199 ^{a-l}	3.686 ^{e-g}
D2	2.462 ^{cd}	1.515 ^{b-e}	7.026 ^{a-c}	2.060 ^g
D4	1.783 ^{c-e}	1.367 ^{c-e}	4.974 ^{a-m}	5.700 ^{b-g}
E1	3.219 ^{ab}	1.938 ^a	5.718 ^{a-j}	8.525 ^{a-d}
E2	2.222 ^{c-e}	1.278 ^{de}	5.786 ^{a-i}	4.067 ^{e-g}
F1	2.333 ^{c-e}	1.325 ^{de}	6.332 ^{a-d}	3.830 ^{e-g}
F2	2.933 ^{a-c}	1.567 ^{a-e}	5.061 ^{a-p}	4.280 ^{d-g}
G1	1.641 ^{de}	1.088 ^e	4.118 ^{c-p}	4.047 ^{e-g}
G2	2.319 ^{c-e}	1.348 ^{c-e}	4.777 ^{a-p}	4.733 ^{c-g}
H1	2.625 ^{a-c}	1.738 ^{a-c}	4.905 ^{a-n}	5.220 ^{b-g}
H2	1.960 ^{c-e}	1.340 ^{c-e}	3.328 ^{d-p}	5.000 ^{b-g}
H3	2.032 ^{c-e}	1.395 ^{c-e}	8.074 ^a	4.840 ^{c-g}
H4	1.970 ^{c-e}	1.290 ^{de}	6.217 ^{a-f}	4.694 ^{d-g}
I1	2.265 ^{c-e}	1.325 ^{de}	3.165 ^{d-p}	4.133 ^{e-g}
I10	2.125 ^{c-e}	1.475 ^{b-e}	4.273 ^{c-p}	4.571 ^{d-g}
I2	2.620 ^{a-d}	1.600 ^{a-d}	6.294 ^{a-e}	5.133 ^{b-g}
I3	2.180 ^{c-e}	1.320 ^{de}	4.939 ^{a-m}	4.871 ^{c-g}
I4	2.394 ^{c-e}	1.389 ^{c-e}	3.683 ^{c-p}	4.613 ^{d-g}
I5	2.240 ^{c-e}	1.340 ^{de}	3.720 ^{c-p}	3.467 ^{e-g}
I6	2.242 ^{c-e}	1.384 ^{c-e}	4.288 ^{c-p}	6.200 ^{b-g}
I7	2.225 ^{c-e}	1.375 ^{c-e}	3.426 ^{d-p}	3.986 ^{e-g}
I8	2.529 ^{b-d}	1.586 ^{a-d}	4.344 ^{b-p}	3.950 ^{e-g}
I9	2.020 ^{c-e}	1.400 ^{c-e}	3.630 ^{c-p}	3.814 ^{e-g}

J1	2.214	c-e	1.814	ab	3.382	d-p	6.750	a-g
K1	2.267	c-e	1.400	c-e	6.124	a-g	6.313	b-g
K2	2.567	b-d	1.511	b-e	5.322	a-k	6.920	a-f
K3	1.657	de	1.193	de	6.382	a-d	4.971	c-g
K4	2.053	c-e	1.495	b-e	6.070	a-h	6.375	b-g
K5	2.280	c-e	1.320	de	5.781	a-i	6.867	a-g

Des différences dans chaque caractère ont été observées. Afin d'évaluer les différences entre les génotypes échantillonnés et la structuration de ces différences phénotypes, les données ont été analysées par AFMD. Une étude préalable a montré que les variables les plus explicatives de la variance portaient sur la caractérisation des limbes (largeur et longueur), des feuilles (nombre de lobes, taille, couleur, forme et taille) et des bractées (longueur et niveau d'ouverture). Ce sont donc ces paramètres qui ont été retenus pour l'AFMD (**Figure 49**).

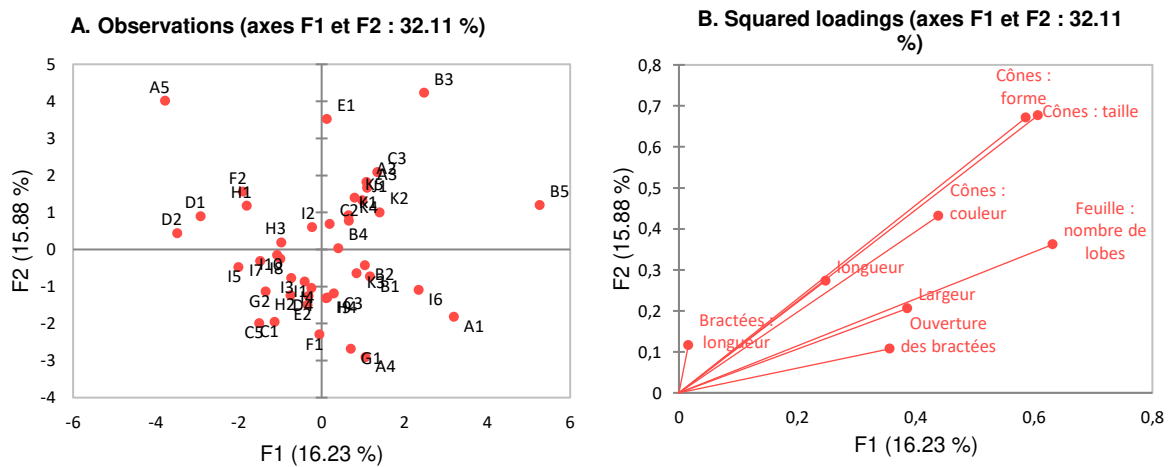


Figure 49. ACP sur les caractéristiques morphologiques les plus discriminantes des 50 accessions sauvages caractérisées. A : Carte factorielle des individus ; B : Loading plot.

La variance expliquée totale est égale à 32,11% (16,23% par la composante 1 et 15,88% par la composante 2), ce qui reste relativement faible et n'indique donc pas de structuration globale des données. Néanmoins, la carte factorielle des observations atteste de la diversité phénotypique des houblons sauvages d'un point de vue phénotypique, ce qui constitue une bonne base de diversité pour des investigations plus poussées.

4. Conclusion

Cette étude préliminaire permet de conclure quant à la grande diversité phénotypique des houblons sauvages collectés. Les marqueurs morphologiques se révèlent être un outil utile pour l'évaluation de la biodiversité dans l'espèce *H. lupulus* L, et en particulier la largeur et la longueur de limbes, le nombre de lobes de feuilles, la taille, la couleur, la forme des cônes ainsi que la longueur et la forme des bractées. Ces caractères semblent être les plus pertinents pour discriminer au mieux les différents génotypes. Ces observations préliminaires attestent donc de la diversité des accessions étudiées et de leur potentiel pour un développement variétal. Néanmoins, compte tenu de leur faible robustesse statistique, ces résultats ne représentent qu'une caractérisation préliminaire de ces accessions et ne feront pas l'objet d'une analyse *in situ* plus poussée.

Étude III. Potentialité de l'utilisation des houblons sauvages du Nord de la France pour un futur développement variétal

Les **Études I et II** ont permis de mettre en évidence la diversité chimique, génétique et morphologique des houblons sauvages collectés *in-situ*. En particulier, la cartographie génétique a mis en évidence des structures génétiques originales pour certaines sous-populations, par comparaison aux variétés commerciales et anciennes. De plus, les flux de gènes entre sous-populations semblent écarter l'hypothèse de houblons rémanents parmi les accessions identifiées comme sauvages. D'un point de vue chimique, ces pieds sauvages semblent produire davantage d'acides β que les variétés commerciales et pour certains des composés aromatiques originaux. Cependant, l'analyse multivariée semble également révéler que cette diversité chimique pourrait être fortement impactée par l'effet du terroir. Cette différenciation chimique en fonction des lieux de collecte pourrait également s'expliquer par des différences de stades phénotypiques à la collecte.

La présente étude porte désormais sur ces mêmes 50 accessions sauvages plantées en houblonnière expérimentale provisoire au lycée de Douai (**Figure 50**).



Figure 50. Houblonnière de conservation des accessions sauvages au lycée de Douai-Wagnonville en septembre 2021.

Ces conditions *ex-situ* ont permis de s'affranchir des effets de l'environnement sur la composition chimique des cônes et de réaliser un suivi régulier et précis de la maturité des cônes, afin de les collecter à leur maturité optimale. Des boutures de rhizomes de ces 50 accessions sauvages collectées en 2019 ont été transplantées dans une houblonnière expérimentale provisoire au lycée de Douai en novembre 2019. Il n'y a pas eu de collecte en 2020. Par contre, 46 accessions sont bien réparties en 2021 et 39 ont produit suffisamment de cônes pour permettre leur analyse phytochimique. Pour 17 accessions, les rendements ont été très satisfaisants. Les pieds ont produit plus de 50 grammes de houblon (poids sec), ce qui a permis d'utiliser leurs cônes pour des tests de brassage (**Figure 51**).

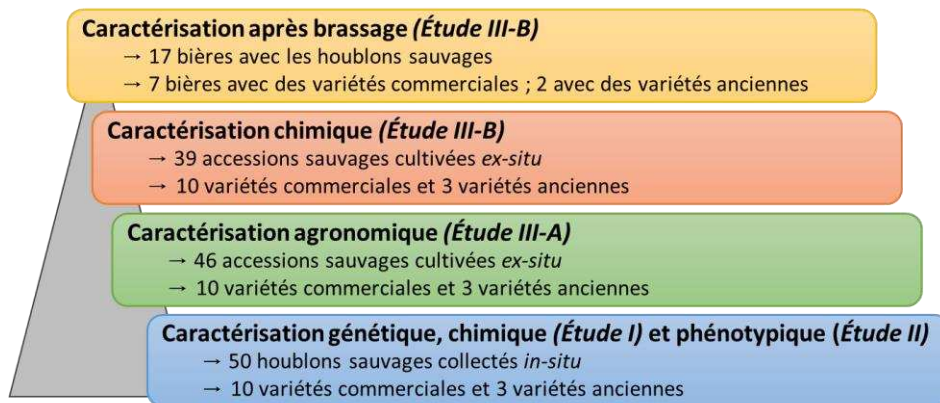


Figure 51. Récapitulatif du nombre d'accessions caractérisées dans les différentes études du présent manuscrit.

Ce travail vise donc à caractériser la diversité des mêmes houblons sauvages, mais cette fois-ci en conditions *ex-situ*. Il s'intègre au programme Feader mis en place parallèlement en 2021. Ceci a ainsi permis de :

- réaliser un suivi des ravageurs et des pathogènes, en lien avec la Fredon Hauts-de-France afin d'évaluer les capacités agronomiques de ces accessions ;
- réaliser un suivi de la maturation des cônes afin de les collecter lorsqu'ils étaient à maturité ;
- analyser la composition phytochimique de ces accessions en s'affranchissant de l'effet terroir (composés volatils, quantification des composés phénoliques majoritaires et analyses de métabolomique non ciblée) ;
- identifier le potentiel aromatique de ces accessions après brassage, par dégustation par un panel de dégustateurs entraînés.

A. Potentiel agronomique des accessions sauvages étudiées : suivi des pathogènes en houblonnière expérimentale

1. Méthodologie

1.1. Matériel d'étude

L'étude porte sur les accessions sauvages collectées en septembre 2019 et replantées en novembre 2019 dans la houblonnière expérimentale provisoire du lycée de Douai-Wagnonville. Les lianes ont été mises au fil en avril 2021 et n'ont subi aucune intervention de fertilisation ni de traitement contre les bioagresseurs. Ce suivi est réalisé par la Fredon Hauts-de-France dans le cadre du programme Feader et est renouvelé en 2022 et en 2023.

1.2. Protocole de suivi des pathogènes

Un suivi des pathogènes présents sur les accessions entre juillet et fin août a été réalisé lors de trois sessions d'analyse. Pour chaque accession, les prélèvements ont été effectués sur 3 niveaux : bas (1m50), moyen (3m) et haut (6m). Sur chaque niveau, 2 feuilles sont prélevées. L'étude sur ces trois niveaux permet d'avoir une vision globale de la progression des ravageurs/maladies au fur et à mesure du développement de la culture. Les feuilles sont ensuite observées à la loupe binoculaire au laboratoire pour dénombrer les populations totales d'acariens tisserands, de pucerons (*Phorodon humuli* Schrank) et de lépidoptères en fonction de la hauteur du prélèvement et de l'accession concernée. Les résultats sont analysés en fonction du pourcentage de feuilles infestées et de l'intensité de l'attaque (nombre de ravageurs présents). Parallèlement, le nombre de feuilles présentant des symptômes de mildiou, de botrytis et d'oïdium a été dénombré. Les résultats sont analysés en fonction du pourcentage de feuilles infestées. Concernant les acariens phytophages, leur dénombrement en laboratoire se fait en distinguant les formes mobiles (adultes) et non mobiles (œufs) pour calculer l'indice de Weihrauch⁸ (Weihrauch 2005) (**Tableau 14**).

⁸ L'index de contamination (F. Weihrauch), est une aide à la décision pour les traitements. Il s'agit de compter les acariens et les œufs (loupe binoculaire) sur les feuilles de houblon prélevées dans une parcelle, puis de calculer l'index par feuille et enfin faire la moyenne des 20 feuilles (AGPH 2020).

Tableau 14. Index de conversion du nombre de formes mobiles et d'oeufs en classe, établi par Weihrauch (2005)

Index											
Classe 0		Classe 1		Classe 2		Classe 3		Classe 4		Classe 5	
F. mob	Oeufs	F. mob	Oeufs	F. mob	Oeufs	F. mob	Oeufs	F. mob	Oeufs	F. mob	Oeufs
0		0	x	0	xx	0	xxx				
		1-9	x	1-9	xx	1-9	xxx				
				10-49	x	10-49	xx				
						10-49	xxx				
						50-99	x				
						50-99	xx				
								50-99	xxx		
								100-999	x		
								100-999	xx		
										100-999	xxx
										>1000	
x : œufs < 30											
xx : 30 < œufs < 300											
xxx : œufs > 300											

2. Résultats

2.1. Suivi des populations d'acariens

Les acariens tétranyques tisserands sont présents en majorité sur les strates basse et moyenne (**Figure 52A**). La strate la plus haute a présenté des ravageurs uniquement fin août, mais à des niveaux bien en-deçà de celui des feuilles les plus basses (**Figure 52A**). La dispersion des acariens sur la strate la plus haute a été peu marquée mais s'explique par un développement tardif des lianes. Les cônes ont ainsi été relativement préservés des attaques du ravageur.

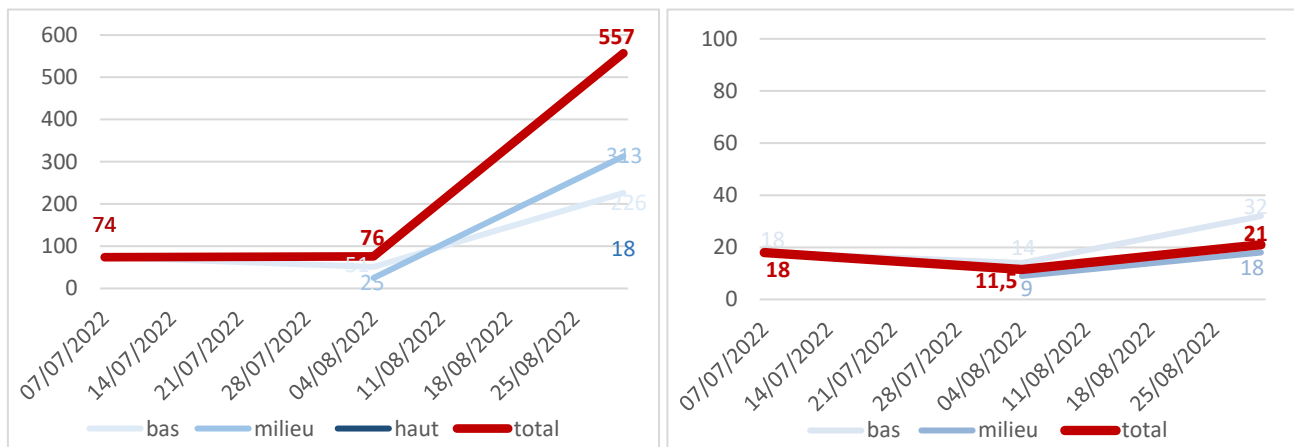


Figure 52. Suivi des populations d'acariens. A : Évolution des populations de tétranyques tisserands sur l'ensemble des pieds de houblon ; B : Évolution du pourcentage moyen de feuilles infestées par les tétranyques, sur l'ensemble des pieds de houblon.

Les décomptes d'acariens ont également été réalisés par pied pour évaluer la plus ou moins grande attractivité de ces derniers vis-à-vis des tétranyques tisserands. Le 7 juillet, des ravageurs étaient présents sur 12 des 46 pieds. A cette date, le seuil de nuisibilité était de 0 selon l'indice de Weihrauch. Il était alors dépassé pour tous les pieds concernés. Quatre semaines après (le 2 août), les acariens étaient visibles sur un nombre équivalent de pieds (14) et avec des proportions de feuilles infestées inférieures. A cette date, le seuil de nuisibilité fixé à 0,125 selon l'indice de Weihrauch, n'a pas été atteint en moyenne sur le rang mais a été dépassé individuellement pour chaque pied

présentant des acariens. Globalement, les populations d'acariens ont légèrement diminué entre juillet et début août alors que leur évolution naturelle tend en principe à augmenter à cette période. Ce phénomène pourrait être lié aux conditions climatiques de l'année et notamment aux fortes précipitations enregistrées fin juillet (41 mm sur 10 jours dont 15 le 2 août) et aux températures moyennes pour la saison. Fin-août (le 30 août), les acariens étaient présents sur 26 pieds sur 46 et infestaient 21% des feuilles en moyenne. Le seuil de nuisibilité était de 0,75 selon l'indice de Weihrauch et n'a été dépassé que sur les accessions K5 et I2. Au terme de ces notations, un classement des accessions a pu être effectué lors du dernier relevé et sur l'ensemble du suivi. Il en ressort une plus forte présence des populations de ravageurs sur les accessions B2, I5, K1 et K5. Certains pieds n'ont en revanche présenté aucune infestation durant tout le suivi (A3, A4, 45, B1, B4, C2, C3, C5, D1, E2, I10 et J3).

2.2. Suivi des populations de pucerons

La présence de pucerons *Phorodon humuli* a été constatée sur le houblon, dès la première observation, le 7 juillet (**Figure 53**), à des niveaux relativement élevés. Les populations ont ensuite rapidement et fortement décliné. Cette évolution des pucerons est identique à celle qu'on peut observer habituellement en houblonnière.

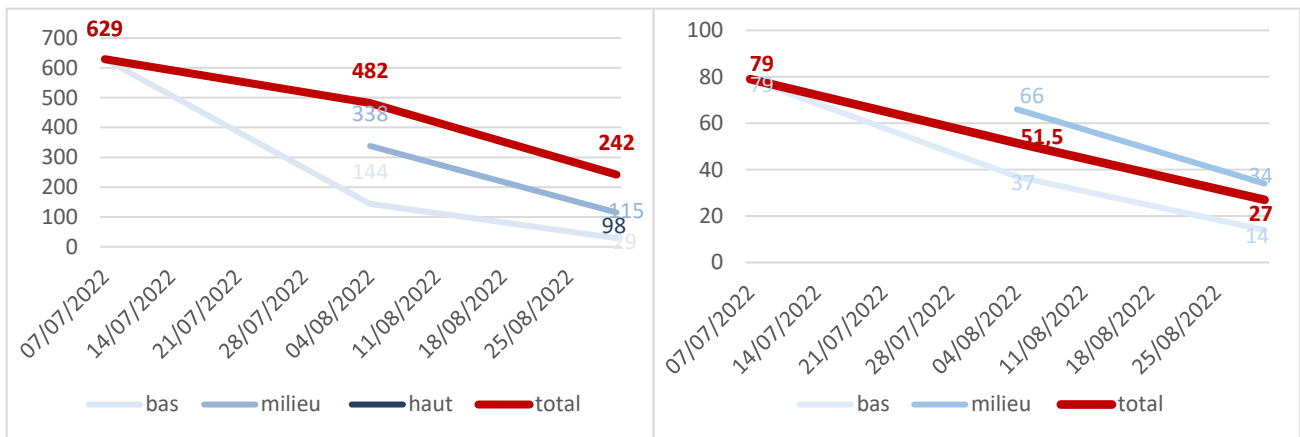


Figure 53. Suivi des populations de pucerons. A : Évolution des populations de pucerons sur l'ensemble des pieds de houblon. B : Évolution du pourcentage moyen de feuilles infestées par les pucerons sur l'ensemble des pieds de houblon

La progression spatiale des ravageurs a également été évaluée grâce aux observations réalisées sur les différents niveaux de végétation. Compte-tenu de la courte période de suivi, il est difficile de conclure sur la progression des ravageurs. Toutefois, il semble que dès début août les pucerons aient migré vers le milieu des treilles (66% des feuilles infestées contre 37% en bas des lianes). Fin août, la majorité des pucerons a été observée au sommet (115 individus et 33% des feuilles) ou milieu (98 et 34% des feuilles) des lianes.

Les premiers pucerons ont été observés début juillet sur tous les pieds à l'exception de A5, I7, I9 et J1 (**Tableau 15**). À cette date, 42 pieds sur 46 présentaient déjà un feuillage infesté à plus de 50%.

Cependant, 1 seul pied (C1) atteignait, en moyenne, plus de 50 pucerons par feuille (seuil d'intervention allemand et alsacien). La colonisation moyenne variait alors, sur les autres pieds, entre 0 et 21 pucerons par feuille. Progressivement, les populations de ravageurs ont diminué sur quasiment tous les pieds pour atteindre, fin août, selon les pieds, 0 à 89% de feuillage infesté et 0 à 5 pucerons par feuille. Sur l'ensemble du suivi, les accessions A2, H1, I7 et I9, ont présenté moins de 20% de feuillage infesté par les pucerons (0% pour K7), tandis que les accessions B1, B4 C1 et J5 ont été colonisés sur au moins 70% de leurs feuilles.

2.3. Suivi des populations de lépidoptères

Toutes espèces de lépidoptères confondues, peu de dégâts ont été recensés sur l'ensemble de la parcelle jusque mi-août. La dernière observation a toutefois montré une recrudescence des attaques en fin de saison. Quelques pieds sont restés indemnes de défoliations : A1, A3, A4, A5, B1, B2, B4, B5, C3, F1, G1, I5, I9 et J1. Les accessions D1, E1, E2, H4, I2, I7, K1, J2 et J4 ont quant à elles présenté entre 50 à 100 % de feuilles échantillonnées lésées (**Tableau 15**). Au cours du suivi, quelques lépidoptères ont été dénombrés sur les feuilles prélevées (17 œufs ou chenilles). 8 pieds ont été concernés par ces présences : C4, D3, K1, I2, I7, I8, I9 et J4.

Chaque oeuf/chenille prélevé a été mis en élevage, en vue d'une détermination au stade adulte. Deux échantillons prélevés sur I7 et I8 n'ont pas atteint le stade imago et n'ont donc pas pu être déterminés. Trois espèces ont pu être identifiées : *Calliteara pudibunda* L., la pudibonde (sur I9), *Eupithecia assimolata* Doubleday, l'Eupithécie du groseiller ou du houblon (sur D3, I2, K1) et *Acrionicta rumicis* L., la Noctuelle de la Patience (sur C4 et J4).

2.4. Suivi du mildiou

Globalement, la pression mildiou a été assez forte cette année, allant jusqu'à 79% des feuilles touchées sur l'ensemble du dispositif en fin de suivi. La présence de la maladie a été détectée dès la première observation, le 7 juillet. Visuellement, des symptômes étaient alors apparents à la base de la plupart des pieds. Toutefois, sur les prélèvements aléatoires effectués un peu plus haut, les symptômes n'ont alors été observés que sur 2% des feuilles en moyenne et sur deux pieds (D1 et I9). Trois semaines plus tard, en raison d'un développement de la végétation et de conditions plus favorables à la maladie, les symptômes se sont généralisés à la plupart des variétés à l'exception des accessions D1, I1, I3, I6, I7, I10, tous les pieds « J » et K5. Ainsi, le 2 août, 45% du feuillage était contaminé par la maladie. Fin août, tous les pieds, à l'exception de I7, étaient contaminés par le mildiou.

Au terme des notations, un classement des variétés a pu être effectué aux deux dates les plus significatives (02/08/21 et 28/08/21). Les accessions B1, C2, H2, I7 et K1 ont ainsi été les moins contaminées par le mildiou, tandis que les accessions A1, A3, A4 et D3 ont présenté le plus de symptômes.

2.5. Suivi des autres maladies

Le suivi précis, réalisé sur un échantillonnage de feuilles, n'a pas permis de déceler la présence d'autres maladies (oïdium, botrytis, alternaria) sur les pieds de houblon, en 2021.

2.6. Suivi des auxiliaires de cultures

En parallèle, un suivi des auxiliaires a été effectué afin d'estimer l'impact des coccinelles, syrphes, hémérobès... sur les populations de ravageurs. Ce suivi révèle une plus forte présence de ces derniers début août (**Tableau 15**). Toutefois, il reste difficile de démontrer leur impact sur la disparition des ravageurs. Au total, 86 auxiliaires ont été observés sur les feuilles prélevées, tout au long du suivi. 66% d'entre eux étaient des parasitoïdes (*Aphidius*), 15% des coccinelles (92% d'*Harmonia axyridis* Pallas, 8% d'*Adalia septempunctata* L.), 9,5% des chrysopes, 7% des syrphes et 2,5% des anthocorides.

Tableau 15. Pourcentage de feuilles infestées par les acariens, pucerons ou lépidoptères, ou présentant des auxiliaires, selon les pieds de houblon

mois accession	Acariens			Pucerons			Lépidoptères			Mildiou			Auxiliaires		
	VII	VIII	IX	VII	VIII	IX	VII	VIII	IX	VII	VIII	IX	VII	VIII	IX
A1	0	0	50	100	50	0	0	0	0	0	100	100	0	0	50
A2	0	0	17	50	0	0	0	0	33	0	50	83	0	0	0
A3	0	0	0	100	0	50	0	0	0	0	100	100	0	0	0
A4	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
A5	0	0	0	0	75	33	0	0	0	0	75	83	0	0	0
B1	0	0	0	100	100	50	0	0	0	0	50	50	0	50	0
B2	100	0	0	100	50	17	0	0	0	0	50	83	0	0	0
B3	0	0	33	100	50	33	0	0	17	0	100	83	0	50	17
B4	0	0	0	100	100	67	0	0	0	0	25	67	0	25	0
B5	50	0	17	50	50	67	0	0	0	0	75	67	0	25	17
C1	0	0	17	100	50	67	0	25	17	0	75	67	0	25	33
C2	0	0	0	100	0	100	0	50	0	0	50	50	50	0	0
C3	0	0	0	50	50	83	0	0	0	0	70	67	0	0	0
C4	0	0	33	100	50	33	0	25	33	0	50	100	0	0	17
C5	0	0	0	100	50	0	0	0	33	0	25	67	0	0	17
D1	0	0	0	100	50	50	0	0	50	50	0	100	50	0	50
D3	50	0	0	50	50	17	0	0	33	0	75	100	0	0	17
E1	0	0	50	100	50	50	0	0	50	0	100	100	0	0	0
E2	0	0	0	100	50	50	0	0	100	0	100	100	0	0	0
F1	0	0	17	100	25	17	0	0	0	0	25	67	0	25	50
G1	0	50	17	50	75	33	0	0	0	0	75	83	0	50	0
G2	50	25	0	100	75	33	0	0	17	0	75	83	0	0	0
H1	0	25	33	50	0	0	0	0	17	0	75	67	0	25	17
H2	50	0	0	100	75	0	0	0	17	0	50	50	0	0	0
H3	0	50	33	100	25	33	0	0	17	0	50	67	0	25	0
H4	0	0	17	100	50	50	0	0	67	0	50	100	0	75	0

I1	0	0	17	100	25	0	0	0	33	0	0	100	0	0	17
I2	0	0	67	100	50	33	0	0	50	0	50	83	0	0	0
I3	50	25	17	100	75	17	0	0	17	0	0	83	0	0	0
I4	50	50	0	100	0	33	0	0	33	0	25	100	0	0	0
I5	100	50	50	50	25	0	0	0	0	0	25	83	0	0	17
I6	0	55	33	50	50	33	0	0	33	0	0	67	0	0	0
I7	0	0	50	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0
I8	0	50	50	50	25	0	50	0	33	0	75	100	0	25	0
I9	0	50	0	0	50	0	0	0	0	50	25	83	0	0	17
I10	0	0	0	100	25	0	0	25	17	0	0	100	0	0	0
J1	50	0	33	0	75	50	0	0	0	0	0	67	0	75	0
J2	0	25	50	50	25	17	0	0	83	0	0	100	0	50	0
J3	0	0	0	100	75	33	0	0	33	0	0	100	0	0	0
J4	100	0	17	100	100	0	0	0	83	0	0	67	0	25	0
J5	50	0	33	100	100	17	0	0	33	0	0	67	0	0	0
K1	0	50	67	50	50	50	0	0	50	0	50	50	0	25	33
K2	0	0	17	100	75	33	0	0	33	0	25	83	0	25	0
K3	0	0	33	100	75	33	0	0	33	0	50	83	0	0	0
K4	50	25	33	100	0	17	0	0	17	0	75	83	0	0	17
K5	50	25	67	100	75	0	0	0	33	0	0	100	0	0	17
Moyenne	18	11	21	79	47	27	1	5	26	2	45	79	2	16	8

3. Conclusion

Les observations réalisées en 2021 ont permis d'effectuer une première évaluation de la sensibilité des pieds de houblon au complexe parasitaire. Suivant les pathogènes considérés, les accessions se distinguent par leur plus ou moins forte sensibilité. En région, l'année 2021 a été marquée par une pluviométrie importante et des températures peu élevées au printemps et au début de l'été. Ce sont des conditions favorables au développement de maladies.

Ainsi, certaines accessions telles que les accessions A5, G1, I7 ou I10 sembleraient plus résistantes aux invasions de ravageurs. Cependant, certains pieds se sont peu développés après leur implantation. Ces observations sont donc à interpréter avec prudence.

Par ailleurs, du fait du schéma d'implantation particulier (absence de répétitions des accessions et du dispositif, 1^{ère} année d'implantation), cet échantillonnage n'a pas permis de conclure statistiquement sur les résultats. L'installation de la nouvelle houblonnière expérimentale pérenne prévue en 2022, identique et avec des répétitions biologiques, permettra d'avoir plus de données et ainsi de mieux comparer la résistance des accessions collectionnées face à la pression des ravageurs. Les variétés commerciales et anciennes seront également plantées dans les lignes de la houblonnière pour servir de témoin. Des données sont disponibles dans la littérature, mais difficilement comparables à nos résultats du fait de l'originalité de chaque installation (nature des accessions, conditions pédo-climatiques, traitements chimiques appliqués...).

B. Caractérisation phytochimique des houblons sauvages du Nord de la France en conditions *ex-situ* : potentiel aromatique des houblons issus du terroir

Les houblons sont utilisés en brasserie pour leur potentiel aromatique et amérisant. La relation entre la composition phytochimique des cônes et l'influence gustative qu'ils apportent à la bière est très complexe (Dietz et al. 2020). D'autres facteurs, comme le type de malt ou les conditions de fermentation, interviennent aussi dans les caractéristiques organoleptiques de la bière.

La présente étude porte tout d'abord sur la caractérisation morphologique et phytochimique des cônes des accessions étudiées. Comme pour l'**Étude I**, cette caractérisation phytochimique s'appuie sur l'analyse des composés volatils par HS-SPME GC-MS, la quantification des composés phénoliques majoritaires par UHPLC-UV et des analyses de métabolomique non ciblée par UHPLC-HRMS-Vion. Afin de compléter cette caractérisation phytochimique, et d'évaluer le potentiel aromatique des accessions étudiées, des brassins tests ont été réalisés en collaboration avec le lycée de Douai-Wagnonville par David Lutun, Norman Degardin et Gabriel Lefèvre sur les accessions les plus productives. Les caractéristiques de chaque brassin test ont été évaluées par SBSE GC-MS pour l'analyse des composés volatils. D'autres paramètres ont également été évalués (IBU, EBU, teneur en sucres résiduels, °P et alcool). Une caractérisation sensorielle a été réalisée par un panel de dégustateurs experts sur la base de différents descripteurs de l'odeur et du goût. La formation du panel et les séances de dégustation ont été organisées par le Pr Sylvie Chollet et le Dr Mathilde Vandenberghe dans le laboratoire d'analyses sensorielles de Junia ISA composé de vingt-quatre cabines répondant aux normes AFNOR V09-105. Les différents jeux de données obtenus ont été comparés par analyse par OPLS-DA afin de mettre en évidence les liens entre les différentes variables et d'estimer l'influence des caractéristiques phytochimiques des houblons dans la bière après brassage.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude sont en préparation en vue de leur publication dans la revue *Food Chemistry* (Facteur d'impact = 7,514).

Anne-Sophie Paguet, Ali Siah, Gabriel Lefèvre, Mathilde Vandenberghe, David Lutun, Norman Degardin, Jennifer Samaillie, David Mathiron, Franck Michels, Marie-Laure Fauconnier, Sylvie Chollet, Roland Molinié, Jean-Xavier Fontaine, Sevser Sahpaz, Céline Rivière. « Phytochemical characterization of wild hops (*Humulus lupulus*) from northern France and evaluation of their aromatic potential in beer: towards a lead for a local variety ».

Résumé de l'article :

Le houblon est une plante dioïque historiquement cultivée et utilisée en brasserie dans le nord de la France. Dans le contexte actuel de développement de bières plus aromatiques, nous nous intéressons au potentiel du houblon sauvage. Pour cela, nous avons préalablement constitué une collection d'accessions sauvages collectées dans le nord de la France présentant un haut niveau de diversité génétique. Cette étude vise à réaliser une caractérisation chimique des cônes de 39 accessions, ainsi que de 10 variétés commerciales et 3 anciennes, en utilisant la GC-MS HS-SPME pour l'analyse des composés volatils, l'UHPLC-UV pour la quantification des composés phénoliques et l'UHPLC-IMS-Qtof pour la métabolomique non ciblée. Ces analyses ont révélé une forte opposition entre les accessions sauvages et les variétés de référence. Nous avons également réalisé 27 bières, analysées par SBSE GC-MS, avec le même style de bière (Lager), dont la différence porte sur le houblon testé. Ces bières ont été évaluées par un panel afin de déterminer le potentiel aromatique et gustatif de ces houblons. Les différents jeux de données obtenus ont été comparés par une analyse multiblocs OPLS-DA, afin d'identifier les marqueurs chimiques qui pourraient influencer le potentiel aromatique du houblon.

Mots-clés : *Humulus lupulus* L.; houblon sauvage ; diversité chimique ; analyse sensorielle ; analyse multivariée.

Phytochemical characterization of wild hops (*Humulus lupulus*) from northern France and evaluation of their aromatic potential in beer: towards a lead for a local hop variety

Anne-Sophie Paguet¹, Ali Siah¹, Gabriel Lefèvre¹, Mathilde Vandenberghe¹, David Lutun², Norman Degardin², Jennifer Samaillie¹, David Mathiron³, Franck Michels¹, Marie-Laure Fauconnier¹, Sylvie Chollet¹, Roland Molinié¹, Jean-Xavier Fontaine¹, Sevser Sahpaz¹, Céline Rivière^{1*}

¹BioEcoAgro, Joint Research Unit 1158, Univ. Lille, INRAE, Univ. Liège, UPJV, YNCREA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ICV—Institut Charles Viollette, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

² Lycée Biotech Douai - Campus Wagnonville, 458 Rue de la Motte Julien, 59500 Douai, France

³ Université Picardie Jules Verne, Plateforme analytique, Rue Dallery – Passage du sourire d'Avril, 80039 Amiens cedex, France

Abstract: Hop is a dioecious plant historically cultivated and used in brewery in the north of France. In the current context of developing more aromatic beers, we are interested in the potential of wild hops. For this purpose, we have previously constituted a collection of wild accessions collected in the north of France with a high level of genetic diversity. This study aims to carry out a chemical characterization of cones of 39 of these accessions, as well as 10 commercial and 3 old varieties, using HS-SPME GC-MS for the volatile compounds, UHPLC-UV for quantification of phenolic compounds and UHPLC-IMS-Qtof for untargeted metabolomics. These analyses revealed a strong opposition between wild accessions and reference varieties. We also performed 27 beers, analysed by SBSE GC-MS, with the same beer recipe, whose unique difference relates to the hops to be evaluated. These beers were evaluated by a panel to determine the aromatic potential of these hops. Different datasets obtained were compared by OPLS-DA multiblock analysis, to identify chemical markers which may influence the aromatic potential of hops.

Keywords: *Humulus lupulus* L.; wild hops; chemodiversity; sensory analysis; multivariate analysis

1. Introduction

Beer is a fermented drink, traditionally flavoured with hop since the middle age. In Germany, the addition of hops alone in beer craft has been imposed since 1516 by a former food decree named *Reinheitsgebot* (Eble & de Vries, 2018). Hops are added to the wort for its bitterness and its aromatic originality as well as for its antiseptic properties, linked to their original chemical composition (De Keukeleire et al., 1992). These female inflorescences, commonly mentioned as hop cones or hops, produce in lupulin glands original phenolic compounds, including prenylated chalcones as xanthohumol and desmethylxanthohumol and acylphloroglucinol derivatives (α -acids or humulone derivatives and β -acids or lupulone derivatives). Hop essential oil is also rich in non-oxygenated monoterpenes and sesquiterpenes, among them β -myrcene, α -humulene and β -caryophyllene (Bocquet et al., 2018a). When bittering hops are added to the wort during the boiling, α -acids are isomerized into iso- α -acids, in *cis* or *trans* position (Schönberger & Kostelecky, 2011) and provide to the beer until 80% of its bitterness (De Keukeleire et al., 1992). By contrast, aromatic hops are rather added to the wort at the end of the boiling or after, to minimise the evaporation of their volatile compounds (Sharpe & Laws, 1981). Monoterpenes and sesquiterpenes are considered to be responsible for the “hoppy” aroma of beer (Goiris et al., 2002; Kishimoto et al., 2005; Van Opstaele et al., 2010). α -humulene and β -caryophyllene can impart spicy and woody notes to beer in particular due to the formation of oxygenated derivatives during wort boiling. β -myrcene, an important contributor to fresh hop aroma, is largely lost during beer processing except in dry hopping, but oxygenated derivatives formed can contribute to the fragrance. Among other terpenoids, alcohol monoterpenes (linalool, geraniol, β -citronellol, α -terpineol) provide floral and citrus notes to beer (Rettberg et al., 2018). Also, not citrus fruity aromas can be attributed to the presence of some esters, such as ethyl-3-methylbutanoate, whereas aldehydes, such as hexanal confer grassy fragrances to the beer (Machado et al., 2021; Biendl et al., 2014). Perception of hop volatile compounds after brewing remains complex. Interactions between hop volatile compounds and other beer components (ethanol, carbohydrates, yeast, hop bitter acids...), combined to oxidation phenomena, require a thorough investigation to understand their resulting effects on the final sensory profile of beer (Dietz et al., 2020). Hops also play a role in the characteristics and stabilisation of the foam (De Keukeleire et al., 1992).

The hydroxyl group of the isohumulone acts as a surfactant, which helps to strengthen the electrostatic bonds between the bubbles and thus stabilises the foam (Asano & Hashimoto 1980). Different types of beer exist, and can be characterised by their colour (EBC: European Brewery Convention), their bitterness (IBU: bitterness unit) or their Plato degree, that is to say the concentration of dissolved solids in the drink (Faiveley, 2020).

North of France is an historical region for beer craft and hop production. In the beginning of the XXth century, 1220 ha of hops and nearly 2,000 breweries were inventoried in the region (Ducloux et al., 1910). If the beer production remains important (around 6 Bn hL in 2020), the hop production as for it clearly decreased during the XXth century, to reach only 35 ha today (Bart-Haas Group, 2021). This decline can be explained by the socio-economical context of the last century, because French brewers have started to import hops from the USA or Germany. However, since a decade, in the context of the “beer craft movement”, current brewers are looking for local and aromatic hops from sustainable or organic agriculture (Paguet et al., 2022). In this context, our project aims to investigate the diversity of wild hops, in particular coming from Northern France, that can be used to support a future varietal development (McCallum et al., 2019; Paguet et al., 2022). In a previous study, we investigated the genetic and chemical diversity of 50 wild hop accessions collected *in-situ* from eleven natural sites of the North of France (Hauts-de-France region) (Paguet et al., submitted). These wild accessions were compared to ten commercial varieties and three old varieties coming from the same region for their genetic and chemical characteristics. This study underlined a high genetic diversity and chemical variability among wild accessions. During collection of samples, rhizomes were also collected and transplanted into our experimental field to get a germplasm resource. The study of these accessions in *ex-situ* conditions allowed us to analyse the chemical diversity of this collection under more standardised conditions. The more productive accessions were used for the production of beers using the same beer style (lager style). The only difference in the recipe was the aromatic hops, with wild or commercial origin. The beers were subjected to a sensory study in order to highlight the aromatic traits of these hops after brewing. Recently, Machado et al. (2021) have studied the aromatic qualities of wild hops on dry-hopped beers. Hong et al. (2022) evaluated, using partial least-squares discriminant analysis, the link

between chemical characteristics of cones and their influence in hop-tea or after brewing.

The present study aimed to explore the chemical composition of wild hops grown in *ex-situ* conditions, as well as their aromatic potential, before and after brewing. This study combined analytical methods (HS-SPME GC-MS, SBSE GC-MS, UHPLC-UV and UHPLC-HRMS-Qtof) for hops and beer characterization, sensory evaluation and multiple statistical methods (heatmap, principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA)) to explore the relationship between wild hops chemical composition and beer aroma.

2. Material and methods

2.1. Samples

2.1.1. Hop collection.

In September 2019, we collected 50 wild hops coming from 11 different locations with ecological or ethnobotanical interests (Paguet et al., 2022, submitted). The rhizomes of these accessions had also been collected and transplanted in November 2019 into our experimental hop field (Ferme brasserie Wagnonville, Douai, France). The present study² on the chemical characterization of hop accessions that have produced cones in sufficient quantity for brewing. Cones were collected at their maturity (80% humidity) in September 2021, oven-dried at a temperature below 40°C until they reached a moisture content of 10% and then stored under vacuum at -20°C before being used for analysis. These wild accessions cultivated in field conditions were compared to 10 commercial cultivars grown in the North of France region. They were selected among the ten most relevant varieties, including so-called top hops used by craft brewers, such as Brewers gold, Cascade, Challenger, Fuggles, Goldings, Magnum, Northern Brewer, Nugget, Strisselspalt and Target. Cones of commercial hops, collected in September 2021, were provided by the Northern France Hop Cooperative, Coophounord (Bailleul, France). They were also compared to three old varieties collected the same year. Three genbank clones representing former Flander cultivars were included: Groene Bel, Coigneau, and Record, coming from Belgium (Hoppecruyt, Poperinge, Belgium). Hop cones dried and kept vacuum-packed in cold storage were grounded in liquid nitrogen using a blender IKA A11 (Staufen, Germany) before being used for extraction.

2.1.2. Beer samples: Brewing processes.

To investigate the aromatic potential of these wild hop accessions after brewing, the 17 more productive hop of our collection were brewed, according to a recipe of blond Pils, for chemical characterization and sensory evaluation. These beers were compared to beers elaborated with 2 old varieties (Groene Bel and Record) and seven commercial varieties (Nugget, Strisselspalt, Cascade, Magnum, Brewers Gold, Target and Northern Brewers. The mash was brewed in 60 L in mash-in with 13 kg of Pilsen malt (La Malterie du Château, Beloeil, Belgium) at 67°C for 1 hour and 15 minutes and filtered. Afterwards, the wort was boiled and 30 grams of bittering hops cv. Magnum in pellets (Coophounord, Bailleul, France) were added 10 minutes after the beginning of boiling. After boiling, the wort was divided into 6 brew test of 10 L each for aroma hopping. 50 grams of dried hops to evaluate, the only ingredient differentiating the brews, were added. A beer control without aromatic hop was also performed. Aromatic hops were added after the boiling step in infusion during the intonation for 20 min (steeping/whirlpool hops mode). After cooling, fermentation took place at atmospheric pressure at 10°C (low fermentation) for one week, with *Saccharomyces cerevisiae* LalBrew Nottingham yeasts (Lallemand Brewing, Felixstowe, United Kingdom). Lagering was carried out at 4°C for 10 °C. The beers were then racked in bottles, without filtration or pasteurisation.

2.2. Chemical analysis

2.2.1. Volatile compound analysis

2.2.1.1. Volatile compound analysis in hops by HS-SPME GC-MS. Extraction of volatile compounds by HS-SPME was reached using a 50/30µm DVB/CAR/PDMS (Supelco, Bellefonte, PA, USA) fiber that was preconditioned according to the instructions of the manufacturer. This triple-phase fiber coating with mixed polarity was chosen because many studies have shown that volatile compounds in hop have a good adsorbance on it (Burgot, 2019). Extraction was done on 2 grams of hop cone powder placed in a vial incubated at 45°C for 5 min. We used the same chromatographic conditions as those detailed in Paguet et al., 2022 (submitted).

