

Vers une analyse de la diversité métabolique des levures

Carole Camarasa

▶ **To cite this version:**

Carole Camarasa. Vers une analyse de la diversité métabolique des levures. Microbiologie et Parasitologie. Université de Montpellier, 2014. tel-02795937

HAL Id: tel-02795937
https://hal.inrae.fr/tel-02795937

Submitted on 5 Jun 2020

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

UNIVERSITÉ MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

Mémoire présenté pour obtenir l'

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Par

Carole CAMARASA-LARTIGUE
camarasa@supagro.inra.fr

Date de soutenance : 2013

JURY

SOMMAIRE

PARCOURS PROFESSIONNEL ET SCIENTIFIQUE

1. Curriculum vitae 4
2. Communications scientifiques 6
3. Encadrement d'étudiants 13
4. Résumé de mon parcours professionnel 16

SYNTHESE DE L'ACTIVITE DE RECHERCHE

5. Premiers pas vers le métabolisme microbien 21
   1. *Problématique générale* 21
   2. *Oxydation du glycérol en dihydroxyacétone par la bactérie acétique Gluconobacter oxydans* 22
      - Cinétique de conversion du glycérol en DHA 22
      - Caractérisation des mécanismes impliqués dans les phénomènes d'inhibition par le glycérol et la DHA 24
      - Optimisation des procédés de bioconversion du glycérol en DHA par *Gluconobacter oxydans* 26
   3. *Réduction du glycérol en 1,3-propanediol par les bactéries anaérobies* 27
      - Synthèse de 1,3-PPD par une flore microbienne mixte 28
      - Identification des bactéries responsables de la conversion du glycerol en 1,3-PPD 29
      - Synthèse de 1,3-PPD par *Cl. butyricum* et *A . agglomerans* 30
6. Vers une vision intégrée du métabolisme et de la physiologie des levures œnologiques 32
   1. *Quelques éléments de contexte* 32
   2. *Métabolisme des acides organiques* 33
      - Réaliser la fermentation malolactique en utilisant une souche de *S. cerevisiae* 33
      - Déviation du flux carboné vers la formation d'acide lactique 40
      - Cycle des acides tri-carboxyliques et synthèse d'acide succinique au cours du métabolisme fermentaire de la levure 41
      - Métabolisme d'un acide aminé particulier : l'acide γ-amino butyrique (GABA) 46
   3. *Vers une analyse intégrée et quantitative du métabolisme de la levure* 50
      - Rôle majeur du maintien de l'équilibre d'oxydoréduction dans les réorientations métaboliques liées à la diminution de la production d'alcool 51
      - Démarche de biologie des systèmes pour comprendre la régulation du métabolisme du NADPH 53
   4. *Vers la prise en compte de la diversité de l'espèce S. cerevisiae* 57
      - Analyse de la diversité phénotypique chez *S. cerevisiae* en relation avec l'origine des souches 58
      - Diversité entre souches dans l'assimilation d'une ressource d'azote complexe 62
      - Incidence sur le métabolisme des ajouts d'azote en fermentation continue bi-étagée 68

7. Projets en cours et à venir 74
   - Analyse quantitative du métabolisme de la levure et de sa régulation 74
   - Diversité métabolique des levures 77

8. Bibliographie 80

PARCOURS PROFESSIONNEL ET SCIENTIFIQUE

1. *Curriculum vitae*

Etat civil

Carole CAMARASA LARTIGUE
Née le 19 octobre 1966
Mariée, 3 enfants

UMR Sciences pour l'œnologie
INRA, 2 place Viala
F-34060 MONTPELLIER
carole.camarasa@supagro.inra.fr
+33 (0)4 99 61 23 36

Formation

1989-1992 Doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSAT). Spécialité : Microbiologie-Technologie, mention très honorable.

1987-1988 Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Spécialité : Microbiologie, mention assez bien.

1983-1988 Diplôme d'Ingénieur de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Option : Génie Biochimique Alimentaire et Génétique Microbienne.

1983 Baccalauréat série C, mention assez bien.

Stages et expérience professionnelle

1992-1993 Ingénieur de recherche GIE REVICO (Cognac). Détachée par au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement des IAA (INRA, Narbonne) dans le cadre d'un contrat de recherche.
Valorisation par voie microbienne de résidus de distillerie de Cognac par production de 1,3 propanediol.

1989-1992 Stage de thèse au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement des IAA (INRA, Narbonne).
Cofinancement INRA / Fédération Provençale des Distilleries Coopératives.
Métabolismes oxydatif et fermentaire du glycérol chez les bactéries. Etude physiologique et cinétique de sa conversion en dihydroxyacétone et en 1,3-propanediol.

1988 Stage de fin d'études et de DEA à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
Etude physiologique de la conversion du glycérol par Clostridium acetobutylicum.

1987 Stage de formation ingénieur au Laboratoire Biotechnologie de l'Environnement des IAA (INRA, Narbonne).
Conversion du glycérol et du glucose par voie aérobie (Gluconobacter oxydans) ou anaérobie (Lactobacillus brevis).

Chercheur à l'INRA

1997 Chargée de recherche 1ère classe. UMR Sciences pour l'œnologie. Montpellier.
Etude physiologique de la levure en métabolisme fermentaire en conditions œnologiques.

1993-1997 Chargée de recherche 2ème classe. Laboratoire de Microbiologie et Technologie des Fermentations. Institut des Produits de la Vigne. Montpellier.
Etude physiologique de la levure en métabolisme fermentaire en conditions œnologiques.

Responsabilités collectives

- Participation à la cellule d'animation scientifique de l'UMR Sciences pour l'œnologie (1999-2002), dont la vocation était l'animation scientifique et la diffusion des travaux de l'unité ; participation à la création du site internet de l'unité.

- Participation à la mise en place de la démarche Assurance Qualité Recherche au sein de l'unité, en tant que responsable du groupe *Modes opératoires et procédures* (2003-2007).

- Membre élue du Conseil de Gestion du département Microbiologie et Chaîne Alimentaire (MICA) de l'INRA (2002-2006) puis du Conseil Scientifique du département MICA depuis 2006.

- Membre du comité scientifique du congrès Levures, modèle et outils depuis 2011.

- Relecture d'articles scientifiques pour des revues internationales (Applied and Environmental Microbiology, Current Microbiology, OMICS…).

- Participation à des jurys de concours d'école doctorale (Ecole doctorale SEVAB, Université de Toulouse, juillet 2012), de thèse (examinateur de la thèse de Julien Pagliardini, 9 juillet 2010, Ecole doctorale SEVAB, Université de Toulouse) et de recrutement (Poste de Maître de Conférence, Chaire d'excellence, INSA Toulouse, septembre 2009).

2. Communications scientifiques

Articles scientifiques dans des revues à comité de lecture

Clement T., Perez M., Mouret J.R., Sanchez I., Sablayrolles J.M., Camarasa C. 2013. Metabolic response of yeast to valine and ammonium pulses during four-stages continuous wine fermentation. Appl. Environ. Microbiol. In press.

Crépin L., Nidelet T., Sanchez I., Dequin S., Camarasa C. 2012. Sequential use of nitrogen compounds by yeast during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. Appl. Environ. Microbiol. 78 :8102-8111.

Celton M., Sanchez I., Goelzer A., Fromion V., Camarasa C., Dequin S. 2012. A comparative transcriptomic, fluxomic and metabolomic analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to increases in NADPH oxidation. BMC Genomics 13:317.

Celton M., Goelzer A., Camarasa C., Fromion V., Dequin S. 2012. A constraint-based model analysis of the metabolic consequences of increased NADPH oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab. Eng. 14:366-379.

Camarasa C., Sanchez I., Brial P., Bigey F., Dequin S. 2011. Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. PLoS One. 6:e25147

Clement T., Perez M., Mouret J.R., Sablayrolles J.M., Camarasa C. 2011 Use of a continuous multistage bioreactor to mimic winemaking fermentation. Int. J. Food Microbiol. 150:42-49.

Cadière A., Ortiz-Julien A., Camarasa C., Dequin S. 2011. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. Metab Eng. 13:263-271.

Bach B., Sauvage, F., Dequin S., Camarasa C. 2010. Role of GABA as a source of nitrogen and succinate in wine. . Am. J. Enol. Vit. 60: 508-516.