2.2.1.2. Beer analysis by SBSE GC-MS. 10 mL of beer samples has been taken and placed in a vial with 2 grams of NaCl (VWR, France) adding a stir bar (10mm x 0.5mm) with PDMS coating (RI Chrom) and stirring for 120 min at 1000 rpm. Some samples were analysed twice on two different bottles, to ensure the inter-bottle repeatability. After extraction, the stir bar was rinsed with some distilled water, dipped on a filter paper and introduced in a glass

thermal desorption tube (4 mm i.d. x 178 mm L). The stir bar was then placed in the thermal desorption unit an Agilent 7890 coupled to an Agilent 5975 C mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a MPS auto-sampler and a HP-5 MS capillary column (30 m x 250 μ m x 0.25 μ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.2 mL/min. The oven was programmed as follows: initial temperature of column of 40°C with a hold of 2 minutes; then increased by 6°C/min to 300°C, where it was maintained for 5 min. Stir bars were thermally desorbed by programming the system from 40°C to 260°C with a rate of 6°C/min and held at this temperature for 5 min. The desorbed analytes were cryofocused at -10°C. Injection was performed in the splitless mode.

2.2.1.3. Volatile compound identification. MassHunter Version B.06.00 (Agilent Technologies) was used for data acquisition and processing. General volatile compound profiles were established through a chromatographic deconvolution process (Agilent MassHunter Unknowns Analysis) and chromatographic areas were obtained for each volatile compound. Identification of the individual components was based on: (a) comparison of the obtained mass spectrum (MS) to those of commercial databases: National Institute of Standards and Technology (NIST17) and Wiley7 (match factor threshold > 700); (b) comparison of the retention index (RI) of each peak with literature RI data (\pm 20) from the NIST WebBook. Experimental retention index (RI) of the compounds were calculated following the injection of a mixture of n-alkanes C8-C20 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany). They were first reported as a percentage of the total chromatographic area on Excel (Microsoft Excel 2016) to allow a general analysis.

2.2.2. Analysis of non-volatile compounds

2.2.2.1. Sample preparation. For each hop studied, hydro-ethanolic extracts were performed on 50 mg of dried cone powder with 1 mL of ethanol-water mixture (9:1, v/v). A one-hour maceration session was carried out in an ultrasonic bath for one hour. Afterwards, tubes were centrifuged at 4000 rpm at 20°C for 5 min. Supernatant was then transferred in a tared tube. The exhausted matrix was then re-extracted two times more following the same protocol and each time the supernatant was pooled with the first extract. At the end of the three maceration sessions, extracts were then evaporated in a centrifugal concentrator Genevac™. Extracts were diluted at 1 mg/mL in methanol (Carlo Erba), and filtered through 0.22 μ m PTFE membrane and placed in glass vials for further LC-MS analysis. Quality

control (QC) samples were prepared by pooling 10 μ L from each sample of the same round preparation and thoroughly mixed.

2.2.2.2. Setting up and validation of the quantification method of main phenolic compounds. Quantification of xanthohumol, *co*-, *n*- and *ad*-humulone, *co*-, *n*- and *ad*-lupulone in each hydro-ethanolic extract was performed on an Acquity UPLC® H-Class Waters® system (Waters, Guyancourt, France) coupled with a Diode Array Detector (DAD) and a QDa ESI-Quadrupole Mass Spectrometer. Separation was achieved using a Waters® Acquity BEH C18 column (pore size 300 Å, particle size 1.7 μ m, 2.1 x 150 mm, Waters, Milford MA) connected to a 0.2 μ m in-line filter. Column temperature was set at 30 °C. Solvent A (water with 0.1% formic acid (v/v)) and solvent B (acetonitrile with 0.1% formic acid (v/v)) were used as mobile phases. Compounds were eluted using the following chromatographic conditions: the flow rate was 0.3 mL/min; the column temperature was set at 40°C; the injection volume was 2 μ L. The gradient elution was performed using eluent A and eluent B: initial condition at 50% B, 0-1 min isocratic step, 1-3 min linear gradient to 75% B, 3-5 min isocratic step at 75% B, 7-9 min linear gradient to 100% B, 7-9 min isocratic step at 100% B, 9-9.5 min linear gradient to 50% B, 9.5–13 min isocratic step at 50% B (total analysis time: 13 min). Chromatograms were acquired at 330 and 370 nm. The ionization was performed in negative mode. Cone voltage was set at 10 V. Probe temperature was 600 °C. Capillary voltage was 0.8 kV. The MS-Scan mode was used from 100 to 1000 Da. Xanthohumol and acylphloroglucinol derivatives were quantified according to The International Conference for Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use guideline Q2-R1 (ICH, 2005). Quantification was performed in UV at 370 nm for xanthohumol and 330 nm for acylphloroglucinols. The quantitation method was set up using standards purified in the laboratory according to the protocol detailed by (Bocquet et al., 2019) and following the methodology detailed in Paguet et al., 2022 (submitted). *Ad*-humulone and *ad*-lupulone were also quantified by the establishment of calibration range using standards purified in the same way as the one detailed in Bocquet et al. (2019) for *n*- and *ad*- humulone and lupulone. The quantitation of each compound was performed in five technical replicates. QC samples were analysed regularly along with unknown samples. To reduce the effects of systematic errors, all samples were assigned to a random LC-MS run order and interspersed after every 20 injections with QC sample injections. Xanthohumol and α - and β -acids were identified

based on the retention time of purified standards and their mass spectra and quantitated using the quantitation methods of previously set up on the Empower software. Data were exported from Empower to Excel (Microsoft Excel 2016).

2.2.2.3. UPLC-IMS-Qtof analysis. UPLC-MS analysis were performed using a Waters ACQUITY UPLC I-Class system interfaced with a Vion IMS Q-TOF (Ion Mobility Quadrupole Time-of-flight) hybrid mass spectrometer, equipped with an electrospray ionisation (ESI) source (Waters, Manchester, UK). The autosampler was programmed to inject 2 μ L of each sample. Chromatographic separation of the analytes was carried out using the same column, a Waters® Acquity BEH C18 column (2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m) connected to a 0.2 μ m in-line filter maintained at 40°C. The UPLC method was carried out following the same protocol and procedure described previously for the quantification. For HRMS, the ESI parameters were set as follows: capillary voltage, 3 kV in negative mode; source temperature, 120°C; desolvation temperature of 450°C. Time-of-flight (TOF) MS was operated in sensitive mode. The data were acquired in high-definition MS^E (HDMS^E) over a mass range of m/z 50-1200 at a mass resolving power of 50,000 FWHM and a scan time of 0.2 s. Spectra were acquired and processed with the UNIFI software (version 1.9.4, Waters), allowing to generate the data matrix with default parameters comprising the retention time, mass-to-charge ratio (m/z) values, and peak intensity. The untargeted metabolomics data matrix was cleaned by removing the variables with a significant variance (>35%) in the quality control (QC) and the variables present in the blank. A minimum intensity threshold was chosen at 500 to keep the variable. Metabolites were principally identified by matching the accurate masses, retention times and fragmentation patterns with those of the reference standards and literature references. Supplementary analyses in DDA mode were done, with a collision energy of 20 keV on QC to perform dereplication analysis on UNIFI and MassLynx (version 4.1, Waters) softwares.

2.3. Beer characterization

2.3.1. Physico-chemical characterization of beers.

Beers were characterised according to different physico-chemical parameters following the American Society of Brewing Chemists recommendations (1992). Samples were preliminarily degassed by agitation in the open air. (i) *Beer colour (EBC)*. Beer colour was determined by an official method from ASBC, in which the absorbance of beer samples was measured at 430 nm using a spectrophotometer UV-1280 (Shimadzu, France). EBC was obtained

following equations: $EBC = 50 \cdot D \cdot Abs_{430nm}$, where D is the dilution factor, and Abs_{430nm} the absorbance at 430 nm. (ii) *Bitterness dosage (IBU)*. Bitterness was determined following Kawa- Rygielska et al., (2019) method: 10 mL of beer sample was added to 1 mL of HCl and 20 mL of iso-octane. Tubes were stirred for 15 min and centrifuged at 1880 G for 3 min. The supernatant was measured at 275 nm against a blank control (pure iso-octane) with a spectrophotometer UV-1280 (Shimadzu, France). IBU values were obtained as follows: $IBU = Abs_{275nm} \cdot 50$ where IBU is the International Bitterness Unit, and Abs_{275nm} is the absorbance at 275 nm. (iii) *Determination of total acidity*. Acidity of beer is considered as mainly due to the presence of malic acid, measured by acid-base titration with soda NaCl 0.1 M, using phenolphthalein as indicator of equivalence. (iv) *Worth density and alcohol content*. Worth density (expressed in °Plato) and alcohol content (% v/v) were measured with a densimeter Alex 500 (Anton Paar, France) on 50 mL of beer sample vacuum filtered through Kieselguhr. Repetability of bottles was tested using a Student test.

2.3.2. Sensory experiments

2.3.2.1. Panel training. 21 trained subjects (13 men and 8 women) were enrolled in a training program designed to produce beer experts. They were trained 1h a week to describe beers on seventeen descriptors (intensity of the smell, hoppy smell, malty smell, fruity smell, intensity of taste, acid, bitter, floral, hops, citrus, malt, sweet, spicy, red fruits, yellow fruits, astringent and bitter persistence) in beer and to evaluate the intensity of these descriptors on a non-structured linear scale. These descriptors have been chosen in the literature and were recalled by the panellists during vocabulary generation sessions. At the time of the experiment, these subjects had already received 12 hours of training. At this point, they should have developed a consensual vocabulary, along with the ability to detect the descriptors on which they have been trained.

2.3.2.2. Procedure. The assessors evaluated the 26 beer samples (17 with wild hops, 7 with commercial varieties, 2 with old varieties) in duplicate during 12 sessions under standard sensory conditions (ISO, 2016). Samples were presented in glasses and 20 mL were served between 8 and 10°C, in a sequential monadic way. Their presentation order was different for each assessor and based on a Williams' Latin-square arrangement. Subjects had to evaluate beers on the 17 descriptors according to a non-structured linear scale from 0 to 10 using FIZZ software (Biosystemes, Dijon, France). The most significant descriptors were chosen with three factors ANOVA (on products, repetitions and panellists), measuring the p -value on the interaction panellist*product.

2.4. Data analysis

For each simple dataset obtained, data were compiled into an Excel sheet. Statistical analysis as Principal Component Analysis (PCA) for quantitation of prenylated phenolic compounds, untargeted metabolomics and sensory analysis, Agglomerative Hierarchical Clustering (AHC) for composition of volatile compounds and sensory analysis, as well as heatmaps for composition of volatile compounds and quantitation of phenolic compounds were obtained using XLStat (Addinsoft, 2022). On the quantitation triplicate, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test with $p < 0.05$ was conducted using XLStat (Addinsoft, 2022). Statistical tests for the verification of the inter-bottles repeatability and the choice of the selection of the most significant descriptors were achieved using the statistical tests on XLStat (Addinsoft, 2022).

For multivariate analyses, OPLS-DA model was performed using MATLAB R2014a (MathWorks, Natick, MA) software. In the OPLS method, the systematic variations in X were separated into two parts; one that is linear to Y and the other is orthogonal to Y (Trygg & Wold, 2002; Boccard & Rutledge, 2013). Hence, the OPLS model comprises two blocks of model variations: 1) the Y-predictive block, which represents the variation between the classes, and 2) the Y-orthogonal block also referred to the uncorrelated variation, which constitutes the within class variation (Bylesjö et al., 2007). OPLS-DA is a multivariate statistical method for regression modelling of multiple dependent variables to multiple independent variables, which can accurately determine the key variables that affect the group (Triba et al., 2015).

3. Results

3.1. Chemical characterization of cones

3.1.1. Volatile compound analysis by HS-SPME GC-MS. The putative identification of volatile compounds by HS-SPME GC-MS revealed the presence of 65 different compounds among all studied hops. 36 compounds were detected at least 1% in one accession. This volatile compound analysis was represented by a heatmap and a dendrogram (**Figure 1**). The majority of these compounds were monoterpenes or sesquiterpenes (**Figure S4**). In particular, we identified β -caryophyllene, β -myrcene and α -humulene, known as the main volatile compounds of hops, in all accessions characterised (**Figure 1A**). The dendrogram associated with the AHC (**Figure 1B**) distinguished 4 different classes of

accessions according to their content of volatile compounds. The blue cluster was mainly composed of commercial and old cultivars² wild accessions I3 and G2. These accessions were characterised by a high content of the main hop volatile compounds, as α -humulene, β -myrcene and β -caryophyllene. In **Figure 1B**, we then noted that the commercial accessions Cascade, Fuggle and Strisselspalt, known for their aromatic characteristics, were distributed in different clusters from other commercial accessions known for their bitter potential. The purple cluster, Strisselspalt, showed a high level of other volatile compounds, such as limonene, germacrene and β -elemene. The green and purple classes, represented by different accessions, both wild, old and commercial, as well as the red class, only composed of few wild accessions, showed a lower content of these non oxygenated terpenes. By contrast, they showed higher contents of minor volatile compounds that were not taken into account in this qualitative classification as γ -muurolene (for B4 and H4 in the purple cluster) or α -cedrol (for I8 in the green one), known for their woody aromas (**Table S4**). We also identified the presence of some particular sesquiterpenes in both wild and commercial accessions, such as α -bergamotene (in Cascade, Fuggle, H2, H3 and I8) or β -farnesene, α - and β -selinene, or even β - and γ - elemene mostly present in wild accessions (**Figure 1A**).

3.1.2. Quantification of main phenolic compounds by UPLC-UV. UHPLC analysis revealed the presence of 7 main peaks at the retention times 2.76, 4.35, 4.73, 4.83, 6.26, 6.87 and 7.00 minutes attributed to xanthohumol (XN), α -acids (*co*-, *n*-, *ad*-humulone) and β -acids (*co*-, *n*-, *ad*-lupulone) respectively. This attribution was based both on their retention times compared with those of the standards purified in the laboratory and on their mass spectra. Xanthohumol, *co*-humulone, *n*-humulone, *ad*-humulone, *co*-lupulone, *n*-lupulone and *ad*-lupulone were then quantified in 52 crude extracts of cone samples using the quantitation method setting up by UHPLC-UV. Acceptable linearity was observed for each compound over the concentration range used for calibration (**Table S5**). Evaluation of the recovery data of the quantitation method showed acceptable intra and inter-day precisions for xanthohumol (RSD % = 18.64, 13.69), *co*-humulone (RSD % = 13.13, 6.40), *n*-humulone (RSD % = 4.01, 2.55), *ad*-humulone (RSD % = 15.55, 16.58), *co*-lupulone (RSD % = 10.19, 11.17), *n*-lupulone (RSD % = 16.12, 9.7) and *ad*-lupulone (RSD % = 15.15, 16.68). Results were expressed in $\mu\text{g/mL}$. Statistical analysis with a Tukey's test revealed significant differences among hop samples in terms of composition in phenolic compounds (**Table S6**). Overall,

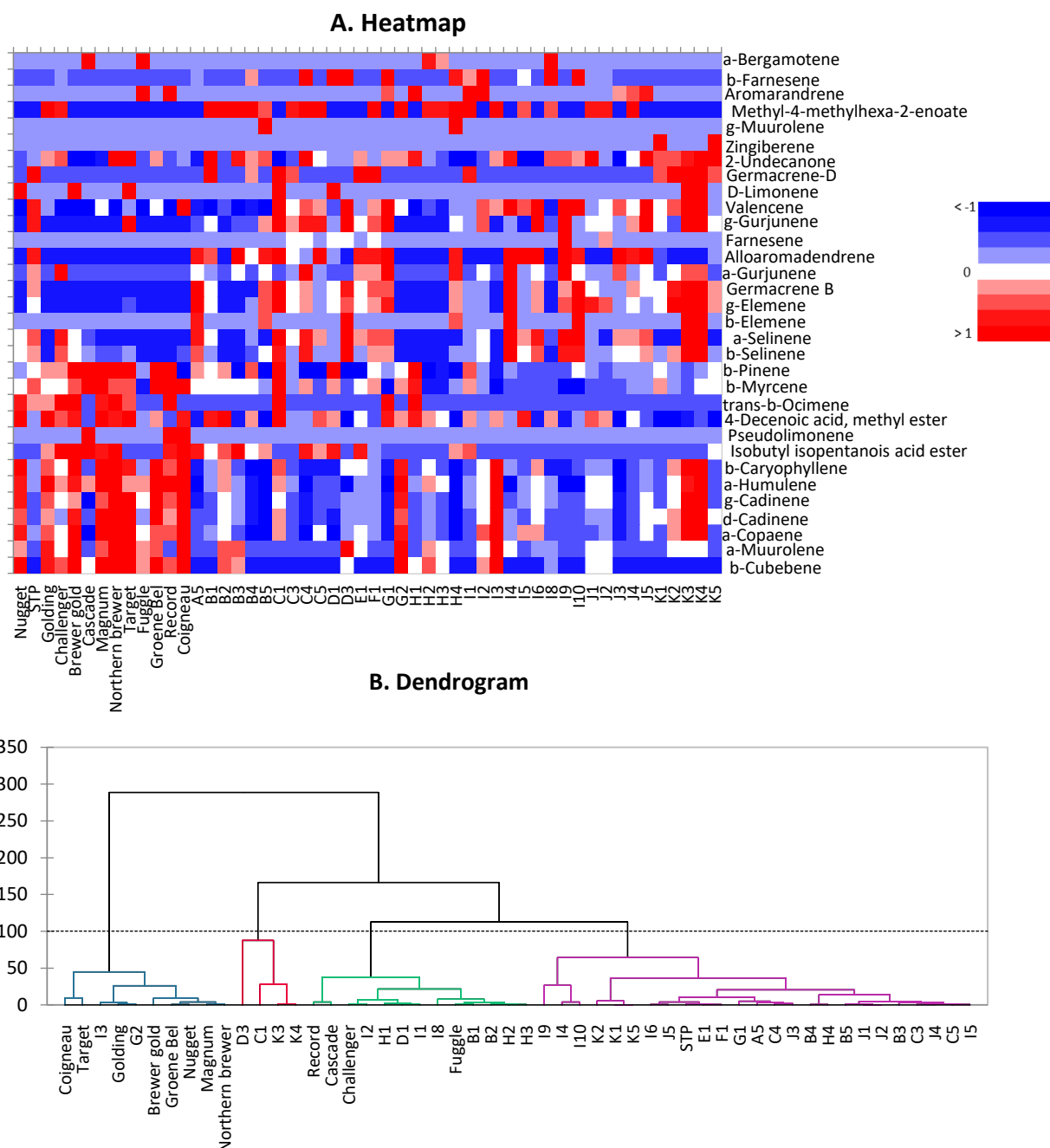


Figure 1. Volatile compounds analysis by HS-SPME GC-MS based on the 36 compounds detected at least 1% in one accession.
A. Heatmap generated with normalized data for the top 36 molecules responsible for the differences between the profiles.
B. Dendrogram associated to the AHC (Ward's method, $n=4$).

commercial varieties showed a higher content of *n*-humulone, *ad*-humulone and xanthohumol, which may assert their bitter potential, unlike in wild accessions which produced more β -acids. Nevertheless, the varieties Strisselspalt and Target were distinguished by low contents of phenolic compounds than other commercial varieties. On the other side, some wild hops showed higher levels than commercial varieties. In the detail, higher contents in xanthohumol, *co*-, *n*-, and *ad*-humulone and *co*-, *n*-, and *ad*-lupulone were observed for the accessions Coigneau (8.1 $\mu\text{g/mL}$), Groene Bel (24.1 $\mu\text{g/mL}$), Nugget (28.1 $\mu\text{g/mL}$), Nugget (12.2 $\mu\text{g/mL}$), Groene

Bel (21.5 $\mu\text{g/mL}$), Groene Bel (24.1 $\mu\text{g/mL}$) and Groene Bel (17.3 $\mu\text{g/mL}$) respectively. Lower contents were observed for C1 (1.3 $\mu\text{g/mL}$), C5 (4.945 $\mu\text{g/mL}$), K4 (2.5 $\mu\text{g/mL}$), K4 (1.2 $\mu\text{g/mL}$), I5 (5.6 $\mu\text{g/mL}$), C5 (4.9 $\mu\text{g/mL}$), I5 (3.2 $\mu\text{g/mL}$) respectively (**Figure 2A and Table S6**). **Figure 2A** thus revealed low contents of humulone for wild hops compared to commercial varieties. Some exceptions were noted for the wild hops G2, B3, D3, I1 and I3 that showed contents of humulone similar to commercial or old cultivars (16.4 $\mu\text{g/mL}$ to 28.7 $\mu\text{g/mL}$). Wild hops also showed low contents of *ad*-humulone and xanthohumol. By contrast, most wild

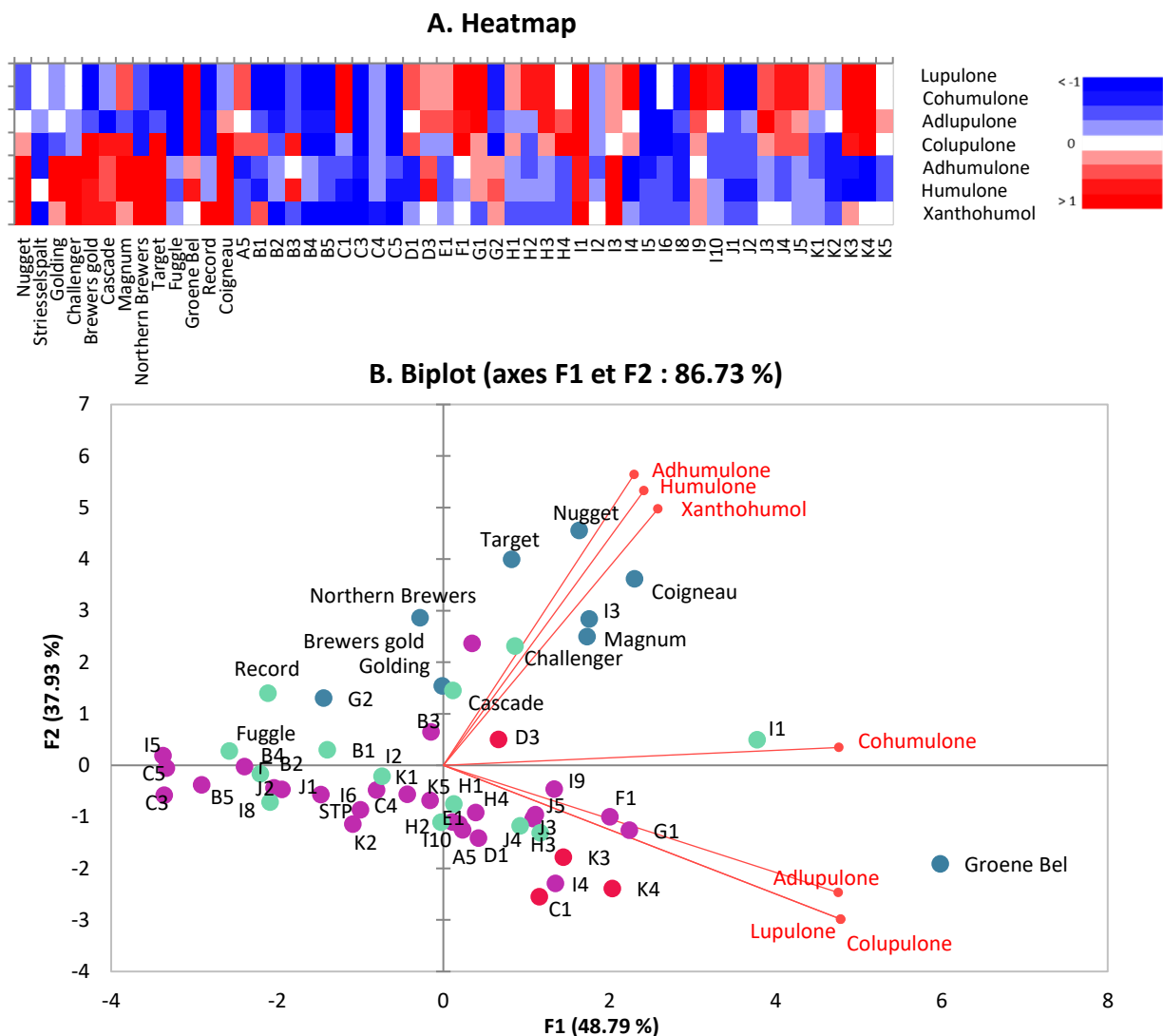


Figure 2. Quantification of prenylated phenolic compounds by UPLC-UV. A: Heatmap; B: PCA biplot for dimensions 1 and 2 based on data of the quantitation. Individuals were colored according to their previous clusterisation regarding their composition in volatile compounds.

accessions had levels of *co*-humulone and β -acids not negligible. These phenolic compounds will have a different impact on bitterness. The output process of the quantification represented in the form of PCA (**Figure 2B**) revealed a good explanation of the distribution of variables, equal to 86.73%, with a contribution of PC1 and PC2 equal to 48.79 % and 37.93 % respectively. Moreover, the biplot clearly revealed a good correlation between α -acid and xanthohumol contents on one side (except for *co*-humulone) and β -acid contents on the other side. According to this figure, most of the commercial and old varieties had higher contents in *n*-humulone, *ad*-humulone and xanthohumol. On the contrary, wild hops (Locations A to K) and the old variety Groene Bel showed higher β -acid contents (*co*-, *n*- and *ad*-lupulone). For *co*-humulone, the distinction is less clear. The strong separation between commercial cultivars and wild hops was also illustrated by the dendrogram (**Figure S7**). The coloration of the accessions, on the biplot and on the dendrogram,

based on their clustering previously obtained with their composition in volatile compounds allowed us to evaluate the composition both in main phenolic compounds and in volatile compounds. Except for the old variety Groene Bel, this new biplot showed that the accessions were globally grouped according to their colour, and therefore according to their composition in volatile compounds (**Figure 2B**). This study also underlined that the accession I3 had a chemical composition very close to those of commercial varieties because it belonged to the same cluster both for GC-MS analysis and quantification by UHPLC-UV (**Figure S7**).

3.2.2.3. *Dereplication and untargeted metabolomics by UPLC-HRMS.* From 164 601 variables acquired, we finally kept 262 variables (160 variables from 1 to 7 min) after cleaning the matrix. From these 160 variables, 15 compounds were identified based on previous works including Farag et al., (2012) and Nicácio et al., (2022). These partially annotated metabolites were classified as putative

MS/MS annotations and one compound was labeled as an unknown compound (**Figure 3A**). Among them, the 7 compounds previously quantified (xanthohumol, *co*-, *n*- and *ad*-humulone and *co*-, *n*- and *ad*-lupulone) were also identified using PDA spectrum and retention times. As presented in the **Table S8** and on the **Figure 3C**, different classes of metabolites were represented, in particular chalcones

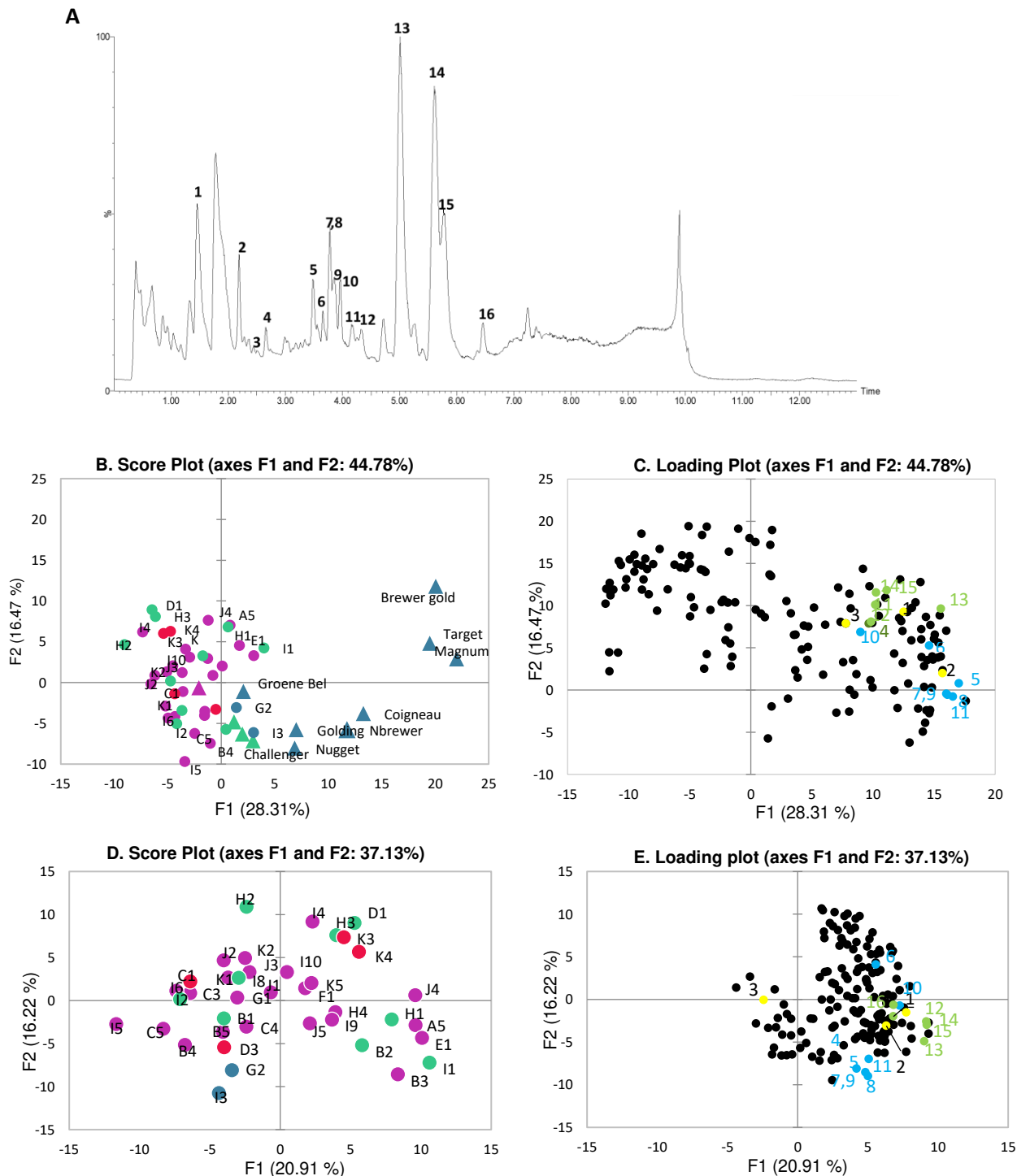


Figure 3. Dereplication and untargeted metabolomics obtained in negative mode by UPLC-HRMS. **A:** annotated TIC of the QC; **B:** loading plot of the 52 individuals. Individuals were colored according to their previous clusterisation regarding their composition in volatile compounds, old and commercial varieties represented by a triangle; **C:** loading plot of the chemical markers; **D:** loading plot of the chemical markers for the wild accessions; **E:** loading plot of the chemical markers for the wild accessions. Identification of the chemical compounds by dereplication: 1 = Desmethylxanthohumol, 2 = Xanthohumol, 3 = Isoxanthohumol, 4 = Unknown, 5 = Cohumulone, 6 = 4-Deoxycohumulone or adhumulone, 7 = Humulone, 8 = Humulinone, 9 = Adhumulone, 10 = Deoxyhumulone, 11 = Préhumulone, 12 = Postlupulone, 13 = Colupulone, 14 = Lupulone, 15 = Adlupulone, 16 = Prelupulone.

and flavanones (desmethylxanthohumol (1), xanthohumol (2), isoxanthohumol (3)), as well as acylphloroglucinol derivatives including α -acids and oxidized derivatives (cohumulone (5), 4-deoxycohumulone (6), humulone (7), humulinone (8), adhumulone (9), deoxyhumulone (10), préhumulone(11)) and β -acids (postlupulone (12), colupulone (13), lupulone (14), adlupulone (15), prelupulone (16)). **Figures 3B and C** showed the PCA score plots for data acquired in MS in negative ion mode corresponding to the UPLC retention times ranging from 1 to 7 min. Considering the two principal components, we explained 44.78% of the variance distributed as follows: 28.31% for the PC1 and 16.47% for the PC2. On **Figure 3B**, individuals were again colored according to their composition in volatile compounds after the HAC. Thus, we noted that we globally had the same repartition of blue varieties after PCA treatment on the LC-MS data; while accessions from other groups were more mixed. The identification of some compounds on **Figure 3C** can provide some explanations to this distribution. Individuals belonging to the first cluster colored in blue, which gathered most of the commercial and old varieties (in triangle), globally showed higher contents in α - and β -acids. **Figure 3C** also highlighted that chemical families, including chalcones, α - and β -acids, were close on the loading plot. These results therefore allowed the identification of some accessions with high contents of α -acids, not only in *co*-, *n*- and *ad*-humulone previously quantified. We have previously identified two accessions, I3 and G2, with a composition in volatile compounds and α -acids close to those of commercial varieties. The **Figures 3D and 3E**, only focused on wild accessions, confirmed the high content of α -acid derivatives in these two accessions. These figures also allowed us to better compare wild accessions to each other. It hence appeared that wild accessions, with a composition in volatile compounds close to those of commercial varieties (in red and in blue), had a lower content of acylphloroglucinol derivatives, B3, I1 or H1, had a higher content of these compounds. However, it would be relevant to continue the identification of the chemical markers located at the top of PC2 and which differentiate while some wild accessions, as the accessions A5, B2, several wild individuals. The distribution of individuals on the loading plot was strongly different from the biplot of the quantification (**Figure 2B**), and the explanation of the variance was relatively weak (less than 50%), thereby reflecting the high chemical diversity of the accessions studied.

3.2. Chemical characterisation after brewing: beer analysis and sensory analysis

Once these hop accessions have been chemically characterised, we were interested in their aromatic and gustative potential after brewing by sensory analysis. The beers elaborated according to a same base beer style (lager) and with the different hops to evaluate were first characterised by physico-chemical analysis before being tasted by a panel. The main objective of these analyses was to characterise the matrix and to ensure the homogeneity of the batches tasted by the panellists.

3.2.1. Physico-chemical analysis. Physico-chemical characterizations were based on a measurement of IBU, EBC, alcohol content, residual sugars and total acidity. These analyses revealed IBUs ranging from 13.1 (Cascade) to 38.2 (Magnum); EBC from 8.2 (H2) to 20.8 (H1); alcohol content from 4.69 (F1) to 6.6 (Groene Bel) %v/v; residual sugars from 1.27 (Nugget) to 2.3°P (B3); total acidity from 4.1 (G1) to 8.1 (Northern Brewers) (**Table S9**). Higher IBUs were measured for beers brewed with commercial bittering hops (Brewers Gold, Magnum and Northern Brewers), while beers brewed with wild hops had IBUs comparable to those of beers brewed with commercial aromatic hops (Striesselspalt, Challenger and Target). EBCs measured were those of a Lager beer, according to the Pilsen malt used. Alcohol content, total acid concentration and density were not statistically influenced by the hop used for the brewing. Furthermore, student test ($P = 0.95$) revealed no significant differences between bottles of a same batch for alcohol, colour and residual sugars (with P -value respectively equal to 0.282, 0.618 and 0.223), while for total acidity, P -value was less than 0.0001, which indicated a high level of variability among bottles from a same batch (**Table S10**).

3.2.2. Analysis of volatile compounds by SBSE GC-MS. In total, 180 volatile compounds were identified by SBSE GC-MS in beer samples. These compounds were mainly represented by the ester chemical class (**Figure S11**). We also detected some sesquiterpenes, as α -humulene, β -caryophyllene, α -, β -, γ - and δ -selinene and alloaromadendrene (**Table S12**) previously identified in hop cones. Some monoterpenes, such as citronellol, were detected in beers but were not found in cones. The analysis of the beer brewed without aromatic hop revealed the quasi absence of terpenoids in this sample, and thus confirmed that terpenes and their derivatives present in other beer samples could come from hop tested. The accession I3 that had a chemical composition very close to those of commercial varieties was also evaluated for its organoleptic potential in beer. Lastly, analysis on several different bottles from the same

batch revealed a similar composition in volatile compounds and thus confirmed the homogeneity of the flavours of the beers tasted by the panellists, even if they come from different bottles.

3.2.3. *Sensory results.* On the 17 descriptors on which the panel has been trained, we finally retained nine descriptors which were significant (p -value <0.05%) (Table S14). These descriptors were: hoppy smell, fruity smell, intensity of the taste, malt, hops, citrus, yellow fruits, bitter taste and bitter persistence. To process data by PCA, we kept the first two principal components explaining 75.06 % of the variance, and we considered the beer brewed with no aromatic hop as a supplementary observation (Figure

4A). PC1 (56.27% of the variance explained) translated the intensity of the taste, bitter taste, bitter persistence, fruity smell, yellow fruits, and hoppy taste and smell; while PC2 (18.79%) translated the citrus and malt tastes (Figure 4B). The Figures 4A and 4B highlighted the bitter taste of beers brewed with so-called bitter commercial varieties (such as Northern Brewers, Magnum, Brewers Gold or Target) which had previously revealed high α -acid levels. The HAC (Figure 4C) clearly opposed the cluster made of beers brewed with commercial varieties on one side (in blue) and another cluster composed of beers brewed with wild accessions on the other side (in red). The clear separation already

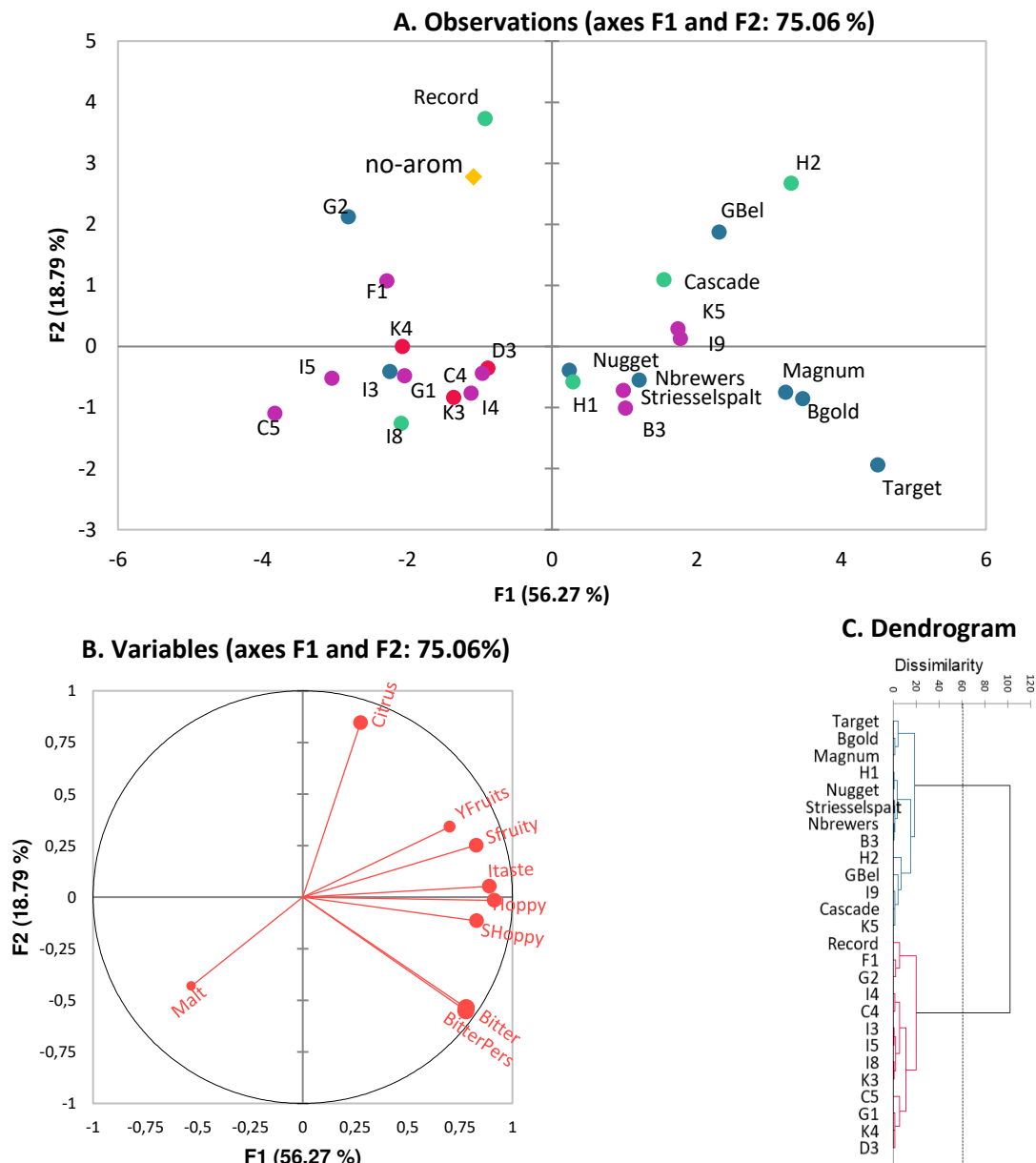


Figure 4. Analysis of the data panel. A: PCA plot for dimensions 1 and 2 on the data of the sensory characterization by a panel. Individuals were colored according their composition in volatile compounds. The observation “no_ arom” is brewed with no aromatic hop; B: PCA correlation circle depicting the projection of the variables (sensorial descriptors) in the 2D space. “SHoppy”: hoppy smell; “Hoppy”: hoppy taste; “Sfruity”: fruity smell “YFruits”: yellow fruits taste; “Itaste”: intensity of the taste; “Citrus”: citrus taste, “Malt”: malt taste; “Bitter”: bitter taste; “BitterPers”: bitter persistence; C: dendrogram obtained by HAC plotting the data of 27 beers for the 9 descriptors obtained (Ward’s method, n=2).

observed for the chemical analysis of the 52 hop samples was thus confirmed after brewing. Nevertheless, the accessions I3 and G2 whose chemical composition was fairly close to the marketed varieties no longer belonged this time to the same cluster concerning the taste felt by the panellists after brewing. By contrast, in this sensory analysis, 5 wild accessions (B3, H1, H2, I9, K5) of our collection belonged to the same cluster as commercial and old varieties (**Figure 4C**). The chemical composition of these accessions were far from the reference varieties in regards to non-targeted metabolomic analysis. However, accessions H1, H2, K5 and I9 revealed the presence of some particular volatile compounds, while the accession B3 had high levels of some phenolic compounds. The proximity of the wild accessions H2, I9 and K5 with the aromatic cultivar Cascade and the old variety Groene Bel, observed on **Figure 4A**, had already been observed on the dendrogram 1B for the analysis of volatile compounds. α -bergamotene was identified in accession H2, γ -elemene in accession K5 as well as β -elemene, γ -elemene, α -selinene, β -selinene and alloaromadendrene in accession I9. This composition was close to those of the accession Strisselpalt for example, also containing alloaromadendrene, α -selinene, β -selinene and γ -elemene and that could explain the fruity, hoppy and citrus perception of these accessions according panellists. Concerning the chemical composition of beers analysed by SBSE GC-MS, some accessions (e.g. Brewers Gold, Magnum, B3, G1, I3 and I5) had a high level of monoterpenes and sesquiterpenes. Nevertheless, among these beers, those brewed with wild accessions did not show similar aroma profiles according to the panel. For the beer brewed with no aromatic hop (in yellow on the **Figure 4A**), analysed in the PCA as a supplementary observation, and therefore not included in the CAH, panellists did not discriminate it from the other samples tasted, and seemed to be fairly close to the accession G2 and the old variety Record, which may not have significant aromatic impact on the beer.

3.3. Multivariate analysis.

To objectively assess the influence of the chemical composition of hop cones used for brewing in the final beer, a supervised OPLS-DA approach based on the chemical profiling and gustative evaluation was performed. Two classes were selected in this study, according to the results of the CAH of the sensory analysis: group 1 ($n = 13$ in blue) and group 2 ($n = 13$ in red) (**Figure 4C**). In total, 225 variables obtained in the two datasets previously obtained to characterise the chemical diversity of hops (volatile compound analysis by HS-SPME GC-MS: 65 variables,

untargeted metabolomic analysis by UHPLC-HRMS-Qtof: 160 variables) were used for the OPLS-DA model to explain the aromatic diversity of the 26 accessions used in brewing tests. The combination of these data was expected to provide a global profiling of the gustative qualities of hops in an integrative brewing perspective. The consensus OPLS-DA strategy was applied for the differential analysis of the two aromatic groups and the simultaneous analysis of the two blocks of data.

The block contributions of the predictive latent variable indicated an equivalent importance of the volatile cone analysis by HS-SPME GC-MS (p: 51.91%, o: 52.05% %) or of the untargeted metabolomics by UPLC-HDMSE-Qtof (p: 48.08 %, o: 47.94 %) (**Figure S16**). A model with one predictive and one orthogonal latent variable was evaluated as the best model based on the DQ2 value computed during leave one-out cross validation, i.e. $DQ2 = 0.393$. Hence, in view of this relative low value, the proposed model is an explanatory model and not a predictive model. Score plot and the contributions of the model were presented in **Figure 5**. This model confirmed the clear opposition between the two beer groups defined by the panellists, separated by the predictive component (**Figure 5A**) and used for the model construction. As discussed before, the **Figure 5B** highlighted the influence of some volatile compounds on the aromatic profile of beers. Beers brewed with commercial varieties were influenced by their content of main hop volatile compounds (as α -humulene, β -myrcene, β -caryophyllene, linalool or β -pinene), while beers brewed with wild accessions were more distinguished by the composition of their cones in α - and β -selinene, alloaromadendrene, α -selinene or α -bergamotene. This model also revealed that the bitterness of beers was imparted by acylphloroglucinols derivatives (**Figure 5C**), and then corroborated the bitter potential of commercial varieties compared to wild hops, which were not distributed along the axes of the bitterness (**Figure 4A**).