Aguera E., Bes M., Roy E., Camarasa C., Sablayrolles J.M. 2009. Partial removal of ethanol during fermentation to obtain reduced-alcohol wines. Am. J. Enol. Vit. 61:53-60.

Bach, B., Meudec E., Lepoutre J.P., Rossignol T., Blondin B., Dequin S., Camarasa, C. 2009. New insights into gamma-aminobutyric acid catabolism: evidence for gamma-hydroxybutyric acid and polyhydroxybutyrate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microb. 75:4231-4239.

Camarasa C., Faucet, V., Dequin, S. 2007. Role in anaerobiosis of the isoenzymes for *Saccharomyces cerevisiae* fumarate reductase encoded by *OSM1* and *FRDS1*. Yeast 24: 391-401.

Cambon B., Monteil V., Remize F., Camarasa C., Dequin S. 2006. Effects of *GPD1* overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking ALD6 genes. Appl. Environ. Microb. 72 :4688-4694.

Camarasa C., Grivet J.P., Dequin S. 2003. Investigation by ^{13}C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. Microbiology. 149 :2669-2678.

Camarasa C., Bony M., Bidart F., BarreP., Dequin S. 2001. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microb. 67:4144-4151.

Fornairon-Bonnefond C., Camarasa C., Moutounet J.M., Salmon J.M. 2001. Etat des connaissances scientifiques actuelles sur le phénomène d'autolyse des levures et l'élevage des vins sur lies. J. Int. Sci. Vig. Vin. 35:57-78.

Barbirato F., Soucaille P., Camarasa C., Bories A. 1998. Uncoupled glycerol distribution as the origin of the accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde during the fermentation of glycerol by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210. Biotech. Bioeng. 58:303-305.

Bony M., Bidart F., Camarasa C., Ansanay V., Dulau L., Barre P., Dequin S. 1997. Metabolic analysis of *S. cerevisiae* strains engineered for malolactic fermentation. FEBS Lett. 410:452-456.

Barbirato F., Astruc S., Soucaille P., Camarasa C., Salmon J.M., Bories A. 1997 Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 : limitations and regulations. Microbiology. 143:2423-2432.

Ansanay V., Dequin S., Camarasa C., Schaeffer V., Grivet J.P., Blondin B., Salmon J.M., Barre P. 1996. Malolactic fermentation by engineered Saccharomyces cerevisiae as compared with engineered Schizosaccharomyces pombe. Yeast 12:215-225.

Camarasa C., Prieto S., Ros R., Salmon J.M., Barre P. 1996. Evidence for a selective and electroneutral K+/H+-exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. Yeast. 12:1301-1313.

Barbirato F., Camarasa C., Bories A., Grivet J.P. 1995. Glycerol fermenation by a new 1,3-propanediol microorganism *Enterobacter agglomerans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:786-793.

Claret-Camarasa C., Salmon J.M., Romieu C., Bories A. 1994. Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41:359-365.

Claret-Camarasa C., Bories A., Soucaille P. 1993. Inhbitory effect of dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* : kinetics aspects and modelisation. J. Ind. Microbiol. 11:105-112.

Claret-Camarasa C., Bories A., Soucaille P. 1992. Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. Curr. Microbiol. 25:149-155.

Bories A., Claret-Camarasa C., Soucaille P. 1991. Kinetic study and optimization of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. Process Biochem. 26:243-248.

Communication orale dans un congrès

Cadiere A., Celton M., Bigey F., Goelzer A., Fromion V., Camarasa C., Dequin S. 2012. Evolutionary engineering of wine yeast strains to increase flavor formation. *International conference on yeasts ICY.* Madison. USA.

Crepin L, Dequin S, Camarasa C. 2012. Fate of nitrogen sources during wine fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Impact on biomass formation. *Levures, modèle et outils (LMO10)*. Toulouse. France.

Galeote V, Bigey F, Legras JL, Sanchez I, Camarasa C, Dequin S. (2011). Genomic and physiological perspectives of wine yeasts. *ESF-EMBO Symposium*. San Feliu de Guixol. Spain.

Camarasa C., Sanchez .I, Brial P., Bigey F., Dequin S. 2011. Emergence of specific traits for wine yeasts reflects both adaptation to environment and human selection. *IXème Edition du Symposium International d'œnologie "OEno 2011"*. Bordeaux. France.

Celton M., Camarasa C., Goelzer A., Fromion V., Dequin S. 2010. A system biology study of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to a NADPH perturbation. *Rencontres des Microbiologistes de l'INRA.* Poitiers. France.

Clement T., Mouret J.R., Perez M., Camarasa C., Sablayrolles J.M. 2010. Multistage continuous fermentation. *CAFE 24-month meeting.* Vigo, Spain.

Cadiere A., Camarasa C., Julien-Ortiz A., Dequin S. 2009. An evolutionary engineering approach for increasing in vivo flux through the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *27th International conference on Yeast Genetics & Molecular Biology.* Manchester, U.K.

Heux S., Camarasa C., Dequin S. 2007. Etude de la diversité du métabolisme central chez *Saccharomyces cerevisiae* par une approche de fluxomique. *VII congrès national de la SFM.* Paris, France.

Heux S., Camarasa C., Dequin S. 2006. Analyse comparative ^{13}C-flux de deux souches *Saccharomyces cerevisiae*. *2èmes Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique.* Saint Sauves d'Auvergne, France.

Heux S., Cadière A., Camaras, C., Nielsen J., Dequin S. 2006. Analyse comparative de la distribution des flux métaboliques chez *S. cerevisiae*. *Rencontres des Microbiologistes de l'INRA,* Dourdan, France.

Heux S., Cadière A., Camarasa C., Nielsen J., Dequin S. 2006. Comparative ^{13}C flux analysis of two *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals substantial differences in the flux through the PP pathway. *25th International Specialised Symposium on Yeasts - Systems Biology of Yeasts: From Models to Applications.* Hanasaari Espoo, Finland.

Heux S., Camarasa C., Dequin S. 2006. Metabolic-flux analysis of *S. cerevisiae* strains for exploring intraspecies diversity. *Lyon's International Multidisciplinary Meeting on Post-Genomics - IPG (Integrative Post-Genomics).* La Doua, Lyon, France.

Saint-Prix F., Bach B., Camarasa C., Dequin S. 2004. Metabolic engineering and redox metabolism in wine yeast. *2nd Physiology of Yeasts and Filamentous Fungi (PYFF2)*. Anglet, France.

Saint-Prix F., Remize F., Camarasa C., Dequin S. 2004. Equilibre redox intracellulaire et métabolisme de la levure en fermentation oenologique. *1er workshop Redox: Influence et prise en compte du potentiel d'oxydoréduction (Eh) dans les processus biologiques et les procédés biotechnologiques. Application en agro-alimentaire.* Dijon, France.

Blondin B., Camarasa C., Luyten K., Riou C., Saint-Prix F., Rossignol T., Dequin S. 2002. Control of carbon flux during wine fermentation. *International Specialised Symposium on Yeast*, Afrique du Sud. .

Camarasa C., Ortiz-Julien A., Sablayrolles J.M. 2002. Importance of the intracellular redox balance of yeasts : comparison of different enological strains. *Symposium of the American Society of Enology and Viticulture.* Portland, Oregon (USA).

Camarasa C., Faucet V., Trihan F., Dequin S. 2001. Voie des acides tricarboxyliques et production de succinate en fermentation. *Levure : Modèle et Outil (v*). Bruxelles, France.

Camarasa C., Faucet V., Dequin S. 2001. Involvement of the fumarate reductase activity during yeast fermentative metabolism. *Physiology of Yeast and Filamentous Fungi*. Hindsgavl Castle, Danemark.

Luyten K., Camarasa C., Riou C., Blondin B., Dequin S. 2001. Engineering of carbon flux in wine yeast. *European Conference on Biotechnology*. Madrid, Espagne.

Dequin S., Ansanay V., Bony M., Camarasa C., Barre P. 1997. Engineering new pathways for organic acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Conférences Européennes « Control of metabolic flux : metabolic pathway engineering in yeasts ».* Giens, France.

Camarasa C., Dequin S., Bidart F., Bony M., Barre P. 1997. Heterologous expression of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *18th International Confeence on Yeasts Genetics and Molecular Biology.* Stellenbosch, Afrique du sud.

Communication par affiche

Clement T., Perez M., Mouret J.R., Camarasa C., Sablayrolles J.M. 2012. Use of a multi-stage continuous bioreactor to study nitrogen metabolism in winemaking conditions. *Levures, modèle et outils (LMO10)*. Toulouse. France.

Celton M, Nidelet T, Goelzer A, Camarasa C, Fromion V, Dequin S. 2012. Constraint-based modeling of yeast fermentative metabolism: application to redox metabolism. *Levures, modèle et outils (LMO10)*. Toulouse. France.

Camarasa C., Sanchez I., Brial P., Bigey F., Dequin S. 2011. Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. *ESF-EMBO Symposium*. San Feliu de Guixol, Spain.

Celton M., Goelzer A., Camarasa C., Fromion V., Dequin S. 2010. A system biology study of the response of Saccharomyces cerevisiae to a NADPH perturbation. *Levures, modèle et outils (LMO9)*. Strasbourg, France.

Cadière A., Tilloy V., Camarasa C., Julien-Ortiz A., Dequin S. 2010. Étude métabolique et génétique d'un mutant de la souche oenologique EC1118 obtenu par évolution adaptative *in vivo*. *Levures, modèle et outils (LMO9)*. Strasbourg, France.

Celton M., Camarasa C., Goelzer A., Fromion V., Dequin S. 2010. A system biology study of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to a NADPH perturbation. *4th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi.* Rotterdam, The Netherlands.

Camarasa C., Sanchez I., Brial P., Bigey F., Dequin S. (2010). Assessing phenotypic diversity in *Saccharomyces cerevisiae* regarding the origin of the strains. *4th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi.* Rotterdam, The Netherlands.

Cadière A., Camarasa C., Ortiz-Julien A., Dequin, S.. 2010. An evolutionary approach for increasing *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *4th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi.* Rotterdam, The Netherlands.

Crépin L., Brial P., Sanchez I., Bigey F., Dequin S., Camarasa, C. 2010. Diversité métabolique chez *S. cerevisiae. Rencontres des Microbiologistes de l'INRA.* Poitiers, France.

Celton M., Goelzer A., Camarasa C., Ehsani M., Fromion V., Dequin S. 2010. Metabolic and transcriptomic impact of NADPH perturbation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Systems Biology of Microorganisms*. Paris, France.

Celton M., Goelzer A., Camarasa C., Ehsani M., Fromion V., Dequin S. 2009. A system biology approach of NADPH metabolism in *S. cerevisiae*. *24th International conference on Yeast Genetics & Molecular Biology,* Manchester, Great Britain.

Celton M., Goelzer A., Camarasa C., Ehsani M., Fromion V., Dequin S. 2009. A system biology approach of NADPH metabolism in *S. cerevisiae*. *27th International Specialised Symposium on Yeasts "Yeasts for health and biotechnologies".* Paris, France.

Cadière A., Camarasa C., Ortiz-Julien A., Dequin S. 2009. An evolutionary approach for increasing *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *27th International Specialised Symposium on Yeasts "Yeasts for health and biotechnologies".* Paris, France.

Cadière A., Camarasa C., Julien-Ortiz A., Dequin S. 2008. Amplification de la voie des pentoses phosphate par évolution dirigée. *Colloque Levures, modèle et outils LMO8.* La colle sur Loup, France.

Bach B., Camarasa C., Blondin B., Dequin S. 2007. Origine de l'acide succinique : rôle de la voie GAD-GABA chez la levure *S. cerevisiae*. *8th Symposium International d'Œnologie.* Bordeaux, France.

Heux, S., Cadière, A., Camarasa, C., and Dequin, S. 2007. Comparative ^{13}C Flux analysis of the central metabolism of a laboratory and a wine yeast strain. *26th International Specialised Symposium on Yeasts "From Alcoholic Beverages to Bioethanol for Transportation: A New Challenge For Fermenting Yeast".* Sorrento, Italy.

Heux S., Cadière A., Camaras, C., Nielsen, J., Dequin S. 2006. Analyse comparative ^{13}C flux de deux souches *Saccharomyces cerevisiae*. *7ème Symposium Levures, Modèles et Outils, Institut Pasteur.* Paris, France.

Heux S., Camarasa C., Nielsen J., Dequin S. 2006. Comparative ^{13}C flux analysis of two Saccharomyces cerevisiae strains reveals substantial differences in the flux through the PP pathway. *25th International Specialised Symposium on Yeasts "Yeast systems biology - from models to applications".* Hanasaari, Espoo, Finland.

Bach B., Camarasa C., Dequin S. 2006. Effet of GABA assimilation on *S. cerevisiae* central carbon metabolism. *25th International Specialised Symposium on Yeasts "Yeast systems biology - from models to applications".* Hanasaari, Espoo, Finland.

Bach B., Camarasa C., Dequin S. 2006. Effect of GABA assimilation on *Saccharomyces cerevisiae* central carbon metabolism. *Rencontres des Microbiologistes de l'INRA.* Dourdan, France.

Bach B., Camarasa C., Dequin S. 2006. Impact de l'assimilation du GABA sur le métabolisme carboné central de *S. cerevisiae*. *7ème Symposium Levures, Modèles et Outils, Institut Pasteur.* Paris, France.

Bach B., Camarasa C., Dequin S. 2005. Pathways of GABA assimilation and effect on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism during wine fermentation. *22nd International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology*. Bratislava, Slovak Republic.

Guendouz J., Perez M., Colombié S., Camarasa C., Sablayrolles J.M. 2005. Mise au point d'un réacteur continu bi-étagé pour étudier la fermentation alcoolique en conditions oenologiques. *Congrès de Génie des Procédés*. Toulouse, France.

Bach B., Camarasa C., Rossignol T., Blondin B., Dequin, S. 2004. γ-aminobutyrate assimilation in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *2nd Physiology of Yeasts and Filamentous Fungi*. Anglet, France.

Camarasa C., Faucet V., Dequin S. 2004. The tricarboxylic acid (TCA) pathway in S*accharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *2nd Physiology of Yeasts and Filamentous Fungi (PYFF2)*. Anglet, France.

Perez M., Guendouz J., Picou C., Colombié S., Camarasa C., Sablayrolles J.-M. 2004. Mise au point d'un fermenteur continu bi-étagé pour l'étude de la fermentation alcoolique en conditions oenologiques. *Journées de la Mesure*. Nancy, France.

Camarasa C., Faucet V., Dequin S. 2003. Roles of the TCA reductive pathway during yeast alcoholic fermentation. *21st International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology*. Göteborg, Sweden.

Camarasa C., Ortiz-Juline, A., Dequin S., Sablayrolles, J.M. 2003. Role de l'équilibre d'oxydoréduction dans le comportement fermentaire de trois levures oenologiques. *7e Symposium International d'Oenologie*. Bordeaux, France, pp. 308-311.

Camarasa C**.**, Faucet V., Cao J., Dequin S. 2002. Tricarboxylic acid pathway (TCA) during yeast fermentative metabolism. *Advanced Technologies for Metabolic Engineering in Biotechnology and Medicine*. Carcavelos, Portugal.

Camarasa C., Trihan F., Dequin S. 2000. Production of succinate during alcoholic fermentation by *S. cerevisiae*. *10th International Symposium on Yeasts* . Papendal, Pays-Bas.

Camarasa C., Trihan F., Dequin S. 2000. Caractérisation des voies métaboliques impliquées dans la formation de succinarte au cours de la fermentation alcoolique chez *S. cerevisiae*. *Colloque de la Société Française de Microbiologie*. Paris, France.

Camarasa C., Dequin S., Grivet J.P. 1999. Fonctionnalité du cycle TCA durant la fermentation alcoolique chez *S. cerevisiae*. *Réunion des Microbiologistes de l'INRA*. Dourdan, France.

Remize F., Camarasa C., Baptista E., Dequin S. 1999. Déviation du flux carboné chez *S. cerevisiae*. *Réunion des Microbiologistes de l'INRA*. Dourdan, France.

Ansanay V., Remize F., Camarasa C., Dequin S. 1998. Potential applications of wine yeast with engineered carbon flux. *19th International Specialized Symposium on Yeasts*. Braga, Portugal.

Camarasa C., Dequin S., Grivet J.P. 1998. Cycles des acides tri-carboxyliques au cours du métabolisme fermentaire de *S. cerevisiae*. *Conférence Levure Modèle et Outil*. Arcachon, France.