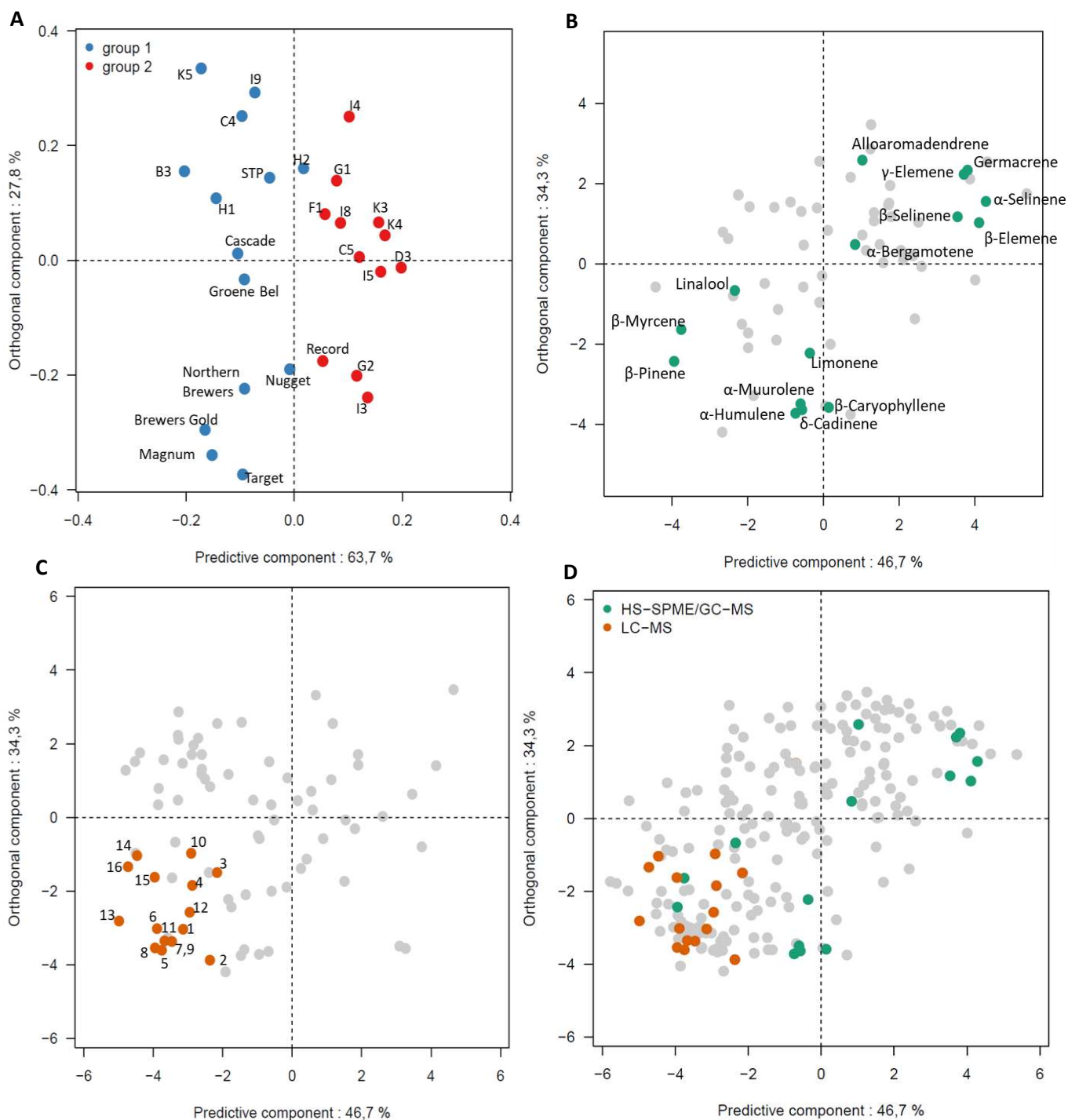


Figure 5. Multivariate association of beer metabolites with panel sensory traits. The association between chemical characterization by HS-SPME GC-MS (68 variables) and the UHPLC-ESI-Qtof (160 variables) was evaluated by OLSA-DA using HAC clusters from sensory analysis. A: score plot of the aromatic qualities of beers according the panel test; **B:** loading plot hop volatile compounds analyzed by HS-SPME GC-MS; **C:** loading plot untargeted metabolomics by UHPLC-HRMS-ESI-Qtof. 1 = Desmethylxanthohumol, 2 = Xanthohumol, 3 = Isoxanthohumol, 4 = Unknown, 5 = Cohumulone, 6 = 4-Deoxycohumulone or adhumulone, 7 = Humulone, 8 = Humulinone, 9 = Adhumulone, 10 = Deoxyhumulone, 11 = Préhumulone, 12 = Postlupulone, 13 = Colupulone, 14 = Lupulone, 15 = Adlupulone, 16 = Prelupulone; **D:** loading plot for the 228 variables of the two datasets of the cones chemistry.

4. Discussion

This study was focused on the chemical composition of wild hops and their aromatic potential in beers. As regards the chemistry of cones, we identified the main volatile compounds of hops, α -humulene, β -myrcene and β -caryophyllene, in all accessions of our collection. In particular, α -humulene and β -caryophyllene are known for their spicy and woody smell (Rettberg et al 2018). We also found original volatile compounds, present in few wild accessions, as α - and β -selinene, alloaromadendrene or β - and γ -elemene. Patzak et al. (2010) reported that selinene was particularly present in wild hops compared to North American hops. This work also highlighted the strong chemical opposition between commercial and old varieties compared to wild accessions on their phytochemical composition (volatile compounds and phenolic compounds) and gustatory quality. A certain form of opposition between varieties and experimental germplasms had already been reported by Yan et al. (2019) especially on volatile compound composition, using GC–accTOFMS, on 30 Australian hop genotypes. Furthermore, recent studies such as Morcol et al. (2020) or Van Holle et al. (2021) suggested a terroir effect on hop chemical composition. The results of this study also served this hypothesis as chemical diversity underlined by the non-targeted analyses was much reduced on the accessions of this study, all coming from the same experimental hop field, compared to the accessions collected *in-situ* in our previous study Paguet et al., (submitted). Nevertheless, the *ex-situ* collection also allowed a monitoring of hop maturation and thus collection of the cones at their optimum maturity, which avoided the appearance of degradation compounds. For instance, contrary to our previous study, we noticed high levels of β -myrcene in all accessions without exception. Myrcene usually does not make a contribution to hop aroma in beer, because its concentration is often far below the sensory threshold level, due to its evaporation during wort boiling (Kishimoto et al., 2005), but it may be used as a marker for cones ripening because monoterpenes are the last produced metabolites (Briggs et al., 2004). Some specific hop volatile components, such as geraniol for Cascade or β -pinene for Centennial, were identified as statistically relevant for forecasting dry-hop aroma quality (Lafontaine et al., 2018). Phytochemical profiling of our collection led to the identification of some wild accessions with a profile close to those of commercial cultivars (e.g. accessions I3 and G2). Previous genotyping in Paguet et al. (submitted) revealed that wild accessions of our collection were significantly different from

commercial and old varieties grown in north of France and were therefore not from an existing commercial variety (**Figure S17**). Hence, the chemical diversity of wild accessions, even under *ex-situ* conditions, was probably due to the wide genetic diversity previously observed. Among this chemical diversity, we have identified some derivatives of bitter acids. Wild accessions revealed high levels in β -acids and in co-humulone. β -acids do not directly impact the beer taste, but their oxidation in hulupones provides a very bitter taste to the beer (Van Cleemput et al., 2009). Long associated with a strong, harsher and undesirable bitterness, co-humulone could have a beneficial impact on the final taste of beer. This more polar compound has been shown to isomerize more efficiently than *n*-humulone and *ad*-humulone (Janish, 2019).

Hence, after highlighting the chemical diversity of these hops grown under the same conditions, we evaluated their aromatic potential after brewing. After evaluation by a panel, we underlined that some wild accessions had a gustative potential fairly close to commercial varieties, as the accession H1, with a bitter perception. Some other wild accessions, H2, I9 and K5, belonging to the same cluster on the dendrogram, rather showed hoppy and fruity taste as the commercial variety Cascade or the old variety Groene Bel. This fruity and hoppy taste may be due to the presence of some volatile compounds, as γ -elemene or α - or β -selinene, which were also detected after brewing by SBSE and were known for their herbal and fresh flavours (**Table S4**). These statements have been confirmed by the OPLS model, which underlined the influence of acylphloroglucinol derivatives and main hop volatile compounds on the bitterness and aromatic properties of beers brewed with commercial varieties on one side, and the influence of less common volatile compounds and typical of our wild hop collection, on the other side. However, the aromatic impact of hops in beer remains very complex to study because beer is a complex matrix due to the interaction with the other ingredients of the beer and the effects of fermentation etc (Dietz et al. 2019), as evidenced by the relative low validation score of our OPLS model. For example, the presence of citronellol, found in some beer composition but in none hop, can be derived from a *de novo* synthesis, induced by yeast during the fermentation (Dietz et al. 2019). Hence, Van Holle et al., (2017) chose to carry out a sensory analysis on single hop beers in order to enhance the perception of the aromatic contribution of tested hop on beer. Machado et al. (2021) studied wild accessions coming from Portugal, and assessed their gustative potential on dry-hopped beers. Dry-hopping allowed highlighting of the aromatic variations between different accessions (Podeszwa & Harasym, 2016). In

our study, we also greatly reduced bias because we tested our hops in a same lager-style recipe, with a unique magnum bittering hop to provide bitterness, and in steeping (whirlpool) hop mode. The only ingredient modifying the recipe was the aromatic hops, wild or commercial, to be tested and it was added after boiling in infusion to preserve the volatile compounds. However, it could also be interesting to test in parallel the organoleptic profile of hops, without brewing, to avoid the interaction with malt and fermentation metabolites, as Martins et al., 2020 evaluated the aromatic potential of hops by check-all-that-apply analysis.

Now that our collection of wild accessions has been replanted under *ex-situ* conditions and the evaluation of their aromatic potential has been begun, we have also initiated the study of their resistance to pathogens and their agronomic adaptability. For example, Trefilová et al. (2021) assessed the resistance to *Pseudoperonospora humuli* on genetic resources integrated into selection programs. We showed that wild accessions produced more *co*-humulone and β -acids. Some of these compounds could be involved in pre-resistance mechanisms, which could explain their presence in wild accessions (Van Cleemput et al., 2009; Morcol et al., 2021). High amounts of *co*-humulone found in wild accessions may be involved in antifungal defence activity (Bocquet et al., 2018b). An evaluation of their morphological characteristics will also be required to initiate varietal breeding based on this collection following (UPOV, 2006).

4. Conclusion

By means of a targeted and untargeted chemical fingerprinting and chemometrics approach, this study was able to identify compounds in our wild hops collection from North of France that make them distinct from commercial varieties. Volatile compound analysis revealed a strong opposition between commercial and old varieties and wild accessions of our collection; this opposition was also noticeable on the quantification of phenolic compounds and sensory evaluation, but less strong as regards untargeted metabolomics.

Some hops of wild accessions, such as I3 and G2, showed a chemical composition fairly close to commercial varieties. However, other wild accessions, such as H2, K5 et I9, showed an aromatic potential more pronounced during sensory analysis and close to the commercial variety Cascade or the old variety Groene Bel. OPLS-DA allowed the identification of chemical markers of cones which lead to a beer with sensory characteristics close to

those brewed with the varieties currently used by brewers. This study underlined the potential for further investigating genetic markers to understand the differences in the volatile compound concentrations as the phenotypic expression for each hop cultivar. These results illustrated the difference between commercially germplasms resulting from robust selection programs and the wild germplasms. This analytical approach thereby confirmed the potential of wild hops for varietal development and gave some information to implement a systematic targeted breeding approach.

Fundings

This work has been carried out in the framework of Feader project which is financed by European Union and the Region of Hauts-de-France in France. The authors gratefully thank the Region Hauts-de-France (Feder), the University of Lille (I-Site) and the “Fondation de la brasserie et de la malterie française” for the funding of the PhD fellow Anne-Sophie Paguet.

Acknowledgments

The authors acknowledge Fabrice Henry, the director of the Douai High School for hosting the experimental hop field. We also thank all the members of the tasting panel. We acknowledge The FREDON Hauts-de-France for monitoring pathogens and pests, as well as Aurélien Honoré and Anne-Hélène Martin to the Chambre d’agriculture de la région Hauts-de-France.

Author's contribution

ASP: Investigation, Formal analysis, Writing – original draft; **AS:** Project administration; **GL:** Conceptualization, harvests and monitoring of the hop field; **MV, SC:** Supervision of the sensorial analysis, Formal analysis; **DL, ND:** brewing, maintenance of the hop field ; **JS, FM, DM:** Investigation, **RM, JXF:** Supervision of untargeted metabolomics analysis, Formal analysis, **SS:** Project administration; **CR:** Conceptualization, Harvests, Methodology, Validation, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing – review & editing.

References

- Addinssoft. (2022). *XLSTAT statistical and data analysis solution*. Paris, France. <https://www.xlstat.com/fr>
- American Society of Brewing Chemists. (1992). *Method Beer-23A, Methods of Analysis of the ASBC* (American Society of Brewing Chemists).
- Asano, K., & Hashimoto, N. (1980). Isolation and Characterization of Foaming Proteins of Beer. *American Society of Brewing Chemists*, 38(4), 129–

- Bart-Haas Group. (2021). *Bart-Haas report*.
- Boccard, J., & Rutledge, D. N. (2013). A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. *Analytica Chimica Acta*, 769, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.022>
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Hilbert, J. L., Rambaud, C., & Rivière, C. (2018a). *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: Overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry Reviews*, 17(5), 1047–1090. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y>
- Bocquet, L., Rivière, C., Dermont, C., Samaillie, J., Hilbert, J.-L., Halama, P., Siah, A., & Sahpaz, S. (2018b). Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Industrial Crops and Products*, 122, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.061>
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Bonneau, N., Beaufay, C., Mahieux, S., Samaillie, J., Roumy, V., Jacquin, J., Bordage, S., Hennebelle, T., Chai, F., Quetin-Leclercq, J., Neut, C., & Rivière, C. (2019). Phenolic Compounds from *Humulus lupulus* as Natural Antimicrobial Products: New Weapons in the Fight against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* Strains. *Molecules*, 24(6), 1024. <https://doi.org/10.3390/molecules24061024>
- Briggs, D., Boulton, C., Brookes, P., & Stevens, R. (2004). *Brewing: Science and Practice*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203024195>
- Burgot, G. (2019). Microextraction en phase solide (SPME). *Techniques d'analyse*. <https://doi.org/10.51257/a-v2-p1430>
- Bylesjö, M., Rantalainen, M., Cloarex, O., Nicholson, J. K., Holmes Elaine, & Trygg, J. (2007). OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*, 20(8–10), 341–351.
- De Keukeleire, D., Vindevogel, J., Szücs, R., & Sandra, P. (1992). The history and analytical chemistry of beer bitter acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 11(8), 275–280. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(92\)87089-3](https://doi.org/10.1016/0165-9936(92)87089-3)
- Dietz, C., Cook, D., Huismann, M., Wilson, C., & Ford, R. (2020). The multisensory perception of hop essential oil: A review. *Journal- Institute of Brewing*, 126, 320–342. <https://doi.org/10.1002/jib.622>
- Ducloux, A., Hédiard, L., & Vallez, T. (1910). *Les productions agricoles du Nord de la France*. (J.B. Baillièere et fils, éditeurs).
- Eble, P., & de Vries, H. J. (2018). How One of The World's Oldest Food Safety Standards Approaches Expiration – The Case of German Beer. *EURAS Proceeding*, 5–15.
- Faiveley, M. (2020). Fabrication des bières. *Agroalimentaire*. <https://doi.org/10.51257/a-v2-f6205>
- Farag, M., Porzel, A., L., Schmidt, J. & Wessjohann, L. (2012). Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): A comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *Metabolomics*. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0335-y>
- Goiris, K., Ridder, M. D., Rouck, G. D., Boeykens, A., Van, F., Aerts, G., Cooman, L. D., & Keukeleire, D. D. (2002). The oxygenated sesquiterpenoid fraction in hops in relation to the spicy hop character of beer. *The Institute & Guild of Brewing*, 108(1), 86–93.
- Hong, K., Xu, Z., Wang, L., Johnpaul, A., Cheng, Y., Lv, C., & Ma, C. (2022). Varietal differences in the phytochemical components' accumulation and aroma profile of three *Humulus lupulus* cultivars. *Food Control*, 132, 108499. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108499>
- ICH. (2005). International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes* (pp. 1041–1053). Brill | Nijhoff. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897>
- ISO. (2016). Analyse sensorielle—Méthodologie—Directives générales pour l'établissement d'un profil sensoriel. ISO. <https://www.iso.org/cms/render/live/fr/sites/isoorg/contents/data/standard/05/80/58042.html>
- Kawa-Rygielska, J., Adamenko, K., Kucharska, A. Z., Prorok, P., & Piórecki, N. (2019). Physicochemical and antioxidative properties of Cornelian cherry beer. *Food Chemistry*, 281, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.093>
- Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kagami, N., & Kawatsura, K. (2005). Analysis of Hop-Derived Terpenoids in Beer and Evaluation of Their Behavior Using the Stir Bar–Sorbptive Extraction Method with GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4701–4707.
- Lafontaine, S. R., Vollmer, D. M., Shellhammer, T. H., & Pereira, C. B. (2018). The Effectiveness of Hop Volatile Markers for Forecasting Dry-hop Aroma Intensity and Quality of Cascade and Centennial Hops. *Brewing Science, Volume 71*, 116–140. <https://doi.org/10.23763/BrSc18-19lafontain>
- Machado, J. C., Lehnhardt, F., Martins, Z. E., Faria, M. A., Kollmannsberger, H., Gastl, M., Becker, T., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2021). Sensory and Olfactometry Chemometrics as Valuable Tools for Assessing Hops' Aroma Impact on Dry-Hopped Beers: A Study with Wild Portuguese Genotypes. *Foods*, 10(6), 1397. <https://doi.org/10.3390/foods10061397>

- Martins, Z. E., Machado, J. C., Cunha, S. C., Barata, A. M., & Ferreira, I. (2020). A chemometric approach to compare Portuguese native hops with worldwide commercial varieties. *Journal of Chemometrics*, e3285. <https://doi.org/10.1002/cem.3285>
- Morcol, T. B., Negrin, A., Matthews, P. D., & Kennelly, E. J. (2020). Hop (*Humulus lupulus* L.) terroir has large effect on a glycosylated green leaf volatile but not on other aroma glycosides. *Food Chemistry*, 321, 126644. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126644>
- Morcol, T., Matthews, P. & Kennelly, E. (2021). Differences in Leaf Chemistry and Glandular Trichome Density between Wild Southwestern American Hop (*Humulus neomexicanus*) and Commercial Hop Cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 69, 7798–7814. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02710>
- Nicácio, K. de J., Ferreira, M. S., Katchborian-Neto, A., Costa, M. L., Murgu, M., Dias, D. F., Soares, M. G., & Chagas-Paula, D. A. (2022). Anti-Inflammatory Markers of Hops Cultivars (*Humulus lupulus* L.) Evaluated by Untargeted Metabolomics Strategy. *Chemistry & Biodiversity*, 19(4), e202100966. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100966>
- Paguet, A. S., Siah, A., Lefèvre, G., Moureu, S., Samaillie, J., Michels, F., Alves dos Santos, H., Etienne-Debaecker, A., Deracinois, B., Flahaut, C., Cadalen, T., Rambaud, C., Chollet, S., Molinié, R., Fontaine, J.-X., Waterlot, C., Fauconnier, M.-L., Sahpaz, S., & Rivière, C. (2022). Multivariate investigation of the chemical and genetic diversity of wild hop (*Humulus lupulus* L.) collected in situ in Northern France. *Phytochemistry*, submitted..
- Paguet, A. S., Siah, A., Lefèvre, G., Sahpaz, S., & Rivière, C. (2022). Agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding. *Phytochemistry Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09813-4>
- Patzak, J., Nesvadba, V., Hencychová, A., & Krofta, K. (2010). Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(2), 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.12.023>
- Podeszwa, T., & Harasym, J. (2016). *New methods of hopping (dryhoppingà and their impact on sensory properties of beer*. 21, 81–88.
- Schönberger, C., & Kostecky, T. (2011). 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(3), 259–267. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x>
- Sharpe, F. R., & Laws, D. R. J. (1981). The Essential Oil of Hops a Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 87(2), 96–107. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1981.tb03996.x>
- Trefilová, M., Nesvadba, V., & Charvátová, J. (2021). Evaluation of resistance to *Pseudoperonospora humuli* and of the content of alpha acids and hop oils in hops of selected genetic resources of hop *Humulus lupulus* L. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. <https://doi.org/10.17221/70/2021-CJGPB>
- Triba, M., Moyec, L. L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., N. Rutledge, D., & Savarin, P. (2015). PLS/OPLS models in metabolomics: The impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular BioSystems*, 11(1), 13–19. <https://doi.org/10.1039/C4MB00414K>
- Trygg, J., & Wold, S. (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics*, 16(3), 119–128. <https://doi.org/10.1002/cem.695>
- UPOV. (2006). *International Union for the Protection of New Varieties of Plants: Hop.Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability*. <http://www.upov.int/portal/index.html.en>
- Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., & Heyerick, A. (2009). Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *Journal of Natural Products*, 72(6), 1220–1230. <https://doi.org/10.1021/np800740m>
- Van Holle, A., Landschoot, A. V., Roldán-Ruiz, I., Naudts, D., & Keukeleire, D. D. (2017). The brewing value of Amarillo hops (*Humulus lupulus* L.) grown in northwestern USA: A preliminary study of terroir significance. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(3), 312–318. <https://doi.org/10.1002/jib.433>
- Van Holle, A., Muylle, H., Haesaert, G., Naudts, D., De Keukeleire, D., Roldan-Ruiz, I., & Van Landschoot, A. (2021). Relevance of hop terroir for beer flavour. *Journal of the Institute of Brewing*. <https://doi.org/10.1002/jib.648>
- Van Opstaele, F., De Rouck, G., De Clippeleer, J., Aerts, G., & De Cooman, L. (2010). Analytical and Sensory Assessment of Hoppy Aroma and Bitterness of Conventionally Hopped and Advanced Hopped Pilsner Beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(4), 445–458. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00796.x>
- Yan, D., Wong, Y. F., Shellie, R., Mariott, P., Whittock, S. P., & Koutoulis, A. (2019). Assessment of the phytochemical profiles of novel hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars: A potential route to beer crafting. *Food Chemistry*, 275, 15–23.

Supplementary informations

Table S1. Weather report for the city of Douai for the year 2021 (source: Météo France)

	Temp_max (mean)	Temp_min (mean)	Precipitation (sum)	Sunhour (sum)	Wind (max)
January	5.06	0.77	81	140.1	35
February	7.89	2.71	39.5	197.7	33
March	11.16	4.29	21.2	265	44
April	11.63	3.30	24.4	342.1	32
May	14.87	7.55	42.5	355.5	41
June	22.53	13.73	49.4	422.5	28
July	21.13	13.74	64.1	384.3	34
August	21.45	13.97	23.7	360.3	32
September	23.33	12.40	1.6	323.7	27
October	16.19	8.65	16.5	241.8	48
November	10.83	5.43	11.4	171.2	30
December	8.77	4.42	13.9	175.8	42
Total	14.60	7.61	389.2	3380	48

Figure S2. Illustration of morphological variations of cones among wild hop accessions



Table S3. Morphological variations among wild cone accessions in 2021

	Leaves: number of lobes	Stem: color	Cones: productivity	Cone: size	Cone shape	Cones: intensity of green color	Cone: degree of opening bracts	Bract: length apex	Petiole : length
A5	3	Green	medium	medium	elongated	light	slightly open	large	short
B1	3	Red	low	medium	elongated	light	slightly open	large	medium
B2	3	Green	medium	medium	medium ovate	light	slightly open	medium	medium
B3	3	Red dark	medium	medium	medium ovate	light	slightly open	large	short
B4	3	Green	low	medium	medium ovate	yellow	slightly open	large	short
B5	1	Red	medium	medium	medium ovate	light	slightly open	large	short
C1	3	Green	medium	small	globose	medium	clearly open	medium	short
C3	3	Red	very low	small	medium ovate	light	slightly open	large	short
C4	3-5	Red	medium	small	medium ovate	medium	slightly open	large	medium
C5	5	Green	high	medium	medium ovate	light	clearly open	large	medium
D1	3	Green	very low	medium	elongated	light	slightly open	large	very short
D3	5	Red	medium	small	medium ovate	light	clearly open	large	medium
E1	3	Red	low	large	elongated	medium	slightly open	large	medium
F1	3	Red	very high	medium	elongated	medium	clearly open	large	long
G1	5	Red	medium	large	medium ovate	light	clearly open	large	medium
G2	5	Green	very low	large	very elongated	light	closed	large	long
H1	3	Green	medium	medium	globose	medium	slightly open	medium	medium
H2	3-5	Green	medium	large	very elongated	light	closed	large	medium
H3	5	Green	medium	medium	medium ovate	medium	slightly open	large	long
H4	5	Green	low	large	medium ovate	medium	slightly open	large	medium
I1	3	Green	medium	medium	elongated	medium	slightly open	large	short
I2	3	Green	medium	medium	medium ovate	medium	clearly open	large	medium
I3	3	Green	medium	small	medium ovate	medium	slightly open	large	medium
I4	3	Red	medium	small	globose	yellow	slightly open	large	long
I5	5	Green	medium	small	medium ovate	medium	slightly open	large	medium
I6	5	Red	medium	small	medium ovate	medium	clearly open	large	medium
I8	5	Red	low	small	medium ovate	medium	slightly open	large	medium
I9	3	Red	medium	medium	medium ovate	medium	slightly open	large	long
I10	3	Red	medium	medium	elongated	medium	clearly open	large	long
J1	3	Red	medium	medium	medium ovate	medium	slightly open	large	medium
J2	3	Red	medium	medium	medium ovate	yellow	clearly open	large	medium
J3	3	Red	low	medium	globose	yellow	clearly open	large	short
J4	3	Red	low	medium	globose	medium	clearly open	large	very short
J5	3	Red	low	small	globose	medium	clearly open	large	very short
K1	5	Red	medium	small	medium ovate	medium	clearly open	large	short
K2	5	Red	medium	small	medium ovate	medium	closed	large	short
K3	3	Green	very high	small	globose	light	clearly open	large	long
K4	3	Green	very high	small	globose	light	clearly open	large	long
K5	3	Green	very high	medium	medium ovate	light	slightly open	large	short

Table S4. GC-MS results of the putative identification of volatile compounds found in hop cones

The putative identification was based on the match factor of the identification (%) and the comparison of the retention index calculated with the one of the literature (NIST17). The number of samples containing the compound identified was also indicated. For compounds with less than five occurrences, samples containing them were specified.

	Formula	match factor %	CAS	RI calculated	RI literature	% area max	n ³	Odour type: Description ⁴	Samples
Monoterpenes and sesquiterpenes									
<i>α</i>-Humulene	C ₁₅ H ₂₄	96.36	6753-98-6	1542	1463	56.53%	52	Woody: Woody	
<i>β</i>-Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	97.07	123-35-3	1002	990	45.88%	52	Spicy: Peppery, terpenic, herbal, spicy, woody, balsamic, plastic, rose, celery, carrot	
<i>β</i>-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	98.24	487-44-5	1583	1421	27.21%	52	Spicy: Sweet, woody, terpenic, spicy, clove, dry	
<i>β</i>-Selinene	C ₁₅ H ₂₄	97.8	17066-67-0	1510	1488	6.33%	50	Herbal	
<i>δ</i>-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	96.78	39029-41-9	1475	1530	3.02%	49	Herbal: Thyme, herbal, woody, dry	
<i>β</i>-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	97.66	127-91-3	1028	990	20.99%	49	Herbal: Dry, cooling, woody, resinous, pine, hay, terpenic, green, fresh, minty, eucalyptus, camphoreous, spicy, peppery, nutmeg	
<i>α</i>-Copaene	C ₁₅ H ₂₄	96.47	3856-25-5	1635	1370	1.69%	46	Woody: Woody, spicy, honey	
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	98.18	78-70-6	902	1109	0.80%	44	Floral: Citrus, orange, floral, terpenic, sweet, rose, waxy, aldehydic, woody, green, blueberry	
<i>γ</i>-Selinene	C ₁₅ H ₂₄	95.46	515-17-3	1522	1484	1.52%	43	n.f.	
Valencene	C ₁₅ H ₂₄	96.28	44630-07-3	1463	1490	3.71%	42	Citrus: Sweet, fresh, citrus, grapefruit, woody, orange, dry, green, oily	
<i>γ</i>-Gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	93.28	22567-17-5	1481	1473	1.24%	35	Musty	
<i>γ</i>-Elemene	C ₁₅ H ₂₄	97.63	515-13-9	1567	1433	5.41%	35	Green, woody, oily	
<i>γ</i>-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	98.2	39029-41-9	1484	1515	13.30%	33	Herbal, woody	
<i>α</i>-Selinene	C ₁₅ H ₂₄	96.52	473-13-2	1498	1494	20.96%	32	Amber	
Germacrene B	C ₁₅ H ₂₄	96.79	15423-57-1	1442	1556	2.13%	31	Woody, earthy, spicy	
<i>α</i>-Gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	98.45	489-40-7	1597	1409	3.91%	27	Woody: Woody, balsamic	
<i>α</i>-Muurolene	C ₁₅ H ₂₄	96.82	31983-22-9	1500	1540	1.71%	27	Woody: Woody	
Alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	97.2	25246-27-9	1562	1437	3.44%	25	Woody	
<i>β</i>-Cubebene	C ₁₅ H ₂₄	97.65	17699-14-8	1574	1389	2.02%	24	Citrus: Citrus, fruity, radish	
<i>β</i>-Maaliene	C ₁₅ H ₂₄	97.4	489-29-2	1462	1380	0.68%	24	n.f.	
<i>β</i>-Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	94.68	18794-84-8	1531	1452	17.15%	15	Woody, citrus, herbal, sweet	
Calarene	C ₁₅ H ₂₄	95.94	17334-55-3	1576	1592	0.64%	13	n.f.	
Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	96.1	23986-74-5	1576	1499	1.15%	13	n.f.	
trans-<i>β</i>-Ocimene	C ₁₀ H ₁₆	97.65	3779-61-1	954	1050	1.84%	12	Sweet herbal	
<i>α</i>-Cubebene	C ₁₅ H ₂₄	97.88	17699-14-8	1664	1345	0.61%	9	Herbal waxy	

Aromarandrene	C ₁₅ H ₂₄	93.46	489-39-4	1493	1437	1.84%	9	n.f.	
β-Elemene	C ₁₅ H ₂₄	97.16	515-13-9	1616	1391	1.05%	8	n.f.	
β-Bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	95.27	495-61-4	1491	1509	0.74%	7	Balsamic, woody	
D-Limonene	C ₁₀ H ₁₆	80.77	5989-27-5	972	1031	1.25%	7	Citrus : citrus, orange, fresh sweet	
α-Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	93.9	502-61-4	1490	1508	16.29%	7	Woody : citru, herbal, lavender, bergamot, myrrh, neroli, green	
Isoledene	C ₁₅ H ₂₄	96.88	95910-36-4	1638	1723	0.74%	7	n.f.	
Eremophilene	C ₁₅ H ₂₄	95.62	10219-75-7	1561	1503	0.30%	6	n.f.	
α-Bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	95.49	17699-05-7	1567	1434	3.20%	5	n.f.	Nugget, Casc, Fuggle, H1, H2
α-Ylangene	C ₁₅ H ₂₄	97.51	14912-44-8	1639	1597	0.52%	5	n.f.	Bgold, Target, Nugget, K3, K4
β-Himachalene	C ₁₅ H ₂₄	94.88	1461-03-6	1520	1499	0.52%	5	n.f.	B5, H4, K1, K2
cis-Farnesol	C ₁₅ H ₂₆ O	93.67	3790-71-4	1493	1664	0.38%	5	n.f.	Nugget, E1, I1, I3, I5
α-Longipinene	C ₁₅ H ₂₄	88.52	5989-08-2	1504	1351	0.75%	3	n.f.	B4, J1, J2
Pseudolimonene	C ₁₀ H ₁₆	91.39	499-97-8	973	996	1.07%	3	n.f.	Record, Coigneau, Cascade
Bicycloelemene	C ₁₅ H ₂₄	97.25	32531-56-9	1678	1334	0.49%	2	n.f.	I4, I10
Zingiberene	C ₁₅ H ₂₄	93.92	495-60-3	1502	1495	1.40%	2	Spicy; spice, fresh, sharp	K1, K5
β-Chamigrene	C ₁₅ H ₂₄	94.62	18431-82-8	1501	1475	7.99%	1	n.f.	K2
γ-Muurolene	C ₁₅ H ₂₄	92.26	30021-74-0	1476	1476	5.39%	2	Woody: Herbal, woody, spicy	B4, H4
α-Cedrol	C ₁₅ H ₂₆ O	83.37	77-53-2	1504	1596	0.59%	1	Woody	I8
Ledene	C ₁₅ H ₂₄	95.53	21747-46-6	1504	1890	2.18%	1	n.f.	B3
Torreyol	C ₁₅ H ₂₆ O	87.51	19435-97-3	1612	1645	0.29%	1	Balsamic, earthy	K3
Esters									
Isobutyl isovalerate	C ₉ H ₁₈ O ₂	98.25	589-59-3	785	1032	1.65%	22	Fruity : sweet, apple, raspberry, green, banana	
Methyl-4-methylhexa-2-enoate	C ₈ H ₁₄ O ₂	86.76	2445-71-8	546		1.21%	22	n.f.	
Methyl dec-4-enoate	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	96.94	1191-02-2	748	1622	2.06%	47	Waxy : waxy, green, sweet, orange, aldehydic, vegetable, herbal	
Methyl heptanoate	C ₈ H ₁₆ O ₂	92.93	106-73-0	548	1006	0.70%	35	Odor Type: fruity, sweer, fruity, green, orris, waxy, floral, berry apple like note	
Methyl octanoate	C ₉ H ₁₈ O ₂	96.9	111-11-5	671	1110	0.73%	20	Waxy : green, sweet, orange, vegetable, herbal	
Methyl-6-methyl heptanoate	C ₉ H ₁₈ O ₂	92.42	2519-37-1	710		0.48%	16	n.f.	
Isobutyl isobutyrate	C ₈ H ₁₆ O ₂	96.74	97-85-8	687	900	0.67%	7	Fruity: ethereal, fruity, fruit, pineapple, grape, skin, banana	
Methyl decadienoate	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	91.69	44493-42-9	745		0.21%	6	n.f.	
Hexanethioic acid S-methyl ester	C ₇ H ₁₄ OS	84.45	2432-77-1	59	1073	0.88%	5	Fruity : fruity, ethereal, green, tropical, cabbage, cheesy, rancid, floral, green	B2, B4, E1, G1, H4

Methyl nonanoate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	97.09	1731-84-6	781	1204	0.36%	4	Fruity: sweet, fruity, pear, wax, tropical, winey	Chall, G1, I5, J1
Geranyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	96.36	105-87-3	1020	1383	0.74%	3	Floral: Floral, rose, lavender, herbal, green, cooling, waxy	Brewers Gold, Cascade, D1
Linalyl isovalerate	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	80.9	1118-27-0	2120		0.75%	3	Herbal: citrus, bergamot, lavender, peach, apricot, sage	B5, C4, H4
Methyl decanoate	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	85.37	110-42-9	725	1326	0.30%	2	Fermented: Oily, winey, fruity, floral	Challenger, Nugget
3,6-Dodecadienoic acid, methyl ester	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	85.42	16106-01-7	1098		0.63%	1	n.f.	Magnum
(E)-methyl geranate	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	89.76	1189-09-9	1224	1270	0.55%	1	Waxy: green, fruity, flower	Northern Brewers
Ketones									
2-Undecanone	C ₁₁ H ₂₂ O	97	112-12-9	772	1388	1.42%	50	Fruity: Waxy, fruity, pineapple, creamy, ketonic, fatty, orris, floral	
2-Nonanone	C ₉ H ₁₈ O	93.87	821-55-6	705	1093	0.87%	29	Fruity: Fresh, fruity, sweet, waxy, soapy, cheesy, green, weedy, earthy, herbal, coconut	
2-Decanone	C ₁₀ H ₂₀ O	93.98	693-54-9	811	1199	0.58%	26	Floral: Orange, floral, fatty, peach	
(Z)-Undec-6-en-2-one	C ₁₁ H ₂₀ O	94.55	107853-70-3	802	682	0.41%	18	Floral	
Alkenes									
Isocarvestrene	C ₁₀ H ₁₆	87.97	1461-27-4	975		0.39%	3	n.f.	K1, K2, K5

Identification of compounds according to the retention index calculated and compared with retention index published online library (<https://webbook.nist.gov/chemistry/cas-ser.html>). Retentions index are calculated using the following formula:

$$Ik = 100 \times \left(n + \frac{t_r(x) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right),$$

with Ik, Kovats retention index

n: the number of carbon atoms in the alkane; $t_r(x)$: retention time of aimed component; $t_r(n)$ and $t_r(n+1)$: the retention time of alkane with 'n+1' and 'n' carbon atoms

² Identification of the compounds by comparison of the mass spectrum with the NIST database.

³ "n samples" indicates the number of samples containing the compound identified. For those identified less than five times, samples in which they are present are indicated in the column "Ref samples". For each compound, the minimal area is indicated in the column "Minimal content".

⁴ Odour types and descriptions of pure compounds are found in <http://www.thegoodscentscompany.com>. n.f.: not found.

Table S5. Linearity and sensitivity of the quantitation method

	Number of points	Linearity range ($\mu\text{g/ml}$)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Maximum Deviation (%)	Equation	R ²
Xanthohumol (370 nm)	6	0.05-25	25	100	14.815	y=26100x-6530	0.998347
Cohumulone (330 nm)	6	0.1-25	50	250	10.493	y=6960x-508	0.999829
Humulone (330 nm)	6	0.25-50	50	250	- 8.379	y=7080x-8.60	0.999610
Adhumulone (330 nm)	6	0.1-50	50	250	-13.219	y=5730x+199	0.999874
Colupulone (330 nm)	6	0.5-50	50	250	-7.913	y=7620x+1370	0.999842
Lupulone (330 nm)	6	0.25-50	50	250	-9.266	y=7250x+2440	0.998409
Adlupulone (330 nm)	6	0.5-50	50	250	8.732	y=3990-359	0.999862

Table S6. Data of the quantitation of the main phenolic compounds (xanthohumol, co-, n-, ad-humulone and co-, n-, ad-lupulone) in the 52 accessions characterized phytochemically, expressed in $\mu\text{g/ml}$, quantified by UHPLC-UV-MS.

Different letters indicate significant differences between treatments according to ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$.

	Xanthohumol	Cohumulone	Humulone	Adhumulone	Colupulone	Lupulone	Adlupulone
Nugget	6.938 ab	9.797 b-e	28.143 a	12.281 a	13.247 a-c	9.797 b-e	6.705 b-f
Strisselspalt	1.832 g-i	11.943 b-e	11.521 c-f	1.916 i	8.650 a-c	11.943 b-e	5.929 b-f
Golding	3.633 d-i	9.926 b-e	18.938 a-f	6.971 b-h	10.113 a-c	9.926 b-e	7.220 b-f
Challenger	4.805 b-f	11.948 a-e	24.484 a-d	7.836 b-e	10.774 a-c	11.948 a-e	6.603 b-f
Brewers gold	4.505 b-g	7.339 c-e	18.084 a-f	7.031 b-g	18.227 ab	7.339 c-e	5.498 d-f
Cascade	4.335 b-g	10.311 b-e	15.141 a-f	5.429 c-i	15.433 a-c	10.311 b-e	4.178 d-f
Magnum	3.714 d-i	13.979 a-e	27.925 ab	9.951 ab	14.687 a-c	13.979 a-e	5.527 c-f
Northern Brewers	4.705 b-f	8.844 b-e	25.580 a-c	7.608 b-f	9.396 a-c	8.844 b-e	4.915 d-f
Target	6.654 a-c	7.347 c-e	23.280 a-e	9.708 ab	15.509 a-c	7.347 c-e	5.819 b-f
Fuggle	2.768 e-i	6.711 c-e	6.331 f	3.328 g-i	7.180 bc	6.711 c-e	3.753 ef
Groene Bel	3.331 d-i	24.071 a	17.073 a-f	4.584 c-i	21.497 a	24.071 a	17.380 a
Record	4.820 b-f	4.992 e	9.372 d-f	3.443 f-i	8.838 a-c	4.992 e	4.543 d-f
Coigneau	8.079 a	10.637 b-e	23.079 a-e	8.335 a-d	18.210 ab	10.637 b-e	7.443 b-f
A5	2.608 e-i	13.973 a-e	6.823 f	1.861 i	13.565 a-c	13.973 a-e	6.856 b-f
B1	4.056 c-h	6.375 c-e	4.540 f	2.112 i	14.023 a-c	6.375 c-e	5.342 d-f
B2	1.593 hi	7.065 c-e	8.404 ef	2.814 hi	9.963 a-c	7.065 c-e	4.405 d-f
B3	2.552 e-i	9.730 b-e	16.968 a-f	4.217 d-i	15.131 a-c	9.730 b-e	5.690 b-f
B4	1.813 g-i	6.759 c-e	9.120 d-f	2.865 hi	8.273 bc	6.759 c-e	4.590 d-f
B5	1.582 hi	6.228 c-e	6.722 f	2.074 i	6.817 bc	6.228 c-e	4.464 d-f
C1	1.284 i	17.271 a-d	5.914 f	2.158 i	11.406 a-c	17.271 a-d	11.139 a-d
C3	1.553 hi	5.323 de	3.416 f	1.433 i	6.991 bc	5.323 de	3.835 ef
C4	1.967 f-i	10.666 b-e	9.333 d-f	3.336 g-i	11.469 a-c	10.666 b-e	6.028 b-f
C5	1.479 hi	4.945 e	6.174 f	2.737 hi	6.787 bc	4.945 e	3.511 ef
D1	2.852 d-i	14.180 a-e	4.529 f	1.746 i	14.418 a-c	14.180 a-e	7.277 b-f
D3	3.302 d-i	12.905 a-e	17.523 a-f	5.340 c-i	11.035 a-c	12.905 a-e	8.166 b-f
E1	2.856 d-i	13.086 a-e	6.708 f	2.529 hi	10.934 a-c	13.086 a-e	8.678 b-f
F1	3.307 d-i	16.966 a-d	8.422 ef	4.106 e-i	16.268 a-c	16.966 a-d	9.154 b-f
G1	2.418 f-i	18.071 a-c	13.082 a-f	4.500 c-i	13.218 a-c	18.071 a-c	11.324 a-d
G2	3.606 d-i	8.058 b-e	16.491 a-f	4.850 c-i	7.077 bc	8.058 b-e	5.188 d-f
H1	2.363 f-i	13.494 a-e	9.523 d-f	3.149 g-i	13.121 a-c	13.494 a-e	6.294 b-f
H2	2.499 e-i	14.765 a-e	8.335 ef	2.575 hi	10.475 a-c	14.765 a-e	6.240 b-f
H3	2.449 f-i	15.736 a-e	9.461 d-f	3.030 hi	13.470 a-c	15.736 a-e	9.213 b-f
H4	2.563 e-i	11.576 b-e	7.163 f	2.521 hi	15.872 a-c	11.576 b-e	8.601 b-f
I1	5.196 b-e	17.549 a-c	18.243 a-f	6.395 b-h	18.063 ab	17.549 a-c	12.345 a-c

I2	3.165	d-i	10.134	b-e	9.115	d-f	2.567	hi	11.257	a-c	10.134	b-e	6.429	b-f
I3	5.487	a-d	12.486	a-e	28.785	a	8.559	a-c	12.508	a-c	12.486	a-e	7.886	b-f
I4	2.815	d-i	19.470	ab	3.774	f	1.321	i	13.335	a-c	19.470	ab	7.304	b-f
I5	2.444	f-i	5.029	e	7.818	f	1.749	i	5.670	c	5.029	e	3.227	f
I6	2.486	e-i	11.603	b-e	7.648	f	2.641	hi	7.495	bc	11.603	b-e	4.188	d-f
I8	2.252	f-i	7.714	b-e	4.538	f	1.580	i	8.746	a-c	7.714	b-e	5.865	b-f
I9	3.746	d-i	16.025	a-e	12.895	b-f	3.594	f-i	12.627	a-c	16.025	a-e	8.228	b-f
I10	2.740	e-i	15.538	a-e	9.217	d-f	2.424	hi	9.828	a-c	15.538	a-e	6.681	b-f
J1	2.344	f-i	7.090	c-e	4.383	f	2.180	i	10.330	a-c	7.090	c-e	5.886	b-f
J2	2.324	f-i	6.917	c-e	4.573	f	2.305	i	9.573	a-c	6.917	c-e	6.045	b-f
J3	3.071	d-i	14.544	a-e	8.921	d-f	2.989	hi	13.489	a-c	14.544	a-e	9.667	b-f
J4	3.238	d-i	14.830	a-e	6.517	f	2.567	hi	13.804	a-c	14.830	a-e	8.657	b-f
J5	2.931	d-i	15.667	a-e	9.847	d-f	3.056	hi	14.424	a-c	15.667	a-e	7.647	b-f
K1	2.661	e-i	12.297	a-e	10.098	c-f	2.773	hi	10.452	a-c	12.297	a-e	6.350	b-f
K2	2.404	f-i	10.871	b-e	4.627	f	1.823	i	9.039	a-c	10.871	b-e	7.175	b-f
K3	3.434	d-i	16.031	a-e	3.775	f	1.722	i	14.623	a-c	16.031	a-e	10.275	a-e
K4	3.075	d-i	16.845	a-d	2.508	f	1.224	i	16.102	a-c	16.845	a-d	12.391	ab
K5	3.427	d-i	11.608	b-e	6.466	f	2.248	i	12.111	a-c	11.608	b-e	7.656	b-f

Figure S7. HAC on the quantitation data of the phenolic compounds by HPLC-UV. Accession names were colored according to their composition in volatile compounds (Ward's method, n=3).

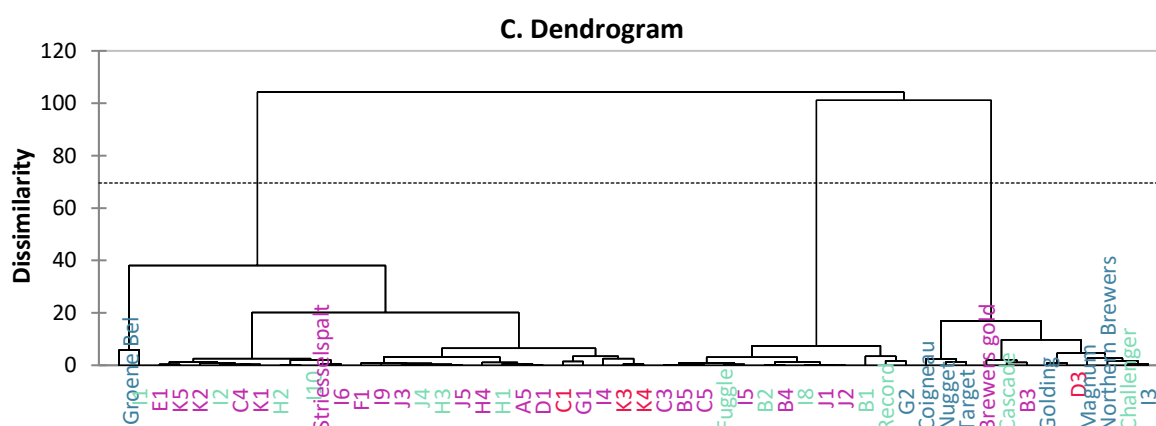


Table S8. Identification of phenolic compounds by UPLC-HDMS^E

#	Rt (min)	[M-H] ⁻ (m/z) measured	Error (ppm)	[M-H] ⁻ precursor ion (m/z)	Identification	Elemental composition	MS ² fragment ions (m/z)	Reference	
1	1.5	339.12352	-0.6	339.12325	Desmethylxanthohumol	C ₂₀ H ₁₉ O ₅ ⁻	237, 317	Farag 2012	*
2	2.193	353.13925	0.0	353.13890	Xanthohumol	C ₂₁ H ₂₁ O ₅ ⁻	354, 327, 311, 251	Farag 2012	*
3	2.526	353.13932	0.0	353.13890	Isoxanthohumol	C ₂₁ H ₂₁ O ₅ ⁻	311, 265, 251	Farag 2012	
4	2.663	377.19689	-0.5	377.19641	unkown 1	C ₂₁ H ₂₉ O ₆ ⁻	311, 297		
5	3.498	347.18617	-0.9	347.18585	Cohumulone	C ₂₀ H ₂₇ O ₅ ⁻	325, 278, 311, 235	Farag 2012	*
6	3.658	331.1913	-0.9	331.19093	4-Deoxycohumulone	C ₂₀ H ₂₇ O ₄ ⁻	325, 297	Nicácio 2022	
7	3.791	361.20194	-0.8	361.20150	Humulone	C ₂₁ H ₂₉ O ₅ ⁻	339, 292, 431	Farag 2012	*
8	3.798	377.19691	0.0	377.19641	Humulinone	C ₂₁ H ₂₉ O ₆ ⁻	339, 292	Farag 2012	
9	3.859	361.2198	-0.3	361.20150	Adhumulone	C ₂₁ H ₂₉ O ₅ ⁻	339, 325, 292	Farag 2012	*
10	3.962	345.20702	-0.9	345.20658	Deoxyhumulone	C ₂₁ H ₂₉ O ₄ ⁻	339	Nicácio 2022	
11	4.312	375.21756	0.3	375.21715	Préhumulone	C ₂₂ H ₃₁ O ₅ ⁻	427, 339, 311	Farag 2012	
12	4.339	385.23838	-0.3	385.23788	Postlupulone	C ₂₄ H ₃₃ O ₄ ⁻	339,311, 265	Nicácio 2022	
13	5.019	399.25408	1.5	399.25353	Colupulone	C ₂₅ H ₃₅ O ₄ ⁻	373, 287	Farag 2012	*
14	5.61	413.3903	1.2	413.26918	Lupulone	C ₂₆ H ₃₇ O ₄ ⁻	387	Farag 2012	*
15	5.776	413.2908	-0.2	413.26918	Adlupulone	C ₂₆ H ₃₇ O ₄ ⁻	287, 325	Farag 2012	*
16	6.466	427.28547	0.2	427.28483	Prelupulone	C ₂₇ H ₃₉ O ₄ ⁻	401, 358, 315	Farag 2012	

Compounds identified with an asterisk were confirmed by standard injections.

Table S9. Physico-chemical characterization of beers

	IBU	Alcool (v/v)	EBC	Total acidity	Residual sugar (°P)
Nugget	25.575	6.033	14.938	7.688	1.270
Strisselspalt	26.400	5.920	13.638	7.688	1.330
Cascade	13.175	6.100	14.575	7.330	1.280
Magnum	38.275	6.313	13.213	7.062	1.213
Nbrewers	18.150	5.967	13.275	8.135	1.270
Target	20.250	5.853	15.800	7.598	1.190
Bgold	32.800	6.553	20.775	6.257	1.393
Gbel	24.325	6.627	16.650	4.023	1.203
Record	20.100	6.553	28.738	7.866	1.493
B3	25.600	6.147	13.400	4.917	2.357
C4	21.225	5.553	39.713	5.721	2.210
C5	17.350	5.240	28.213	5.185	2.193
D3	18.400	5.533	8.375	6.883	2.097
F1	15.325	4.690	14.500	4.201	2.275
G1	17.625	5.040	11.225	4.112	2.155
G2	15.425	5.260	8.888	6.973	2.083
H1	21.350	6.567	20.800	5.989	1.387
H2	20.650	5.447	8.225	6.973	2.123
I3	18.600	5.587	12.400	7.062	2.120
I4	20.075	6.447	16.763	4.470	1.240
I5	13.950	4.880	9.813	3.754	2.100
I8	15.950	5.127	9.763	5.006	2.183
I9	23.350	5.933	37.638	6.526	2.250
K3	20.600	5.907	16.038	7.330	1.363
K4	17.450	4.867	14.588	4.470	2.287
K5	17.025	5.573	11.138	6.973	2.063
No-arom	15.650	5.863	5.975	7.330	2.180

Table S10. ANOVA on the physico-chemical characterization of beers

	Bitterness	Alcohol	Color	Residual sugar	Total acidity
R²	0.987	0.971	0.999	1.000	0.970
F	80.418	34.775	768.513	8164.336	33.384
Pr > F	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Figure S11. Relative composition (% of total TIC peak area) of 26 beers analyzed by SBSE GC-MS based on classification of the identified metabolites in the following nine groups: monoterpenes and sesquiterpenes, hydrocarbons, alcohols, carboxylic acids, alkenes, ketones, esters, halogenated, others and unidentified.

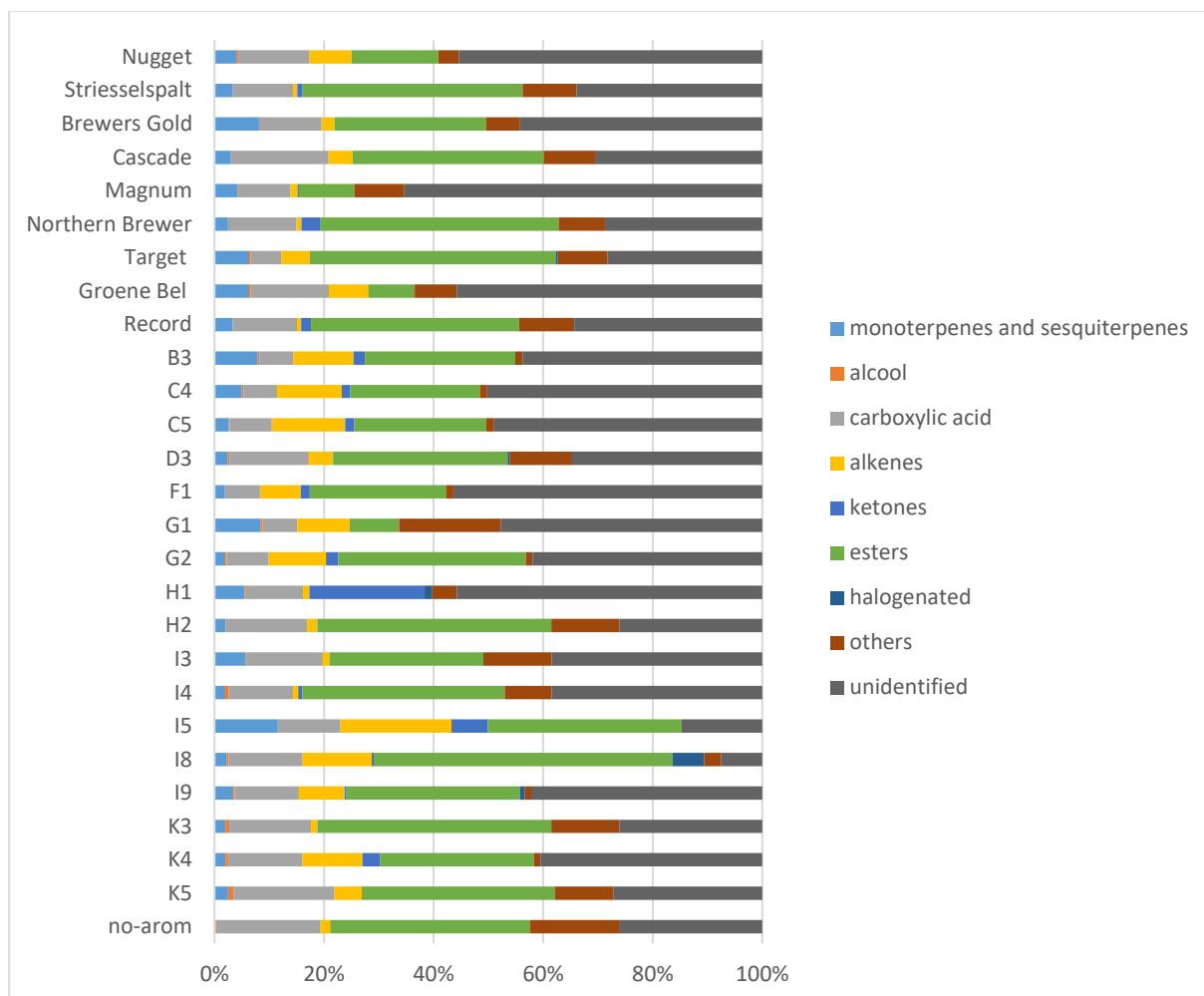


Table S12. Volatile compounds detected in beers by SBSE GC-MS

	Formula	Score	Rt	CAS	Aire max (%)
Terpenes and sesquiterpenes					
<i>β</i> -Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	94.08	20.396	87-44-5	0.39%
Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	84.97	24.598	1139-30-6	1.45%
<i>α</i> -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	84.54	25.072	473-16-5	4.28%
<i>β</i> -Damascenone	C ₁₃ H ₁₈ O	87.9	19.588	23726-93-4	0.11%
<i>α</i> -Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	86.28	24.99	481-34-5	0.74%
<i>δ</i> -Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	88.29	24.722	483-76-1	0.50%
Alloarmarandrene	C ₁₅ H ₂₄	85.64	20.293	25246-27-9	0.22%
Citronellol	C ₁₀ H ₂₀ O	94.69	15.912	106-22-9	6.23%
<i>γ</i> -Elemene	C ₁₅ H ₂₄	90.28	20.634	30824-67-0	0.12%
trans-Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	89.78	16.54	106-24-1	0.78%
<i>α</i> -Humulene	C ₁₅ H ₂₄	94.27	21.011	6753-98-6	1.29%
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	93.88	12.734	78-70-6	6.61%
Nerol	C ₁₀ H ₁₈ O	84.46	16.587	106-25-2	3.72%
Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	90.66	23.147	7212-44-4	0.52%
<i>α</i> -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	80.83	23.958	80-56-8	0.24%
<i>γ</i> -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	91.62	21.437	515-17-3	0.17%
<i>β</i> -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	95.38	21.69	17066-67-0	0.34%
<i>α</i> -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	95.67	21.867	473-13-2	0.26%
<i>δ</i> -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	83.03	24.572	28624-23-9	1.81%
Spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	95	23.632	6750-60-3	1.21%
Rosifoliol	C ₁₅ H ₂₄ O	81.93	24.492	0-00-0	0.15%
<i>α</i> -Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	87.95	12.858	586-62-9	6.15%
Valencene	C ₁₅ H ₂₄	91.23	24.72		0.52%
Esters					
1-Butanol. 3-methyl-. acetate	C ₇ H ₁₄ O ₂	91.51	7.058	123-92-2	10.40%
1-Chloroethyl acetate	C ₄ H ₅ ClO ₂	82.97	2.236	0-00-0	4.43%
2-Propenoic acid. 3-phenyl-. ethyl ester	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	93.27	21.186	103-36-6	0.78%
2-Propenoic acid. 3-phenyl-. ethyl ester	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	96.18	21.191	103-36-6	0.54%
1-Pentadecyne	C ₁₅ H ₂₈	84.4	17.126	765-13-9	0.46%
1.2-Benzenedicarboxylic acid. diethyl ester	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	93.82	38.535	117-81-7	0.32%
1.5.8.8-tetramethyl-cycloundeca-5.9-dien-1-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	82.14	24.005	0-00-0	0.33%
(E)-2.(Z)-6 methyl 3.11-dimethyl-7-trifluoromethyldodeca-2.6.10-trienoate	C ₁₆ H ₂₃ F ₃ O ₂	80.12	10.773	69856-59-3	0.37%
3.7.11-trimethyl-3-hydroxy-6.10-dodecadien-1-yl acetate	C ₁₇ H ₃₀ O ₃	80.11	23.137	107697-30-3	0.30%
Ethyl 3-phenylpropionate	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	95	18.774	2021-28-5	2.46%
Ethyl E-4-decenoate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	93.23	19.309	0-00-0	0.64%
Ethyl 9-decenoate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	93.54	19.508	0-00-0	23.68%
Ethyl Caproate	C ₈ H ₁₆ O ₂	81.27	10.164	123-66-0	0.35%

Ethyl caprate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	92.59	19.704	110-38-3	8.18%
Ethyl cinnamate	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	95.54	21,273	103-36-6	0.30%
Ethyl Laurate	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	85.91	23.684	106-33-2	0.16%
Diethyl butanedioate	C ₈ H ₁₄ O ₄	93.62	14.857		0.31%
Citronellyl acetate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	80.96	15.91	150-84-5	0.24%
Cyclopentasiloxane, octamethyl-	C ₈ H ₂₄ O ₄ Si ₄	92.21	10.142	556-67-2	0.36%
Cyclopentasiloxane, decamethyl-	C ₁₀ H ₃₀ O ₅ Si ₅	89.48	14.126	541-02-6	2.52%
Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	C ₈ H ₂₄ O ₄ Si ₄	94.86	10.146	556-67-2	0.51%
Isoamyl acetate	C ₇ H ₁₄ O ₂	84.23	7.04	123-92-2	1.24%
Isobutyl isopentanoic acide ester	C ₉ H ₁₈ O ₂	94.59	10.691	03/01/2050	0.37%
Methyl 4-methylhexa-2-enoate	C ₈ H ₁₄ O ₂	81.17	10.987	2445-71-8	2.60%
Linalyl propionate	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	85.17	15.151	144-39-8	0.14%
Alcohols					
1-Decanol	C ₁₀ H ₂₂ O	95.73	17.012	0-00-0	2.19%
1-Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	85.51	12.089	112-53-8	0.51%
1-Nonanol	C ₉ H ₂₀ O	88.27	14.617	143-08-8	1.35%
1-Eicosanol	C ₂₀ H ₄₂ O	95.3	31.123	629-96-9	0.20%
1-Heptanol	C ₇ H ₁₆ O	93.35	9.506	111-70-6	1.05%
1-Hepten-3-ol	C ₇ H ₁₄ O	81.1	9.737	4938-52-7	4.48%
1-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	97.14	11.993	111-87-5	3.94%
1-Octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	88.45	9.746	3391-86-4	1.00%
1-Tetradecanol	C ₁₄ H ₃₀ O	96.85	28.88	112-72-1	0.16%
1-Hexadecanol	C ₁₆ H ₃₄ O	93.11	32.12	36653-82-4	0.11%
1-Undecanol	C ₁₁ H ₂₄ O	83.32	21.31	112-42-5	0.11%
1.6.10-Dodecatrien-3-ol. 3.7.11-trimethyl-. (E)-	C ₁₅ H ₂₆ O	88.29	23.141	40716-66-3	0.65%
2-Decanol	C ₁₀ H ₂₂ O	91.21	15.262	1120-06-5	0.94%
2-Heptanol. 5-methyl-	C ₈ H ₁₈ O	80.81	15.335	54630-50-1	0.13%
2-Naphthalenemethanol. 2.3.4.4a.5.6.7.8-octahydro-.alpha...alpha..4a.8-tetramethyl-. [2R-(2.alpha..4a.beta..8.beta.)]-	C ₁₅ H ₂₆ O	86.07	25.026	63891-61-2	0.72%
6.10-Dodecadien-1-ol. 3.7.11-trimethyl-	C ₁₅ H ₂₈ O	85.76	25.527	51411-24-6	0.44%
Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)-	C ₂₇ H ₄₆ O	88.33	45.285	57-88-5	0.32%
4-(2.2.6-Trimethylcyclohexyl)-2-butanol	C ₁₃ H ₂₆ O	92.51	15.899		3.20%
2-Undecanol	C ₁₁ H ₂₄ O	90.9	17.566	1653-30-1	1.02%
3-Cyclohexene-1-methanol. .alpha...alpha..4-trimethyl-	C ₁₀ H ₁₈ O	93.93	15.153	98-55-5	0.21%
3-Octen-1-ol	C ₈ H ₁₆ O	88.89	9.742	18185-81-4	3.87%
3.3-dimethyl-1-decen-4-ol	C ₁₂ H ₂₄ O	91.91	8.392	121231-51-4	3.30%
3-Ethyl-pentan-2-ol	C ₇ H ₁₆ O	83.84	4.204	609-27-8	0.56%
4-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	83.83	15.842	589-62-8	2.41%
4-vinyl-2-methoxy-phenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	91.37	17.915		8.96%
6-Octen-1-ol. 3.7-dimethyl-. (R)-	C ₁₀ H ₂₀ O	83.47	15.903	1117-61-9	0.96%
(Z)-6-undecen-2-ol	C ₁₁ H ₂₂ O	82.69	17.132	0-00-0	0.29%
Alkenes and alkanes					

1.4-Pentadiene. 2.3.3-trimethyl-1-Heptene. 6-methyl-	C ₈ H ₁₄	80.34	17.324	756-02-5	0.20%
1.6-Octadiene. 3.5-dimethyl-. cis-5-Iodopent-2-ene	C ₈ H ₁₆	89.25	11.997	5026-76-6	0.28%
(1RS,2SR,6RS)-Methyl 9-oxo-8-oxabicyclo-[4.3.0]non-4-ene-2-carboxylate	C ₁₀ H ₁₈	82.42	7.814	0-00-0	0.23%
(1RS,2RS,4SR,5SR)-6-Oxabicyclo[3.1.0]hexane-2.4-diol	C ₅ H ₉ I	82.56	8.392	75067-63-9	3.50%
1.5.7-Octatrien-3-ol. 2.6-dimethyl-2.6-Octadiene. 2.7-dimethyl-2.3.4-Trimethylpentane	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	81.47	16.402	122457-91-4	0.11%
2-Phenylnitroethane	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	81.47	16.402	122457-91-4	2.43%
3-(Methoxymethoxy)cyclohexene	C ₁₀ H ₁₆	90.1	14.283	586-62-9	0.30%
4.4-dimethyl-3-trimethylsilyloxy-1-pentene	C ₁₀ H ₁₈	91.45	10.103	16736-42-8	4.60%
Nonalal	C ₈ H ₁₈	88.87	9.377	0-00-0	0.48%
Benzene. 1.2-dimethyl-Ketone	C ₈ H ₉ NO ₂	89.71	17.684	0-00-0	0.18%
2-Nonanone	C ₈ H ₁₄ O ₂	80.33	10.293	5070-51-9	0.15%
3-Buten-2-one	C ₁₀ H ₂₂ OSi	80.78	19.62	90270-49-8	0.15%
5.9-Undecadien-2-one. 6.10-dimethyl-. (E)-6-Methyl-5-hepten-2-one	C ₉ H ₁₈ O	91.72	12.948	124-19-6	2.38%
3-Cyclohexyl-1.3-dimethylazetidione					5.63%
Oxacycloheptadecan-2-one	C ₉ H ₁₈ O	87.54	12.641	821-55-6	0.18%
5.9-Undecadien-2-one. 6.10-dimethyl-. (E)-Acid carboxylic	C ₄ H ₆ O	85.05	7.045	78-94-4	0.89%
2-Methyl-2-pentenoic acid	C ₁₃ H ₂₂ O	82.64	20.979	3796-70-1	0.20%
2-Methyl-2-pentenoic acid	C ₈ H ₁₄ O	88.93	9.943	110-93-0	3.10%
2(3H)-Furanone. 5-hexyldihydro-2(3H)-Furanone. dihydro-5-pentyl-2.6.10.14.18.22-Tetracosahexaene. 2.6.10.15.19.23-hexamethyl-2-Naphthalenemethanol. 2.3.4.4a.5.6.7.8-octahydro-.alpha...alpha..4a.8-tetramethyl-. [2R-(2.alpha..4a.beta..8.beta.)]-5-Methylhexanoic acid	C ₁₁ H ₁₇ NO ₂	84.91	8.415	74255-34-8	0.24%
9-Octadecenoic acid (Z)-9-Octadecenoic acid (Z)-. ethyl ester	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	90	29.916	109-29-5	4.78%
Acetic acid. 2-phenylethyl ester	C ₁₃ H ₂₂ O	80.69	20.978	110-38-3	0.39%
Acetic acid. hexyl ester	C ₆ H ₁₀ O ₂	84.67	10.692	3142-72-1	0.97%
Benzeneacetic acid. ethyl ester	C ₆ H ₁₀ O ₂	83.74	10.62	3142-72-1	0.54%
Benzoic acid	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	83.85	18.978	706-14-9	0.79%
Benzoic acid. ethyl ester	C ₉ H ₁₆ O ₂	84.7	19.099	104-61-0	0.92%
Butanoic acid	C ₃₀ H ₅₀	81.64	42.012	7683-64-9	7.08%
Butanoic acid. anhydride	C ₁₅ H ₂₆ O	89.73	24.412	63891-61-2	1.06%
Butanoic acid. ethyl ester	C ₇ H ₁₄ O ₂	87.34	11.742	0-00-0	0.14%
	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	82.74	32.963	57-11-4	1.43%
	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	82.24	33.315	111-62-6	0.22%
	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	93.02	16.613	103-45-7	7.35%
	C ₈ H ₁₆ O ₂	95.9	10.622	142-92-7	0.20%
	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	92.51	16.306	101-97-3	1.94%
	C ₇ H ₆ O ₂	94.83	15.879	65-85-0	1.20%
	C ₉ H ₁₀ O ₂	91.43	14.636	93-89-0	0.31%
	C ₄ H ₈ O ₂	82.63	9.985	107-92-6	0.28%
	C ₈ H ₁₄ O ₃	90.16	5.406	106-31-0	0.24%
	C ₆ H ₁₂ O ₂	81.14	5.416	105-54-4	0.28%

Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	82.89	19.588	334-48-5	21.45%
Decanoic acid. ethyl ester	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	93.25	19.681	110-38-3	10.67%
Dehydroisohumulinic acid	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	83	31.465	38574-25-3	1.61%
Dehydro-cohumulinic acid	C ₁₄ H ₁₈ O ₃	83.69	29.904	959058-26-5	#REF!
Dodecanoic acid. ethyl ester	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	92.46	23.684	106-33-2	5.35%
Heptanoic acid	C ₇ H ₁₄ O ₂	84.12	12.61	111-14-8	0.17%
Heptanoic acid. ethyl ester	C ₉ H ₁₈ O ₂	88.61	12.391	106-30-9	1.05%
Heptadecene-(8)-carbonic acid -(1)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	83.42	32.883	0-00-0	0.68%
Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	84.1	30.282	57-10-3	8.47%
Hexadecanoic acid. ethyl ester	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	85.89	30.664	628-97-7	7.52%
Hexadecanoic acid. 1-methylethyl ester	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	83.07	31.223	142-91-6	13.40%
Hexanoic acid. ethyl ester	C ₈ H ₁₆ O ₂	90.93	10.193	123-66-0	12.39%
Humulinic acid	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	88.25	29.224		0.66%
Nonanoic acid	C ₉ H ₁₈ O ₂	83.97	17.054	112-05-0	2.86%
Nonanoic acid. ethyl ester	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	95.67	17.45	123-29-5	0.29%
Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	85.99	33.236	57-11-4	1.13%
Octanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	94.69	15.282	106-32-1	7.67%
Octanoic acid. ethyl ester	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	94.36	15.223	106-32-1	24.94%
Propanoic acid	C ₄ H ₈ O ₂	82.11	9.057	79-31-2	0.77%
Propanoic acid. 2-methyl-	C ₄ H ₈ O ₂	82.11	9.057	79-31-2	0.14%
Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	90.78	30.275		10.12%
Pentanoic acid	C ₅ H ₁₀ O ₂	83.76	15.616	109-52-4	1.57%
Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	89.04	28.544	1002-84-2	4.37%
Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	90.95	26.786	544-63-8	6.13%
4-(2'.4'-dimethoxy-6'-propylbenzoyloxy)-2-hydroxy-6-pentylbenzoic acid	C ₂₄ H ₃₀ O ₇	88.97	5.859	104307-58-6	0.17%
Halogenated					
3-Chloro-4-methoxy-1-(2-deoxy-.beta.-D-erythro-pentofuranosyl)pyridazin-6-one	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₅	85.63	25.027	87008-98-8	0.33%
7-Methyl-3-trifluoromethylocta-1.6-dien-3-ol	C ₁₀ H ₁₅ F ₃ O	91.2	19.542	69856-62-8	0.23%
cis-2-butoxy-1.1-difluoro-3-methylcyclopropane	C ₈ H ₁₄ F ₂ O	82.26	4.218	131262-41-4	0.51%
cis-1.3-Difluoro-1.3-dimethylcyclobutane	C ₆ H ₁₀ F ₂	83.26	15.827	87295-31-6	5.77%
Erythro-4-Bromo-5-fluorooctane	C ₈ H ₁₆ BrF	83.37	4.182	130876-11-8	0.88%
Others					
4.7.10-Cycloundecatriene. 1.1.4.8-tetramethyl-. cis. cis. cis-	C ₁₅ H ₂₄	86.98	21.015	0-00-0	0.16%
4-Methoxy-2-methylbenzaldehyde	C ₉ H ₁₀ O ₂	84.96	25.014	52289-54-0	0.23%
6.7-Dimethoxy-2-methyl-3.4-dihydro[1-D]isoquinolinium ion	C ₁₂ H ₁₅ DNO ₂	86.19	5.86	0-00-0	0.18%
Agaruspriol	C ₁₅ H ₂₆ O	90.01	24.728	1460-73-7	0.78%
Benzene. 1.2-dimethyl-					5.63%
Benzeneacetonitrile	C ₈ H ₇ N	90.67	16.407	101-97-3	0.16%
Benzeneethanol	C ₈ H ₁₀ O	93.9	13.21	60-12-8	12.95%
Undecanal	C ₁₁ H ₂₂ O	89.55	17.802	112-44-7	0.21%

Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	94.17	15.458		9.61%
Benzonitrile. 2-methyl-	C ₈ H ₇ N	92.26	13.866	529-19-1	0.15%
Benzyl prop-1-enyl ether	C ₁₀ H ₁₂ O	83.72	16.399	15895-87-1	0.31%
Calaren	C ₁₅ H ₂₄	82.37	24.8	17334-55-3	0.37%
Cyclobutane. 1,2-diethyl-. cis-	C ₈ H ₁₆	81.59	12.094	61141-50-2	0.34%
Di-isobutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	90.94	28.655	84-69-5	0.46%
Dodecanamide. N,N-bis(2-hydroxyethyl)-	C ₁₆ H ₃₃ NO ₃	92.69	23.218	120-40-1	6.70%
Farnesol	C ₁₅ H ₂₆ O	88.72	26.105	4602-84-0	0.74%
Globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	91.36	23.76		0.26%
Hexane. 3-methyl-	C ₇ H ₁₆	93.29	9.942	589-34-4	0.19%
Hinesol	C ₁₅ H ₂₆ O	83.05	24.803	23811-08-7	0.21%
Isospathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	86.12	26.212	0-00-0	0.23%
Junipercamphor	C ₁₅ H ₂₆ O	96.74	25.796	107341-58-2	1.29%
Methane. isocyanato-	C ₂ H ₃ NO	81.2	4.226	624-83-9	0.50%
N-methylpropylidenamin-n-oxid	C ₄ H ₉ NO	88.06	8.749	107341-58-2	0.54%
Oxirane. decyl-	C ₁₂ H ₂₄ O	84.66	17.12	2855-19-8	0.30%
Propane. 1-(1-methylethoxy)-	C ₆ H ₁₄ O	80.47	15.704	627-08-7	2.41%
Styrene	C ₈ H ₈	95.34	7.477	100-42-5	0.48%
(2R)-2-Methyl-4-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]butan-1-ol	C ₁₀ H ₂₀ O ₃	83.52	15.674		0.11%
(Z)6.(Z)9-Pentadecadien-1-ol	C ₁₅ H ₂₈ O	81.93	25.239	77899-11-7	0.16%

Table S13. Panel validation on performances test

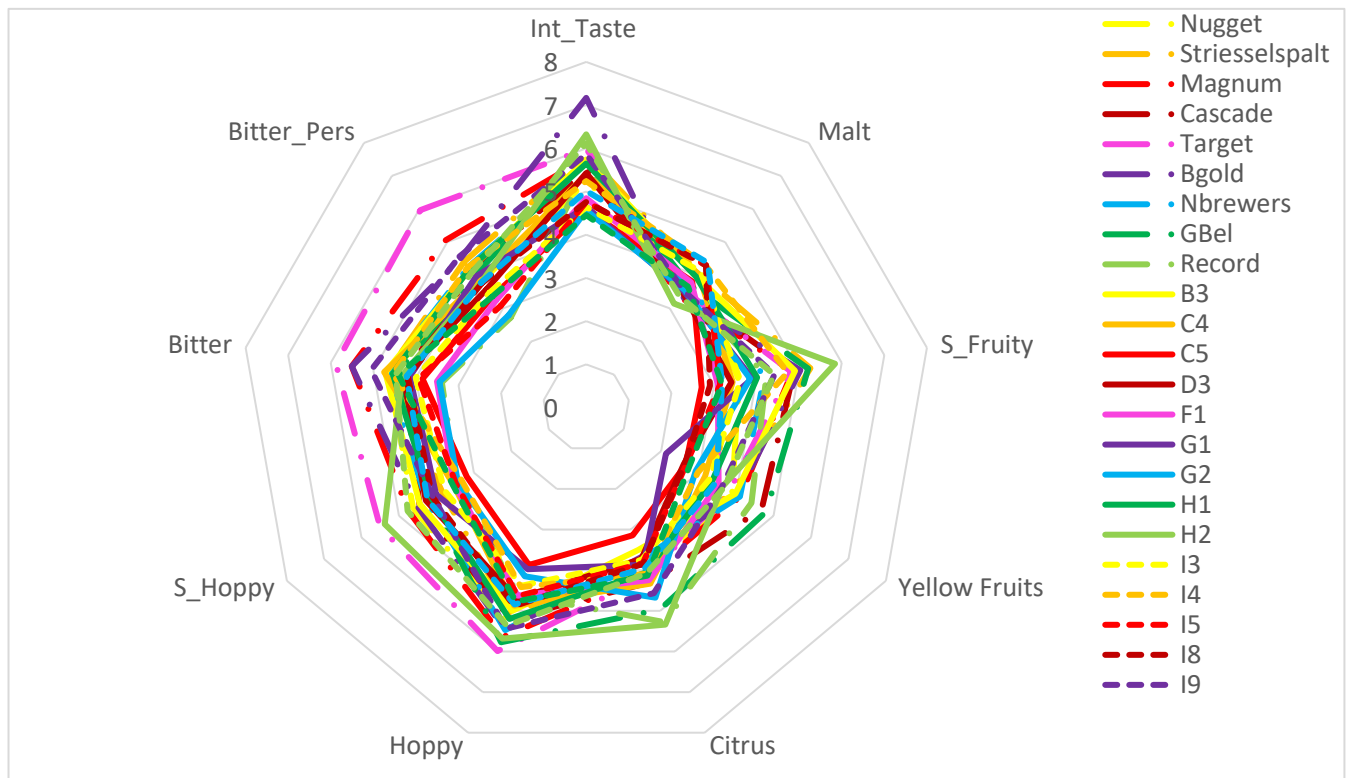
Descripteur	O_fruitée	O_houblon	O_malt	Int_goût	Fruité	Floral	Houblon	Malt	Acide	Amer	Sucré	Astringeant	Perst_amère
P produit	0,017	<0,0001	0,043	0,019	0,023	<0,0001	<0,0001	0,125	0,201	<0,0001	0,347	0,000	<0,0001
P répétition	0,378	0,947	0,134	0,904	0,588	0,962	0,155	0,716	0,567	0,662	0,315	0,423	0,939
P juges	0,015	<0,0001	0,008	0,057	<0,001	<0,0001	0,000	0,001	0,001	0,043	0,007	0,043	0,222
P produit*juge	0,068	0,003	0,891	0,430	0,002	0,002	0,003	0,102	0,565	0,013	0,846	0,075	0,187
P produit*répétition	0,205	0,077	0,279	0,583	0,132	0,256	0,155	0,881	0,953	0,964	0,655	0,882	0,908

Table S14. Significance of descriptors (ANOVA)

Descriptors	<i>p</i> -values
Intensity of the smell	0,055
Hoppy smell	0,034
Fruity smell	0,043
Malty smell	0,131
Intensity of the taste	0,007
Malt	0,049
Hops	0,007
Citrus	0,004
Red fruits	0,839
Yellow fruits	0,005
Bitter	0,006
Floral	0,234
Acid	0,248
Sweet	0,313
Spicy	0,454
Astringent	0,995
Bitter persistence	0,004

Significant *p*-value <5% are in bold.

Figure S15. Aromatic profile of beers



“S_hoppy”: hoppy smell; “Hoppy”: hoppy aroma; “S_fruity”: fruity smell; “Int_taste”: intensity of the taste; “Bitter”: bitter taste; “Bitter_pers”: persistence of the bitterness; “S_Fruity”: fuity smell; “Yellow Fruits”: yellow fruits taste; “Malt”: malt taste.

Figure S16. Blocks contribution

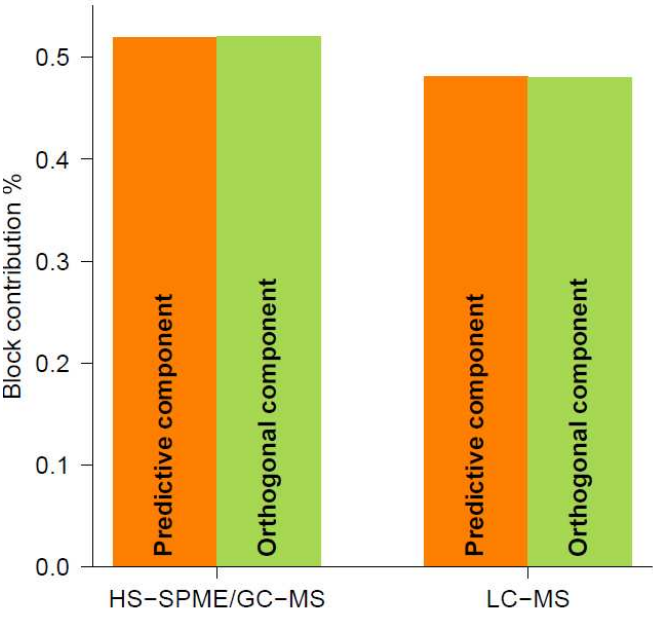
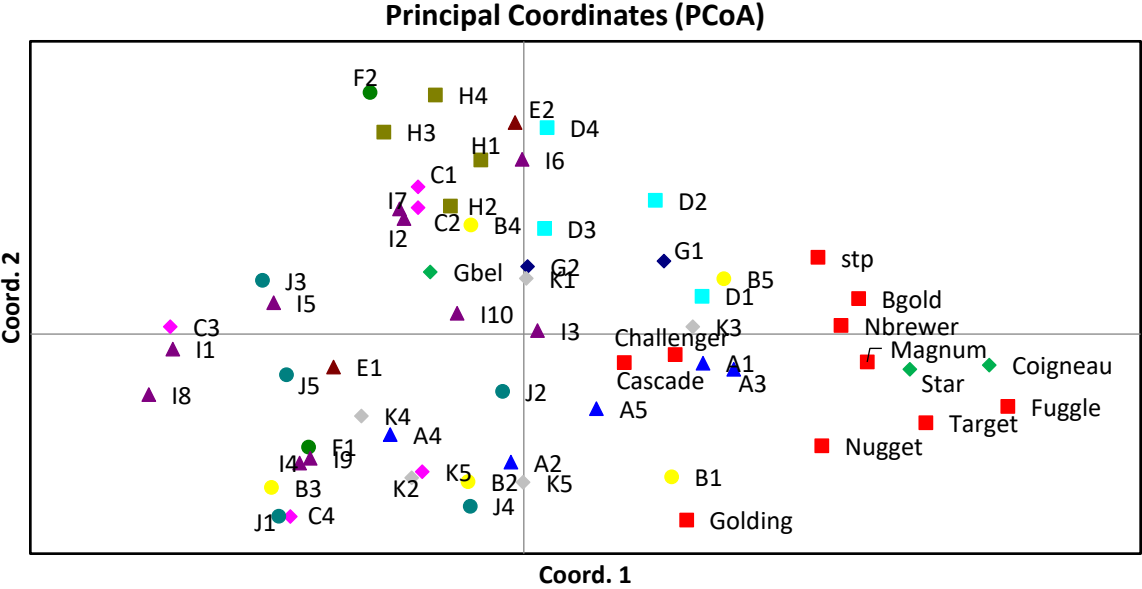


Figure S17. PCoA based on genetic distances between each accession



Individuals were colored according to their sample site collection. This figure was obtained by data analysis of the genotyping obtained in the study Paguet et al. (submitted).

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Ce projet de thèse visait à explorer la diversité génétique et chimique de houblons sauvages collectés sur différents biotopes de la région Hauts-de-France. Cette plante cultivée présente un fort ancrage régional, notamment lié à des pratiques culturelles anciennes partagées avec la Belgique. Dans le contexte actuel de renouveau des bières aromatiques et artisanales, les brasseurs sont, comme nous avons pu le mettre en évidence au cours du **Chapitre 1**, à la recherche de houblons typiques de la région, avec un potentiel aromatique original et produits localement. En effet, le développement variétal du houblon a considérablement érodé la diversité génétique, et les variétés actuelles recherchées, plutôt aromatiques que amérisantes, sont peu adaptées au terroir local. Les accessions sauvages apparaissent ainsi comme un réservoir de diversité potentiel, pouvant être utilisé comme base dans le cadre d'un projet d'amélioration variétale. L'évaluation et la valorisation de la diversité du houblon sauvage (**Chapitre 3**) dont la méthodologie a été développée au cours du **Chapitre 2**, i) est primordiale pour enrichir la diversité génétique en Europe ; ii) peut permettre de trouver des variétés adaptées au terroir local, avec des caractéristiques aromatiques originales et intéressantes ; iii) constitue une étape possible pour le développement de programmes de sélection. Dans la présente étude, grâce à une approche pluridisciplinaire, il a été possible d'explorer la diversité des houblons sauvages du Nord de la France, par comparaison à 10 variétés commerciales et 3 variétés anciennes.

La caractérisation génétique des accessions, par l'utilisation de marqueurs moléculaires (**Étude I**), a permis d'avoir un pouvoir de discrimination élevé entre les différentes accessions. En utilisant 11 marqueurs microsatellites dotés d'une bonne capacité de discrimination, de reproductibilité et de robustesse, l'étude génétique de la diversité des houblons sauvages collectés dans le Nord de la France a montré, par une analyse hiérarchique, une grande variabilité parmi les accessions analysées. Cette étude a aussi mis en évidence une distance génétique intéressante entre les accessions sauvages collectées, contrairement aux accessions commerciales plus proches génétiquement. Cette observation confirme ce qui a déjà été observé dans les travaux de Mongelli et al. (2015) en Italie ou de Mafakheri et al. (2020) en Iran. Les analyses de flux de gènes entre populations semblent mettre en évidence que les accessions sauvages issues du Nord de la France ne peuvent pas être considérées comme des houblons rémanents, et sont de ce fait bien des individus natifs, comme le suggèrent Murakami et al. (2006). Néanmoins, la robustesse de ces analyses, notamment les analyses bayésiennes, pourrait être améliorée en augmentant le nombre d'accessions génotypées. En raison de la complexité de l'organisation des collectes et de l'échantillonnage (séchage, stockage...) sur un seul mois et de leur conservation au sein de notre collection de ressources génétiques, nous n'avons pu génotyper qu'une cinquantaine d'accessions comparées à 13 variétés commerciales et sauvages. C'est

un nombre relativement limité pour ce type d'analyses, bien que Mafakheri et al. (2020) ont réalisé des analyses avec le logiciel STRUCTURE sur 54 germoplasmes au total. En augmentant le nombre d'individus inclus dans l'étude, cela permettrait d'avoir une meilleure vision de la structuration génétique de ces populations de houblons sauvages.

La caractérisation chimique de ces mêmes accessions sauvages, incluant le dosage du XN et des acides α et β , une analyse des composés volatils et une analyse de métabolomique non ciblée, a été réalisée en conditions *in-situ* (**Étude I**) et *ex-situ* (**Étude III**). Leur potentiel phytochimique a été comparé à celui de variétés commerciales et anciennes. La quantification des acides α et β a révélé que les houblons sauvages étaient globalement caractérisés par des teneurs en acides α plutôt modérées, mais des teneurs en acides β supérieures à celles des références commerciales. Certaines accessions sauvages ont par ailleurs révélé des teneurs en composés volatils intéressantes. L'ensemble des génotypes contenaient du β -caryophyllène et de l' α -humulène, deux sesquiterpènes responsables de l'arôme épicé et boisé du houblon, avec pour certaines accessions des teneurs assez élevées (notamment pour les accessions G2, I3, K3 et K4). Les accessions I8, I9 et I10 semblent quant à elles particulièrement intéressantes pour leur teneur élevée en β -farnésène, molécule aromatique que l'on trouve dans le "houblon noble" traditionnel. Enfin, des teneurs importantes en α - et β -sélinène ont reportées dans certaines de nos accessions sauvages. Patzak et al. (2010) avaient identifié ces molécules comme des composés volatils typiques du houblon sauvage, ce qui s'est également confirmé par notre analyse multiblocks. La présence de certains composés aromatiques d'intérêt renforce donc l'idée de l'utilisation possible du houblon sauvage comme base de programme de sélection, pour le développement de variétés avec un potentiel et une originalité aromatique. Néanmoins, le nombre de composés volatils originaux identifiés en *ex-situ* (**Étude III**) était moins important que celui des composés volatils originaux identifiés en *in-situ* (**Étude I**). Ces analyses en *ex-situ* pourront être reproduites en 2022 et en 2023 pour confirmer cette observation qui pourrait s'expliquer par un effet terroir. Plusieurs auteurs, notamment Morcol et al. (2020) et Van Holle et al. (2017), ont déjà mis en évidence le fait que les houblons cultivés en conditions « standardisées » avaient une diversité chimique moins importante que ceux collectés en conditions *in-situ*. Dans le cadre de notre étude, cet effet terroir a également été souligné par l'analyse multifactorielle réalisée sur les houblons sauvages collectés *in-situ* (**Étude I**). En prenant en compte les effets de la génétique et du biotope (caractérisation pédologique), l'effet du site de collecte prédomine pour expliquer le chémotype des accessions caractérisées. Enfin, les analyses de métabolomique non-ciblée ont montré une plus grande diversité chimique des houblons sauvages par comparaison aux variétés anciennes et cultivées, et ce, aussi bien en conditions *in-situ* qu'en conditions *ex-situ*. Les analyses réalisées par UHPLC-HRMS sur les houblons collectés en *ex-situ* (**Étude III**) ont permis d'identifier certains dérivés d'acylphloroglucinols par déréplication. Des analyses par réseaux moléculaires seraient complémentaires aux études de métabolomique non ciblée pour explorer davantage cette diversité

chimique, notamment parmi les dérivés d'acylphloroglucinols. De telles analyses ont été initiées mais les difficultés techniques liées à l'équipement utilisé ne nous ont pas permis d'aller jusqu'au bout du traitement des données. Les houblons sauvages étant notamment riches en acides β , cela ouvre des pistes quant à leur valorisation pour leurs activités biologiques, notamment antimicrobiennes (Bocquet et al. 2018c).