Rosenfeld E., Dequin S.,Camarasa C. 1998. Conséquences physiologiques de l'expression d'une LDH bactérienne chez *S. cerevisiae*. *Conférence Levure Modèle et Outil*. Arcachon, France.

Remize F., Roustan J.L., Pons A., Camarasa C., Barre P., Dequin S. 1997. Characterization of the changes in glycolysis by-products synthesis induced by glycerol overproduction in yeast. *Conférences Européennes « Control of metabolic flux : metabolic pathway engineering in yeasts ».* Giens, France.

Barbirato F., Soucaille P., Camarasa C., Bories A. 1996. Uncoupled glycerol distribution as the origin of the accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde during the fermentation of glycerol by *Enterobacter agglomerans*. *Conférences Internationales "rDDNA biotechnology: metabolic engineering*. Danvers, USA.

Camarasa C., Salmon J.M., Grivet J.P., Ansanay V., Dequin S., Barre P. 1995. Non functionality of the TCA cycle under glucose catabolite repression in a *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strain expressing the gene encoding the malolactic enzyme of *Lactococcus lactis*. *Conférences Européennes « Control of metabolic flux : metabolic pathway engineering in yeasts ».* Grenade, Espagne.

Ansanay V., Dequin S., Camarasa C., Salmon J.M., Barre P. 1995. Transfert of malolactic activity in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Conféérences Européennes « Control of metabolic flux : metabolic pathway ingineering in yeasts ».* Grenade, Espagne.

Bories A., Barbirato F., Camarasa-Claret C. 1994. Mise en evidence de la fermentation du glycerol en 1,3-propanediol chez *Enterobacter agglomerans*. *5ème Congrès de la Société Française de Microbiologie*.. Lille, France.

Salmon J.M., Dequin S., Camarasa-Claret C. 1994. Etude physiologique de la fermentation anaérobie mixte alcoolique / lactique d'une souche de *S. cerevisiae* exprimant l'activité lacticodéshydrogénase de *Lactobacillus casei*. *5ème Congrès de la Société Française de Microbiologie*.. Lille, France.

Camarasa-Claret C., Bories A. 1992. Etude enzymatique de l'inhibition de l'oxydation du glycérol par la dihydroxyacétone chez *Gluconobacter oxydans. 3ème Congrès de la Société Française de Microbiologie*. Lyon, France.

Camarasa-Claret C., Bories A. 1991. Modélisation et optimisation de la production de dihydroxyacétone. *Journée Fermentation INRA*. Dijon, France.

Camarasa-Claret C., Bories A. 1989. Etude cinétique de la conversion du glycérol en dihydroxyacetone par *Gluconobacter oxydans. Journée Fermentation INRA*. Grignon, France.

Bories A., Camarasa-Claret C. 1988. Aerobic and anaerobic conversion of glycerol by micro-organisms. *8th International Biotechnology Symposium*. Paris, France.

3. *Encadrement d'étudiants*

STAGES DE COURTE DUREE *(Responsabilité directe d'encadrement)*

Eric ROSENFELD. 1997. DEA Sciences des Aliments. Université de Montpellier II.

Expression hétérologue d'une lactate déshydrogénase chez *Saccharomyces cerevisiae* : conséquences physiologiques en fermentation.

Fabienne TRIHAN. 2000. DEA Sciences des Aliments. Université de Montpellier II.

Etudes des voies métaboliques impliquées dans la production de succinate au cours de la fermentation alcoolique chez *Saccharomyces cerevisiae.*

Virginie FAUCET. 2001. DEA Sciences des Aliments. Université de Montpellier II.

Implication de la fumarate réductase dans le métabolisme fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae.*

Jeremy GUENDOUZ. 2004. DEA Sciences des Aliments, Université de Montpellier II.

Mise au point et validation d'un réacteur continu et bi-étagé pour l'etude des fermentations alcooliques en conditions œnologiques.

Chloé BONNINEAU. 2005. Stage ingénieur INSA Toulouse 2ème année (6 mois).

Etude de l'activité malate deshydrogénase chez Saccharomyces cerevisiae au cours de la fermentation alcoolique.

Adrien GUERRERO. 2005. Stage ingénieur INSA Toulouse 2ème année (5 mois).

Conséquences de la désalcoolisation en cours de fermentation sur le métabolisme de S. cerevisiae .

Audrey FUALDES. 2006. Stage ingénieur INSA Toulouse 3ème année (6 mois).

Etude des flux autour de l'α-cétoglutarate au cours de la fermentation alcoolique en condition œnologique.

Adeline LOPES. 2010. BTS 1ère année Bioanalyses et contrôles. (2 mois).

Séquence d'assimilation de l'azote chez *Saccharomyces cerevisae*.

Adeline LOPES. 2011. BTS 2ème année Bioanalyses et contrôles (2 mois).

Impact de la concentration initiale en azote assimilable sur la composition de biomasse chez *Saccharomyces cerevisae*.

Nhat-My TRUONG. 2012. Master Biologie des Plantes et des Micro-organismes, Biotechnologies, Bioprocédés. Université de Montpellier II.

Synthèse des composés aromatiques en fermentation œnologique.

STAGES DE DOCTORAT

PARTICIPATION A L'ENCADREMENT

Florence SAINT-PRIX. 2005. Ecole doctorale : Sciences des Aliments. Université de Montpellier II. Directrice de thèse : Sylvie Dequin.

Production d'acétate chez *S. cerevisiae*, en fermentation œnologique. Rôle des gènes *ALD* codant pour les acetaldéhyde déshydrogénases.

Encadrement : 10 %.

Stéphanie HEUX. 2006. Ecole doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé. Université de Bourgogne. Directeurs de thèse : Sylvie Dequin ; Rémy Cachon.

Ingénierie métabolique et analyse ^{13}C flux du métabolisme central des levures *S. cerevisiae* œnologiques.

Encadrement : 20 %.

Axelle CADIERE. 2010. Ecole doctorale : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments. Montpellier Supagro. Directrice de thèse : Sylvie Dequin.

Ingénierie de la voie des pentoses phosphate : applications en œnologie.

Encadrement : 15 %.

Magalie CELTON. 2011. Ecole doctorale : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments. Montpellier Supagro. Directeurs de thèse : Sylvie Dequin ; Vincent Fromion.

Analyse de la réponse de *S. cerevisiae* à une perturbation du métalolisme NADPH, par une approche de biologie des systèmes.

Encadrement : 35 %.

RESPONSABILITE DIRECTE D'ENCADREMENT

Benoît BACH. 2007. Ecole doctorale : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments. Université de Montpellier II. Directrice de thèse : Sylvie Dequin.

Rôle de la voie "GAD/GABA" chez *S. cerevisiae* en fermentataion œnologique

Tiphaine CLEMENT. 2012. Ecole doctorale : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments. Montpellier Supagro. Directeur de thèse : Jean Marie Sablayrolles.

Utilisation d'un fermenteur continu multi-étagé pour la compréhension des mécanismes d'adaptation de la levure à des ajouts d'azote en conditions œnologiques.

Lucie CREPIN. 2012. Ecole doctorale : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments. Université de Montpellier II. Directrice de thèse : Sylvie Dequin.

Variabilité dans l'utilisation de l'azote chez *Saccharomyces cerevisiae* et conséquences sur la production de biomasse en fermentation œnologique.

4. *Résumé de mon parcours professionnel*

L'objectif de cette partie est de retracer brièvement mon parcours professionnel, depuis les travaux que j'ai menés au cours de ma formation à la recherche (DEA, thèse), jusqu'à ce jour. Je présenterai plus particulièrement les faits marquants de mon activité scientifique et ses évolutions, tant au niveau des problématiques abordées que des approches et des méthodologies mises en place.

Au cours de ma formation initiale d'Ingénieur de l'Institut National des Sciences Appliquées (INSA) de Toulouse en « Génie Biochimique et Agroalimentaire », je me suis orientée très tôt vers la recherche scientifique. Ainsi, j'ai choisi d'effectuer mon stage de formation d'ingénieur dans un laboratoire de recherche, sur un projet portant sur la comparaison du métabolisme du glycérol et du glucose de deux microorganismes, l'un étant aérobie et l'autre anaérobie (Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement des Industries Agroalimentaires -LBEIAA, INRA, Narbonne). J'ai également effectué, en parallèle avec ma dernière année d'ingéniorat, un DEA en Microbiologie dont l'objet des travaux de recherche était de décrire le métabolisme du glycérol de la bactérie anaérobie *Clostridium acetobutylicum* (Département de Génie Biochimique et Alimentaire, INSA, Toulouse).