Pour compléter l'exploration génétique et chimique de notre collection d'accessions sauvages, des brassins tests ont été réalisés afin d'évaluer également leur potentiel organoleptique (**Étude III**). Pour les différentes bières réalisées, les caractéristiques physico-chimiques (EBC, IBU, °P, %v/v) étaient globalement répétables d'une bouteille à l'autre. Par ailleurs, l'analyse de leurs composés volatils montre des variabilités intéressantes, en lien avec le houblon ajouté en *hop stand* (*whirlpooling*). Les analyses sensorielles réalisées par le panel ont permis de mettre en évidence certaines accessions avec un potentiel aromatique intéressant, telles que les accessions B3, H1, H2, I9, K5 par exemple, et ont confirmé l'opposition entre les variétés commerciales et les accessions sauvages, déjà identifiée d'un point de vue chimique. Néanmoins, nous avons dû éliminer un certain nombre de descripteurs (9 conservés sur les 17 sur lesquels le panel a été entraîné), et les résultats n'ont pas mis en évidence de tendance très tranchée. Cette observation est probablement liée à la recette utilisée dans le cadre de cette étude qui n'a pas permis au panel de correctement discriminer des différences aromatiques entre les différents échantillons. En particulier, le panel n'a pas fait de réelle différence entre les bières testées et la bière témoin brassée sans houblon aromatique. Ces analyses sensorielles seront donc à renouveler dans le cadre du programme Feader en améliorant la recette du brassin pour pouvoir mettre davantage en évidence les spécificités aromatiques des houblons testés. Il est notamment prévu d'augmenter la quantité de houblon ajouté et de tester le *dry hopping*. Par ailleurs, pour les prochaines sessions de brassage, la méthode de fabrication sera optimisée en réalisant un seul brassin de 600 L ensuite divisé en brassins de 10 L avant d'ajouter les houblons à tester. Une autre hypothèse pour expliquer la non répétabilité de ces analyses sur un grand nombre de descripteurs serait le manque d'entraînement du panel, bien qu'il valide toutefois les critères de validation (répétabilité, consensus et discrimination) lors des tests de performances (**cf. Annexe 5**).

Par ailleurs, comme pour la caractérisation chimique des accessions sauvages en *in-situ* de l'**Étude I**, un des biais de l'**Étude III** réside dans la différence d'itinéraire technique entre les variétés commerciales et anciennes et les accessions sauvages cultivées en *ex-situ* au lycée de Douai. En effet, les variétés commerciales ont subi des interventions (traitement phytosanitaire, fertilisation,...) afin d'assurer de bons rendements et des teneurs en composés volatils et acides α importantes (**Chapitre 2A**), alors que les accessions sauvages cultivées n'ont subi aucune intervention. Cette différence d'origine et d'itinéraire technique pourrait renforcer l'opposition déjà observée au niveau génétique, ce qui se traduit par une opposition du chémotype et donc du potentiel aromatique d'autant plus forte. Ce biais devrait être supprimé lors des futures analyses car il est prévu de mettre en culture les variétés

commerciales et anciennes sur la même parcelle que les accessions sauvages dans la houblonnière expérimentale.

Enfin, concernant l'évaluation de la diversité morphologique et du potentiel agronomique des accessions de notre collection, ce suivi a été difficile à mettre en œuvre en raison de l'absence de répétitions biologiques pour le moment. L'analyse morphologique a permis d'identifier des caractéristiques phénotypiques variées (**Étude II**). Cependant, le manque de répétitions biologiques n'aura pas permis d'approfondir cette caractérisation de la diversité morphologique, qui pourrait être utile pour définir les différents géotypes selon les critères de l'UPOV (2006). Ces résultats préliminaires ont néanmoins mis en évidence que les houblons sauvages collectés présentaient une diversité morphologique et pas uniquement génétique et chimique. Nous avons pu également montrer que les différentes accessions étaient plus ou moins résistantes à l'attaque de ravageurs et de pathogènes. Ces observations morphologiques et agronomiques vont se poursuivre dans le cadre du programme Feader et seront facilitées par la mise en place de houblonnières expérimentales et de conservation pérennes au lycée agricole de Douai-Wagnonville et sur un autre site probable à Villeneuve d'Ascq. Avec des résultats plus robustes, il serait en effet intéressant de relier ces observations avec les données de la métabolomique. Cela permettrait par exemple d'identifier des marqueurs responsables de la résistance des accessions aux ravageurs, comme Undas et al. (2018) ont pu le faire pour la résistance des houblons aux pucerons (*Phorodon humuli*), ou Trefilová et al. (2021) pour la résistance des houblons au mildiou, *Pseudoperonospora humuli*.

Ces trois années de recherche ont ainsi permis de constituer une base de données importante intégrant les profils phénotypique, génétique, chimique et aromatique d'un certain nombre d'accessions sauvages collectées dans le Nord de la France. Ce travail d'investigation a attesté de la richesse de la diversité des houblons sauvages de la région Hauts-de-France. Cette étude est bien sûr à approfondir, mais plusieurs accessions pourraient à l'issue de ce travail être candidates pour le développement de programmes de sélection. Dans un futur plus proche, la mise en place des houblonnières expérimentales pérennes permettra d'avoir des réplicats biologiques, et donc des suivis phénotypique et agronomique (résistance aux pathogènes et productivité notamment) plus robustes que ceux réalisés au cours de cette étude. Un suivi précis des pathogènes et des ravageurs pourra notamment permettre l'identification de marqueurs de la résistance aux pathogènes. L'amélioration de la recette de brassage et une meilleure formation du panel bière permettra une identification plus précise des marqueurs sensoriels. Au regard de la grande diversité chimique des accessions sauvages, des tests d'activités biologiques pourraient également être réalisés en santé humaine et du végétal, dans la continuité des travaux initiés antérieurement au sein de l'équipe. Il serait alors intéressant de coupler ces différentes caractéristiques agronomiques et biologiques à la diversité chimique, en particulier *via* des analyses par réseaux moléculaires

PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE EXPERIMENTALE

Cette partie reprend plus en détails la méthodologie utilisée pour les analyses dont les résultats ont été développés au cours du **Chapitre 3**.

1. Matériel collecté

1.1. Échantillonnage des houblons sauvages en conditions *in-situ*

Les collectes en *in-situ* se sont déroulées avant le début de ma thèse, en septembre 2019, période de maturité des cônes de houblon, et ont été réalisées par les Drs Céline Rivière et Gabriel Lefèvre, en partenariat avec les plusieurs gestionnaires de sites naturels (parcs naturels régionaux, départements du Nord et du Pas-de-Calais...) mais également sur quelques terrains privés en accord avec les propriétaires. Préalablement à cette collecte, le Dr C. Rivière a réalisé une déclaration pour l'accès aux ressources génétiques et le partage des avantages découlant de leur utilisation auprès du ministère de la transition écologique et solidaire. Cette déclaration a été réalisée en août 2019 en tant que personne morale au nom de l'Université de Lille et a reçu une décision officielle le 09/06/2020 (NOR : TREL2002508S/284) (cf. **Annexe 4**).

Pour chaque accession sauvage étudiée, une planche d'herbier a été réalisée et plusieurs parties de la plante ont été collectées :

- les cônes pour les analyses chimiques. Ils ont été séchés en étuve à moins de 40°C puis broyés et conservés à l'obscurité. Une partie, utilisée pour les analyses de composés volatils et pour la quantification des composés phénoliques prénylés, a été conservée à -20°C ;
- quelques feuilles conservées à -20°C, à destination des analyses de génotypage ;
- un fragment de rhizome, ensuite replanté dans la houblonnière expérimentale provisoire du lycée de Douai-Wagnonville afin de conserver ces ressources génétiques.
- des échantillonnages de sol de l'horizon A⁹ ont également été réalisés puis conservés à -20°C et ont été utilisés pour la caractérisation des environnements pédologiques. Une nouvelle campagne de collecte a été réalisée en novembre 2021 pour les échantillons collectés en trop petite quantité lors de la première campagne.

⁹ En pédologie un horizon désigne une couche distincte du profil de sol. L'horizon A (couche arable) contient à la fois de la matière organique transformée et de la matière minérale.

1.2. Échantillonnage des houblons sauvages en conditions *ex-situ*

Les cônes des accessions sauvages mises en culture dans la houblonnière expérimentale ont pu être collectés à partir de septembre 2021. En conditions *ex-situ*, un suivi de la maturation des cônes a pu cette fois-ci être réalisé, par mesure du taux d'humidité par dessiccation, afin de collecter les cônes à leur stade optimal de maturité (80 %). Après collecte, les cônes ont été séchés en étuve à environ 35°C, jusqu'à atteindre un taux d'humidité de 10 %, mis sous vide et conservés à -20°C avant leur utilisation.

Des fragments de tiges ont été collectés par le Dr. Caroline Rambaud (Université de Lille, UMRt BioEcoAgro) sur ces mêmes pieds afin de mettre en place les *vitro*-plants de chaque accession. De jeunes feuilles ont également été collectées en mai 2021 afin d'améliorer le protocole d'extraction de l'ADN.

2. Phénotypages

Les caractérisations phénotypiques qualitatives ont été réalisées à partir des photographies des cônes prises lors de la collecte. Les mesures quantitatives ont été réalisées sur au moins 20 éléments provenant des herbiers réalisés après la collecte. Les mesures ont été réalisées en suivant les critères définis par l'UPOV : www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg227.pdf (UPOV 2006). Ces mesures sont intéressantes mais peu robustes. Elles n'ont pas été incluses de ce fait dans les comparaisons statistiques entre les jeux de données. Dans le cadre du programme Feader, la caractérisation phénotypique se poursuit désormais directement sur les pieds mises en cultures en conditions *ex-situ*.

3. Caractérisation des biotopes : analyse de sols

Les échantillons de sols collectés ont été séchés à l'air libre et tamisés à 250 µm. Ces analyses ont été réalisées au sein du LGCGe, sur le site de Junia ISA (Lille), en collaboration avec le Pr Christophe Waterlot.

3.1. Poids secs et perte au feu

3 grammes d'échantillon de sol tamisé à 250 µm sont prélevés et déposés dans un creuset taré. L'ensemble est placé dans un four à 105°C pendant 16 heures. Une première pesée est réalisée et permettra de mesurer le taux d'humidité des échantillons. La calcination est réalisée ainsi :

- 1) 1 heure de montée en température jusqu'à 650°C,
- 2) 3 heures à 650°C. Une calcination à 650 °C est ici suffisante du fait de fortes teneurs en matières organiques des horizons A (Baize 2000).

Une fois refroidis, les creusets sont pesés. Le taux de matière organique est la différence entre la masse sèche (matière organique + matière minérale) et le poids de cendres (matière minérale), rapporté à la masse sèche.

3.2. Mesures de pH et de conductimétrie

3.2.1. Mesure de pH

Un volume de 6 mL de sol est placé dans des pots à cape. 30 mL d'eau distillée y sont ajoutés. Le mélange est mis à agiter pendant 1 heure à 750 rpm sur la table d'agitation, avec un barreau aimanté, puis laissé reposer pendant 2 heures. Le pH est ensuite mesuré directement avec un pHmètre préalablement étalonné.

3.2.2. Mesure de conductivité

La conductivité électrique des sols est mesurée en mélangeant 4 grammes de sol à 20 mL d'eau bidistillée dans des tubes Falcon. Le mélange est agité pendant 2 heures sur les agitateurs rotatifs à 18 rpm. Les tubes sont ensuite centrifugés à 1000 G pendant 10 minutes. La conductimétrie est mesurée à l'aide d'un pH-mètre/conductimètre (Metrohm, Herisau Suisse) préalablement étalonné.

3.3. Dosage des éléments calcium, magnésium, sodium et potassium

3.3.1. Minéralisation des échantillons

Environ 300 mg d'échantillon de sol séché et broyé ont été pesés dans des tubes de minéralisation. 1,5 mL d'acide nitrique HNO₃ à 70% et 4,5 mL d'acide chlorhydrique HCl y ont été ajoutés. Le mélange a été mis à incuber pendant 2 heures à 95°C avec un verre de montre afin de limiter l'évaporation. Après refroidissement de la solution, de l'eau bidistillée est ajoutée à qsp 25 ml. La solution de digestion ainsi obtenue a été filtrée à vide (filtre à 0,45 µm) puis conservée au réfrigérateur à 4°C avant analyse.

3.3.2. Spectrophotomètre à absorption atomique

Les concentrations pseudo-totales en calcium (Ca), magnésium (Mg), sodium (Na) et potassium (K) ont été mesurées par un spectrophotomètre d'absorption atomique (Shimadzu AA-6800 Tokyo, Japon) couplé à un échantillonneur automatique (Shimadzu Tokyo, Japon). Avant analyse sur le spectromètre à absorption atomique, 1 mL de solution de sol minéralisé est dilué 10 fois dans du chlorure de lanthane (LaCl₃). Les courbes d'étalonnage sont établies dans le domaine de linéarité de l'appareil, en fonction de chaque composé à doser, en suivant les recommandations décrites dans la littérature pour éviter les interférences spectrales potentielles. Les détails sur les caractéristiques de la source lumineuse et la méthode de quantification, les limites de détection et de quantification sont

indiquées dans Waterlot et Hechelski (2019). Un blanc de chlorure de lanthane et un blanc technique sont également injectés. Les données issues de ce dosage, exprimées en mg/L, sont converties en mg/kg, selon la masse de sol analysée, puis exprimées en mg/kg de poids sec en fonction du taux d'humidité de l'échantillon, mesuré selon le **protocole 3.1** de ce chapitre.

4. Caractérisation génétique par marqueur microsatellites

4.1. Extraction de l'ADN

Les analyses génétiques réalisées sous l'encadrement du Dr Ali Siah ont initialement été sur les feuilles collectées en conditions *in-situ* en septembre 2019. Des tests ont également été réalisés sur des feuilles très jeunes collectées au printemps 2021 en conditions *ex-situ*. Les ADN ont été extraits selon deux protocoles :

- extractions au chloroforme et phénylchloroforme selon le protocole de Siah et al. (2010) ;
- extractions avec le kit « NucleoSpin Plant II, Mini kit for DNA from plants » de chez Macherey-Nagel.

Les ADN extraits ont été dilués au quarantième dans 200 μ L d'eau ppi puis dosés au NanoDrop (NanoDrop One, ThermoScientific, Wilmington, USA). Leur qualité a été mesurée grâce au rapport des absorbances aux longueurs d'onde de 260 et 280 nm. Une PCR de vérification des ADN a permis de s'assurer de leur bonne extraction avant le screening des amorces.

Après plusieurs essais, c'est finalement le protocole d'extraction avec le kit « NucleoSpin Plant II, Mini kit for DNA from plants » de chez Macherey-Nagel sur les jeunes feuilles fraîches, préalablement broyées dans l'azote liquide qui a été retenu.

4.2. Amplification des régions microsatellites

4.2.1. Amorces

Au total, 20 couples d'amorces microsatellites décrites par Stajner et al. (2005) et Jakse et al. (2008) ont été testées sur les ADN extraits pour un screening préliminaire afin de déterminer celles permettant de discriminer au mieux les différents polymorphismes. Finalement 11 amorces ont été retenues pour l'amplification des ADN des 63 accessions (**Tableau 2, Étude II**).

4.2.2. Protocole de PCR

Les amplifications des microsatellites par PCR sont réalisées avec un thermocycleur (BioRad C100 touch Thermal cycler). Pour chaque amorce, la composition du mix de PCR pour un échantillon est détaillée ci-dessous (**Tableau 16**).

Tableau 16. Composition du mix de PCR pour un échantillon

	Concentration finale
--	----------------------

MgCl₂ (Fisher BioReagents®)	4 mM
Buffer B (Fisher Scientific, USA)	1X
dNTP (5 Prime)	0.2 mM
Amorce R (Sigma-Aldrich, UK)	0.04 µM
Amorce F (Sigma-Aldrich, UK)	0.04 µM
Taq polymerase (Fisher Bioreagent)	1 X
Eau ppi	Qsp 45 µL

A ces 45 µL de mix sont ajoutés 5 ng d'ADN dosés à 1 ng/µL. Le mélange de mix de PCR et d'ADN est déposé en micro-puits (Thermo Scientific). Pour chaque amorce testée, un témoin négatif est également réalisé afin de s'assurer de l'absence de contamination dans le mix de PCR. Les 5 µL de matrice sont alors remplacés par 5 µL d'eau ppi.

4.2.3. Programme de PCR

Le programme de PCR utilisé pour l'amplification des régions microsatellites est détaillé dans le **Tableau 17**.

Tableau 17. Programme de PCR pour l'amplification des régions microsatellites

Incubation	Dénaturation	Hybridation	Extension	Incubation	Conservation
10 min à 94°C	60 sec à 94 °C	30 sec à TA	30 sec à 72°C	10 min à 72 °C	Infini à 4°C
x 39 cycles					

4.2.4. Vérification des amplicons par électrophorèse sur gel

La révélation des régions amplifiées se fait dans un premier temps par électrophorèse sur gel d'agarose. La migration par électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur poids moléculaire et de leur charge électrique négative. Le gel d'agarose est préparé à 1 % (w/v) d'agarose (Condalab, Espagne) dans du tampon Tris Borate EDTA (Euromedex, France) et 6 µl de gel RED. La révélation des fragments se fait sous UV (**Figure 54**).

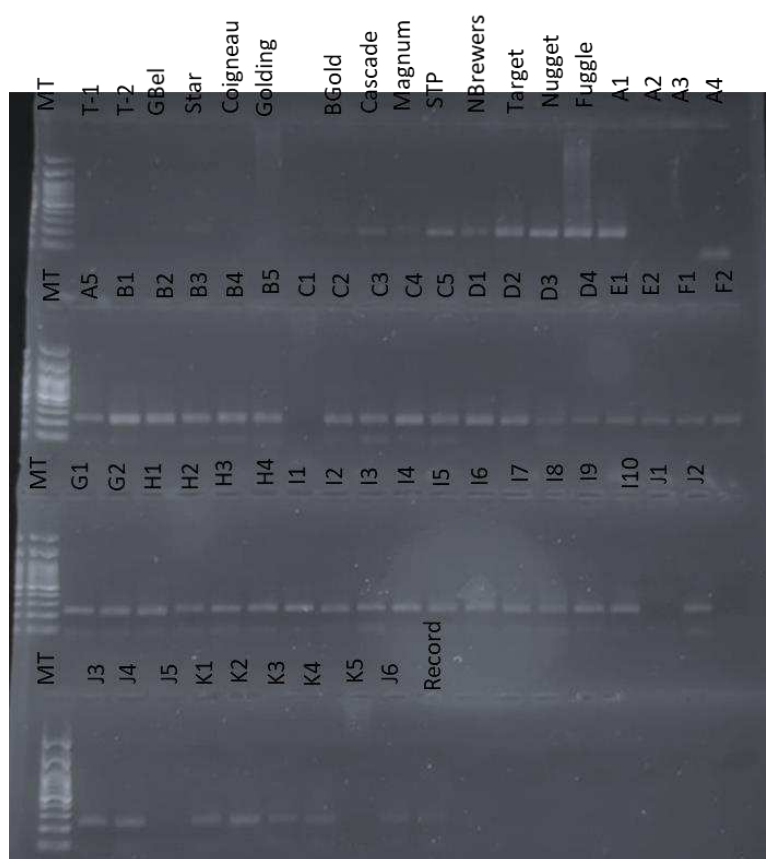


Figure 54. Révélation aux UV du gel d'agarose à 1% après migration dans le TAE des échantillons d'ADN amplifiés par PCR avec le marqueur HI GT-16 permettant de vérifier le correct déroulement du protocole d'amplification. T- 1 et T-2 : témoin négatif (sans matrice) ; MT : marqueur de taille ; STP : Strisselspalt.

Les couples accession/amorce qui n'ont pas fonctionné ont fait l'objet d'une nouvelle amplification afin de s'assurer qu'il s'agit bien d'un allèle nul et non d'un problème technique.

4.3. Analyse par électrophorèse capillaire

La séparation des amplicons a été effectuée par électrophorèse capillaire (Applied Biosystem, CA), au sein du laboratoire du bâtiment SN2, en collaboration avec le Dr Thierry Cadalen (Université de Lille, UMRt BioEcoAgro). Les amplicons ont été regroupés en cinq *pools* de deux amplicons, un couple d'amorce a été analysé en solitaire (**Tableau 2, Étude II**). Chaque paire d'amorces utilisée pour les amplifications PCR ayant été marquée en position 5' par un fluorochrome (Applied Biosystem, CA) bleu (6-FAM) ou vert (HEX), une meilleure résolution du système capillaire a ainsi été obtenue. Les mélanges ont été réalisés en utilisant 1 μ L de chaque produit de *pool*-PCR mélangé avec 10 μ L de formamide (Sigma-Aldrich, France) et 0,15 μ L de standard de taille GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystem, CA). Après une étape de dénaturation à 94 °C pendant dix minutes, les *pools* de produits de PCR ont été analysés sur un séquenceur d'ADN 3130 xl Genetic analyzer (Applied Biosystem, CA). La taille des pics fluorescents a été normalisée à l'aide du logiciel Genescan Analyse v. 3.7.1 Genotyper (Applied Biosystem, CA). La conversion en allèles et la détermination de la taille des allèles ont été réalisées à l'aide du logiciel Genotyper (Applied Biosystem, CA) (**Figure 55**).

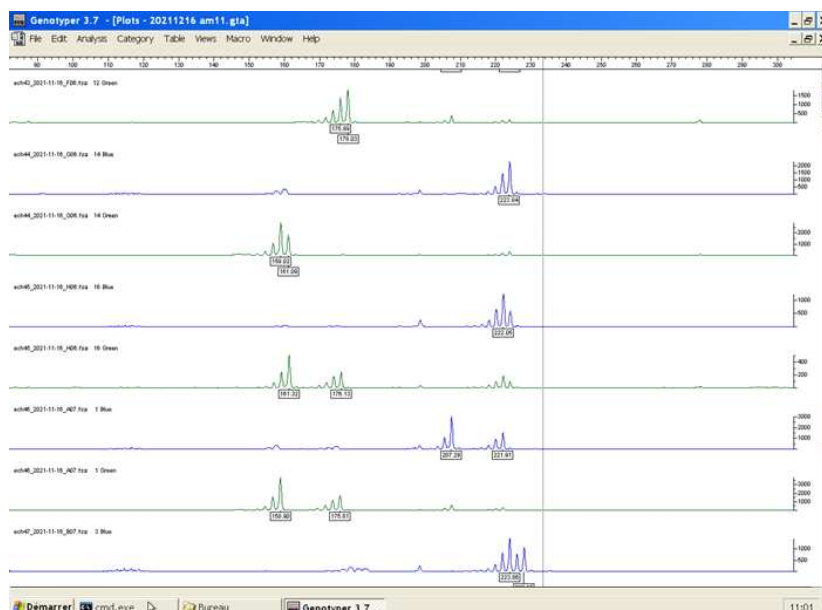


Figure 55. Capture d'écran du logiciel Genotyper (Applied Biosystem, CA) permettant l'analyse des tailles d'allèles des amplicons, ici pour les marqueurs HI GT-16 en bleu et GT1-K1-4 en vert.

Pour chaque couple accession/marqueur, les tailles ont été synthétisées dans un fichier Excel avant d'être soumis aux différentes analyses statistiques.

4.4. Traitement statistique

À partir de la matrice ainsi obtenue, différentes analyses ont été réalisées en utilisant différents logiciels.

4.4.1. Statistiques de base et calcul d'indices avec Genalex

Le logiciel GenAEx v. 6.50142 a permis de calculer les statistiques de base par locus, telles que le nombre d'allèles (N_a), l'hétérozygotie observée (H_o), attendue (H_e) et non biaisée (uH_e), l'indice de fixation (F), l'indice d'hétérozygotie de Nei (I) et l'index de Shannon (H'). La différenciation entre les sous-populations, selon chaque locus, a été estimée sur la base de plusieurs indices de fixation : a) l'indice F de Wright (F_{ST}), b) l'indice G_{ST} de Nei, un analogue multiallélique du F_{ST} qui convient aux haploïdes comme aux diploïdes, c) de nouveaux estimateurs normalisés de la structure génétique, tels que l'indice de fixation normalisé de Hedrick G''_{ST} et l'indice de fixation normalisé de Jost D_{est} . Le programme GenAEx version 6.50142 a également été exécuté pour calculer les indices F_{ST} et Φ_{ST} afin de mettre en évidence le degré de différenciation des populations entre les paires de sous-collections. Les indicateurs de structure génétique dans chaque collection ont été étudiés par une AMOVA mise en œuvre dans GenAEx version 6.501 (Peakall et Smouse 2012), par l'estimation du degré de différenciation génétique au sein et entre les sous-collections avec 1 000 permutations.

4.4.2. Logiciel STRUCTURE

La structure des populations étudiées a également été analysée à l'aide du logiciel STRUCTURE

version 2.3.4, classiquement utilisé en génétique des populations. Ce programme de regroupement des individus est basé sur un modèle par approche bayésienne pour estimer le nombre de regroupements et assigner de manière probabiliste les individus aux populations. L'analyse a été effectuée sans information préalable sur les sous-collections auxquelles les individus appartenaient. 10 répétitions, obtenues avec 50 000 itérations de la chaîne de Markov Monte Carlo (MCMC) utilisées comme "burn-in" et suivies de 500 000 itérations MCMC, ont été produites pour comparer la probabilité logarithmique $\ln Pr(K)$ de chaque modèle, où K est le nombre de clusters. Les données ont été analysées avec K allant de 1 à 20, avec 10 répétitions pour chaque K. Les valeurs ont été calculées et tracées par le logiciel STRUCTURE Harvester. La meilleure estimation de K était basée sur les valeurs ΔK calculées à partir de $\ln P(D)$, comme décrit dans Evanno et al. (2005).

4.4.3. Dendrogramme (logiciel DARWIN)

Un dendrogramme estimant le regroupement génétique des haplotypes a été produit à l'aide de la méthode de jonction des voisins non pondérée et basée sur la matrice de dissimilarité (10 000 bootstraps), telle qu'implémentée dans le logiciel DARwin version 6.0.01452 (Perrier et Jacquemoud-Collet 2006).

4.4.4. Flux de gènes

La migration relative directionnelle sur le réseau entre les 11 emplacements et les 13 variétés de l'échelle régionale a été déterminée à l'aide du logiciel divMigrate-online en utilisant le nombre de migrants effectifs par génération N_m comme mesure de la différenciation génétique. Cette approche fournit des graphiques de réseau, ce qui facilite la visualisation des modèles de migration relative directionnelle entre les emplacements.

5. Caractérisation phytochimique des cônes

5.1. Caractérisation des composés volatils par HS-SPME GC-MS

5.1.1. Extraction des composés volatils

Des tests d'analyse des composés volatils avaient été initiés sur l'huile essentielle obtenue classiquement après hydrodistillation. Cependant, compte-tenu du faible rendement, du temps nécessaire pour la mise en place du protocole, et des faibles quantités de matière première végétale dont nous disposions pour certaines accessions, nous avons envisagé d'autres méthodes d'analyses des composés volatils. En particulier, la HS-SPME GC-MS nous est apparue comme une technique idéale, permettant d'extraire et d'analyser rapidement les composés volatils de nos échantillons à partir de faibles quantités de matière (quelques grammes). Les analyses par HS-SPME GC-MS ont ainsi été réalisées en collaboration avec l'équipe du Pr Marie-Laure Fauconnier à Gembloux AgroBioTech (Université de Liège, UMRt BioEcoAgro). Pour cela, l'incubation des échantillons a été réalisée sur 1 ou

2 grammes de poudre de cônes, broyés dans l'azote liquide, à 45°C pendant 30 min d'exposition d'une fibre SPME phase triple DVB/CAR/PDMS (30/50 µm) (Supelco, Darmstadt, Allemagne) dans l'espace de tête de l'échantillon.

5.1.2. Analyse par des composés extraits par GC-MS

La désorption des composés volatils extraits et capturés sur la fibre a eu lieu pendant 2 min. L'injection a été réalisée en mode splitless à 280 °C. La fibre a été conditionnée pendant 20 min à température d'injection. Les analyses ont été réalisées par GC-MS (7890A-5975C, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) équipée d'une colonne capillaire HP-5 MS (30 m × 250 µm × 0,25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un débit de 1,2 mL/min. Le programme de température du four était le suivant : démarrage à 40°C avec un maintien pendant 2 min ; augmentation de 4°C/min jusqu'à 200 °C ; augmentation de 20°C/min jusqu'à 300°C, maintien pendant 5 min. Le spectromètre de masse a été réglé pour avoir une température de 230°C au niveau de la source d'ions (impact électronique) et de 150°C au niveau du quadripôle. Le spectromètre de masse a été programmé avec un mode d'acquisition SCAN, les spectres de masse ont été balayés de 35 à 500 amu.

5.1.3. Analyse des chromatogrammes et identification des composés volatils

Le profil général en composés volatils a été obtenu pour chaque houblon sauvage par analyse des chromatogrammes (Agilent MassHunter Unknowns Analysis) ; les aires sous pic ont ainsi été obtenues pour chaque composé volatil. Ils ont ensuite été rapportés en pourcentage de la surface chromatographique totale pour permettre une analyse générale, en pourcentage relatif. L'identification putative des composés a été réalisée par comparaison des spectres avec ceux des bases de données de référence (Nist17 et Wiley) sur le logiciel MassHunter. De plus, les indices de rétention (RI) expérimentaux ont été calculés après l'injection d'un mélange de n-alcane C₈-C₃₀ (Sigma Aldrich, Darmstadt, Allemagne) dans les mêmes conditions chromatographiques que celles mentionnées précédemment. Ces RI expérimentaux ont ainsi pu être comparés à ceux donnés dans la littérature (Babushoka et al. 2011) avec la formule : $Ik = 100 \times \left(n + \frac{t_r(x) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right)$, avec Ik : indice de rétention de Kovats, n : le nombre d'atomes de carbone dans le plus petit n-alcane ; N : le nombre d'atomes de carbone dans le plus grand n-alcane ; t_r : le temps de rétention. Caractérisation des composés non-volatiles

5.2. Quantification des composés phénoliques majoritaires par UHPLC-UV

5.2.1. Réalisation des extraits à analyser

Des extraits bruts hydro-éthanoliques ont été préparés à partir de poudre de cônes par extractions solide/liquide (S/L). L'extraction se fait sur 50 mg de poudre de cônes de houblon séchés et broyés, dans 1 ml d'un mélange de solvants éthanol/eau (9:1, v/v), permettant d'extraire une large gamme de composés phénoliques (Bocquet et al. 2019). Trois sessions de macération d'une heure ont été réalisées dans un bain à ultrasons. A l'issue de chaque macération, les tubes sont centrifugés et le surnageant est récupéré dans une tube à hémolyse taré puis conservé au frais. A l'issue des trois sessions de macération, les extraits bruts ainsi récupérés sont mis à sécher dans un concentrateur centrifuge Genevac™. Les extraits bruts obtenus sont conservés au congélateur à -20°C pour les analyses.

5.2.2. Analyse des extraits par UHPLC-UV-MS

Des extraits bruts hydro-éthanoliques ont été préparés dans des tubes à hémolyse à partir de la poudre de cônes des accessions caractérisées, en triplicat (en 2019 pour les analyses *in-situ*), ou en 5 répétitions (en 2021 pour les *ex-situ*) selon le protocole détaillé précédemment. Les échantillons ont été quantifiés par UHPLC-UV avec le système Acquity UPLC H-Class Waters system (Waters, Guyancourt, France) et un détecteur à barrette de diodes (DAD). Le spectromètre de masse de type quadripôle (Acquity Qda ESI-Quadropole Mass spectrometer) avec pour mode d'ionisation l'électrospray a permis de vérifier les masses de chaque standard utilisé dans les extraits. La phase stationnaire est une colonne C18 Waters Acquity BEH (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) maintenue à une température de 30°C. Les échantillons ont été injectés à une concentration de 1 mg/ml, à un débit de 0,3 ml/min, à une pression de 5 800 psi, avec le gradient détaillé ci-dessous (**Tableau 18**) (Phase mobile A : eau + 0,1% acide formique ; B : acétonitrile + 0,1 % d'acide formique).

Tableau 18. Gradient utilisé pour la quantification par UHPLC-UV des composés phénoliques prénylés dans les extraits hydro-éthanoliques

Temps (min)	0	1	3	5	7	9	9,5	13
% A	50	50	25	25	0	0	50	50
% B	50	50	75	75	100	100	50	50

Pour les analyses de 2021 (**Étude III**), un QC (mélange en volume équivalent des tous les échantillons de chaque session d'analyse) a été en plus injecté tous les 10 échantillons.

La composition des échantillons a été analysée sur le logiciel Empower avec les méthodes de quantification du XN et des acides α et β mises au point selon le **protocole 5.2.4**, avec les standards purifiés comme suit (**protocole 5.2.3**).

5.2.3. Purification des standards pour la quantification

Afin de pouvoir quantifier les composés phénoliques prénylés majoritaires dans les extraits bruts des accessions caractérisées chimiquement (**Chapitre 3, Études I et III**) et des variétés commerciales et anciennes, il a été nécessaire de purifier les standards afin d'établir les gammes de calibration par UHPLC-UV-MS pour chacun des composés ciblés : xanthohumol, *co-*, *n-*, *ad*-humulone et *co-*, *n-*, *ad*-lupulone. Certains de ces standards auraient éventuellement pu être commandés à des fournisseurs, mais compte tenu de leur coût et de leur forte instabilité (Taniguchi et al. 2013), nous avons préféré les purifier en interne. Ce protocole de purification a été initié dans le cadre de la thèse de Laetitia Bocquet (Bocquet 2018), mais a depuis été adapté et amélioré. La purification des standards a été réalisée à deux reprises à partir de la poudre de cônes de la variété Nugget récoltés en septembre 2019 et en septembre 2021 à la ferme Beck à Bailleul (59, Hauts-de-France). Le xanthohumol, les acides α (*co*-humulone, humulone et *ad*-humulone) et des acides β (*co*-lupulone, lupulone et *ad*-lupulone) ont été purifiés suivant le protocole de la figure suivante (**Figure 56**).

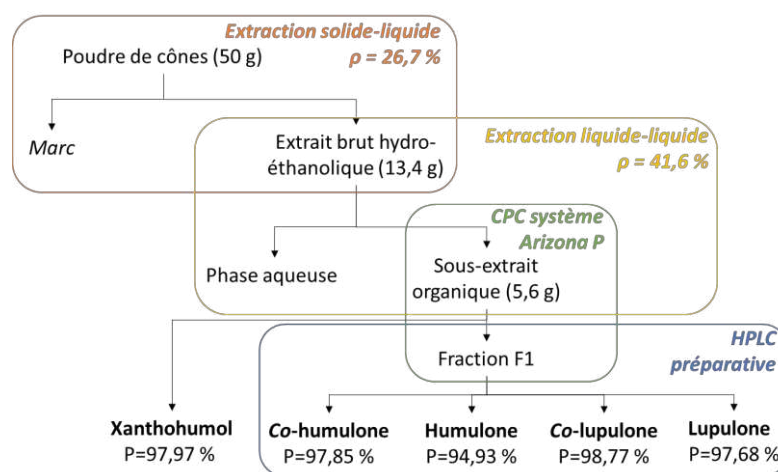


Figure 56. Protocole d'obtention des composés phénoliques prénylés.

5.2.3.1. Obtention de l'extrait brut hydro-éthanolique par extraction solide-liquide

Les extraits bruts sont réalisés selon un protocole adapté de celui mentionné en 5.2.1. Ils sont préparés par extraction solide liquide (S/L), par macération dans un erlenmeyer de 50 grammes de poudre de cônes de Nugget, immergés dans 75 ml d'un mélange de solvants éthanol/eau (9:1, v/v), à l'abri de la lumière. Quatre sessions de macérations ont été réalisées (4 x 10 h), sous agitation et à l'abri de la lumière. Entre chaque session de macération, une filtration sur coton est réalisée afin de récupérer les filtrats. Les filtrats obtenus sont évaporés à l'évaporateur rotatif (HeidolphTM, Allemagne) à 35°C à 100 rpm, à pression descendante. Le marc est ensuite repris dans le même mélange de solvants éthanol/eau pour la macération suivante. Les extraits bruts (EB) obtenus sont analysés par UHPLC-DAD-MS selon la méthode détaillée dans le **paragraphe 5.2.2** et solubilisés dans de l'eau ultra pure, congelés à -20°C puis lyophilisés à -50°C sous vide dans le lyophilisateur à ballons (Telstar CryodosTM, Espagne) afin d'assurer la stabilité de l'extrait. Les extraits lyophilisés sont conservés au congélateur à -20°C.

5.2.3.2. Obtention du sous-extrait organique par extraction liquide-liquide

Un sous-extrait organique est ensuite obtenu par extraction liquide-liquide (L/L) à partir de l'extrait brut précédemment obtenu. L'EB est solubilisé dans 100 ml d'eau ultra-pure et extrait avec 100 ml de dichlorométhane (DCM) dans une ampoule à décanter. Les extractions sont réalisées trois fois afin d'épuiser au maximum la phase aqueuse. Celle-ci est ensuite mise à évaporer à l'évaporateur rotatif afin d'éliminer les éventuelles traces de DCM puis analysée par UHPLC-DAD-MS selon la méthode détaillée dans le **paragraphe 5.2.2 (Figure 57)**. Elle est ensuite conservée au congélateur et lyophilisée. Les phases organiques sont rassemblées dans un ballon et débarrassées des possibles traces d'eau avec du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4). Le ballon est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif ($T = 35^\circ\text{C}$, 100 tours/min), et le sous-extrait organique est conservé au congélateur à -20°C sous azote.

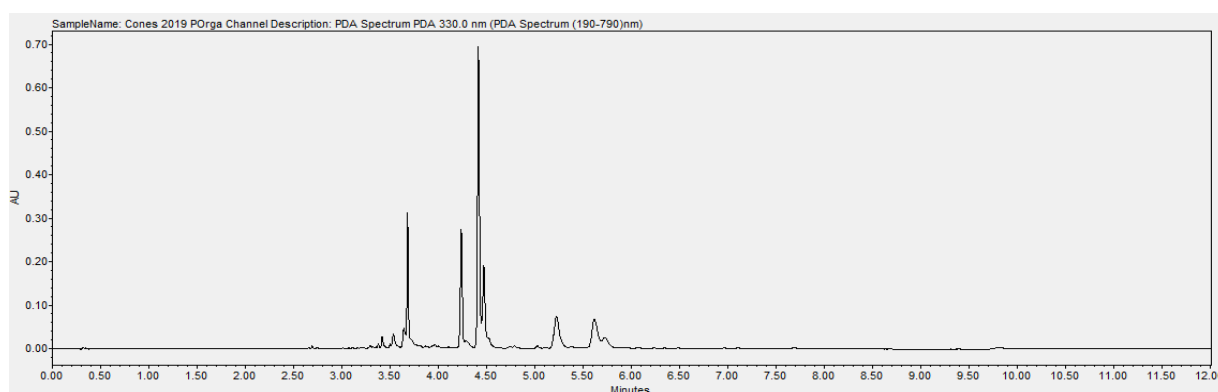


Figure 57. Chromatogramme obtenu par UHPLC-DAD à 330 nm du sous-extrait DCM de cônes femelles de houblon cv. Nugget injecté à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.2.3.3. Fractionnement par CPC du sous-extrait organique des cônes de Nugget

Les fractionnements CPC du sous-extrait organique ont été réalisés par CPC. La chaîne CPC utilisée est une Armen Instruments®-Gilson® (Saint-Avé, France) munie d'un rotor d'un litre, couplée à une pompe (Shimadzu® LC-20AP) et à un détecteur à barrette de diodes (Shimadzu® SPD-M20A). Le système utilisé est le système Arizona P : n-heptane/acétate d'éthyle/méthanol/eau (6:5:6:5 ; v/v), sélectionné lors d'études antérieures (Bocquet, 2018). Pour ce système, le coefficient de partage K_d du XN est égal à 0,7. La phase stationnaire aqueuse est d'abord éluée dans le rotor à 50 mL/min en mode ascendant avec une rotation de 500 rpm. La rotation du rotor est ensuite augmentée à 1200 rpm avant de pomper la phase mobile organique à travers la colonne avec un débit de 30 mL/min. Une fois le système équilibré (environ 190 mL de phase stationnaire déplacés), 500 μl d'une solution de 6 grammes du sous-extrait organique solubilisés dans 40 mL d'un mélange des phases aqueuses et organiques du système Arizona P (1:1), filtrés sur membrane PTFE 0,45 μm (FisherBrand), sont injectés dans la boucle d'injection.

La séparation (**Figure 58**) commence par 45 à 50 minutes d'éluion en mode ascendant (100% de la phase organique) à 1200 rpm, à une pression de 40 bars. Cette séparation est suivie de 20 à 25 minutes d'éluion additionnelles en mode descendant (100% de la phase aqueuse), à 30 mL/min à

1200 rpm, à une pression de 22 bars. Le suivi de l'élution se fait sur le logiciel Labsolution® à la longueur d'onde de 330 nm et 370 nm. Des fractions de 30 mL sont collectées chaque minute dans des tubes en verre VWR grâce à un collecteur automatique. Le système est ensuite rincé avec un mélange méthanol/eau (50:50 ; v/v) à 50 ml/min et 500 rpm pendant 20 minutes.

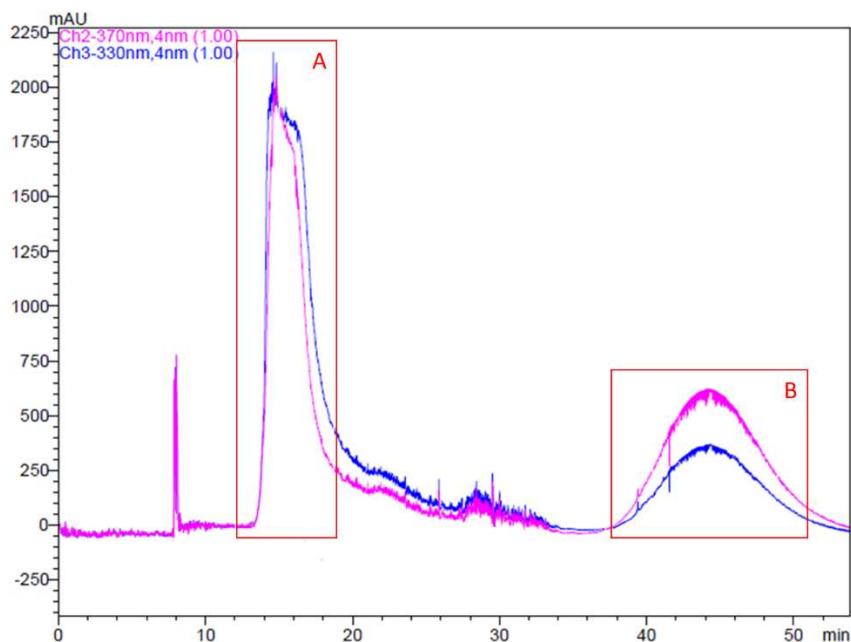


Figure 58. Profil chromatographique de la purification des acylphloroglucinolés et du XN par CPC avec le système Arizona P à 330 nm (en bleu) et 370 nm (en rose).

La zone A correspond à l'élution des acylphloroglucinolés, la zone B à celle du XN. Le mode descendant n'a pas été enregistré et ne figure donc pas sur le chromatogramme.

La composition des fractions issues de la CPC est analysée par chromatographie sur couche mince et par UHPLC-UV-MS. Les fractions aux profils chromatographiques similaires sont rassemblées et concentrées à l'évaporateur rotatif à 35°C à pression descendante. Plusieurs fractions d'intérêt sont ainsi identifiées : celles contenant les acides α et β , éluant entre 14 et 20 min (fractions 19 et 20) (**Figure 59**), et celles contenant le xanthohumol, éluant entre 40 et 50 min (fractions 46 à 67).

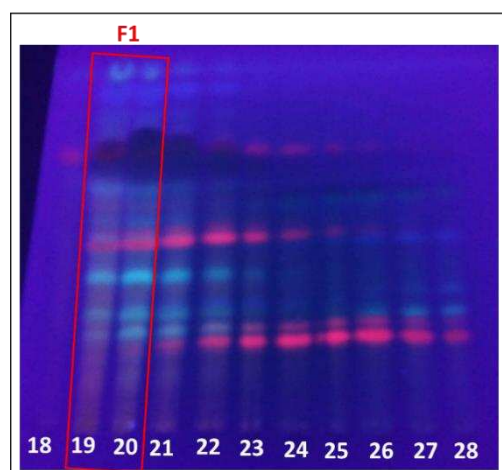


Figure 59. CCM des fractions 18 à 28 issues de la CPC lors de la purification des acides α et β avec le système Arizona P à 365 nm à partir du sous-extrait organique de cônes de Nugget.

La phase mobile est toluène / acétone / acide formique (73 : 18 : 9, v/v).

Les acides α et β ayant des polarités assez proches, il est difficile de les obtenir purifiés uniquement par cette méthode, une étape de purification supplémentaire par HPLC préparative est nécessaire. Les fractions contenant les acides α et β sont rassemblées et constituent la fraction F1 analysée par UHPLC-DAD-MS selon la méthode détaillée dans le **paragraphe 5.2.2 (Figure 60)**. La masse de la fraction F1 est de 1,55 grammes à partir de 4 g de sous-extrait organique injecté. Le rendement par rapport à la quantité injectée est donc de 39 %. Ces fractions sont ensuite conservées au congélateur à -20°C .