Ayant obtenu une bourse de thèse cofinancée par le Département des Fruits et Légumes et Dérivés de l'INRA et la Fédération Provençale des Distilleries Coopératives, j'ai pu ensuite poursuivre ma formation en physiologie et métabolisme microbien, en préparant un doctorat au LBEIAA, sous la responsabilité scientifique d'André Bories (Directeur de recherche, LBEIAA) et de Philippe Soucaille (Professeur INSA). Dans ce cadre, j'ai étudié sous un angle cinétique et métabolique la conversion bactérienne du glycérol en molécules d'intérêt industriel : la dihydroxyacétone (oxydation) et le 1,3-propanediol (réduction).

D'un point de vue personnel, ce projet m'a tout d'abord amenée à concevoir une démarche que j'ai ensuite souvent appliquée dans mon activité de recherche, qui consiste à observer un caractère phénotypique, comme la cinétique de production d'un composé , à l'analyser dans le contexte cellulaire et en relation avec l'environnement du microorganisme afin de proposer des mécanismes ou modèles permettant de l'expliquer, et finalement à valider ou infirmer expérimentalement les différentes hypothèses émises. Il m'a également conduit à mesurer les avancées que peuvent apporter une connaissance détaillée du métabolisme et de sa régulation pour définir des stratégies de mise en œuvre optimale des microorganismes dans des applications industrielles. Enfin, ce travail m'a permis de me familiariser et d'acquérir des méthodologies expérimentales dédiées à la caractérisation du métabolisme dans le cadre de collaborations comme le traçage de voies métaboliques spécifiques par filiation isotopique (Jean-Philippe Grivet, CNRS Orléans), ou la mesure d'activité de transport transmembranaire (Jean-Michel Salmon, INRA Montpellier). Finalement, dans le cadre d'un contrat de

recherche avec le Groupement d'Intérêt Economique REVICO (Cognac), j'ai pu décliner les aspects applicatifs des connaissances fondamentales générées au cours de ma thèse et établir la faisabilité des deux procédés de conversion microbienne du glycérol pour valoriser les résidus de distillerie de cognac.

Ce parcours doctoral a conforté mon intérêt pour l'étude de la physiologie et du métabolisme microbiens, dont bien des aspects restent à explorer, notamment au niveau de la compréhension de la régulation des voies métaboliques et de l'identification des mécanismes sous-jacents à un caractère phénotypique. Il m'a également montré que cette problématique de recherche offrait de larges perspectives d'applications, dans des domaines variés, allant de la production de molécules à forte valeur ajoutée à l'amélioration de la qualité de produits alimentaires.

Cela m'a alors conduit à passer un concours de recrutement de chargée de recherche à l'INRA, dont le profil de poste portait sur la caractérisation de la physiologie et du métabolisme de microorganismes eucaryotes : les levures œnologiques. J'ai ainsi intégré, en novembre 1993, l'équipe Physiologie de la Levure (responsable scientifique : Jean-Michel Salmon) du Laboratoire de Microbiologie et de Technologie des Fermentations (MTF), dirigé par Pierre Barre et faisant partie de l'Institut des Produits de la Vigne (IPV) du centre INRA de Montpellier. Suite à l'évolution en 2000 de l'IPV en Unité Mixte de Recherche (UMR), l'ensemble du laboratoire MTF est devenu l'équipe Microbiologie (responsables scientifiques : Sylvie Dequin, Jean-Marie Sablayrolles) de l'UMR 1083 « Sciences Pour l'Œnologie », dirigée par Guy Albagnac, puis par Jean-Marie Sablayrolles et Véronique Cheynier.

Lors de mon arrivée, les principaux programmes de recherche de mon laboratoire d'accueil portaient sur la modification de certaines propriétés des souches de levures utilisées pour l'élaboration des vins, en vue d'améliorer le déroulement de ce procédé industriel, mais aussi la qualité du produit. Dans ce contexte, mon activité de recherche a été focalisée sur l'identification et l'étude du fonctionnement et de la régulation, chez *S. cerevisiae,* des différentes étapes métaboliques impliquées d'une part dans les performances fermentaires des souches, et d'autre part, dans l'utilisation et/ou la formation de métabolites d'intérêt au cours de la fermentation œnologique. Les phénotypes cibles, souvent en lien avec des traits technologiques spécifiques, ont été choisis en accord avec Sylvie Dequin, qui avait en charge les projets d'amélioration génétique des souches (équipe MTF Génétique et Biologie Moléculaire) et mon responsable scientifique, Jean-Michel Salmon.

Pour mener à bien ces thématiques, j'ai été amenée à acquérir puis à développer au sein de mon unité des méthodologies spécifiques, dédiées à la caractérisation du transport de molécules, à l'identification de voies métaboliques (traçage isotopique, quantification de flux) et à l'analyse de leur fonctionnement et de leur régulation (dosage de cofacteurs intracellulaires, mesure du pH cellulaire...). Certaines de ces approches ont été développées dans le cadre de collaborations (J.P. Grivet, Laboratoire

de Biophysique Moléculaire, CNRS Orléans ; A. Pons et C.G. Dussap, CUST, Université d'Orléans). En parallèle, je me suis formée aux techniques de biologie moléculaire, afin de les utiliser en tant qu'outil pour l'étude de métabolisme, en particulier pour analyser la contribution d'un gène ou d'une protéine à un caractère phénotypique.

Ainsi, de façon générale, mes travaux ont permis (i) de préciser la contribution de certaines voies métaboliques dans la formation de produits secondaires participant à la qualité organoleptique du vin, et ainsi être utilisés pour la définition de stratégies d'amélioration de souches (ingénierie génétique, évolution) ou du mode de conduite de fermentation (ii) d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'orientation du métabolisme de souches de levure sauvages ou améliorées et finalement (iii) d'évaluer l'incidence du mode de conduite des fermentation sur le métabolisme. Ils m'ont également donné l'opportunité de participer à des contrats de recherche européen (Biotechnology : Cell Factory) ou industriels, avec les sociétés Lallemand –développement de souches de levure réalisant la fermentation malo-lactique- et Lesaffre –construction de souches de levure effectuant la fermentation alcoolique-lactique-.

Le développement d'outils de post-génomique et la production massive de données haut-débit à différents niveaux de la hiérarchie cellulaire, qui ont rapidement suivi la publication de la séquence complète du génome de *S. cerevisiae*, en 1996, a souligné les limitations de la démarche d'analyse fonctionnelle de voies métaboliques ciblées. L'inconvénient majeur de cette démarche est son caractère réductionniste, puisqu'elle apporte une connaissance détaillée d'une partie très restreinte du métabolisme, sans prendre en compte l'entité cellulaire et l'interdépendance entre les différentes voies. Il m'est apparu nécessaire de pratiquer un changement d'échelle dans les approches mises en œuvre pour étudier le métabolisme microbien, afin d'en avoir une vision globale et quantitative. Pour cela, j'ai dans un premier temps, adapté la méthodologie ^{13}C-Flux Analysis pour quantifier la distribution des flux carbonés de la levure au cours de la fermentation œnologique. D'autre part, j'ai initié un projet visant à développer une démarche de biologie intégrative pour étudier le métabolisme de la levure, qui associe la production de données dites « omics » (génome, transcriptome, métabolome et distribution des flux) à la modélisation. Dans ce cadre, une collaboration avec Vincent Fromion et Anne Goelzer, (MIG, Jouy en Josas) a conduit au développement d'un modèle stœchiométrique DynamoYeast, dédié à l'analyse du métabolisme carboné au cours de la fermentation œnologique par *S. cerevisiae* (Contrat INRA AGROBI).

Ces dernières années, les questions scientifiques abordées au sein de mon unité ont fortement évolué pour satisfaire aux contraintes de la filière œnologique dont l'enjeu est maintenant de produire des vins de qualité dans un contexte de durabilité. Ainsi, nous nous sommes de plus en plus intéressés à la caractérisation de la diversité naturelle qui existe au sein de l'espèce *S. cerevisiae*, et à l'identification des mécanismes et bases génétiques responsables de l'adaptation des levures œnologiques à leur

environnement et de celles qui sont à l'origine des propriétés spécifiques de ces souches. En conséquence, une part importante de mon activité est maintenant orientée vers l'analyse de la diversité phénotypique et métabolique chez *S. cerevisiae*, ce qui me permettra d'une part d'évaluer la flexibilité du réseau métabolique de la levure et d'autre part de préciser certains mécanismes qui sous-tendent la spécificité métabolique des souches œnologiques. Finalement, alors que mes premiers travaux sur l'étude du métabolisme de la levure étaient exclusivement focalisés sur le métabolisme carboné central de la levure, j'ai élargi ces dernières années mon activité de recherche à d'autres métabolismes, notamment le métabolisme de l'azote, et, dans une moindre mesure, le métabolisme de certains composés lipidiques, qui sont en lien avec les voies de production des composés aromatiques. Cette évolution s'inscrit pleinement dans la démarche de biologie intégrative vers laquelle je me tourne actuellement, qui vise à appréhender le fonctionnement du métabolisme à l'échelle cellulaire, en prenant en compte les contraintes liées à l'environnement (disponibilité en nutriments). Elle répond également à des objectifs appliqués, dans un marché mondial de plus en plus compétitif, où le vinificateur souhaite disposer d'outils lui permettant de produire des vins présentant un profil aromatique défini.

Dès le début de mon parcours professionnel, j'ai participé à l'encadrement de stagiaires : BTS/IUT, DEA ou Masters, doctorants et post-doctorants. Il s'agissait au départ de co-encadrements, le choix des sujets de recherche et le suivi de leur progression étant réalisé avec l'aval des responsables scientifiques de mon équipe (Jean-Michel Salmon dans un premier temps, puis Sylvie Dequin). Par la suite, ayant acquis la maîtrise de mes thématiques de recherche et une expérience pour la formation d'étudiants, j'ai pu proposer des projets de stage et en assurer l'encadrement de façon autonome.
Finalement, j'ai contribué tout le long de ma carrière, j'ai contribué à la vie collective des organisations dans laquelle je travaille. J'ai participé à la cellule d'animation scientifique de l'IPV, puis à la mise en place de la démarche AQR au sein de notre unité. J'ai été membre élue du Conseil de Gestion du Département MICA, puis du Conseil Scientifique de ce même département. Enfin, je suis régulièrement sollicitée pour participer à des jurys de recrutement et pour l'évaluation scientifique d'articles.

SYNTHESE DE L'ACTIVITE DE RECHERCHE

5. Premiers pas vers le métabolisme microbien

Ma formation doctorale m'a permis de découvrir le domaine du métabolisme microbien et les larges perspectives qu'il ouvre en termes d'applications biotechnologiques, et de me familiariser avec différentes approches qui peuvent être mises en œuvre pour son étude. Cela a été réalisé au travers de stages (ingéniorat, DEA, thèse) portant sur une thématique commune qui est la conversion du glycérol par voie microbienne, effectués sous la responsabilité scientifique d'André Bories (Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement des IAA, INRA, Narbonne) et de Philippe Soucaille (Département de Génie Biochimique et Alimentaire, INSA, Toulouse).

1. Problématique générale

Le début des années 1990 a connu un essor considérable des sources d'énergie renouvelables, dont certaines d'entre elles sont issues de la transformation de matières premières végétales. Ainsi, le bioéthanol est produit à partir des composés osidiques (mono ou polymères de sucres) des végétaux et le biodiesel (diester) provient de l'estérification de triglycérides contenu dans les matières grasses, comme l'huile de colza. Le développement de ces filières de valorisation de matières premières ou déchets agricoles a conduit à une augmentation de la production mondiale de glycérol, qui est le principal métabolite associé à la production de ces bio-carburants. Pour valoriser ces excédents, il est alors apparu nécessaire de rechercher de nouvelles voies d'utilisation de cette molécule, jusqu'alors essentiellement synthétisée par voie pétrochimique. Vis-à-vis de cet objectif, la conversion microbienne du glycérol offre d'importantes potentialités : ce substrat intervient au niveau du métabolisme carboné central et peut être assimilé par de nombreux microorganismes aérobies et anaérobies.

Une analyse exhaustive des données bibliographiques portant sur le catabolisme du glycérol, nous a conduits à retenir deux voies de conversion de ce substrat en molécules d'intérêt industriel : la dihydroxyacétone (DHA), qui est entre dans la composition de crèmes auto-bronzantes en cosmétologie, du fait de ses propriétés tannantes et le 1,3-propanediol, qui peut être utilisé comme précurseur pour la synthèse de polyesters et de polyuréthanes dans l'industrie chimique.

Bien que mettant en jeu des voies métaboliques simples (une ou deux étapes), ces transformations correspondent en fait à une réalité biologique beaucoup plus complexe, liée à la multiplicité des systèmes enzymatiques pouvant intervenir dans l'assimilation du glycérol et de leur régulation, mais surtout au rôle joué par le système accepteur final d'électrons. Le glycérol présente en effet un degré de réduction élevé, et son catabolisme génère un excès d'équivalents réducteurs par rapport aux composés osidiques ou poly-hydriques comportant plus de 3 atomes de carbone. La particularité de ce métabolisme réside donc dans la nécessité de la présence d'un accepteur exogène d'électrons, qui peut être l'oxygène, un co-substrat moins réduit que le glycérol, ou une voie métabolique consommatrice

d'équivalents réducteur. Ainsi, ce système constitue un modèle de choix pour l'étude de l'incidence des contraintes de maintien de l'équilibre d'oxydoréduction sur l'orientation du métabolisme microbien, en outre de son intérêt pour définir des stratégies visant à optimiser les performances de productivité et de rendement de la conversion microbienne de glycérol en molécules à forte valeur ajoutée.

2. Oxydation du glycérol en dihydroxyacétone par la bactérie acétique Gluconobacter oxydans

Les bactéries acétiques se différencient fortement des autres micro-organismes par leur métabolisme. En effet, elles sont d'une part caractérisées par une absence de voie glycolytique et par une voie des acides tricarboxyliques incomplète (Greenfield et Claus, 1972). En conséquence, la conversion cytoplasmique des sucres et polyols pour produire les précurseurs carbonés nécessaires à la croissance, s'effectue, après phosphorylation oxydative, par la voie des pentoses phosphates. D'autre part, ces organismes sont dotés d'un grand nombre de déshydrogénases membranaires (De Ley and Dochy, 1960), dont l'activité semble être directement couplée à la chaîne respiratoire pour la synthèse d'énergie et qui leur confèrent un fort pouvoir oxydant des sucres et des composés poly-hydriques. Ces systèmes d'oxydation membranaire des substrats présentent un intérêt réel pour la biotechnologie. Ainsi, les bactéries acétiques, qui peuvent être décrites comme des catalyseurs d'oxydation vivants, sont utilisées pour la mise en œuvre des « fermentations industrielles oxydatives » qui conduisent par exemple à l'oxydation en une étape de l'éthanol en l'acétate, du glucose en gluconate, du glycérol en DHA, de D-sorbitol en L-sorbose et d'autres encore.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, la bactérie acétique *G. oxydans* était déjà utilisée pour la production industrielle de DHA à partir de glycérol, étant considérée comme l'un des micro-organismes les plus performants pour réaliser cette bioconversion. Toutefois, il n'existait que peu de données dans la littérature sur les aspects cinétiques et physiologiques de cette conversion. Mon travail a alors été orienté suivant trois axes :

- caractériser la cinétique de production de DHA à partir de glycérol chez cette bactérie, afin de mettre en évidence les éventuels effets inhibiteurs (substrat / produit) lors de ce procédé
- déterminer la contribution relative des voies cytoplasmique et membranaire dans l'utilisation du glycérol ainsi que le mode de régulation des différentes enzymes impliquées
- utiliser les connaissances produites pour mettre en œuvre un mode de conduite de fermentation optimisé pour réaliser cette bioconversion.

Cinétiques de conversion du glycérol en DHA

J'ai mené cette étude par une approche de génie microbiologique classique, basée sur la comparaison de paramètres cinétiques (productivités, vitesses spécifiques, rendements) de croissance,

de consommation de glycérol et de production de DHA. Ces données ont été déterminées au cours de fermentations réalisées dans des différentes conditions de culture : variation de la teneur initiale en glycérol ou présence de concentrations croissantes en DHA en début de culture.