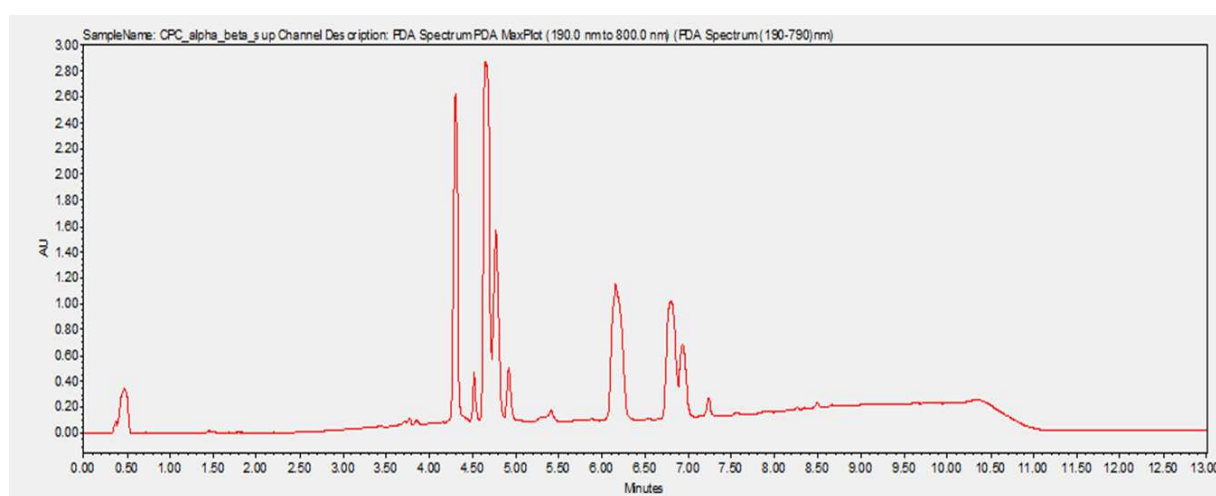


Figure 60. Chromatogramme obtenu par UHPLC-DAD à 330 nm de la fraction F1, constituée des acides α et β en sortie de CPC, injectée à $100\ \mu\text{g/mL}$.

Le xanthohumol est souvent obtenu en une étape avec une pureté proche de 98% et un rendement de 45 % et ne nécessite pas toujours une seconde purification par HPLC préparative (**Figure 61**).

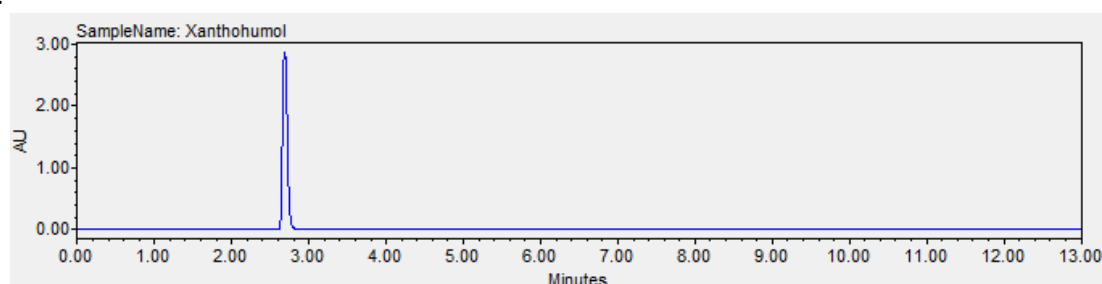


Figure 61. Chromatogramme obtenu par UHPLC-DAD à 370 nm de la fraction de xanthohumol, en sortie de CPC, injectée à $100\ \mu\text{g/mL}$.

5.2.3.4. Purification des acylphloroglucinols par HPLC préparative à partir de la fraction obtenue par CPC du sous-extrait organique de cônes de Nugget

Les acides α et β contenus dans la fraction F1 sont donc séparés par HPLC préparative. Le principe de l'HPLC préparative est identique à celui de l'HPLC analytique. La différence réside notamment dans la taille de la colonne, qui possède un diamètre plus important permettant d'injecter une plus grande quantité d'extrait. Les produits purifiés sont fractionnés et collectés séparément en sortie de colonne. L'HPLC préparative est réalisée sur une chaîne d'HPLC-UV Proeminence (Shimadzu®) équipée de deux pompes LC-20AP, d'un détecteur à barrettes de diode SPD-M20A, d'un module de communication CBM-20A et d'un module de contrôle SCL-10Avp. Le système est piloté par le logiciel LC Solutions®. La purification a été réalisée sur une colonne Vision HT C18 HL (5 μ m, 250 mm x 22 mm, GraceTM, France). Les solvants utilisés sont de qualité analytique (de grade HPLC), de l'eau ultra pure (Millipore Integral 5 Milli-Q, Merck™, Allemagne) pour la voie A et de l'acétonitrile 100 % (Carlo Erba Reagent) pour la voie B. Le gradient utilisé pour la purification des acylphloroglucinols est initialement inspiré des travaux de Prencipe et al. (2014) et adapté pour l'HPLC préparative (**Tableau 19**). Le temps d'analyse a notamment été raccourci, tout en conservant une bonne résolution, par rapport au gradient employé en HPLC analytique afin de limiter la consommation de solvants. En s'appuyant sur la littérature, d'autres colonnes préparatives ont été testées, mais la résolution apportée par la colonne Vision HT C18 HL est pour le moment la plus intéressante.

Tableau 19. Gradient utilisé pour le fractionnement de la phase organique avec l'HPLC préparative

Temps (min)	0	20	25
% ACN	75	100	100

La purification des acylphloroglucinols est réalisée à partir de la fraction F1 (fractions 19 et 20 rassemblées) issue de la CPC. 400 mg de la fraction F1 sont au total injectés. 500 μ L d'une solution préparée à 100 mg/ml dans du méthanol de grade HPLC (Fisher Scientific®, Illkirch, France) et filtrée sur membrane CHROMAFIL® Xtra PTFE-45/13 sont injectés dans la boucle d'injection. 9 injections sont ainsi successivement réalisées. La purification est effectuée à une pression de 65 bars et à un débit de 15 ml/min. Huit fractions (pour les acides α : 1 : cohumulone, 2 : humulone, 2' : humulone et adhumulone, 3 : adhumulone ; et pour les acides β : 4 : colupulone, 5 : lupulone, 5' : lupulone et adlupulone, 7 : adlupulone) sont collectées séparément en erlenmeyers, en suivant le profil chromatographique à la longueur d'onde $\lambda = 330$ nm sur l'interface LabSolution® (Shimadzu®) (**Figure 62**).

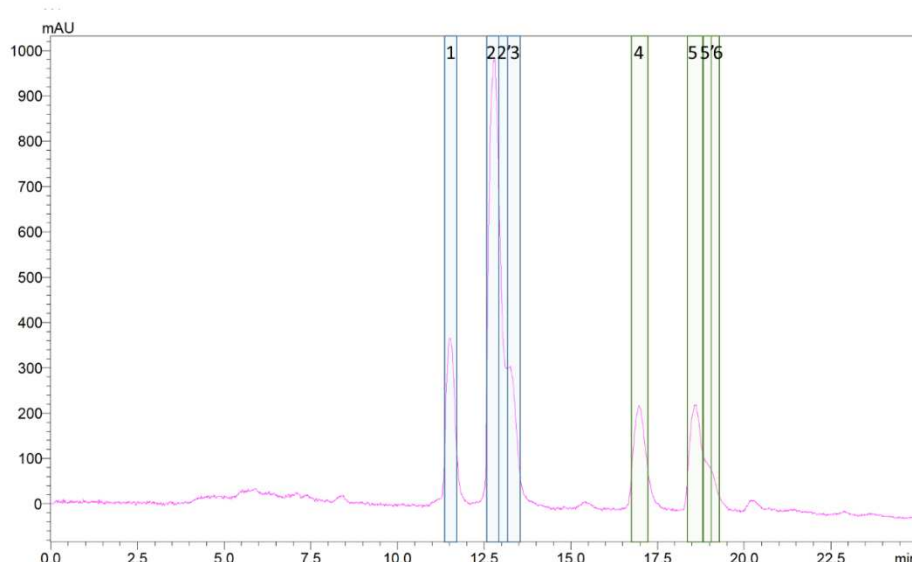


Figure 62. Profil chromatographique de purification des acylphloroglucinols par HPLC-UV préparative à 330 nm. Les zones encadrées correspondent aux fractions collectées : 1 : cohumulone ; 2 : humulone ; 2' : humulone + adhumulone 3 : adhumulone (acides α) et 4 : colupulone ; 5 : lupulone ; 5' : lupulone + adlupulone ; 6 : adlupulone (acides β).

Les fractions contenant les acides α purifiés (cohumulone, humulone et adhumulone) sont très rapidement évaporées à l'évaporateur rotatif puis transférées dans des tubes à hémolyse séchés au concentrateur rotatif. Ils sont ensuite conservés sous azote à -20°C . Les acides β (colupulone, lupulone et adlupulone) sont rassemblés dans des vials en sortie d'HPLC préparative. Ils sont dilués à moitié (10 :10, v/v) dans de l'eau miliQ, puis lyophilisés directement et conservés sous azote à -20°C . La pureté des composés purifiés est ensuite contrôlée par UHPLC-UV-MS. Le chromatogramme obtenu à l'UV (PDA) permet de déterminer leur degré de pureté. Le TIC obtenu par la spectrométrie de masse permet de vérifier qu'ils ne se sont pas oxydés au cours du procédé de purification. Enfin, la RMN permet de vérifier parallèlement leur pureté. Ces données spectrales sont données dans le **Supplementaring information** de l'article publié dans le cadre de l'Étude I.

Tableau 20. Pureté des standards purifiés, analyses sur l'UHPLC-MS-DAD.

MM : masse molaire.

	Temps de rétention	Pureté (%)	Quantité purifiée (mg)
Cohumulone (MM = 348 g/mol)	4.318	97,85	27,8
Humulone (MM = 362 g/mol)	4.679	94,93	31,24
Adhumulone (MM = 362 g/mol)	4.775	47,03	
Colupulone (MM = 400 g/mol)	6.282	98,77	21,2
Lupulone (MM = 414 g/mol)	6.879	97,68	16,4
Adlupulone (MM = 414 g/mol)	7.003	63,61	

Comme indiqué dans le **Tableau 20**, lors des premières CPC, la cohumulone, l'humulone, la colupulone et la lupulone ont pu être purifiées en quantité suffisante et avec une pureté satisfaisante (au moins 95%) pour réaliser les courbes de calibration en UHPLC-UV permettant leur quantification dans les extraits bruts (**Étude I**). Pour le xanthohumol, ce composé étant plus stable que les acides α et β , des extraits précédemment réalisés au laboratoire à partir de Nugget, ont été utilisés pour la courbe de calibration de cette chalcone. En revanche, l'adlupulone et l'adhumulone n'ont pas pu être obtenues suffisamment pures en 2019 lors la première série de quantification (**Étude I**), à l'inverse de la seconde étude (**Étude III**). Ainsi, pour l'**Étude I**, la détermination de leur teneur dans les extraits bruts a été estimée par extrapolation à partir des courbes de calibration de l'humulone et de la lupulone.

La purification des standards s'est faite à partir de 50 grammes de poudre de cônes du cultivar Nugget. Le tableau suivant (**Tableau 21**) synthétise les masses et rendement obtenus en acides α et β purifiés, après HPLC préparative.

Tableau 21. Rendements en acides α et β purifiés par HPLC préparative.

	Masse (en mg)	Rendement (%)
Cohumulone	27,84	6,96
Humulone	31,24	7,81
Mélange humulone et adhumulone	29,5	0,74
Adhumulone	26,16	6,54
Colupulone	21,2	5,30
Lupulone	16,4	4,10
Mélange lupulone et adlupulone	7,7	1,92
Adlupulone	22,4	5,6

5.2.4. Mise en place et validation des méthodes de calibration

5.2.4.1. Mise en place des méthodes de calibration sur l'UHPLC-DAD-MS

La quantification des composés phénoliques majoritaires par UHPLC-DAD-MS, a nécessité la mise en place d'une méthode sur le logiciel Empower 3.

Les standards utilisés pour la mise en place des gammes calibration sont ceux purifiés au laboratoire selon le protocole détaillé précédemment (**5.2.3**). Pour chaque composé, et pour chaque concentration (12 au total), 3 injections de deux solutions de concentration précisément connue, allant de 25 ng/ml à 100 ng/ml ont été injectées sur deux jours. Les solutions étalons ont été préparées à partir des solutions mères individuelles. Une fois la droite de calibration obtenue, deux méthodes de quantification ont été créées sur le logiciel Empower, une pour la quantification du XN à 370 nm et une autre à 330 nm pour la quantification des acides α et β .

5.2.4.2. Validation de la méthode de quantification

Le dosage du xanthohumol et des acides amers dans les extraits bruts de houblon ont été réalisés en utilisant les courbes de calibration obtenues par injection des gammes de concentrations des cinq standards purifiés au laboratoire sur l'UHPLC-UV-MS. Les équations des droites de calibration ainsi que les paramètres permettant la validation de la méthode de quantification sont présentés dans le **Tableau 22**.

Tableau 22. Paramètres de validation des gammes étalon du xanthohumol, de la cohumulone, de l'humulone, de la colupulone et de la lupulone par UHPLC-UV pour le dosage des métabolites majoritaires dans les extraits bruts de houblon (pour l'Étude I).

	Gamme de concentration	Nombre de points	Déviati on maximale (%)	Coefficient directeur (a)	Ordonnée à l'origine (b)	R²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Xanthohumol (370 nm)	2,5 ng/mL - 100 µg/mL	6	19,637 (LOQ)	37 200	260	0,9997	25	100
Cohumulone (330 nm)	25 ng/mL - 100 µg/mL	6	5,958	6 540	162	0,9996	50	250
Humulone (330 nm)	25 ng/mL - 100 µg/mL	6	- 13,724 (LOQ)	5 880	151	0,9993	50	250
Colupulone (330 nm)	25 ng/mL - 100 µg/mL	6	11,209 (LOQ)	9 660	160	0,9994	50	250
Lupulone (330 nm)	25 ng/mL - 100 µg/mL	6	- 6,667	9 090	138	0,9994	50	250

Les déviations sont acceptables car inférieures à 15 % pour chaque point de gamme sauf éventuellement pour les LOQs où le seuil de 20 % est toléré. Enfin, la linéarité de chaque gamme est acceptable car supérieure à 0,99. L'injection d'un blanc méthanol avant et après les différentes séries d'analyses a permis de confirmer l'absence d'interférences aux temps de rétention des composés dosés, confirmant ainsi la sélectivité de la méthode.

La précision de la méthode analytique a été validée en répétant trois fois le protocole d'extraction sur cinq échantillons de houblon. La précision de l'UHPLC-DAD a été vérifiée en effectuant trois injections intra- et inter-jour des extraits de houblon, puis en vérifiant les temps de rétention et les aires sous pic. Trois injections ont été effectuées chaque jour pendant trois jours consécutifs. Les variabilités intra et inter-jour sont présentées dans le **Tableau 23**.

Tableau 23. Précision de la méthode de dosage des métabolites majoritaires de l'extrait brut de cônes. Les coefficients de variation (en %) expriment la répétabilité intra et inter-jour.

	Répétabilité intra-jour	Répétabilité inter-jour
Xanthohumol	16,94	15,78
Cohumulone	17,91	19,59
Humulone	15,55	16,75
Colupulone	14,12	12,51
Lupulone	13,95	12,39

Les variabilités intra et inter-jour sont proches de 15% et inférieures à 20%, permettant ainsi de valider la méthode (EMA, 2011).

5.3. Analyses de métabolomique non ciblée

5.3.1. Métabolomique non-ciblée sur les cônes collectés en 2019 en conditions *in-situ*

Les analyses de métabolomique non-ciblée des échantillons collectés en 2019 en conditions *in-situ* ont été réalisées sur la plateforme analytique EQUIPEX REALCAT (Ecole Centrale, Lille, ANR-11-EQPX-0037). Les extraits bruts ont été réalisés en triplicata selon le **protocole 5.2.1**, dilués à 1 mg/mL dans du méthanol et placés en microplaques de 96 puits de 1 mL. La séparation a été effectuée sur 10 μ L de chaque échantillon par UHPLC-HRMS en phase inverse à l'aide d'une colonne BEH C18 (1.7 μ m, 2.1mm x 50 mm) (Waters, Guyancourt, France) à 30°C. L'équipement utilisé est un système Acquity UHPLC (Waters, Manchester, Royaume-Uni). L'élution a été réalisée avec un débit de 0,450 mL/min, avec une phase mobile composée de (A) eau ultrapure (Millipore Integral 5 - Milli-Q) + 0.1% d'acide formique (v/v) et de (B) acétonitrile + 0,1% d'acide formique (v/v), selon le gradient ci-dessous (**Tableau 24**).

Tableau 24. Gradient en UHPLC utilisé pour les analyses de métabolomique non ciblée.

Temps (min)	0	0,2	7,5	8	8,1	10
% A	90	90	0	0	90	90
% B	10	10	100	100	10	10

Ce gradient permet de séparer efficacement les composés phénoliques prénylés ainsi que les composés plus polaires, plus rapidement qu'avec la méthode utilisée pour la quantification, permettant ainsi de gagner du temps d'analyse compte tenu du grand nombre d'échantillons à analyser. Un QC a également été injecté plusieurs fois au cours de la session d'analyse, permettant de s'assurer de la stabilité des mesures de l'appareil au cours du temps.

Les échantillons ont été analysés grâce d'un spectromètre de masse Synapt-G2-Si-IMS (Waters) fonctionnant avec un analyseur de type Q-ToF et une source d'ionisation de type électrospray. Les paramètres utilisés étaient les suivants : tension de 3 kV en utilisant un gaz de désolvation (N) à un flux de 600 L/h, un flux de gaz de nébulisation de 6,5 bars et une température de 300 °C. Le spectromètre de masse SYNAPT-G2-Si (Waters) a été préalablement étalonné à l'aide d'une solution de formiate de sodium. Les mesures de spectrométrie de masse ont été effectuées en mode négatif haute résolution à l'aide du logiciel propriétaire MassLynx (version 4.1, Waters). Les analyses MS et MS/MS ont été effectuées en mode DDA, et les données de masse ont été acquises dans la plage de mesure de 100 à 1000 m/z en utilisant une correction de la *lock mass* de 554,2615 m/z , correspondant à la leucine enképhaline chargée négativement. Les données ont ensuite été transférées sur le logiciel Progenesis Q1 (Waters®), afin d'obtenir la *peak list*.

5.3.2. Métabolomique non ciblée sur les cônes collectés en 2021 en conditions *ex-situ*

Pour les analyses des échantillons collectés en 2021 en conditions *ex-situ*, celles-ci ont été réalisées en collaboration avec les Drs Roland Molinié, Jean-Xavier Fontaine et David Mathiron (Université d'Amiens, UMRt BioEcoAgro) sur la plateforme analytique de l'Université d'Amiens, sur des extraits bruts hydro-éthanoliques (**protocole 5.2.1**). Cette fois-ci, les analyses UHPLC-HRMS ont été réalisées sur un système ACQUITY UPLC I-Class (Waters, Manchester, UK) couplé un spectromètre de masse hybride Vion IMS Q-TOF, équipé d'une source d'ionisation par électrobulbation (ESI) (Waters, Manchester, UK). 2 µL ont été injectés pour chaque échantillon. La séparation chromatographique des analytes a été réalisée sur la même colonne Waters® Acquity BEH C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm) connectée à un filtre en ligne de 0,2 µm maintenu à 40°C, en utilisant cette fois-ci le même gradient que pour les analyses de quantification ciblées (**Tableau 23**). Ceci a ainsi permis de mieux identifier les composés dosés. Les composés séparés par chromatographie ont été ionisés par électrospray. Les paramètres ESI étaient réglés comme suit : tension capillaire, 3 kV pour le mode négatif ; température de la source, 120 °C ; température de désolvatation de 450 °C. La spectrométrie de masse à temps de vol (TOF) a été utilisée en mode sensible. Les données ont été acquises en MS^E haute définition (HDMSE) sur une gamme de masse de m/z 50-1200 avec un pouvoir de résolution de masse de 50 000 FWHM et un temps de balayage de 0,2 s. Un QC a été injecté tous les 10 échantillons.

Les spectres ont été acquis et traités avec le logiciel UNIFI (version 1.9.4, Waters), permettant de générer la matrice de données avec des paramètres par défaut comprenant le temps de rétention, les valeurs du rapport masse/charge (m/z) et l'intensité du pic. La matrice a été nettoyée en supprimant les variables avec une variance dans le QC significative (> 35%) et les variables présentes dans le blanc. Un seuil d'intensité minimum a été fixé à 500 pour conserver la variable. Les métabolites ont été identifiés en faisant correspondre les masses exactes, les temps de rétention et le modèle de fragment avec ceux des standards de référence et des références bibliographiques. L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel R en utilisant le *package* FactoMineR (Lê et al. 2008).

Le QC a également été analysé en MS et MS/MS par acquisition des données en DDA dans la plage de mesure de 100 à 1000 m/z à différentes énergies de collision (10, 20, 30, 50 et 70 keV). Un maximum de 10 ions précurseurs détectés avec un seuil d'intensité supérieur à 10 000 sont sélectionnés pour être fragmentés par dissociation induite par collision à un voltage de 8 à 9 V pour les ions de faible MM, et de 40 à 90 V pour les ions de MM élevée. La leucine enképhaline ($[M+H]^+ = 556,632$ Da) a été injectée dans le système toutes les 2,5 minutes pendant 0,5 seconde pour suivre les erreurs de mesure de masse pendant toute la période d'analyse. Des analyses par réseaux moléculaires ont été initiées mais malheureusement le format .raw de Waters n'a pas permis de convertir correctement les données pour pouvoir les utiliser sur d'autres logiciels que MassLynx, tels que MZmine ou le GNPS (the *Global Natural Product Social Molecular Networking*). Des identifications de marqueurs par déréduplication ont également été réalisées sur les logiciels UNIFI (Waters) ou MassLynx

(Waters) et ont permis l'identification de quelques dérivés d'acides α ou β notamment, par comparaison avec ceux qui avaient pu être trouvés dans la littérature, en particulier à partir des travaux de Farag et al. (2012) et Nicácio et al. (2022).

6. Caractérisation physico-chimique et aromatique des bières

6.1. Recette des brassins tests

Les brassages ont été réalisés dans le cadre du programme Feader au lycée de Douai-Wagnonville par David Lutun, Norman Degardin et Gabriel Lefèvre. 27 bières ont ainsi été brassées : 7 avec des variétés commerciales, 2 avec des variétés anciennes, 17 avec les houblons sauvages cultivés *ex-situ* les plus productifs, et une « témoin » sans houblon aromatique. Pour cela, la recette de base est une recette de blonde Pils en brassins de 60 L, brassés en monopalier en infusion descendante avec 13 kg de malt Pilsen (La Malterie du Château, Beloeil, Belgique) à 67°C pendant 1 heure et 15 minutes, puis filtrée. Le moût est porté à ébullition et houblonné avec 30 grammes de houblon Magnum en pellets (Coophounord, France) ajoutés dix minutes après le début de l'ébullition. Après 1h15 minutes de maintien en ébullition, les 60 L de moût sont divisés en 6 brassins-tests de 10 L pour le houblonnage aromatique. 50 grammes de cônes séchés du houblon testé, le seul ingrédient différenciant les brassins, sont ajoutés après l'ébullition en infusion, avant l'entonnement, pendant 20 min. La fermentation se fait à la pression atmosphérique à 10°C (fermentation basse) pendant une semaine, avec des levures *Saccharomyces cerevisiae* LalBrew Nottingham (Lallemand Brewing, Felixstowe, Royaume-Uni). La garde est effectuée pendant 3 semaines à 4°C. Les bières sont ensuite soutirées en bouteilles, sans filtration ni pasteurisation, avec un ressucrage au saccharose à 7g/L afin d'effectuer la prise de mousse.

6.2. Caractérisation physico-chimique

Ces analyses ont été réalisées par Lydia Lefkhi, stagiaire de Master 2 recrutée au sein de Junia ISA (UMRt BioEcoAgro) dans le cadre du projet Feader en collaboration avec le Pr Sylvie Chollet et le Dr Mathilde Vandenberghe. L'ensemble de ces mesures a été réalisé sur des échantillons de bières préalablement dégazés par agitation de l'échantillon avec un barreau aimanté en suivant les recommandations de l'*American Society of Brewing Chemists* (1992).

6.2.1. Colorimétrie (EBC)

Un volume de 5 mL de bière est dilué dans de l'eau distillée 2:1 (v/v). La valeur de la coloration des échantillons est obtenue par mesure de l'absorbance par spectrophotométrie à 430 nm. L'expression du résultat est donnée par l'équation $C_{EBC} = Abs \times k \times d$, avec C : la couleur de la bière (EBC), Abs : l'absorbance mesurée (en nm), k : le coefficient de coloration (adimensionnel), égal à 25, et d : le facteur de dilution.

6.2.2. Dosage de l'amertume (IBU)

Le dosage de l'amertume est réalisé en déterminant le taux en acides iso- α de la bière. Pour cela, les substances amères de la bière sont extraites avec de l'isooctane. 10 mL de bière dégazée sont prélevés et centrifugés. 1 mL d'acide chlorhydrique HCl et 20 mL d'isooctane y sont ajoutés avec quelques billes de verre. Le mélange est mis à agiter puis centrifugé à 1000 rpm pendant 3 minutes. L'absorbance de la phase organique est mesurée à 275 nm par spectrophotomètre. La valeur de l'IBU est classiquement calculée selon la formule : $UA_{EBU} = Abs \times k_{UA}$, avec UA : l'unité d'amertume aussi appelée EBU, Abs : l'absorbance mesurée en nm et k_{UA} : le coefficient adimensionnel égal à 50.

6.2.3. Dosage de l'acidité totale par titrage acido-basique

L'acidité totale est définie comme la somme des acidités titrables, et peut se mesurer par titrage avec une solution alcaline. 5 mL de bière dégazée sont dilués au 10^{ème} dans de l'eau distillée, 3 gouttes de la phénolphthaléine sont ajoutées, le mélange est placé sous agitation magnétique. Une titration à la burette par solution de NaCl à 0,1 M est réalisée, jusqu'à ce que la solution vire au rose. Le volume à l'équivalence permet de manière classique d'estimer la concentration massique totale d'acides, tel que $C_{m\text{ acide}} = C_{base} \times V_{eq} \times MM_{acide\ malique}$ (avec $MM_{acide\ malique} = 134,08\text{ g/mol}$).

6.2.4. Mesure du sucre résiduel et du degré d'alcool

La détermination du taux de sucres résiduels (en degré Plato, °P) et le pourcentage en volume d'alcool (% v/v) se fait en mesurant la densité relative d'un échantillon de bière. Le degré Plato est une unité spécifique au domaine brassicole et correspond à la masse d'extrait sec (en grammes) par 100 grammes de moût ou de bière. La densité relative d'un moût est mesurée *via* un densimètre sur environ 50 mL de bière dégazéifiée, à température ambiante et filtrée sous vide avec 20 g de kieselguhr. Les valeurs de la densité du moût et du pourcentage d'alcool sont mesurées sur 50 mL de filtrat et sont directement affichées par le densimètre.

Un test de Student réalisé sur les mesures des caractéristiques physico-chimiques de plusieurs bouteilles d'un même lot a permis de s'assurer de la répétabilité et de l'homogénéité des produits dégustés par les panélistes.

6.3. Analyse des composés volatils par SBSE-GC-MS

Les analyses des composés volatils des 17 bières ont été réalisées à nouveau en collaboration avec l'équipe du Pr Marie-Laure Fauconnier à Gembloux AgroBioTech (Université de Liège, UMRt BioEcoAgro). 10 mL de bière sont mis à agiter à 1000 rpm pendant 2 h avec un barreau aimanté recouvert de PDMS (10mm x 0.5mm), en présence de 1 g de NaCl, afin de favoriser le relargage des composés volatils sur le barreau aimanté par *salting-out*. Après extraction, le barreau aimanté est rincé à l'eau distillée, séché avec précaution et inséré dans un tube de désorption thermique (4 mm i.d. x 178 mm L). Il est ensuite inséré dans l'unité de désorption thermique d'une GC Agilent 7890 couplée à un spectromètre de masse Agilent 5975 C (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) équipé d'un échantillonneur automatique MPS et d'une colonne capillaire HP-5 MS (30 m × 250 µm × 0,25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un débit de 1,2 mL/min. Le four a été programmé selon les paramètres suivants : température initiale 40°C avec un maintien de 2 minutes ; puis augmentation de 6°C/min jusqu'à 300°C, maintien pendant 5 min. Les barreaux aimantés ont été désorbés thermiquement en programmant le système de 40°C à 260°C à une vitesse de 6°C/min et maintenus à cette température pendant 5 min. Les analytes désorbés ont été cryofocalisés à -10°C. L'injection a été réalisée en mode splitless.

L'analyse des résultats s'est faite de la même manière que pour les données de l'analyse des composés volatils de cônes par HS-SPME. Les composés ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse à ceux des bases de données du NIST et Wiley7. Les RI expérimentaux des composés ont été calculés et comparés à ceux des composés de la base de données en ligne du NIST. Les aires chromatographiques ont été obtenues pour chaque composé volatil (Agilent MassHunter Unknowns Analysis), et rapportées en pourcentage pour permettre une analyse générale sur XLStat (XLStat 2020 1.1, Paris, France).

6.4. Analyse sensorielle

6.4.1. Composition et entraînement du panel

Un groupe de 21 adultes (8 femmes et 13 hommes) a été recruté et formé pendant 12 séances, à raison d'une séance par semaine. Les panélistes ont reçu un programme de formation conçu pour former un groupe d'experts à identifier les caractéristiques aromatiques. Les panélistes ont été entraînés afin de décrire l'intensité de l'odeur et 3 odeurs (malté, houblonné, fruité), l'intensité en goût, 3 goûts (amer, acide et sucré) et 7 arômes (malt, houblon, agrumes, fruits jaunes, fruits rouges, floral, épicé) ainsi que l'astringence et la persistance amère dans les échantillons de bière à l'aide d'une échelle allant de 1 à 10. L'entraînement du panel a été supervisé par le Dr Mathilde Vandenberghe et le Pr Sylvie Chollet (Junia ISA, UMRt BioEcoAgro).

Avant l'évaluation de ces 17 descripteurs, la performance du panel a également été vérifiée en termes de discrimination, de répétabilité et de consensus (**Cf. Annexe 5**).

6.4.2. Conditions de dégustation et présentation des échantillons

Les panélistes ont évalué les 27 échantillons de bières (7 avec des houblons commerciaux, 2 avec des variétés anciennes, 17 avec des houblons sauvages et un sans houblon aromatique), en doubles, pendant 12 séances (ISO 13.299, 2003). Les échantillons ont été présentés en monadique séquentiel et leur ordre de présentation ont suivi un carré latin de Williams. Tous les échantillons ont été présentés dans des verres de dégustation, environ 20 mL ont été servis entre 8 et 10°C. Les tests ont été effectués dans des cabines individuelles sous un éclairage blanc. Les panelistes ont évalué les produits dégustés sur 17 descripteurs, 4 descripteurs concernant l'odeur (l'intensité de l'odeur, les odeurs malt, houblon et fruitée) et 13 descripteurs concernant le goût (l'intensité du goût, les goûts malté, houblon, agrume, fruits jaunes, fruits rouges, floral, épicé, saveur amère, acide, sucrée, l'astringence et la persistance amère) (cf. **Annexe 7**). Entre chaque échantillon, un protocole de rinçage devait être appliqué, avec de l'eau et une biscotte sans sel. Aucune restriction de temps n'a été imposée aux évaluateurs pour effectuer ce test.

6.4.3. Analyses des données

Les données de chaque descripteur ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à trois facteurs, sur les produits (P), les juges (Suj) et les répétitions (Rep) avec une interaction produit*juge, tels que : $Y = P + \text{Suj} + \text{Rep} + P*\text{Suj}$. Ceci a ainsi permis de sélectionner les descripteurs significatifs ($p\text{-value} < 5\%$).

Pour l'ensemble des sessions de dégustation, les données ont d'abord été analysées à l'aide d'ACP où les variables étaient les descripteurs significatifs et les observations étaient les 26 bières brassées avec un houblon aromatique puis par une CAH. L'ensemble de ces analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel statistique XLStat (XLStat 2020 1.1, Paris, France).

7. Analyse statistique

7.1. Analyse indépendante de chaque jeu de données

Chaque jeu de données a été traité puis importé sur Excel (Microsoft Excel 2016). Les cartes de chaleurs, les ACP (à l'exception des analyses de métabolomique non ciblée) et les CAH ont été réalisées avec le logiciel XLStat (Addinsoft, Paris, France). Les figures de métabolomique non ciblée ont été réalisées sur R avec le package *FactoMineR* (Lê et al. 2008) afin de permettre une meilleure visualisation des *loadings*.

7.2. Analyse multivariée sur les données *in-situ* par AFM

L'analyse multivariée des données *in-situ* (**Étude I**) a été réalisée par une AFM sur les 5 jeux de données acquis pour les 63 observations :

- analyses de sols : 7 variables quantitatives ;
- matrice de distance en génétique : 63 variables quantitatives ;
- analyse des composés volatils : 107 variables qualitatives (la SPME ne permettant pas d'avoir une quantification très précise, nous avons préféré traiter ces données en présence/absence d'un composé) ;
- dosage des composés phénoliques prénylés majoritaires : 5 variables quantitatives ;
- métabolomique non ciblée : 132 variables quantitatives.

L'AFM a été choisie car elle permet de visualiser les ressemblances entre individus du point de vue de l'ensemble des variables et les relations entre variables, en prenant en compte la structure en groupe des variables. L'ensemble des jeux de données a été importé dans un fichier Excel (Microsoft Excel 2016) et l'AFM a été réalisée avec le logiciel XLStat (Addinsoft, Paris, France).

7.3. Analyse multivariée des données *ex-situ* par OPLS-DA

L'analyse multivariée des échantillons de l'**Étude III-B** a été réalisée par OPLS-DA sur les 26 individus qui ont fait l'objet d'une caractérisation complète (analyse phytochimique des cônes et après brassage). Les jeux de données de la caractérisation phytochimique ont été pris en compte car le houblon utilisé est le seul élément différenciant dans la recette les différents échantillons dégustés par le panel. L'OPLS-DA a ainsi été réalisée sur quatre jeux de données suivants : 2 jeux de données de caractérisation des cônes :

- analyse des composés volatils : 68 variables semi-quantitatives (car l'OPLS ne permet pas de traiter des données qualitatives) ;
- métabolomique non ciblée : 160 variables quantitatives ;

et 2 jeux de données d'analyse de la bière :

- caractérisation des composés volatils par SBSE GC-MS : 173 variables quantitatives ;
- caractérisation sensorielle par le panel : 9 variables quantitatives (notes moyennes en 0 et 10 attribuée par le panel pour chaque descripteur à chaque produit).

Cette fois-ci, nous avons préféré traiter les données par OPLS-DA car elle permet d'identifier les variables qui contribuent le plus à la répartition des observations dans le modèle (Triba et al. 2015), et donc d'identifier les composants chimiques du houblon qui impactent le plus les qualités organoleptiques de la bière. Tous les jeux de données ont été importés dans un fichier Excel (Microsoft Excel 2016) puis traités sur MatLab (The MathWorks, Natick, USA) avec l'aide du Dr Jean-Xavier Fontaine (Université d'Amiens, UMRt BioEcoAgro). Le jeu de données de la génétique obtenu lors de l'**Étude I**, dont la matrice est différente (distances orthodromiques), aurait pu éventuellement être

intégré à la construction de ce modèle, mais comme il conforte l'opposition accessions sauvages d'un part et variétés anciennes et commerciales d'autre part, nous avons préféré concentrer notre analyse sur les marqueurs phytochimiques afin de minimiser le biais de notre analyse.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Seules les références citées dans le manuscrit sont présentes ci-dessous. Les références citées dans les articles sont intégrées dans leurs bibliographies respectives.

- Acquaah G. *Principles of Plant Genetics and Breeding Evaluation sensorielle - Guide de bonnes pratiques*. Seconde édition. Wiley-Blackwell. Malden : 2012. 768 p.
- Actia. *Evaluation sensorielle - Guide de bonnes pratiques*. 2014. 82 p. ISBN : 978-2-9531423-5-8.
- AGPH. « Histoire de la culture du Houblon en France ». In : *Fr. Houblon* [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.france-houblon.fr/france-houblon/association-generale-de-producteurs-de-houblon-de-france/histoire/histoire-de-la-culture-du-houblon-en-france/> > (consulté le 27 juillet 2022).
- AGPH. « Le houblon : Bilan 2019 ». In : *Guide Technique 2020* [en ligne]. Disponible sur : < https://rd-agri.fr/external_data/acta/PNDAR-2019/AGPH_Houblon_Bilan%20et%20conseils%20agronomiques.pdf > (consulté le 14 juillet 2022).
- Ahmed M. O., Salem F. B., Bedhif S., M'Naouer D. « Analyse moléculaire de la diversité génétique des dromadaires (*Camelus dromedarius*) en Tunisie ». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 2010. Vol. 14, n°3, p. 399-408.
- Almaguer C., Schönberger C., Gastl M., Arendt E. K., Becker T. « A review: *Humulus lupulus*- a story that begs to be told ». *Journal of the Institute of Brewing*. 2014. Vol 120, n°4, p.289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- American Society of Brewing Chemists. *Method Beer-23A, Methods of Analysis of the ASBC*. Huitième édition. *American Society of Brewing Chemists*. Minnesota, 1992.
- Armenta S., Alcalá M., Blanco M. « A review of recent, unconventional applications of ion mobility spectrometry (IMS) ». *Analytica Chimica Acta*. 2011. Vol. 703, n°2, p. 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.021>
- ARS USDA. « Progress (66051) » [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/2450/hopcultivars/66051.html> > (consulté le 10 août 2022a).
- ARS USDA. « Neoplanta (21082) » [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/2450/hopcultivars/21082.html> > (consulté le 10 août 2022b).
- ARS USDA. « Ahil (21050) » [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/2450/hopcultivars/21050.html> > (consulté le 10 août 2022c).
- Arthur C. L., Pawliszyn Janusz. « Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers ». *Analytical Chemistry*. 1990. Vol. 62, n°19, p. 2145-2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>
- Asano K., Hashimoto N. « Isolation and characterization of foaming proteins of beer ». *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1980. Vol. 38, n°4, p. 129-136.

- Babushoka V., Linstrom P., Zenkevich I. « Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils ». *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 2011. Vol. 40, 043101. <https://doi.org/10.1063/1.3653552>
- Baize D. *Guide des analyses en pédologie*. Inra-Quae. Techniques et Pratiques. 2ème édition. Paris, France. 2000. 257 p. ISBN : 2-7380-0892-5
- Baltussen E., Sandra P., David F., Cramers C. « Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles ». *Journal of Microcolumn Separations*. 1999. Vol. 11, n°10, p. 737-747. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-667X\(1999\)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-667X(1999)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4)
- Bart-Haas Group. « Bart-Haas report 2020/2021 ». 2021. 36 p.
- Bart-Haas Group. « Bart-Haas report 2021/2022 ». 2022. 40 p.
- Behre K.-E. « The history of beer additives in Europe — A review ». *Vegetation History and Archaeobotany*. 1999. Vol. 8, n°1-2, p. 35-48. <https://doi.org/10.1007/BF02042841>
- Biendl M., Engelhard B., Forster A., Gahr A., Lutz A., Mitter W., Schmidt R., Schönberger C. *Hops: Their Cultivation, Composition and Usage*. 2015. Fachverlag Hans Carl GmbH, Nuremberg, Germany. 571 p. ISBN 978-3-418-00900-1
- von Bingen H, Throop P. *Hildegard von Bingen's Physica: the complete English translation of her classic work on health and healing*. Healing Arts Press, Rochester. 1998. 256 p. ISBN 9780892816613
- Bird C., Karl S., PE S., Toonen R. « Detecting and measuring genetic differentiation ». In : Held C., Koenemann S., Schubart C. (eds.). *Phylogeography and Population Genetics in Crustacea*. 2011. Crustacean Issues. Vol. 19, p. 31-55. <https://doi.org/10.1201/b11113-4>
- Bishop L. R., Whitear A. L., Inman W. R. « A Scientific Basis for Beer Foam Formation and Cling ». *Journal of the Institute of Brewing*. 1974. Vol. 80, n°1, p. 68-80. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1974.tb03585.x>
- Black IV W. C., Baer C. F., Antolin M. F., DuTeau N. M. « Population genomics: genome-wide sampling of insect populations ». *Annual Review of Entomology*. 2001. Vol. 46, n°1, p. 441-469. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.441>
- Boccard J., Rutledge D. N. « A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock omics data fusion ». *Analytica Chimica Acta*. 2013. Vol. 769, p. 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.022>
- Bocquet L., Sahpaz S., Hilbert J. L., Rambaud C., Rivière C. « *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology ». *Phytochemistry Reviews*. 2018a. Vol. 17, n°5, p. 1047-1090. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y>
- Bocquet L. *Les composés phénoliques du houblon, Humulus lupulus L. : Lutte contre la résistance microbienne et perspectives industrielles*. Université de Lille, 2018. 201 p.
- Bocquet L., Rivière C., Dermont C., Samaillie J., Hilbert J.-L., Halama P., Siah A., Sahpaz S. « Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* ». *Industrial Crops and Products*. 2018. Vol. 122, p. 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.061>
- Bocquet L., Sahpaz S., Rivière C., « An overview of the antimicrobial properties of hop ». In : Mérillon J.M. & Rivière C (ed.). *Natural Antimicrobial Agents, Sustainable Development and Biodiversity*. 2018. Cham, Switzerland, Springer. Vol. 19, pp. 31-54. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4_2

- Bocquet L., Sahpaz S., Bonneau N., Beaufay C., Mahieux S., Samaillie J., Roumy V., Jacquin J., Bordage S., Hennebelle T., Chai F., Quetin-Leclercq J., Neut C., Rivière C. « Phenolic Compounds from *Humulus lupulus* as Natural Antimicrobial Products: New Weapons in the Fight against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* Strains ». *Molecules*. 2019. Vol. 24, n°6, p. 1024. <https://doi.org/10.3390/molecules24061024>
- Borsdorf H., Eiceman G. A. « Ion Mobility Spectrometry: Principles and Applications ». *Applied Spectroscopy Reviews*. 2006. Vol. 41, n°4, p. 323-375. <https://doi.org/10.1080/05704920600663469>
- Brasseurs de France. « Cahier des charges des brasseurs » [en ligne]. 2017. Disponible sur : <https://www.calameo.com/read/0054360669f648ad6e3d7> (consulté le 13 octobre 2020).
- Brasseurs de France. *Les types de bière* [en ligne]. *Brasseurs de France*. Disponible sur : < <https://www.brasseurs-de-france.com/tout-savoir-sur-la-biere/les-types-de-biere/> > (consulté le 31 juillet 2022a).
- Brasseurs de France. *Histoire* [en ligne]. *Brasseurs de France*. Disponible sur : < <https://www.brasseurs-de-france.com/tout-savoir-sur-la-biere/histoire/> > (consulté le 14 juin 2022b).
- Bruneton J. *Pharmaognosie - Phytochimie, plantes médicinales*. Tec&Doc, Paris. 2016. 1504 p. (Lavoisier).
- Burgot G. « Microextraction en phase solide (SPME) ». *Techniques Analytiques*. 2019. <https://doi.org/10.51257/a-v2-p1430>
- Camille JA. *Le Houblon*. Bières du monde. 2000. 60 p. ISBN : 3507370001011.
- Castro L. F., Ross C. F. « Determination of flavour compounds in beer using stir-bar sorptive extraction and solid-phase microextraction ». *Journal of the Institute of Brewing*. 2015. Vol. 121, n°2, p. 197-203. <https://doi.org/10.1002/jib.219>
- Cavalli-Sforza L. L., Edwards A. W. F. « Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures ». *The American Journal of Human Genetics*. 1967. Vol. 19, n°3 Pt 1, p. 233-257.
- Čerenak A., Kolenc Z., Sehur P., Whittock S. P., Koutoulis A., Beatson R., Buck E., Javornik B., Škof S., Jakše J. « New Male Specific Markers for Hop and Application in Breeding Program ». *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, n°1, p. 14223. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50400-z>
- Chambre d'agriculture NPDC. *Fiche technico-économique pour le houblon*. 2021. (non diffusée)
- Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. « The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes ». *Nature*. 1994. Vol. 371, n°6494, p. 215-220. <https://doi.org/10.1038/371215a0>.
- Cibaka M.-L. K., Gros J., Collin S. « Revue sur les étonnantes analogies et les différences relevées entre un cône de houblon et une baie de raisin ». *Cerevisia*. 2014. Vol. 38, n°4, p. 103-117. <https://doi.org/10.1016/j.cervis.2014.04.001>
- Clark S. M., Vaitheeswaran V., Ambrose S. J., Purves R. W., Page J. E. « Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*) ». *BMC Plant Biology*. 2013. Vol. 13, n°1, p. 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-12>
- Clarke B. J. « Hop Products ». *Journal of the Institute of Brewing*. 1986. Vol. 92, n°2, p. 123-130. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04385>
- Collin S., Jerkovic V., Bröhan M., Callemien D. « Polyphenols and Beer Quality ». In : Ramawat KG, Mérillon J-M (éd.). *Natural products : phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Berlin, Heidelberg : Springer, 2013. p. 2333-2359. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_78

- Comptoir Agricole. « La marque HOP FRANCE - Comptoir Agricole » [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.comptoir-houblon.fr/content/204-hop-france-origin> > (consulté le 11 août 2022).
- Cougard M.-J. « Bière : le houblon français en voie de disparition ». *Les Echos* [en ligne]. 6 novembre 2018. Disponible sur : < <https://www.lesechos.fr/industrie-services/conso-distribution/biere-le-houblon-francais-en-voie-de-disparition-145330> > (consulté le 5 septembre 2020).
- CPVO. « Variety Finder » [en ligne]. Disponible sur : < <https://vf.plantvarieties.eu/varieties> > (consulté le 10 août 2022).
- Dabbous-Wach A., Rodolfi M., Paolini J., Costa J., Ganino T. « Characterization of Wild Corsican Hops and Assessment of the Performances of German Hops in Corsican Environmental Conditions through a Multidisciplinary Approach ». *Applied Sciences*. 2021. Vol. 11, n°9, p. 3756. <https://doi.org/10.3390/app11093756>
- Dalongeville A. *Variation et persistance des populations en milieu marin : implication pour la conservation*. Université de Montpellier, 2017. 244 p.
- Darby P. « Brewery History ». In: *Brewery History* [en ligne]. 2005. Disponible sur : < <http://www.breweryhistory.com/journal/archive/121/bh-121-094.htm> > (consulté le 2 juin 2021).
- Darwin C. *Origin of species - preservation of favoured races in the struggle for life*. Londres, John Murray, Albermarle Street, 1859. 642 p.
- De Keukeleire D. « Fundamentals of beer and hop chemistry ». *Quím. Nova*. 2000. Vol. 23, n°1, p. 108-112. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>
- De Keukeleire D., Verzele M. « The absolute configuration of the isohumulones and the humulinic acids ». *Tetrahedron*. 1971. Vol. 27, n°20, p. 4939-4945. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)98199-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)98199-2)
- De Keukeleire D., Vindevogel J., Szücs R., Sandra P. « The history and analytical chemistry of beer bitter acids ». *Trends in Analytical Chemistry*. 1992. Vol. 11, n°8, p. 275-280. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(92\)87089-3](https://doi.org/10.1016/0165-9936(92)87089-3)
- De Keukeleire J., Ooms G., Heyerick A., Roldan-Ruiz I., Van Bockstaele E., De Keukeleire D. « Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.) ». *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003. Vol. 51, n°15, p. 4436-4441. <https://doi.org/10.1021/jf034263z>
- Depledge F., Sauvageot F. « Évaluation sensorielle des produits alimentaires ». *Techniques de l'ingénieur*. 2002. <https://doi.org/10.51257/a-v1-f4000>
- Dicke M., Loreto F. « Induced plant volatiles: from genes to climate change ». *Trends Plant Sciences*. 2010. Vol. 15, n°3, p. 115-117. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.007>
- Dietz C., Cook D., Huismann M., Wilson C., Ford R. « The multisensory perception of hop essential oil: a review ». *Journal of the Institute of Brewing*. 2020. Vol. 126, p. 320-342. DOI 10.1002/jib.622
- Driskill M., Pardee K., Hummer K. E., Zurn J. D., Amundsen K., Wiles A., Wiedow C., Patzak J., Henning J. A., Bassil N. V. « Two fingerprinting sets for *Humulus lupulus* based on KASP and microsatellite markers ». *PLoS ONE*. 2022. Vol. 17, n°4, e0257746.. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257746>
- Ducloux A., Hédiard L., Vallez T. *Les productions agricoles du Nord de la France*. J.B. Baillière et fils, éditeurs. Paris, France. 1910.
- Dudareva N., Negre F., Nagegowda D. A., Orlova I. « Plant volatiles: recent advances and future perspectives ». *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2006. Vol. 25, n°5, p. 417-440. <https://doi.org/10.1080/07352680600899973>

- Earl D. A., VonHoldt B. M. « STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method ». *Conservation Genetics Resources*. 2012. Vol. 4, n°2, p. 359-361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- El-Aneed A., Cohen A., Banoub J. « Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers ». *Applied Spectroscopy Reviews*. 2009. Vol. 44, n°3, p. 210-230. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>
- EMA. « Guideline on bioanalytical method validation ». 2011. p. 23.
- EMA, HMPC. « Community herbal monograph on *Humulus lupulus* L., flos ». 2014. p. 7.
- Emwas A.-H. M., Al-Talla Z. A., Yang Y., Kharbatia N. M. « Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts ». In : Bjerrum JT (éd.). *Metabonomics: Methods and Protocols*. New York, Springer, 2015. p. 91-112. ISBN : 978-1-4939-2376-2
- Escofier B., Pagès J. *Analyses factorielles simples et multiples. Objectifs méthodes et interprétation*. Dunod, Paris, 2008. 328 p. ISBN 978-2-10-053809-6
- Eßlinger H. M. *Handbook of Brewing. Process, technology, market*. Wiley-VCH. Freiberg, Germany. 2009. 779 p. ISBN : 978-3-527-31674-8
- European Commission. « EU Plant variety database » [en ligne]. Disponible sur : < https://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/search/public/index.cfm >
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. « Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study ». *Molecular Ecology*. 2005. Vol. 14, n°8, p. 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. M. « Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data ». *Genetics*. 1992. Vol. 131, n°2, p. 479-491.
- Faiveley M. « Fabrication des bières ». *Techniques de l'ingénieur*. 2020. <https://doi.org/10.51257/a-v2-f6205>
- Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. « Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies ». *Genetics*. 2003. Vol. 164, p. 1567-1587. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>
- FAO. *The state of the world's biodiversity for food and agriculture*. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Bélanger J. & Pilling D. (eds.), Rome, 2019. ISBN : 978-92-5-131270-4
- FAO Stat. « Value of Agricultural Production » [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QV> > (consulté le 8 juin 2022).
- FAOSTAT. « Cultures et produits animaux -Production, quantités de 1961 à 2020 ». 2022. Disponible sur : < <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/QV> > (consulté le 27 juillet 2022).
- Farag M., Porzel A., Wessjohann L., Schmidt J. « Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): A comparison of MS and NMR methods in metabolomics ». *Metabolomics*. 2012. Vol. 8, p. 492-507. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0335-y>
- FDA. « GRAS Notices » [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices> > (consulté le 9 août 2022).
- Felsenstein J. « Maximum Likelihood and Minimum-Steps Methods for Estimating Evolutionary Trees

- from Data on Discrete Characters ». *Systematic Biology*. 1973. Vol. 22, n°3, p. 240-249. <https://doi.org/10.2307/2412304>
- Felsenstein J. « Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach ». *Journal of Molecular Evolution*. 1981. Vol. 17, n°6, p. 368-376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
- Fillaudeau L., Blanpain-Avet P. « Secteur brassicole - Caractéristiques technico-économiques ». *Techniques de l'ingénieur*. 1999. p. 16.
- Forcisi S., Moritz F., Kanawati B., Tziotis D., Lehmann R., Schmitt-Kopplin P. « Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling ». *Journal of Chromatography A*. 2013. Vol. 1292, p. 51-65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.017>
- FREDON Hauts-de-France. « Recherche de méthodes de lutte contre les acariens du houblon » [en ligne]. In : Wateau et Dewaegeneire, Fiche technique 2012/21. Disponible sur : < http://fredon.fr/hauts-de-france/sites/hauts-de-france/files/fiches%20techniques/2012_21_recherche_de_methodes_de_lutte_contre_les_acariens_du_houblon.pdf > (consulté le 14 juillet 2022).
- FUN MOOC. « Chimie, chapitre 2/2 : les méthodes supervisées » [en ligne]. Disponible sur : < <http://www.fun-mooc.fr/fr/cours/chimie-chapitre-22-les-methodes-supervisees/> > (consulté le 17 octobre 2020).
- Gabelica V. « Ion Mobility–Mass Spectrometry: an Overview ». In : Sobott F (Ed). *Ion Mobility-Mass Spectrometry : Fundamentals and application*. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 2021. p. 1-25. ISBN : 1839161663
- Ganal M. W., Altmann T., Röder M. S. « SNP identification in crop plants ». *Current Opinion in Plant Biology*. 2009. Vol. 12, n°2, p. 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.009>
- GEVES. « GEVES Expertise & Performance » [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.geves.fr/> > (consulté le 14 août 2022).
- GIEC. « Bilan 2001 des changements climatiques - Rapport de synthèse » [en ligne]. Watson R. (Ed), Programme des Nations Unies pour l'Environnement, Genève, Suisse, 2001. Disponible sur : < https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/08/TAR_syfull_fr.pdf > (consulté le 8 juin 2022).
- Graf T., Beck M., Mauermeier M., Ismann, Protner J., Doleschel P., Schmidhalter U. « *Humulus lupulus* – The Hidden Half ». *Brewing Science*. 2014. Vol. 67, p. 161-166.
- Hanke S., Ditz V., Hermann M., Back W., Becker T., Krottenthaler M. « Influence of ethyl acetate, isoamyl acetate and linalool on off-flavour perception in beer ». *Brewing Science*. 2010. n°63, p. 94-99.
- Haunold A. « Hop Production, Breeding, and Variety Development in Various Countries ». *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1981. Vol. 39, n°1, p. 27-34. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-39-0027>
- Hedrick P. W. « A standardized genetic differentiation measure ». *Evolution: International Journal of Organic Evolution*. 2005. Vol. 59, n°8, p. 1633-1638. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01814.x>
- Heiri O., Lotter A. F., Lemcke G. « Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results ». *Journal of Paleolimnology*. 2001. Vol. 25, n°1, p. 101-110. <https://doi.org/10.1023/A:1008119611481>
- Heyerick A., Zhao Y. N., Sandra P., Huvaere K., Roelens F., Keukeleire de D. « Photolysis of hop-derived trans-iso-a-acids and trans-tetrahydroiso-a-acids: product identification in relation to the

- lightstruck flavour of beer ». *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2003. Vol. 2, p. 306-314. <https://doi.org/10.1039/B210935B>
- Holopainen J. K., Gershenzon J. « Multiple stress factors and the emission of plant VOCs ». *Trends Plant Sciences*. 2010. Vol. 15, n°3, p. 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.006>
- Hong K., Xu Z., Wang L., Johnpaul A., Cheng Y., Lv C., Ma C. « Varietal differences in the phytochemical components' accumulation and aroma profile of three *Humulus lupulus* cultivars ». *Food Control*. 2022. Vol. 132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108499>
- Horreo J. L., Peredo E. L., Olmedo J. L., Valladares J. E., García E., Revilla M. A. « Genetic diversity inferred from microsatellites of wild hops in Galicia (Spain) ». *Monatsschrift Für Brauwiss.* 2014. Vol. 67, p. 5.
- Husson F. « Analyse Factorielle Multiple - AFM » [en ligne]. Disponible sur : <<https://www.youtube.com/watch?v=1U-s8u1rcpo>> (consulté le 9 juin 2022).
- ICH. « International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use ». In : Nijhoff *Handbook of Transnational Economics Governance Regimes*. 2005. p. 1041-1053. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897>
- Idrees M., Irshad M. « Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity; a review ». *European Academic Research*. 2014. Vol. 2, n°1, p. 1513-1540.
- Jakše J., Bandelj D., Javornik B. « Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.) ». *Molecular Ecology Notes*. 2002. Vol. 2, n°4, p. 544-546. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00309.x>
- Jakše J., Luthar Z., Javornik B. « New polymorphic dinucleotide and trinucleotide microsatellite loci for hop *Humulus lupulus* L ». *Molecular Ecology Resources*. 2008. Vol. 8, n°4, p. 769-772. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2007.02053.x>
- Jeanet R., Croguennec T., Schuck P., Brule G. « De l'orge à la bière ». In : *Sciences des aliments : biochimie, microbiologie, procédés, produits, volume 2. Technologie des produits alimentaire stabilisation biologique et physico-chimique*. Editions Tec&Doc, Paris. 2007. 456 p.
- Jelinek L., Sneberger M., Karabin M., Dostalek P. « Comparison of Czech Hop Cultivars Based on their Contents of Secondary Metabolites ». *Czech Journal of Food Sciences*. 2010. Vol. 28, p. 309-316. <https://doi.org/10.17221/65/2010-CJFS>
- Jost L. « GST and its relatives do not measure differentiation ». *Molecular Ecology*. 2008. Vol. 17, n°18, p. 4015-4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>
- Kaminski D., Gaweda K., Arczewska M., Senczyna B., Gagos M. « A kinetic study of xanthohumol cyclization to isoxanthohumol - A role of water ». *Journal of Molecular Structure*. 2017. Vol. 2239, p. 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.03.027>
- Karabín M., Jelínek L., Kinčl T., Hudcová T., Kotlíková B., Dostálek P. « New approach to the production of xanthohumol-enriched beers ». *Journal of the Institute of Brewing*. 2013. Vol. 119, n°3, p. 98-102. <https://doi.org/10.1002/jib.71>
- Kawecki T. J., Ebert D. « Conceptual issues in local adaptation ». *Ecology Letters*. 2004. Vol. 7, n°12, p. 1225-1241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x>
- Kishimoto T., Teramoto S., Fujita A., Yamada O. « Evaluation of Components Contributing to the International Bitterness Unit of Wort and Beer ». *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 2021. Vol. 80, n°1, p. 53-61. <https://doi.org/10.1080/03610470.2021.1878684>
- Kishimoto T., Wanikawa A., Kagami N., Kawatsura K. « Analysis of Hop-Derived Terpenoids in Beer and Evaluation of Their Behavior Using the Stir Bar-Sorptive Extraction Method with GC-MS ». *Journal*

- of *Agricultural and Food Chemistry*. 2005. Vol. 53, n°12, p. 4701-4707. <https://doi.org/10.1021/jf050072f>
- Kondić D., Čerenak A., Košir I. J., Ocvirk M., Krmpot T., Đurić G. « Morphological and Biochemical Characterization of Wild Hop (*Humulus lupulus* L.) Populations from Banja Luka Area (Bosnia and Herzegovina) ». *Agronomy*. 2021. Vol. 11, n°2, p. 239. DOI 10.3390/agronomy11020239
- Korpelainen H., Pietiläinen M. « Hop (*Humulus lupulus* L.): Traditional and Present Use, and Future Potential ». *Economic Botany*. 2021. Vol. 75, n°3-4, p. 302-322. <https://doi.org/10.1007/s12231-021-09528-1>
- Kováts E. « Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone ». *Helvetica Chimica Acta*. 1958. Vol. 41, n°7, p. 1915-1932. <https://doi.org/10.1002/hlca.19580410703>
- Krofta K. « Comparison of quality parameters of Czech and foreign hop varieties ». *Plant Soil Environ.* 2003. Vol. 49, n°No. 6, p. 261-268. <https://doi.org/10.17221/4123-PSE>
- Krofta K., Nesvadba V., Patzak J. « Utilization of wild hops for extention of genetic sources for breeding ». *Rostl. Vyroba - UZPI Czech Repub.* 1998.
- Kruve A., Rebane R., Kipper K., Oldekop M.-L., Evard H., Herodes K., Ravio P., Leito I. « Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I ». *Analytica Chimica Acta*. 2015. Vol. 870, p. 29-44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>
- Labbe D., Rytz A., Hugi A. « Training is a critical step to obtain reliable product profiles in a real food industry context ». *Food Quality and Preference*. 2004. Vol. 15, n°4, p. 341-348. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00081-8](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00081-8)
- Lafontaine S., Caffrey A., Dailey J., Varnum S., Hale A., Eichler B., Dennenlöhr J., Schubert C., Knoke L., Lerno L., Dagan L., Schönberger C., Rettberg N., Heymann H., Ebeler S. E. « Evaluation of variety, maturity, and farm on the concentrations of monoterpene diglycosides and hop volatile/nonvolatile composition in five *Humulus lupulus* cultivars ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021. Vol. 69, n°15, p. 4356-4370. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07146>
- Lê S., Josse J., Husson F. « FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. » *Journal of Statistical Software*. 2008. Vol. 25, n°1, p. 1-18. DOI 10.18637/jss.v025.i01
- Lin M., Xiang D., Chen X., Huo H. « Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019. Vol. 67, n°30, p. 8291-8302. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03780>
- Liu L., Wang J., Rosenberg D., Zhao H., Lengyel G., Nadel D. « Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting ». *Journal of Archaeological Science: Reports*. 2018. Vol. 21, p. 783-793. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2018.08.008>
- Lv H. « Mass spectrometry-based metabolomics towards understanding of gene functions with a diversity of biological contexts ». *Mass Spectrometry Reviews*. 2013. Vol. 32, n°2, p. 118-128. <https://doi.org/10.1002/mas.21354>
- Lynch M., Milligan B. G. « Analysis of population genetic structure with RAPD markers ». *Molecular Ecology*. 1994. Vol. 3, n°2, p. 91-99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00109.x>
- Machado J. C., Faria M. A., Ferreira I. « Hops: New Perspectives for an Old Beer Ingredient ». *Natural Beverages*. 2019. p. 267-301. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816689-5.00010-9>
- Mafakheri M., Kordrostami M., Rahimi M., Matthews P. D. « Evaluating genetic diversity and structure of a wild hop (*Humulus lupulus* L.) germplasm using morphological and molecular characteristics ».

- Euphytica*. 2020. Vol. 216, n°4, p. 216-258. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02592-z>
- Malandain H. *Étude physico-chimique et analytique de l'absorption de molécules extractantes par des polymères (méthode SBSE) et expertise par technique LC-MS*. Conservatoire National des Arts et Métiers Paris. 2012.
- Mammadov J., Aggarwal R., Buyyarapu R., Kumpatla S. « SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding ». *International Journal of Plant Genomics*. 2012. Vol. 2012, p. 1-11. <https://doi.org/10.1155/2012/728398>
- Mark J. « Beer in the Ancient World - World History Encyclopedia » [en ligne]. 2011. Disponible sur : < <https://www.worldhistory.org/article/223/beer-in-the-ancient-world/> > (consulté le 17 juin 2022).
- Marquet P. « Théorie et instrumentation des techniques de LC-MS et LC-MS/MS applicables à la toxicologie ». *Annales de toxicologie analytique*. 2005. Vol. 17, n°1, p. 5-12. <https://doi.org/10.1051/ata:2005032>
- Martins Z. E., Machado J. C., Cunha S. C., Barata A. M., Ferreira I. « A chemometric approach to compare Portuguese native hops with worldwide commercial varieties ». *Journal of Chemometrics*. 2020. Vol.34, p. e3285. <https://doi.org/10.1002/cem.3285>
- Maxted N. « In Situ, Ex Situ Conservation ». *Encyclopedia of Biodiversity*. 2013. Vol.4, p. 313-323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00049-6>
- McCallum J. L., Nabuurs M. H., Gallant S. T., Kirby C. W., Mills A. A. S. « Phytochemical characterization of wild hops (*Humulus lupulus* ssp. *lupuloides*) germplasm resources from the maritimes region of Canada ». *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01438>.
- Mediburu F. De. *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-5*. [en ligne]. 2021. Disponible sur : < <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae> >
- Meirmans P. G., Hedrick P. W. « Assessing population structure: F(ST) and related measures ». *Molecular Ecology Resources*. 2011. Vol. 11, n°1, p. 5-18. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x>
- Ménard G., Biais B., Prodhomme D., Ballias P., Petit J., Just D., Rothan C., Rolin D., Gibon Y. « High-throughput biochemical phenotyping for plants ». *Advances in Botanical Research*. 2013. Vol. 67, p. 407-439. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397922-3.00009-5>
- Menet M.-C. « Principes de la spectrométrie de masse ». *Techniques de l'ingénieur*. 2011. Vol. 2011, n°437, p. 41-53. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(11\)71211-4](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(11)71211-4)
- Mesmin C. *Application de la spectrométrie de masse à l'identification et la quantification de peptides biomarqueurs*. Université Pierre et Marie Curie, 2012. 327 p.
- Michel T. « Bière | Interhoublon, une interprofession officielle pour le houblon ». *Dépêche – Le Petit Meunier* [en ligne]. 2020. Disponible sur : < <https://www.reussir.fr/ladepeche/interhoublon-une-interprofession-officielle-pour-le-houblon> > (consulté le 14 septembre 2020).
- Miller R. H. « Morphology of *Humulus lupulus*. II. Secondary Growth in the Root and Seedling Vascularization ». *American Journal of Botany*. 1959. Vol. 46, n°4, p. 269-277.
- Mongelli A., Rodolfi M., Ganino T., Marieschi M., Dall'Asta C., Bruni R. « Italian hop germplasm: Characterization of wild *Humulus lupulus* L. genotypes from Northern Italy by means of phytochemical, morphological traits and multivariate data analysis ». *Industrial Crops and Products*. 2015. Vol. 70, p. 16-27. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.036>
- Mongelli A., Rodolfi M., Ganino T., Marieschi M., Caligiani A., Dall'Asta C., Bruni R. « Are *Humulus lupulus* L. ecotypes and cultivars suitable for the cultivation of aromatic hop in Italy? A

- phytochemical approach ». *Industrial Crops and Products*. 2016. Vol. 83, p. 693-700. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.046>
- Moore B., Andrew R., Külheim C., Foley W. « Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context ». *The New Phytology*. 2014. Vol. 201, n°3, p. 733-750. <https://doi.org/10.1111/nph.12526>
- Morcol T. B., Negrin A., Matthews P. D., Kennelly E. J. « Hop (*Humulus lupulus* L.) terroir has large effect on a glycosylated green leaf volatile but not on other aroma glycosides ». *Food Chemistry*. 2020. Vol. 321, p. 126644. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126644>.
- Murakami A., Darby P., Javornik B., Pais M. S. S., Seigner E., Lutz A., Svoboda P. « Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus* L. » *Heredity*. 2006. Vol. 97, n°1, p. 66-74. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800839>.
- Murashige T., Skoog F. « A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture ». *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol 15, n°3, p. 473-97. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nations Unies. *Convention sur la diversité biologique* [en ligne]. Cancún, Mexique. 4-17 décembre 2016. Disponible sur : <www.cbd.int/doc/decisions/cop-13/cop-13-dec-08-fr.pdf> (consulté le 8 juin 2022)
- Nei M. « Analysis of gene diversity in subdivided populations ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973. Vol. 70, n°12, p. 3321-3323. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
- Nei M., Tajima F., Tateno Y. « Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data ». *Journal of Molecular Evolution*. 1983. Vol. 19, n°2, p. 153-170. <https://doi.org/10.1007/BF02300753>
- Neve R. A. *Hops*. Springer -Science. Suffolk, Angleterre. 1991. ISBN : 978-94-010-5375-4.
- Nicácio K. de J., Ferreira M. S., Katchborian-Neto A., Costa M. L., Murgu M., Dias D. F., Soares M. G., Chagas-Paula D. A. « Anti-inflammatory markers of hops cultivars (*Humulus lupulus* L.) evaluated by untargeted metabolomics strategy ». *Chemistry & Biodiversity*. 2022. Vol. 19, n°4. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100966>
- Nybom H. « Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants ». *Molecular Ecology*. 2004. Vol. 13, n°5, p. 1143-1155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x>
- Oliver S. G., Winson M. K., Kell D. B., Baganz F. « Systematic functional analysis of the yeast genome ». *Trends in Biotechnology*. 1998. Vol. 16, n°9, p. 373-378. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(98)01214-1)
- Paguet A. S., Siah A., Lefèvre G., Sahpaz S., Rivière C. « Agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding ». *Phytochemistry Reviews*. 2022. Vol. 21, n°2, p. 667-708. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09813-4>
- Palmer J. J. *How to brew: everything you need to know to brew beer right for the first time*. Boulder, Colorado. Brewers Publications, 2006. 372 p. ISBN : 978-0-937381-88-5
- Papet Y., Brunet B., Mura P. « Headspace (HS) et micro-extraction en phase solide (SPME). Théorie et applications ». *Annales de Toxicologie Analytique*. 2010. Vol. 22, n°2, p. 75-79. <https://doi.org/10.1051/ata/2010022>
- Parkin E., Shellhammer T. « Toward Understanding the Bitterness of Dry-Hopped Beer ». *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2018. Vol. 75, n°4, p. 363-368. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-4311-01>

- Pasteur L. « Nouveaux faits concernant l'histoire de la fermentation alcoolique ». *Comptes Rendus Chimie*. 1857. Vol. 47, p. 1011-1013.
- Patzak J., Krofta K., Henychová A., Nesvadba V. « Number and size of lupulin glands, glandular trichomes of hop (*Humulus lupulus* L.), play a key role in contents of bitter acids and polyphenols in hop cone ». *International Journal of Food Science & Technology*. 2015. Vol. 50, n°8, p. 1864-1872. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12825>
- Patzak J., Nesvadba V., Henychová A., Krofta K. « Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses ». *Biochemical Systematics and Ecology*. 2010. Vol. 38, n°2, p. 136-145. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.12.023>
- Peacock V. E. « Triskel and Aramis ». 2014. p.4.
- Peakall R., Smouse P. E. « GenAEx Tutorial 1, an introduction to genetic analysis for populations studies ». Australian National University, Canberra, Australia. 2012.
- Peakall R., Smouse P. E. « GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update ». *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28, n°19, p. 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pepi S., Chicca M., Telloli C., Di Roma A., Grisenti P., Tessari U., Vaccaro C. « Discrimination of geographical origin of hop (*Humulus lupulus* L.) using geochemical elements combined with statistical analysis ». *Environmental Geochemistry and Health*. 2019. Vol. 41, p. 1559-1576. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0232-7>
- Peredo E. L., Arroyo-García R., Martínez-Zapater J. M., Revilla M. Á. « Evaluation of Microsatellite Detection Using Autoradiography and Capillary Electrophoresis in Hops ». *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2005. Vol. 63, n°2, p. 57-62. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-63-0057>
- Perrier X., Jacquemoud-Collet J. P. « DARwin Software ». 2006. Disponible sur : < <https://darwin.cirad.fr/feedback.php> > (consulté le 11 avril 2022)
- Peycru P., Grandperrin D., Perrier C. « Les mécanismes de l'évolution ». In : *Biologie Tout-En-Un*. Dunod, Paris. 2014a. p. 334-361. ISBN 2100599224
- Peycru P., Grandperrin D., Perrier C. « Les populations et leur dynamique ». In : *Biologie Tout-En-Un*. Dunod, Paris. 2014b. p. 334-361. ISBN 2100599224
- Plumb R. S., Johnson K. A., Rainville P., Smith B. W., Wilson I. D., Castro-Perez J. M., Nicholson J. K. « UPLC/MSE; a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006. Vol. 20, n°13, p. 1989-1994. DOI 10.1002/rcm.2550
- Podeszwa T., Harasym J. « New methods of hopping (dryhopping) and their impact on sensory properties of beer ». *Acta Innovations*. 2016. Vol. 21, p. 81-88
- Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., Taberlet P. « Genotyping errors: causes, consequences and solutions ». *Nature Reviews Genetics*. 2005. Vol. 6, n°11, p. 847-859. <https://doi.org/10.1038/nrg1707>
- Porrás-Hurtado L., Ruiz Y., Santos C., Phillips C., Carracedo Á., Lareu M. V. « An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software ». *Frontiers in Genetics*. 2013. Vol. 4, p. 98. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00098>
- Prencipe F. P., Brighenti V., Rodolfi M., Mongelli A., Dall'Asta C., Ganino T., Bruni R., Pellati F. « Development of a new high-performance liquid chromatography method with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection for the metabolite fingerprinting of bioactive compounds in *Humulus lupulus* L. ». *Journal of Chromatography A*. 2014. Vol. 1349, p. 50-59.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.097>

- Prieto A., Basauri O., Rodil R., Usobiaga A., Fernández L. A., Etxebarria N., Zuloaga O. « Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions ». *Journal of Chromatography A*. 2010. Vol. 1217, n°16, p. 2642-2666. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.051>
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. « Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data ». *Genetics*. 2000. Vol. 155, n°2, p. 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- R Core Team. « R: A language and environment for statistical computing. » In : *R Found. Stat. Comput. Vienna Austria*. 2021. Disponible sur : < <https://www.R-project.org/>. >
- Raimond C., Garine E. « Agrobiodiversité ». In : *Dictionnaire de L'Anthropocène*. CNRS Editions. 2020. p. 23-26.
- Regnault-Roger C., Fabres G., Philogène B. *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement* Lavoisier. Paris, France. 2005. 1013 p. ISBN : 2-7430-0785-0
- Rettberg N., Biendl M., Garbe L.-A. « Hop Aroma and Hoppy Beer Flavor: Chemical Backgrounds and Analytical Tools—A Review ». *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2018. Vol. 76, n°1, p. 1-20. <https://doi.org/10.1080/03610470.2017.1402574>
- Reynolds J., Weir B. S., Cockerham C. C. « Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance ». *Genetics*. 1983. Vol. 105, n°3, p. 767-779. <https://doi.org/10.1093/genetics/105.3.767>
- Rigr A., Faberova I. « Descriptor list—genus *Humulus* L. » *CHI-Zatec*. 2000. p. 3-18.
- Robert P., Escoufier Y. « A Unifying Tool for Linear Multivariate Statistical Methods: The RV-Coefficient ». *Journal of the Royal Statistical Society*. 1976. Vol. 25, n°3, p. 257-265. <https://doi.org/10.2307/2347233>
- Roberts M. T., Dufour J.-P., Lewis A. C. « Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC x GC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil ». *Journal of Separation Science*. 2004. Vol. 27, n°5-6, p. 473-478. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301669>
- Rodolfi M., Silvanini A., Chiancone B., Marieschi M., Fabbri A., Bruni R., Ganino T. « Identification and genetic structure of wild Italian *Humulus lupulus* L. and comparison with European and American hop cultivars using nuclear microsatellite markers ». *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2018. Vol. 65, n°5, p. 1405-1422. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0622-9>
- Rondeau D. « Spectrométrie de masse organique - Analyseurs et méthodes en tandem ou MS ». *Techniques Analytiques*. 2017. <https://doi.org/10.51257/a-v1-p2647>
- Rossini F., Virga G., Loreti P., Iacuzzi N., Ruggeri R., Provenzano M. E. « Hops (*Humulus lupulus* L.) as a novel multipurpose crop for the mediterranean region of Europe: challenges and opportunities of their cultivation ». *Agriculture*. Vol. 11, n°6, p. 484. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060484>
- Roux A., Lison D., Junot C., Heilier J.-F. « Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review ». *Clinical Biochemistry*. 2011a. Vol. 44, n°1, p. 119-135. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.08.016>
- Roux A. *Analyse du métabolome urinaire humain par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution*. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011b.
- Rutnik K., Knez Hrnčič M., Jože Košir I. « Hop Essential Oil: Chemical Composition, Extraction, Analysis, and Applications ». *Food Reviews International*. 2021. p. 1-23. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1874413>

- Rutnik K., Ocvirk M., Košir I.J. « Impact of Hop Freshness on Dry Hopped Beer Quality ». *Foods*. 2022. Vol 11, p.1310. <https://doi.org/10.3390/foods11091310>.
- Saitou N., Nei M. « The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees ». *Molecular Biology and Evolution*. 1987. Vol. 4, n°4, p. 406-425. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Sandoval-Ramírez B. A., M. Lamuela-Raventós R., Estruch R., Sasot G., Doménech M., Tresserra-Rimbau A. « Beer Polyphenols and Menopause: Effects and Mechanisms—A Review of Current Knowledge ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. Vol. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4749131>
- Santagostini L., Caporali E., Giuliani C., Bottoni M., Ascrizzi R., Araneo S. R., Papini A., Flamini G., Fico G. « *Humulus lupulus* L. cv. Cascade grown in Northern Italy: morphological and phytochemical characterization ». *Plant Biosystems*. 2020. Vol. 154, n°3, p. 316-325. <https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1610111>
- Sanz V., Torres M. D., López Vilariño J. M., Domínguez H. « What is new on the hop extraction? ». *Trends Food Sciences Technologies*. 2019. Vol. 93, p. 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.018>
- Saussereau É., Imbert L. « Intérêt et applications en toxicologie analytique du couplage UPLC-Spectrométrie de masse haute résolution avec extraction en ligne des échantillons ». *Revue Francophone des Laboratoires*. 2016. Vol. 2016, n°479, p. 59-67. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(16\)30049-1](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(16)30049-1)
- Schönberger C., Kostelecky T. « 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing ». *Journal of the Institute of Brewing*. 2011. Vol. 117, n°3, p. 259-267. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x>
- Seethapathy S., Górecki T. « Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: A review ». *Analytica Chimica Acta*. 2012. Vol. 750, p. 48-62. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.004>
- Seigner E., Lutz A., Oberhollenzer K., Seidenberger R., Seefelder S., Felsenstein F. « Breeding of hop varieties for the future ». *Acta Horticulturae*. 2009. n° 848, p. 49-58. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.848.4>
- Shannon C. E. « A mathematical theory of communication ». *Bell Labs Technical Journal*. 1948. Vol. 27, n°3, p. 379-423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Sharp D., Qian Y., Shellhammer G., Shellhammer T. « Contributions of Select Hopping Regimes to the Terpenoid Content and Hop Aroma Profile of Ale and Lager Beers ». *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2017. Vol. 75, n°2, p. 93-100. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-2144-01>
- Sharpe F. R., Laws D. R. J. « The Essential Oil of Hops a Review ». *Journal of the Institute of Brewing*. 1981. Vol. 87, n°2, p. 96-107. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1981.tb03996.x>
- Sherwin W. B., Jabot F., Rush R., Rossetto M. « Measurement of biological information with applications from genes to landscapes ». *Molecular Ecology*. 2006. Vol. 15, n°10, p. 2857-2869. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02992.x>
- Siah A., Tisserant B., El Chartouni L., Duyme F., Deweer C., Roisin-Fichter C., Sanssené J., Durand R., Reignault P., Halama P. « Mating type idiomorphs from a French population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism ». *Fungal Biology*. 2010. Vol. 114, n°11-12, p. 980-990. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.09.008>
- Simard J.-F. *Comment faire de la bonne bière chez soi*. Brouwland. Beringen; 2011. 271 p. ISBN : 2-89568-114-7

- Slatkin M. « A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies ». *Genetics* 1995. Vol. 139, n°1, p. 457-462. <https://doi.org/10.1093/genetics/139.1.457>
- Small E. « 51. Hop (*Humulus lupulus*) – a bitter crop with sweet prospects ». *Biodiversity*. 2016. Vol. 17, n°3, p. 115-127. <https://doi.org/10.1080/14888386.2016.1199327>
- Small E. « A Numerical and Nomenclatural Analysis of Morpho-Geographic Taxa of *Humulus* ». *Systematic Botany*. 1978. Vol. 3, n°1, p. 37. <https://doi.org/10.2307/2418532>
- Solberg S. Ø., Brantestam A. K., Kylin M., Bjørn G. K., Thomsen J M. G. « Genetic variation in Danish and Norwegian germplasm collections of hops ». *Biochemical Systematics and Ecology*. 2014. Vol. 52, p. 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.12.014>
- Sommet de la terre. *Convention sur la diversité biologique*. Rio, Brésil. 1992.
- Spitze K. « Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation ». *Genetics*. 1993. Vol. 135, n°2, p. 367-374. <https://doi.org/10.1093/genetics/135.2.367>
- Srećec S., Zechner-Krpan V., Petravić-Tominac V., Cerenak A., Liber Z., Šatović Z. « Phenotypic and alpha-acid content diversity of wild hop populations in Croatia ». *Plant Soil Environment*. 2010. n°56, p. 37-42. <https://doi.org/10.17221/130/2009-PSE>
- Stajner N., Jakse J., Kozjak P., Javornik B. « The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.) ». *Plant Science*. 2005. Vol. 168, n°1, p. 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.031>
- Statista. « Craft beer: production volume by brewery type U.S. 2020 » [en ligne]. *Statista*. 2021. Disponible sur : < <http://www.statista.com/statistics/732171/craft-beer-production-by-brewery/> > (consulté le 22 mai 2021).
- Steenackers B., De Cooman L., De Vos D. « Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review ». *Food Chemistry*. 2015. Vol. 172, p. 742-756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.139>
- Stevens R. « The Chemistry of Hop Constituents ». *Chemical Reviews*. 1967. DOI 10.1021/cr60245a002.
- Su X., Yin Y. « Aroma characterization of regional Cascade and Chinook hops (*Humulus lupulus* L.) ». *Food Chemistry*. 2021. Vol. 364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130410>
- Sundqvist L., Keenan K., Zackrisson M., Prodöhl P., Kleinhans D. « Directional genetic differentiation and relative migration ». *Ecology and Evolution*. 2016. Vol. 6, n°11, p. 3461-3475. <https://doi.org/10.1002/ece3.2096>
- Swartz M. « HPLC detectors: a brief review ». *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2010. Vol. 33, n°9-12, p. 1130-1150. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>
- Taniguchi Y., Matsukura Y., Ozaki H., Nishimura K., Shindo K. « Identification and quantification of the oxidation products derived from α -acids and β -acids during storage of hops (*Humulus lupulus* L.) ». *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2013. Vol. 61, n°12, p. 3121-3130. <https://doi.org/10.1021/jf3047187>
- Tembrock L. R., McAleer J. M., Gilligan T. M. « A revision of native North American *Humulus* (Cannabaceae) ». *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*. 2016. Vol. 10, n°1, p. 11-30.
- The Chemical Sources Association. « The Good Scents Company » [en ligne]. 2010. Disponible sur : < <http://www.thegoodscentscompany.com/search3.php> > (consulté le 20 juillet 2022).
- Theis N., Lerdau M. « The evolution of function in plant secondary metabolites ». *International Journal of Plant Sciences*. 2003. Vol. 164, n°S3, p. S93-S102. <https://doi.org/10.1086/374190>

- Theodoridis G. A., Gika H. G., Want E. J., Wilson I. D. « Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review ». *Analytica Chimica Acta*. 2012. Vol. 711, p. 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.09.042>
- Thomas G. G., Neve R. A. « Studies on the effect of pollination on the yield and resin content of hops (*Humulus lupulus* L.) ». *Journal of the Institute of Brewing*. 1976. Vol. 82, n°1, p. 41-45. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1976.tb03720.x>
- Van Tienderen P. H., De Haan A. A., Van der Linden C. G., Vosman B. « Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits ». *Trends in Ecology & Evolution*. 2002. Vol. 17, n°12, p. 577-582. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02624-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02624-1)
- Tofana M., Socaci S., Socaciu C., Mihaiescu D., Semeniuc C., Truta D. « Optimization of HS/GC-MS method for the determination of volatile compounds from some indigenous hop varieties ». *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*. 2009. Vol. 66, p. 500-505
- Trefilová M., Nesvadba V., Charvátová J. « Evaluation of resistance to *Pseudoperonospora humuli* and of the content of alpha acids and hop oils in hops of selected genetic resources of hop *Humulus lupulus* L. ». *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2021. <https://doi.org/10.17221/70/2021-CJGPB>
- Triba M., Moyec L. L., Amathieu R., Goossens C., Bouchemal N., Nahon P., N. Rutledge D., Savarin P. « PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters ». *Molecular BioSystems*. 2015. Vol. 11, n°1, p. 13-19. <https://doi.org/10.1039/C4MB00414K>
- Trygg J., Holmes E., Lundstedt T. « Chemometrics in metabonomics ». *Journal of Proteome Research* 2007. Vol. 6, n°2, p. 469-479. <https://doi.org/10.1021/pr060594q>
- Trygg J., Wold S. « Orthogonal projections to latent structures (O-PLS) ». *Journal of Chemometrics*. 2002. Vol. 16, n°3, p. 119-128. <https://doi.org/10.1002/cem.695>
- Tsurumaru Y., Sasaki K., Miyawaki T., Uto Y., Momma T., Umemoto N., Momose M., Yazaki K. « HIPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops ». *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012. Vol. 417, n°1, p. 393-398. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.125>
- Uemoto M., Takoi K., Tanigawa A., Takazumi K., Ogushi K., Koie K., Suda N. « Effect of “Late Harvest” of Hops (*Humulus lupulus* L.) on the Contents of Volatile Thiols in Furano Beauty, Furano Magical, and Cascade Varieties ». *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2022. Vol. 70, n°2, p. 607-614. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c08210>
- Undas A. K., Weihrauch F., Lutz A., Van Tol R., Delatte T., Verstappen F., Bouwmeester H. « The use of metabolomics to elucidate resistance markers against damson-hop aphid ». *Journal of Chemical Ecology*. 2018. Vol. 44, n°7, p. 711-726. DOI 10.1007/s10886-018-0980-y
- UPOV. *International Union for the Protection of New Varieties of Plants: Hop. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability*. 2006.
- Urquhart A., Kimpton C. P., Downes T. J., Gill P. « Variation in short tandem repeat sequences—a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers ». *International Journal of Legal Medicine*. 1994. Vol. 107, n°1, p. 13-20. <https://doi.org/10.1007/BF01247268>
- Van Holle A., Landschoot A. V., Roldán-Ruiz I., Naudts D., Keukeleire D. D. « The brewing value of Amarillo hops (*Humulus lupulus* L.) grown in northwestern USA: A preliminary study of terroir significance ». *Journal of the Institute of Brewing*. 2017. Vol. 123, n°3, p. 312-318. <https://doi.org/10.1002/jib.433>

- Van Holle A., Muylle H., Ruttink T., Van Landschoot A., Haesaert G., Naudts D., De Keukeleire D., Roldán-Ruiz I. « Single Nucleotide Polymorphisms and biochemical markers as complementary tools to characterize hops (*Humulus lupulus* L.) in Brewing Practice ». *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2019. Vol. 67, n°13, p. 3761-3771. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00816>
- Van Opstaele F., De Causmaecker B., Aerts G., De Cooman L. « Characterization of Novel Varietal Floral Hop Aromas by Headspace Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry/Olfactometry ». *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2012. Vol. 60, n°50, p. 12270-12281. DOI 10.1021/jf304421d
- Vázquez-Araújo L., Rodríguez-Solana R., Cortés-Diéguez S. M., Domínguez J. M. « Use of hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction to characterize the volatile composition of different hop cultivars ». *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2013. Vol. 93, n°10, p. 2568-2574. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6078>
- Veitch N., Smith M., Barnes J., Anderson L., Phillipson D. « Hops ». In : Baxter I (Ed) *Herbal Medicines*. Pharmaceutical Press. 2012. 952 p. ISBN 0857110357, 9780857110350
- De Villiers A., Lestremau F., Szucs R., Gélébart S., David F., Sandra P. « Evaluation of ultra performance liquid chromatography ». *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1127, n°1-2, p. 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.071>
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T. Van de, Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M., Zabeau M. « AFLP: a new technique for DNA fingerprinting ». *Nucleic Acids Research*. 1995. Vol. 23, n°21, p. 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Wang G., Tian L., Aziz N., Broun P., Dai X., He J., King A., Zhao P. X., Dixon R. A. « Terpene Biosynthesis in Glandular Trichomes of Hop ». *Plant Physiology*. 2008. Vol. 148, n°3, p. 1254-1266. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125187>
- Ward J. H. « Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function ». *Journal of the American Statistical Association*. 1963. Vol. 58, n°301, p. 236-244. <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>
- Waterlot C., Hechelski M. « Benefits of Ryegrass on Multicontaminated Soils Part 1: Effects of Fertilizers on Bioavailability and Accumulation of Metals ». *Sustainability*. 2019. Vol. 11, n°18, p. 5093. <https://doi.org/10.3390/su11185093>
- Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. « DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers ». *Nucleic Acids Research*. 1990. Vol. 18, n°22, p. 6531-6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
- Weihrauch F., « Evaluation of a damage threshold for two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), in hop culture ». *Annals of Applied Biology*. 2005. Vol n°146, p.146:501– 509. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.040163.x>
- World Flora Online (WFO) [en ligne]. 2021. Disponible sur : < <http://www.worldfloraonline.org> > (consulté le 19 juillet 2021).
- Wright S. « Isolation by Distance ». *Genetics*. 1943. Vol. 28, n°2, p. 114-138.
- Wright S. « Genetical structure of populations ». *Nature*. 1950. Vol. 166, n°4215, p. 247-249. <https://doi.org/10.1038/166247a0>
- Yeh F. C., Yang R., Boyle T., Ye Z. H., Mao J. *POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetics Analysis*. 2000.
- Zanolli P., Zavatti M. « Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. ». *Journal of Ethnopharmacology* 2008. Vol. 116, n°3, p. 383-396. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>

La Coopounord, coopérative des planteurs de houblon des Flandres [en ligne]. Ausha. 2020. Disponible sur : < <https://podcast.ausha.co/podcapsuleur/coopounord> > (consulté le 24 août 2020).