Il est tout d'abord apparu (figure 1A) que l'augmentation de la teneur initiale en glycérol de 30 à 130 g/L se traduisait par une augmentation de la phase de latence de fermentation, et par une diminution marquée des productivités (31 %) et vitesses spécifiques (65 %). Cette inhibition des cinétiques de croissance et de production de DHA par la concentration en substrat a été modélisée. Différents modèles de la littérature qui permettent de décrire les phénomènes d'inhibition de l'activité microbienne par le substrat ont été testés. J'ai ainsi retenu des lois de type exponentiel (modèle d'Aïba and Shoda, 1968) pour traduire l'effet du glycérol au cours de la fermentation oxydative de ce composé par *G. oxydans* : $\mu = 0.53 \,.\, e^{-(\frac{S}{93.6})}$ et $q_p = 12.6 \,.\, e^{-(\frac{S}{76.7})}$. Ces équations permettent de décrire la décroissance asymptotique des paramètres spécifiques pour les fortes concentrations en glycérol et de montrer que le phénomène d'inhibition n'évolue pas de façon linéaire avec l'augmentation de la teneur en substrat. L'évolution des paramètres étudiés en fonction de la concentration en glycérol du milieu indique également un effet global de ce composé sur l'activité microbienne : il semble que de fortes teneurs en glycérol perturbent l'adaptation des cellules à leur environnement et la mise en place d'un régime microbien actif.

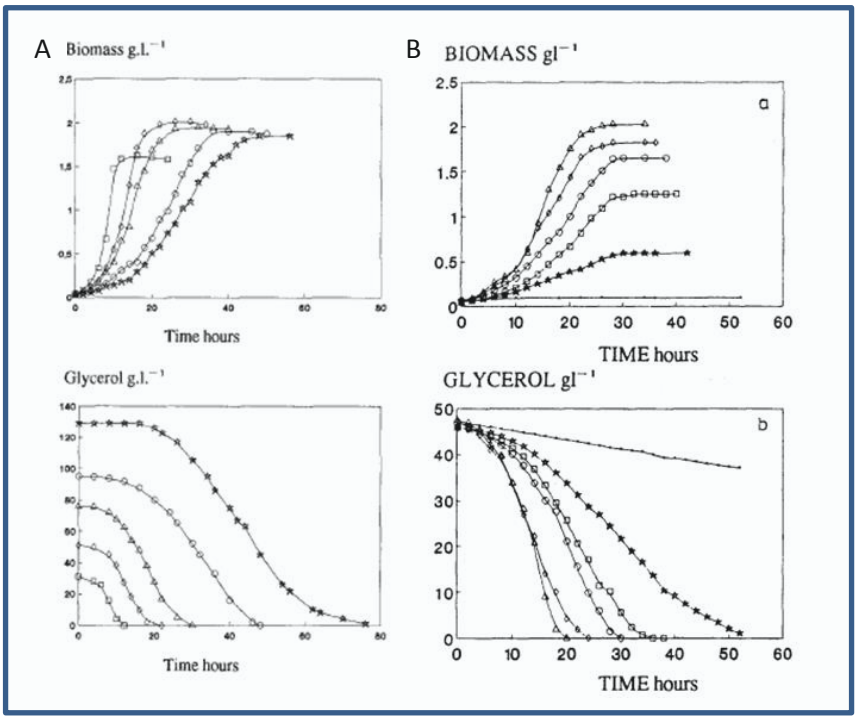


Figure 1. Etude cinétique de la conversion du glycérol en DHA chez *G. oxydans*. A. Effet de la concentration initiale en glycérol sur la formation de biomasse et la consommation de glycérol. Les cultures de *G. oxydans* sont réalisées sur milieu riche, contenant des concentrations croissantes en glycérol : (□) : 29 g/L ; (◇) : 51 g/L ; (Δ) : 76 g/L ; (○) : 95 g/L ; (✕) : 129 g/L. B. Effet de la concentration initiale en DHA sur la formation de biomasse et la consommation de glycérol. Les cultures de *G. oxydans* sont réalisées sur milieu riche, contenant 49 g/L de glycérol et des concentrations croissantes en DHA : (Δ) : 0 g/L ; (◇) : 14 g/L ; (○) : 26 g/L ; (□): 38 g/L ; (★) : 48 g/L ; (●) : 69 g/L.

Une limitation de la formation de biomasse autour de 2 g/L, qui n'a pu être attribuée à une limitation en élément nutritif, ainsi qu'un découplage partiel entre croissance cellulaire et production de DHA en fin de culture ont également été observés. Ces données suggèrent qu'un effet inhibiteur lié au produit, la DHA, se superpose à celui du glycérol. J'ai donc par la suite cherché à caractériser l'incidence de la teneur en DHA sur l'activité de *G. oxydans*.

La comparaison de cultures réalisées en présence de teneurs initiales croissantes en DHA (de 0 à 100 g/L, figure 1B), a permis de montrer le fort effet inhibiteur de la DHA qui se traduit par une augmentation de la durée de fermentation oxydative du glycérol (concentration fixe de 50 g/L) et une diminution progressive de l'activité cellulaire allant jusqu'à un arrêt de la croissance pour des teneurs initiales en DHA supérieures à 67 g/L et de l'oxydation de glycérol pour des concentrations initiales en DHA excédant 100 g/L. J'ai ensuite modélisé cette inhibition sur la croissance et sur l'oxydation de glycérol par des équations de type Levenspiel, qui traduisent les diverses observations biologiques : $\mu = 0.328 \,.\, (1 - \left(\frac{P}{87}\right))^{1.095}$ et $q_p = 7.\,(1 - \left(\frac{P}{96}\right))^{1.205}$.

Caractérisation des mécanismes impliqués dans les phénomènes d'inhibition par le glycérol et la DHA

La deuxième partie de mon travail a été d'identifier quels étaient les mécanismes physiologiques responsables des d'inhibitions par le glycérol et par la DHA sur la fermentation oxydative du glycérol par *G. oxydans*, que nous avons établis au cours de l'étude cinétique.

Dans un premier temps, la combinaison de plusieurs approches - dosages d'activités enzumatiques à partir d'extraits cellulaires bruts, analyse de l'effet d'agents découplants de la phosphorylation oxydative et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire sur les voies potentiellement impliquées dans le catabolisme du glycérol, mesures de concentrations intracellulaires en métabolites, caractérisation du mode de transport du substrat - a permis d'établir avec certitude le mode d'assimilation du glycérol chez cette bactérie (Figure 2).

L'oxydation du glycérol en DHA est exclusivement catalysée par la glycérol déshydrogénase membranaire, dont le fonctionnement est couplé à la chaîne respiratoire par l'intermédiaire de quinone et de cytochrome o (Ameyama et al., 1981). La DHA produite est alors directement excrétée dans le milieu de culture et n'intègre pas le métabolisme carboné central. En accord avec ces observations, aucune activité cytoplasmique glycérol déhydrogénase ou DHA kinase n'a été détectée chez cet organisme. Cette voie métabolique membranaire permet à la cellule d'assurer ses besoins énergétiques, puisqu'elle ne dispose pas de la voie de la glycolyse et de certaines enzymes du cycle des acides carboxyliques, qui assurent la production d'énergie chez la grande majorité des organismes vivants. Elle mobilise le flux majeur de glycérol consommé par la bactérie.