ANNEXES

Annexe 1. Diagramme de GANTT de ces trois années de thèse

Annexe 2. Principales caractéristiques agronomiques des variétés de houblon cultivées en région

Annexe 3. Illustrations des collectes des accessions sauvages en *in-situ*

Annexe 4. Récépissé n°284 autorisant la collecte des accessions sauvages

Annexe 5. Glossaire des termes utilisés en génétique des populations

Annexe 5. Principe de fonctionnement de la chromatographie par partage centrifuge (CPC)

Annexe 6. Entraînement et performances du panel sensoriel

Annexe 7. Descripteurs en analyse sensorielle

Annexe 8. Questionnaire de l'analyse de filière à destination des brasseurs

ANNEXE 1. DIAGRAMME DE GANTT DE CES TROIS ANNEES DE THESE

Première année :

	oct-19	nov-19	déc-19	janv-20	févr-20	mars-20	avr-20	mai-20	juin-20	juil-20	août-20	sept-20
Collectes	Séchage Broyage											
Génétique		Essais préliminaires										
Phytochimie <i>in situ</i>												
Composés volatiles												
Quantification					Purification standards				Purification		MeP méthode	Analyses
Non ciblé												Realcat
Publi Jacquin et al.		Manip fractionnement bioguidé										
Rédaction												
Revue							Premier jet					
CSI / Manuscrit												CSI1
Formations		MOOC Intégrité scientifique		Biologie moléculaire		MOOC Chimométrie						

Deuxième année :

	oct-20	nov-20	déc-20	janv-21	févr-21	mars-21	avr-21	mai-21	juin-21	juil-21	août-21	sept-21
Collectes & morpho							Phénotypages				Collectes	
Génétique			Tests				Collectes	Mise au point de protocole				
Phytochimie <i>in situ</i>												
Composés volatiles		Tests ISA			Analyses Gembloux	Ttt données						
Non ciblé	Ttt données											
Phytochimie <i>in situ</i>												
Composés volatils												Analyses
Analyses de sol									Analyses 1			
Rédaction												
Revue							Finalisation pour soumission					Soumission
CSI / Manuscrit		CSI 1										CSI2
Communications orales	Méta SP		FB2NP				CNPD		STOLON Reims			
Formations								Challenge Doc'				

Troisième année :

	oct-21	nov-21	déc-21	janv-22	févr-22	mars-22	avr-22	mai-22	juin-22	juil-22	août-22	
Génétique	Amplifications		Séquençage	Analyse des résultats								
Phytochimie <i>in situ</i>												
Composés volatiles									Ttt données			
Quantification				Purification								
					MeP méthode							
					Analyses					Ttt données		
Non ciblé					Amiens							
Analyses de sol						Analyses 2						
Analyses sensorielles			Formation du panel			Dégustations		Analyse des résultats				
Analyses SBSE								Analyse des résultats				
Analyses de filière			Enquêtes			Analyse des résultats						
Rédaction												
Revue	Soumission 2											
Article 1 (étude I)		Matériel et méthodes				Résultats	Discussion		Soumission			
Article 2 (étude III)								Rédaction				
CSI / Manuscrit		CSI 2						Manuscrit				
Communications orales							PSE Crète		AFERP			
Enseignement				TD Physiologie végétale (L1), 30 heures								

MeP : Mise en place ; Ttt : traitement

ANNEXE 2. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES AGRONOMIQUES DES VARIETES DE HOUBLON CULTIVEES EN REGION



Variétés de Houblon cultivées par la COOPHOUNORD

(Coopérative des houblonniers du Nord)

	Variété	Target	Nugget	Challenger	Magnum	Golding (east kent)	Brewers Gold	Strisselspalt	Cascade	Northern Brewer	Fuggie
Caractéristiques	Origine	UK - 1992	USA	UK - 1972	Allemagne	UK - 1790	UK	Allemagne / France	US	UK/US	US
	Utilisation	Mixte	Américain	Mixte	Américain	Aromatique	Américain	Aromatique	Mixte	Mixte	Aromatique
Productivité et qualité	Rendement moyen 10ans (Indice % base 100 Target)	100	91	76	79	93	113	95	84	74	86
	% alpha	11	9	7	13	5	6	3	4	7	5
Conduite culturale	précocité taille	précoce	tardif	précoce	intermédiaire	précoce	tardif	précoce	intermédiaire	précoce	tardif
	précocité récolte	intermédiaire	tardif	précoce	intermédiaire	précoce	tardif	tardif	tardif	précoce	précoce
Tolérance aux bio-agresseurs	mildiou	sensible	sensible	tolérant	tolérant	sensible	intermédiaire	sensible	très tolérant	tolérant	tolérant
	oidium	tolérant	tolérant	sensible	sensible sur cone	tolérant	tolérant	sensible	tolérant	sensible	intermédiaire
	verticillium	tolérant	tolérant	sensible	tolérant	tolérant	sensible	tolérant	tolérant	tolérant	sensible
	puceons	intermédiaire	intermédiaire	intermédiaire	sensible	intermédiaire	très sensible	sensible	sensible	intermédiaire	intermédiaire
Autres critères	remarques (conduite, récolte)	Mauvaise tenue sur fil	Récolte et séchage difficile souvent dû sa tardivité	Sensible aux stress thermiques, récolte difficile	séchage long et gras	Sensible au stress thermique et au virus de la mosaïque	Volumineux, sensible pucerons	sensible maladies, conduite délicate.	bonne tenue étege, très volontaire et tolérant aux maladies	faible vigueur	récolte difficile
	Conservation	délicate	bonne	bonne	bonne	bonne	bonne	bonne	délicate	bonne	bonne



Mise à jour juillet 2022.
Contact Chambre d'Agriculture : Aurélien HONORE aurelien.honore@npdc.chambagri.fr

ANNEXE 3. ILLUSTRATIONS DES COLLECTES DES ACCESSIONS SAUVAGES EN *IN-SITU*¹⁰

Accession A5, Pré des Nonettes, Marchiennes (59) :



Accession B1, Tourbière de Vred, Vred (59) :



¹⁰ Photos réalisées par les Drs C. Rivière et G. Lefèvre lors des collectes réalisées en septembre 2019.

Accession D4, Plage de Tardingham, PNR Caps et Marais d'Opale, Tardingham (62) :



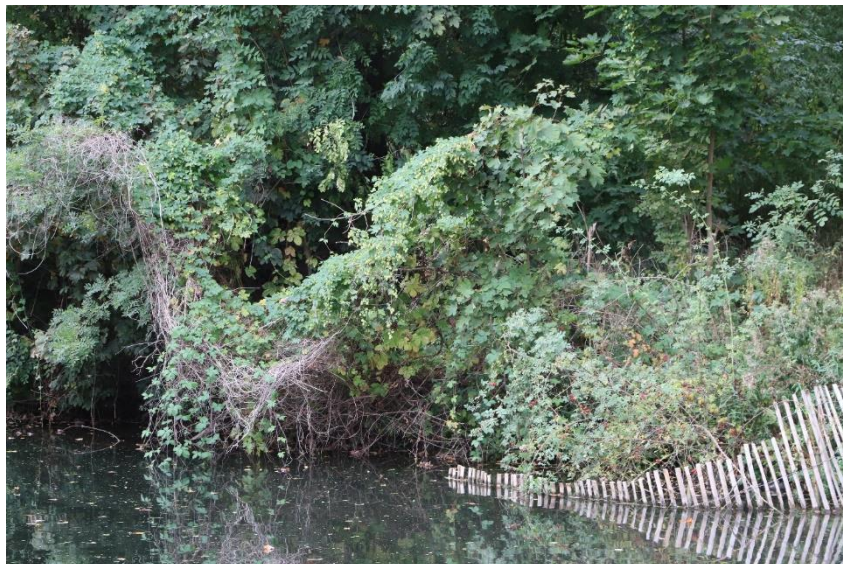
Accession E2, PNR Caps et Marais d'Opale, Marquise (62) :



Accession H4, Flandres, Métieren (59) :



Accession J1, Douves de la Citadelle de Lille, Lille (59) :



Accession K1, Dunes d'Ecault, Saint-Étienne-au-Mont (62) :



ANNEXE 4. RECEPISSE N°284 AUTORISANT LA COLLECTE DES ACCESSIONS SAUVAGES

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Ministère de la transition écologique et
solidaire

Décision du **09 JUIN 2020**

portant récépissé de déclaration pour l'accès aux ressources génétiques sur le territoire national et le partage des avantages découlant de leur utilisation – Université de Lille

NOR : TREL2002508S / 284

La ministre de la transition écologique et solidaire,

Vu la convention sur la diversité biologique (ensemble deux annexes), adoptée à Rio de Janeiro le 22 mai 1992 et signée par la France le 13 juin 1992 ;

Vu le protocole sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation relatif à la convention sur la diversité biologique (ensemble une annexe), adopté à Nagoya le 29 octobre 2010 et signé par la France le 20 septembre 2011 ;

Vu le règlement (UE) n° 511/2014 du Parlement européen et du Conseil du 16 avril 2014 relatif aux mesures concernant le respect par les utilisateurs dans l'Union du protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation ;

Vu le code de l'environnement, notamment ses articles L. 412-3 à L. 412-7 et R. 412-12 à R. 412-15 ;

Vu le dossier de déclaration reçu le 19 août 2019, présenté par : Université de Lille,

Décide :

Article 1^{er}

Il est donné récépissé à :

*Université de Lille
42 rue Paul Duez
59800 Lille*

de la déclaration présentée conformément à l'article L. 412-7 du code de l'environnement en vue de la réalisation des activités suivantes :

Etude sur la diversité chimique et génétique des houblons sauvages des Hauts-de-France

Ces activités pourront entraîner l'accès aux ressources génétiques des espèces suivantes :

Humulus lupulus L.

Article 2

L'origine des spécimens utilisés pour la réalisation des activités décrites à l'article 1^{er} sera la suivante :

Aisne, Nord, Oise, Pas-de-Calais, Somme

Les modalités techniques d'accès aux ressources génétiques et le calendrier prévisionnel de réalisation des activités seront celles décrites dans le dossier de déclaration susvisé.

Article 3

En vue d'assurer un partage juste et équitable des avantages découlant de l'utilisation décrite à l'article 1^{er}, le déclarant mettra en œuvre les actions suivantes :

Publications scientifiques ; mise en place d'une houblonnière expérimentale en lien avec le lycée agricole de Douai ; présentations grand public

Article 4

Un changement d'utilisation non prévu dans la déclaration requiert une demande d'autorisation ou une nouvelle déclaration.

Article 5

Le présent récépissé est délivré sous réserve des droits des tiers.

Article 6

Un résumé de la présente décision sera publié au *Bulletin officiel* du ministère de la transition écologique et solidaire, après occultation ou disjonction des informations confidentielles suivantes :

Néant

Fait le **09 JUIN 2020**

La ministre de la transition écologique et solidaire,

Pour la ministre et par délégation :



Pour le Ministre et par délégation,

Par empêchement du directeur de l'eau et de la biodiversité,

Le sous-directeur de la protection et de la
restauration des écosystèmes terrestres

Matthieu PAPQUIN

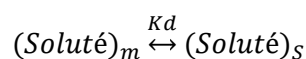
La présente décision peut faire l'objet, dans un délai de deux mois à compter de sa notification :

- d'un recours gracieux auprès de la ministre de la transition écologique et solidaire (direction de l'eau et de la biodiversité) – Tour Séquoia – 1, place Carpeaux – 92055 La Défense ;
- d'un recours contentieux auprès du tribunal administratif.

NOR : TREL2002508S / 284

ANNEXE 5. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA CHROMATOGRAPHIE PAR PARTAGE CENTRIFUGE (CPC)

Au cours de ce projet, les standards utilisés pour la quantification (XN, acides α et acides β) ont été purifiés par chromatographie partage centrifuge (CPC) sur le sous-extrait organique (**Partie expérimentale 5.2.2.3**). Cette technique de chromatographie liquide/liquide permet de séparer les molécules d'intérêt en fonction de leur affinité entre deux phases non miscibles et de densités différentes. Les composés d'intérêt présentent une certaine solubilité dans chacune des phases liquides. Cet équilibre est régi par une constante thermodynamique, appelée coefficient de partage K_d , correspondant au rapport des activités chimiques du soluté dans les deux phases :



$$K_d = \frac{a_s}{a_m} = \frac{S_s}{S_m}$$

Avec K_d : coefficient de partage ; a_s (a_m) l'activité chimique dans la phase stationnaire (dans la phase mobile), S_s (S_m) la solubilité du composé dans la phase stationnaire (dans la phase mobile).

Il est recommandé d'avoir un K_d proche de 1 pour une séparation optimale des composés¹¹.

La CPC est composée de cellules reliées entre elles par des canaux et mises en rotation par le rotor (**Figure i**).

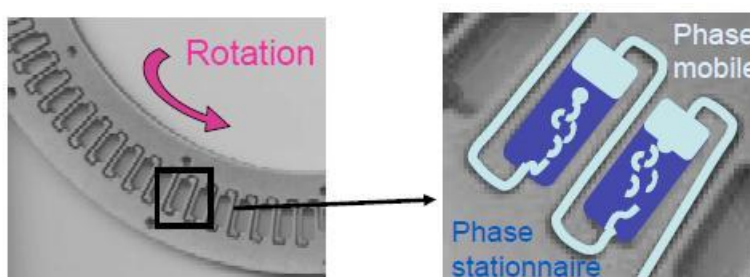


Figure i. Schématisation d'un rotor de CPC montrant les cellules reliées les unes aux autres et contenant les deux phases du système, d'après Bocquet 2018.

Les échanges entre les phases n'ont lieu qu'au sein des cellules et la phase mobile est transférée d'une cellule à une autre par les canaux. La phase stationnaire est soumise à une faible pression maintenue en place grâce à la force centrifuge. La CPC est préalablement remplie de phase stationnaire et mise en rotation à la vitesse nécessaire permettant d'obtenir le champ centrifuge souhaité. La phase mobile est ensuite introduite *via* une pompe. Son entrée expulse une certaine quantité de phase

¹¹ Faure, K. 2016. « Chromatographie de partage centrifuge - Principes et applications ». *Techniques de l'ingénieur*, 17.

stationnaire, jusqu'à l'équilibre entre les deux phases. La colonne ainsi équilibrée, l'échantillon peut être injecté. Le choix du système de solvant est crucial, puisqu'il doit permettre la meilleure séparation possible des composés entre les deux phases. Plusieurs combinaisons de phases peuvent être utilisées. Les systèmes ARIZONA, une combinaison des solvants heptane, acétate d'éthyle, méthanol et eau en différentes proportions sont les plus couramment utilisés dans la séparation de produits d'origine naturelle. Dans le cadre de notre étude, le système ARIZONA P a été sélectionné d'après les travaux antérieurs de Bocquet (2018)¹. Pour ce système, le coefficient de partage K_d du XN est égal à 0,7.

Différents modes peuvent être utilisés en CPC :

- l'élution isocratique permet d'éluer les composés avec une phase mobile de nature constante hors de la colonne remplie de la phase stationnaire également de nature constante. L'élution isocratique peut se faire en mode ascendant ou descendant. En mode descendant, la phase mobile est la phase inférieure, mise en mouvement au sein de la phase supérieure dans le même sens que la force centrifuge. En mode ascendant, la phase mobile est la phase supérieure, introduite dans la phase inférieure à contre-sens de la force centrifuge
- le mode gradient permet de diminuer la durée d'analyse tout en conservant la sélectivité, en augmentant la force éluante de la phase mobile. Ce mode reste peu utilisé en CPC car il implique que la nature de la phase stationnaire ne soit pas affectée par la modification de la composition en phase mobile, ce qui est difficilement réalisable en raison des équilibres liquide/liquide qui s'établissent à tout moment dans la colonne
- le mode élution/extrusion permet d'accélérer l'élution des composés fortement retenus sur la phase stationnaire. Tout commence par une élution isocratique ; l'extrusion consiste ensuite à introduire la « phase stationnaire » en tête de colonne, tout en conservant le champ centrifuge. La phase mobile continue de sortir de la colonne et entraîne les composés les moins fixés. L'extrusion est complète une fois que la colonne est remplie par la phase stationnaire. Un volume de colonne suffit alors à éluer les composés hors de la colonne, ils conservent leur temps d'élution.

CPC permet donc d'injecter une grande quantité d'extrait (1 à plusieurs grammes selon la capacité du rotor) sans perdre d'échantillons, puisqu'il n'y a pas de risque d'adsorption non réversible sur la phase stationnaire. Les composés avec une rétention trop forte peuvent par ailleurs être extrudés par la phase stationnaire¹².

¹² Marchal L., Legrand J., Foucault A. 2003. « Centrifugal Partition Chromatography: A Survey of Its History, and Our Recent Advances in the Field ». *The Chemical Record*. Vol n°4, p. 133-143.

ANNEXE 6. ENTRAÎNEMENT ET PERFORMANCES DU PANEL SENSORIEL

Entraînement du panel

1. Objectif

Il existe une grande variabilité entre les dégustateurs :

- au niveau du vocabulaire. Un même stimulus peut être décrit par différents termes selon les dégustateurs ;
- au niveau de la sensibilité. Pour une même concentration, différents dégustateurs vont percevoir des intensités différentes (seuils de détection et de reconnaissance) ;
- au niveau de l'utilisation de l'échelle de mesure

L'objectif de cet entraînement est donc d'aligner gustativement et qualitativement les dégustateurs. Il va permettre de familiariser les dégustateurs avec le vocabulaire, de mémoriser les saveurs, les odeurs, les arômes, les caractéristiques, et également de s'étalonner sur des gammes de concentrations connues pour juger les intensités. C'est une étape primordiale car il permet d'accroître les capacités de discrimination du panel, ainsi que la répétabilité et l'accord entre les sujets. Il est donc nécessaire de travailler avec les descripteurs retenus précédemment pour caractériser les différentes bières.

2. Matériel et méthodes

2.1. Organisation des séances

Le recrutement des sujets a été réalisé au sein de JUNIA (écoles ISA, HEI et ISEN). Une vingtaine de personnes ont été retenues sur la base de leur motivation et de leur éventuelles allergies alimentaires. Les sujets ont participé à 12 séances hebdomadaires d'entraînement d'une heure, afin de s'entraîner sur les différents descripteurs grâce à différents tests sensoriels. Cet entraînement permet une amélioration dans leur capacité à détecter, reconnaître et mémoriser des textures, des odeurs, des saveurs et des arômes caractéristiques. Les échantillons sont dégustés en carré latin afin que chaque panéliste ait un ordre de présentation des échantillons différent.

2.2. Épreuves

Différents tests ont été effectués sur les différents descripteurs sur lesquels le panel a été entraîné (**Tableau i**) :

Tableau i. Descripteurs sur lesquels le panel a été formé et type de test utilisé pour l'entraînement.

Descripteur travaillé	Type de test, description	Type d'analyse
Amertume	Classement : les panélistes indiquent la bière la plus persistante en amertume.	<i>Test de Friedman /Fewman-Keuls</i>
Malt	Classement : les panélistes classent les échantillons du moins malté au plus malté	<i>Test de Friedman /Fewman-Keuls / Page</i>
Houblon	Classement : les panélistes classent les échantillons du moins houblonné au plus houblonné.	<i>Test de Friedman /Fewman-Keuls /Page</i>
Odeur fruité/floral	Catégorisation : les panélistes s'entraînent sur la perception du fruité et du floral ; ils doivent relier une bière à une odeur ou à un goût	<i>En pourcentage de bonnes réponses</i>
Astringence	Classement : les panélistes classent les échantillons du moins astringent au plus astringent	<i>Test de Friedman /Fewman-Keuls / Page</i>
Acide	Classement : les panélistes classent les échantillons du moins acide au plus acide	<i>Test de Friedman /Fewman-Keuls / Page</i>
Tous	Profil : pour chaque échantillon, les panélistes évaluent l'ensemble des descripteurs (odeur fruitée, odeur malt, odeur de houblon, intensité goût, fruité, floral, houblon, malt, amer et sucré, astringent, persistance amère).	<i>Box plot</i>

- **Test de classement.** Ce test permet de classer des produits les uns par rapport aux autres, en fonction d'une caractéristique sensorielle donnée (**Tableau ii**). Les produits sont présentés simultanément aux panélistes qui doivent leur attribuer un rang sur différents critères proposés. Le traitement des réponses s'effectue à l'aide du test de Friedman (NF ISO 8587), à partir de la somme des rangs obtenue par chaque produit.

Tableau ii. Protocoles de préparation des échantillons pour les tests de classement.

Descripteur	Préparation de l'échantillon	Gradient de concentration
Amertume	Bière amère (Pilsner Urquell) ajoutée à de la Kronenbourg en proportions variables	0, ¼, ½, ¾, 1 (v/v)
Malt	Solution de malt ajoutée à de la Kronenbourg Ou Bière maltée (Jade sans gluten) ajoutée à de la Kronenbourg en proportions variables	0, ¼, ½, ¾, 1 (v/v)
Houblon	Solution de houblon (infusion) ajoutée à de la Kronenbourg en proportions variables	0, ¼, ½, ¾, 1 (v/v) Puis 0, ¹ / ₁₀ , ² / ₁₀ , ³ / ₁₀ (v/v)
Acide	Acide citrique dilué dans de la Kronenbourg	0 / 0,075 / 0,15 / 0,3 mg/L
Astringence	Sulfate alun + potassium dilués dans de la Kronenbourg	0 / 50 /100 / 150 mg/L

- **Test de catégorisation.** Le test de catégorisation est basé sur une évaluation globale des produits, en regroupant les produits selon leurs ressemblances. Par exemple, les panélistes doivent classer 3 bières dans la catégorie soit fruitée ou florale selon leur ressenti. Par la suite, on exprime le résultat en pourcentage par rapport à la majorité de réponse.
- **Test de profil complet.** Les panélistes sont invités à évaluer des bières du commerce avec le questionnaire utilisé pour l'évaluation des bières du projet houblon. Ceci permet de se familiariser avec le questionnaire, de s'assurer qu'ils comprennent bien tous les descripteurs (préalablement introduits au cours des séances de dégustation) et qu'ils savent utiliser les échelles. Ainsi, ce test permet d'entraîner le panel à analyser les bières sur les descripteurs : odeur fruitée, odeur malt, odeur houblon, intensité goût, fruité, floral, houblon, malt, amer et sucré. Pour chaque échantillon, les panélistes évaluent l'ensemble des descripteurs.

Ces tests ont été retravaillés plusieurs fois afin que le panel soit le plus compétent possible.

3. Résultats

3.1. Test de classement

Le **Tableau iii** indique les résultats des tests de Friedman/Fewman-Keuls réalisés sur le classement des différents échantillons tests dégustés lors des tests de classement pour la formation du panel.

Tableau iii. Résultats des tests de classement pour les différents descripteurs.

*** L'ordre réel a été significativement trouvé par les sujets au seuil de 1 %.*

Descripteur	Gradient de concentrations	% de classement correct
Amertume	0 ; ¼ ; ½ ; ¾ ; 1 (v/v)	48,4% **
Malt	0 ; ¼ ; ½ ; ¾ ; 1 (v/v)	41,7 %, 43,8 % **
Houblon	0 ; ¼ ; ½ ; ¾ ; 1 (v/v) Puis 0 ; 1/10 ; 2/10 ; 3/10 (v/v)	41,1 % **, 54,1 % **, 51,5 % **
Acide	0 ; 0,075 ; 0,15 ; 0,3 mg/L	54,7 % **, 50 % **
Astringence	0 ; 50 ; 100 ; 150 mg/L	23,4%, 22,1 %

Le panel est performant et constant sur le descripteur houblon au cours des différents entraînements réalisés (41,1 %, 54,1 %, 51,5 %). Sur le descripteur malt, le panel a une moyenne de 43,8%, et est globalement en progrès et performant. Les tests sur l'astringence révèlent en revanche des difficultés du panel sur ce descripteur (23,4% et 22,1%). Les panélistes restent sur une moyenne constante pour le descripteur d'acidité avec un pourcentage de bonnes réponses de 54,7% et 50%. Les panélistes font bien la distinction entre les différentes intensités pour les différents descripteurs, sauf pour l'astringence. Les panélistes sont en difficultés sur ce descripteur qui est une sensation à ressentir en bouche difficile à assimiler en bouche.

3.2. Profil complet

Les résultats des tests de classement pour les différents descripteurs sont présentés dans le **Tableau iv.**

Tableau iv. Résultats des tests de classement pour les différents descripteurs.

* : différence significative au seuil de 5% ; ** : différence significative au seuil de 1%.

	Intensité Odeur	Odeur Fruitée	Odeur Houblon	Odeur Maltée	Intensité Goût	Fruité	Floral	Houblon	Malt	Acide	Amer	Sucré	Astringent	Persistanc e Amère
Séance 1 : Ch'ti/ Leffe														
Ch'ti	6,200 ^a	5,913 ^a	6,600 ^a	3,494 ^a	7,738 ^a	4,344 ^a	6,538 ^a	7,706 ^a	3,563 ^b	2,900 ^a	7,463 ^a	3,413 ^a	4,969 ^a	6,988 ^a
Leffe	5,463 ^a	4,031 ^a	4,919 ^b	4,838 ^a	7,044 ^a	3,694 ^a	4,138 ^b	5,631 ^b	6,006 ^a	4,150 ^a	6,213 ^a	4,431 ^a	3,619 ^a	5,038 ^b
Pr >F (Modèle)	0,292	0,071	0,04 *	0,123	0,209	0,548	0,011 *	0,008 **	0,002 **	0,139	0,089	0,315	0,117	0,028 **
Séance 2 : Goudale / Rince Cochon														
Goudale	5,709 ^a	4,082 ^a	3,845 ^a	4,764 ^a	5,145 ^a	3,918 ^a	3,891 ^a	5,200 ^a	5,036 ^a	4,709 ^a	5,500 ^a	4,509 ^a	4,100 ^a	5,264 ^a
Rince- Cochon	4,009 ^a	2,164 ^a	3,436 ^a	5,882 ^a	5,909 ^a	2,491 ^a	4,282 ^a	4,336 ^a	5,691 ^a	4,045 ^a	5,400 ^a	3,636 ^a	4,000 ^a	6,000 ^a
Pr >F (Modèle)	0,107	0,080	0,704	0,252	0,536	0,155	0,683	0,417	0,481	0,463	0,926	0,365	0,912	0,510
Séance 3 : 3 monts / Jade pur malt														
3 monts	4,806 ^a	3,176 ^a	3,888 ^a	4,600 ^a	7,276 ^a	3,288 ^a	3,994 ^a	4,376 ^a	4,812 ^a	4,518 ^a	7,141 ^a	4,118 ^a	6,318 ^a	5,675 ^a
Jade pur malt	4,153 ^a	4,041 ^a	2,935 ^a	3,759 ^a	4,882 ^a	3,771 ^a	3,700 ^a	3,535 ^a	4,491 ^a	3,724 ^a	3,212 ^a	5,071 ^a	3,276 ^b	2,488 ^b
Pr >F (Modèle)	0,411	0,243	0,169	0,248	0,000 **	0,553	0,654	0,272	0,872	0,335	<0,00 01 **	0,263	<0,00 01 **	0,000 **

Le panel a discriminé les bières sur les descripteurs : odeur houblon, floral, houblon, malt et la persistance amère lors du premier test. Lors du deuxième test, il n'a discriminé aucun descripteur. Lors du troisième test, le panel a discriminé les bières sur les descripteurs : goût intensité, amertume, astringence et persistance amère.

Contrôle des performances

1. Objectif

Le contrôle de performance permet de valider la qualité du panel à la fin de l'entraînement et repose sur trois concepts :

(i) la **répétabilité** : résultat très proche en réponse à un même stimulus. Un juge doit donner une même note pour l'appréciation d'un même produit ;

(ii) la **discrimination** : aptitude à détecter des différences sensorielles entre deux produits. Un juge doit donner des notes différentes à des produits différents ;

(iii) l'**accord entre les panélistes** : homogénéité des réponses obtenues pour le même stimulus par les mêmes dégustateurs. Un juge doit trouver la même différence sur un produit que les autres juges.

Lors de l'analyse de performance, la note attribuée à un descripteur doit refléter l'intensité de la sensation dans le produit de manière la plus exacte possible. Cependant, on ne peut pas avoir une intensité « exacte ». En effet, la mesure de l'intensité d'un descripteur dépend du produit testé mais aussi des capacités sensorielles de panélistes qui s'avèrent être différents. Ceci serait dû à un nombre de récepteurs sensoriels différent selon chaque individu¹³. C'est pourquoi, lors des entraînements, la présentation de référence pour chaque descripteur permet de calibrer la notation du panel.

2. Matériel et méthodes

2.1. Produits

7 produits, avec répétitions sont présentés au panel lors de deux séances de contrôle de performance (Séance 1 : Goudale IPA, Brewdog puk IPA et La chouffe, séance 2 : Leffe, Fisher, 1664 Blanche et Anostéké IPA). Les échantillons ont été choisis afin de retrouver un maximum de descripteurs présents sur notre liste finale de descripteurs (**Annexe 7**).

2.2. Procédure

Des analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLStat (Addinsoft, Paris, France) afin de rendre compte des performances du panel.

(i) ANOVA à trois facteurs.

- **Discrimination.** Le pouvoir discriminant se traduit comme la capacité à détecter une différence d'intensité entre plusieurs échantillons pour un descripteur donné. L'effet produit (F_{produit}) indique si les moyennes des notes des produits sont différentes ou non. Si l'effet est significatif,

¹³ Prutkin J, Duffy VB, Etter L, et al (2000) Genetic variation and inferences about perceived taste intensity in mice and men. *Physiology & Behavior* 69:161–173. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00199-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00199-2).

le panel sera déclaré comme discriminant pour ce descripteur. S'il ne l'est pas, le panel doit être réentraîné sur ce descripteur. Un test de Tukey est réalisé afin de déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes.

- **Consensus.** Le consensus correspond au degré de ressemblance qui existe entre les notations des sujets pour différents produits. Malgré l'entraînement, les juges n'utilisent pas toutes les échelles de la même manière. Un étalement différent et un niveau moyen de notation ne doivent pas être considérés comme des sources de désaccord (**Figure i**).

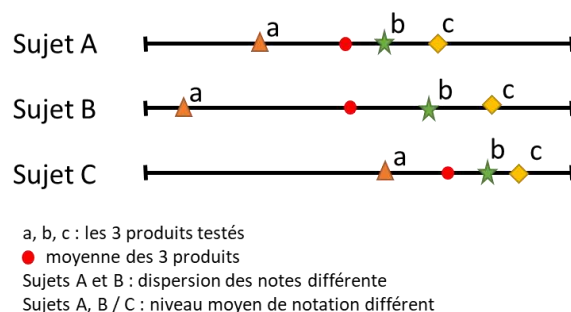


Figure i. Exemple de différences d'utilisation d'échelle de notation des produits pour un descripteur.

Un effet sujet significatif indique que le niveau moyen de notation sur l'échelle n'est pas homogène entre les sujets. En pratique, cet effet est souvent significatif, mais n'apporte pas de réelle information sur la performance des panélistes. Ici, on regarde le plus souvent l'interaction produit/juge ($F_{\text{produit/juge}}$). Cette dernière doit être non significative. Si ce n'est pas le cas, cela implique que les sujets ne perçoivent pas les mêmes différences entre les produits.

Afin d'obtenir une représentation des différences de notation, il est possible d'effectuer une ACP pour chaque descripteur, permettant d'identifier si les juges sont en réel désaccord ou s'il s'agit d'un effet de *scaling*. Plus les vecteurs suivent la même direction, plus les sujets ont noté les produits de la même façon. Plus le vecteur est long, plus le sujet est discriminant.

- **La répétabilité.** Un même produit est présenté au panel deux fois afin d'évaluer la répétabilité du panel. Pour cela les mesures devaient être les plus proches possibles les unes des autres, c'est-à-dire que l'interaction $F_{\text{interaction produit / répétition}}$ pour chaque descripteur devait être non significative. En cas de significativité, le panel est considéré comme non répétable et doit alors être réentraîné.

(ii) ANOVA à deux facteurs avec interactions pour juger la performance de chaque panéliste. Cette analyse à chaque panéliste permet d'avoir un retour personnel sur leur performance :

- **Discrimination :** F_{produit} pour chaque descripteur (doit être significatif) ;
- **Répétabilité :** $F_{\text{interaction/répétition}}$ pour chaque descripteur (doit être non-significatif).

Si ce n'est pas le cas, on peut soit réentraîner les juges non performants, soit enlever leurs données du profil (si manque de temps).

(iii) *ACP globale*. Cette ACP globale a pour but de synthétiser graphiquement l'ensemble des informations sur les deux axes principaux (CP1 et CP2), permettant ainsi d'examiner les relations entre variables corrélées, et de mettre en évidence les différences entre produits et les corrélations entre descripteurs au niveau du groupe.

3. Résultats

Le **tableau vi** présente les résultats de l'ANOVA à 3 facteurs du test de performance du panel.

*Tableau vi. Résultats de l'ANOVA à trois facteurs.
En gras, les p-value < 5%.*

Descripteur	O_fruitée	O_houblon	O_malt	Int_goût	Fruité	Floral	Houblon	Malt	Acide	Amer	Sucré	Astringent	Perst_amère
P produit	0,017	<0,0001	0,043	0,019	0,023	<0,0001	<0,0001	0,125	0,201	<0,0001	0,347	0,000	<0,0001
P répétition	0,378	0,947	0,134	0,904	0,588	0,962	0,155	0,716	0,567	0,662	0,315	0,423	0,939
P juges	0,015	<0,0001	0,008	0,057	<0,001	<0,0001	0,000	0,001	0,001	0,043	0,007	0,043	0,222
P produit*juge	0,068	0,003	0,891	0,430	0,002	0,002	0,003	0,102	0,565	0,013	0,846	0,075	0,187
P produit*répétition	0,205	0,077	0,279	0,583	0,132	0,256	0,155	0,881	0,953	0,964	0,655	0,882	0,908

3.1. Discrimination des produits

On observe un effet produit pour tous les descripteurs ($p < 0,05$) excepté les descripteurs « malt », « acide » et « sucré ». Ceci signifie que les panélistes différencient bien les produits en leur donnant des notes différentes selon les descripteurs (sauf pour les 3 descripteurs sus-mentionnés). Cependant, les goûts des échantillons étant difficiles à caractériser, il se peut que les produits aient tous un goût malté, sucré et acide, ce qui pourrait expliquer pourquoi le panel retrouve ces descripteurs dans les différents produits analysés.

3.2. Consensus

Concernant l'accord entre les juges, l'interaction produit*juge est significative pour 4 descripteurs sur 13. Cependant, une analyse de cette interaction par panéliste montre que le panel est homogène. La différence observée serait donc davantage due à un effet d'échelle.

3.3. Répétabilité

Enfin, pour l'ensemble des 13 descripteurs, la p-value de l'interaction produit*répétition est supérieure à 0,05. Ceci indique que le panel est répétable en présence d'un même produit, et qu'il n'y a pas de différence significative entre les notes d'un même produit. Cette interaction n'est donc pas significative, ce qui atteste de la répétabilité du panel.

ANNEXE 7. DESCRIPTEURS EN ANALYSE SENSORIELLE

Descripteurs	Définitions
Odeurs	
Intensité odeur	Degré d'intensité des composés odorants perçus en sentant.
Odeur malt	Odeur de céréale (maltée).
Odeur houblon	Odeur de houblon.
Odeur fruitée	Odeur de fruits perçue lors de l'olfaction de la bière : agrumes (orange, citron, pamplemousse, mandarine), fruits jaunes (banane, pomme, poire, pêche, ananas, mangue, ...), fruits rouges (fraise, framboise, cerise, cassis...).
En bouche	
Intensité goût	Degré d'intensité des saveurs et des arômes perçus en bouche.
Malt	Arômes de céréales (malt, blé, orge...) ou de produits dérivés du pain (biscotte, baguette...) perçus en bouche.
Houblon	Arômes de houblon perçu en bouche, qui peut être herbacé, floral et/ou fruité.
Agrume	Arômes d'orange, de citron, de pamplemousse ou de mandarine perçus en bouche.
Fruits jaunes	Arômes de banane, pomme, poire, pêche, ananas, mangue... perçus en bouche.
Fruits rouges	Arômes de fraise, framboise, cerise, cassis... perçus en bouche.
Floral	Arômes de fleurs (muguet, rose, lilas, lys, violette, jasmin, rose, géranium...) perçus en bouche.
Epicé	Arômes principalement de clou de girofle, peuvent également être cannelle, gingembre, poivre... dans des bières de Noël par exemple.
Amer	Qualifie une des 5 saveurs fondamentales. L'amertume est perçue principalement sur la langue. Exemple d'aliments amers : café, endive, chicorée.
Acide	Qualifie une des 5 saveurs fondamentales. L'acidité est perçue principalement sur la langue. Exemple d'aliments acides : citron, vinaigre, groseilles.
Sucré	Qualifie une des 5 saveurs fondamentales. Le sucré est perçu principalement sur la langue. Exemple d'aliments sucrés : sucre, bonbons, gâteaux, sodas.
Astringent	L'astringence est une sensation en bouche qui entraîne une sensation d'assèchement, sensation poudreuse ou rugueuse sur les dents. Exemple d'aliments astringents : thé noir très fort, vin rouge avec tanins, banane plantin.
Persistance amère	Intensité d'amertume après déglutition.

ANNEXE 8. QUESTIONNAIRE DE L'ANALYSE DE FILIERE A DESTINATION DES BRASSEURS

- Nom de la brasserie :
- Coordonnées du contact :
- Poste :
- Comment pouvez-vous présenter votre brasserie ?

1/ Vos produits aujourd'hui

- Quelles variétés utilisez-vous ? (récupérer à minima le tonnage global de chacune des variétés de houblons utilisées dans la production globale, et leur évolution)

Dénomination produit	Variété de houblon + origine de l'appro	Tonnage annuel houblon	Volume annuel actuel bière	Evolution volumes bière depuis 5 ans	Evolution volume bière présagée à 5 ans

- Vos fournisseurs actuels :

Variété de houblon	Fournisseur (s)	Fréquence de commande	Type de conditionnement	Tarif indicatif au Kg	Le « + » du fournisseur ?

- En fonction des réponses,
 - Pourquoi tel conditionnement ?
 - Avez-vous la possibilité de stocker chez vous ?
 - Quelle DLUO max ?
- Quels sont aujourd'hui vos principaux critères de choix pour un houblon ? (% alpha, mode de production, origine, fournisseur, impact environnemental, en particulier le bilan carbone du transport des houblons ?)
- Aujourd'hui avez-vous des difficultés particulières à vous fournir en houblon, en général ? Pourquoi ?

2/ Parlons du houblon « local »

- Dans un premier temps, pour vous, que signifie houblon « local » : régional, français, belge... ?
- À quoi associez-vous le houblon local (cher / qualité / rareté.) ? Pourquoi ?
- Si vous n'utilisez pas de houblon régional, pourquoi ?
- Comment qualifieriez-vous votre attente pour du houblon local = produit en région HDF ?

	Primordiale	Forte	Intéressante, mais pas nécessaire dans mon développement	Pas intéressante	Non concerné
Variété					

- Que vous apporte / vous apporterait l'utilisation de houblon régional ?
- Le critère "diminution de votre impact C" est-il un critère qui pourrait être intéressant pour vous ? (dans votre démarche, dans votre communication marketing)
- Connaissez-vous bien les variétés de houblon produites localement ? Les producteurs régionaux ?
- Avez-vous déjà testé les variétés produites en région dans vos bières ? Si non, pourquoi ?
- Qu'est-ce qui pourrait améliorer la connaissance/ l'utilisation des variétés locales par les brasseurs ? *événements /rencontre, publications/catalogue, site internet, tests brassage, données techniques...*

3/ Vos attentes produits

- Lors du développement de nouvelles recettes, comment récupérez-vous les informations sur les variétés de houblons existantes (nouvelles variétés, innovation, label...) ?
- Avez-vous des attentes particulières en termes de houblon régional ? (variété régionale ou IGP ? + intérêt pour eux ?) Ex : mode de production reconnue, typicité, teneur en acide alpha, bêta ; physiologie des cônes et sous quelle forme (pellets, broyés, entiers ; composés volatils, autres ?

4/ Le développement de la filière régionale

Le développement des surfaces en région implique de la visibilité pour les houblonniers, et donc des perspectives/engagements d'achat de la part des brasseurs.

- Qu'est-ce qui selon vous pourrait être mis en place pour développer la filière régionale ?
- Seriez-vous favorable à la contractualisation ? Si oui, sur quelle période ? (Donner un minimum réaliste et intéressant pour les producteurs)

Nous avons bien conscience qu'un engagement sur une telle durée n'est pas simple pour vous. La contractualisation de tous vos tonnages n'est pas réalisable.

- Sur quelle(s) variété(s) et dans quelle(s) proportion(s) seriez-vous certains de pouvoir vous engager (si pas le cas actuellement) ?
- Pourriez-vous envisager de co-investir dans des houblonnières pour faciliter l'installation de nouveaux producteurs ?
- Pourriez-vous envisager de payer un peu plus cher votre houblon pour constituer un fond pour favoriser l'installation de jeunes houblonniers ou le développement des houblonniers actuels ? (idée évoquée un temps par les brasseurs)
- Est-ce que la mise en place d'un label "houblon local", "houblon" du Nord"... pourrait avoir un intérêt (avec logo sur les produits finis)? Si oui, quelles valeurs devrait-il promouvoir? (critères à respecter)
- Est-ce que vous identifiez d'autres leviers pour développer la filière régionale ?

Valorisation de la diversité chimique et génétique du houblon sauvage de la région Hauts-de-France dans un objectif de développement variétal et d'applications agro-alimentaires et agricoles

Le houblon, *Humulus lupulus* L., est une plante de culture traditionnelle dans le Nord de la France. Les inflorescences femelles, nommées aussi cônes, sont utilisés en brasserie pour apporter amertume et arômes à la bière, ainsi que pour leurs propriétés antimicrobiennes. Ces propriétés sont étroitement liées à leur composition chimique originale. En particulier, le houblon produit des chalcones prénylées dont le xanthohumol et le desméthylxanthohumol, ainsi que des dérivés d'acylphloroglucinols avec les analogues de l'humulone (acides α) et les analogues de la lupulone (acides β). Par ailleurs, l'huile essentielle de cônes est principalement représentée par des monoterpènes et des sesquiterpènes majoritaires non oxygénés (β -myrcène, β -caryophyllène et α -humulène). L'amertume recherchée par les brasseurs est due aux acides alpha, tandis que les arômes proviennent des composés volatils. Depuis quelques années, le regain d'intérêt des consommateurs pour les bières artisanales et aromatiques donne un nouveau dynamisme à la filière houblon en région. Dans ce contexte, notre étude visait à investiguer la diversité génétique, chimique et phénotypique des houblons sauvages du Nord de la France, reconnus comme une source potentielle de caractères intéressants pour l'amélioration variétale. Pour cela, cinquante houblons sauvages ont été collectés sur différents biotopes du Nord de la France et mis en culture en houblonnière expérimentale. Ces houblons sauvages ont été comparés à dix variétés commerciales cultivées en région, et trois variétés anciennes. Une caractérisation du biotope a été réalisée sur des échantillons de sol. Les analyses génétiques des différents houblons se sont concentrées sur l'étude des régions microsatellites. La caractérisation phytochimique des houblons collectés *in-situ* et *ex-situ* a porté sur la quantification des composés phénoliques prénylés majoritaires par UHPLC-UV, l'analyse métabolomique non ciblée par UHPLC-HRMS et l'analyse des composés volatils par HS-SPME GC-MS. Des bières ont également été brassées avec les cônes de certains houblons de notre collection et ont fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique, d'une analyse de leur composition en composés volatils par SBSE-GC-MS et de leurs propriétés organoleptiques par un panel de dégustateurs. Les données multivariées obtenues au cours de ces différentes analyses ont été complétées par analyse multifactorielle. Ces résultats ont révélé une grande diversité génétique et chimique parmi les accessions sauvages, mais également l'importance de l'effet terroir sur la composition chimique du houblon. Ces différents jeux de données et leur analyse statistique constituent un solide support pour l'étude de cette diversité.

Mots-clés : houblons sauvages ; phénotypage ; marqueurs microsatellites ; analyse de composés volatils ; métabolomique non ciblée ; analyse sensorielle ; analyse multivariée.

Valorisation of the chemical and genetic diversity of wild hops in the Hauts-de-France region with a view to varietal development and agro-food and agricultural applications

Hop, *Humulus lupulus* L., is a traditional crop of Northern France. Female inflorescences, also named cones or hops, are used in brewing to provide bitterness and aroma to beer, as well as for their antimicrobial properties. These properties are closely connected to their original chemical composition. In particular, hops produce prenylated chalcones including xanthohumol and desmethylxanthohumol as well as acylphloroglucinol derivatives with humulone derivatives (α -acids) and lupulone derivatives (β -acids). Moreover, hop essential oil is mainly represented by non oxygenated monoterpenes and sesquiterpenes (β -myrcene, β -caryophyllene and α -humulene). The bitterness sought by brewers is due to the alpha acids, while the aromas come from the volatile compounds. In recent years, the new interest of consumers for craft and aromatic beers has given a new dynamism to the hop sector in the region. In this context, our study aims to investigate the genetic, chemical and phenotypic diversity of wild hops from Northern France, recognized as a potential source of interesting traits for varietal improvement. For this purpose, fifty wild hops were collected on different biotopes in Northern France and replanted in experimental hop fields. These wild hops were compared to ten commercial varieties grown in the region, and three old varieties. Biotope characterization was performed on soil samples. Genetic analyses of the different hop were focused on the study of microsatellite regions. Phytochemical characterization of hops collected *in-situ* and *ex-situ* was focused on the quantification of major prenylated phenolic compounds by UHPLC-UV, non-targeted metabolomic analysis by UHPLC-HRMS, and volatile compound analysis by HS-SPME GC-MS. Beers were also brewed with some hops from our collection and were subjected to physicochemical characterization, analysis of their volatile compound composition by SBSE-GC-MS and organoleptic characterization by a panel of tasters. The multivariate data obtained during these different analyses were correlated by multifactor analysis. These results revealed a high genetic and chemical diversity among the wild accessions, but also the importance of the terroir effect on the chemical composition of hops. These different datasets and their statistical analysis constitute a solid support for the study of this diversity.

Keywords: wild hops; phenotypage; microsatellite markers; volatile compound analysis; non targeted metabolomics; sensorial analysis; multivariate analysis.