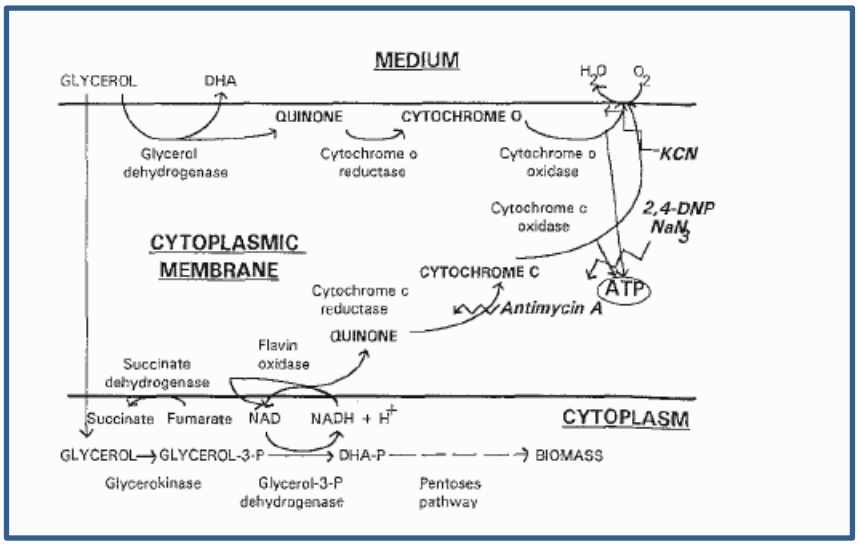


Figure 2. Assimilation du glycérol chez *G. oxydans*. Schéma récapitulatif des voies métaboliques impliquées dans l'assimilation de glycérol dans le cytoplasme pour la formation de précurseurs pour la biomasse et dans sa conversion membranaire en DHA. Cette dernière étape fournit à la cellule l'énergie nécessaire à la croissance et la maintenance cellulaire. Le mode d'action au niveau de ces voies des inhibiteurs de la chaîne respiratoire (antimycine A, cyanure de potassium KCN) et d'agents découplants de la phosphorylation oxydative (azide de sodium NaN3, 2,4-dinitroindophnol 2,4-DNP) est précisé par des flèches brisées.

Nous avons établi que le glycérol était importé dans la cellule par diffusion facilitée. Dans le cytoplasme, ce composé est catabolisé en DHA-phosphate par une glycérol kinase et une glycérol-3-phosphate déshydrogénase. La DHA-P est ensuite isomérisée en glyceraldéhyde-3-phosphate pour rejoindre la voie des pentoses-phosphate et permettre la synthèse de précurseurs nécessaires à l'anabolisme. Le flux au travers de cette voie représente moins de 10 % du glycérol consommé.

Nous avons ensuite cherché à identifier quels pouvaient être le mode de régulation du glycérol et de la DHA des enzymes impliquées dans ces voies.

Le glycérol est une molécule considérée comme dépresseur de l'activité de l'eau (a_w), qui peut limiter la disponibilité en eau pour le développement cellulaire conduisant à un ralentissement de l'activité des microorganismes (Beuchat, 1983). L'analyse comparative des effets d'une diminution de l'a_w par le glycérol à celle provoquée par d'autres solutés a montré que sur l'inhibition par le glycérol des cinétiques de croissance et de production de DHA par *G. oxydans* était essentiellement due à la diminution de l'a_w du milieu. La faible valeur de l'a_w de milieux contenant de fortes concentrations en glycérol conduit à une période d'adaptation des cellules au milieu importante et ralentit les cinétiques microbiennes. Par contre, nous avons établi que le glycérol n'avait pas de rôle régulateur de l'activité de la majorité des enzymes impliquées dans le transport et le catabolisme du glycérol. Seul, une faible inhibition de la fructose-1,6-diphosphatase a été mise en évidence.

Mes travaux ont également montré, qu'à l'inverse du glycérol, la DHA exerçait une inhibition marquée sur l'ensemble des enzymes de transport et de conversion du glycérol. Par exemple, au cours cultures réalisées en présence de 30 g/L de DHA, l'activité spécifique de la glycérol-3-phosphate membranaire

est 4 fois plus faible que celle obtenue sur des cultures sans ajout initial de DHA. De plus, l'activité *in vitro* de cette enzyme est diminuée de moitié en présence de 0.5 M de DHA.

Nous avons observé que l'intensité de l'inhibition augmentait avec le temps de mise en contact de l'enzyme avec la DHA et variait avec la nature de l'enzyme. La DHA est décrite comme une molécule fortement réactive avec les protéines : elle se combine avec les acides di-aminés, notamment l'arginine, pour former des bases de Schiff, ce qui est à l'origine de ses propriétés tannantes (Meybeck, 1977 ; Blazejak et Sobcjak, 1988). Il est donc probable que l'effet de la DHA soit lié à une interaction directe de cette molécule avec les acides aminés du site catalytique des enzymes, l'intensité de l'inhibition dépendant alors de la composition en acides aminés et de l'accessibilité de ce site.

Optimisation du procédé de bioconversion du glycérol en DHA par G. oxydans

La dernière partie du projet portant sur le métabolisme oxydatif du glycérol a consisté à reconsidérer les concepts de culture de *G. oxydans* sur glycérol pour la production industrielle de DHA, qui était alors réalisée en culture batch, à partir des nouvelles connaissances acquises.

Dans un premier temps, afin de pallier les problèmes d'inhibition par le substrat, un fermenteur de type fed-batch a été développé. Une culture de *G. oxydans* est initiée en batch, pendant environ 10 h, sur un milieu contenant une faible teneur en glycérol (30 g/L), puis du glycérol est apporté en continu, à une vitesse de 6.5 g/L/h -proche de la vitesse maximale de consommation de glycérol observée en batch, qui est de 5.2 g/L/h- pendant 18 h. Ce système, en évitant l'accumulation de substrat dans le milieu, a permis d'améliorer de façon significative les performances de la fermentation oxydative du glycérol (tableau I).

Tableau I. Comparaison des performances fermentaires au cours de la conversion de glycérol en DHA par G. oxydans au cours de cultures en mode batch, fed-batch et bi-phasique mono-étagé.Assimilation du glycérol chez *G. oxydans*. .

	Batch	Fed-batch	Biphasique mono-étagé
Glycérol consommé (g/L)	95	127	120
DHA produite (g/L)	92.5	108	110
Durée (h)	60	40	32
Productivité (g/L/h)	4.0	7.2	7.3
Rendement (g/g)	0.97	0.85	0.91

Cependant, en fin de culture, un ralentissement de l'activité biologique, probablement lié à forte toxicité de la DHA, est observé et la bioconversion cesse alors que la totalité du glycérol apporté n'est pas consommé et les rendements de conversion sont moins élevés que pour le mode batch.

Des essais en mode continu n'ont pas permis de s'affranchir de l'inhibition par la DHA : la concentration critique en DHA conduisant à un arrêt de la croissance cellulaire est dans ce cas de 30 g/L, contre 67 g/L pour des cultures en batch : cette différence a été attribuée à un temps de mise en contact des cellules avec la DHA beaucoup plus important en mode continu.

L'ensemble de notre expérience sur la fermentation oxydative du glycérol par *G. oxydans* nous a conduit à penser que le principal verrou de cette conversion était l'obtention et le maintien d'une population cellulaire concentrée et active. Nous avons alors envisagé de développer un procédé en deux phases : la première phase consiste en une croissance sur un substrat non glycérique favorable à la croissance : le mannitol (25 g/L, 10 h), puis la population cellulaire est utilisée en catalyseur pour la conversion de glycérol, apporté en continu (6.5 g/L/h) en DHA. Ce système a permis une conversion totale du glycérol apporté (rendement de conversion équivalent au mode batch) tout en maintenant une productivité élevée.

3. Réduction du glycérol en 1,3-propanediol par les bactéries anaérobies

La réduction du glycérol en 1,3-PPD, et plus généralement le métabolisme fermentaire du glycérol par des bactéries, étaient des thèmes de recherche relativement récents au moment de ma formation doctorale, puisque la plupart des travaux sur ce sujet dataient de moins de 5 ans. Le point clef qui ressortait des données de la littérature était le rôle majeur de la conservation de l'équilibre d'oxydoréduction de la cellule dans l'orientation et le contrôle du catabolisme anaérobie du glycérol. En effet, la production de l'énergie requise pour assurer la croissance et le maintien des fonctions cellulaires implique des réactions d'oxydation, ce qui conduit à la production d'acides gras à courte chaîne (acide acétique, propionique, butyrique) et à un excès d'équivalents réducteurs (NADH, NADPH). Ainsi, la croissance bactérienne sur glycérol n'est possible qu'en présence d'un système accepteur d'équivalents réducteurs, qui peut être un co-substrat moins réduit que le glycérol (fumarate, CO_2 ou SO_2), ou une voie métabolique consommatrice de coenzymes réduits, comme la voie de réduction du glycérol en 1,3-propanediol. Cette conversion met en jeu une glycérol déshydratase, qui conduit à la formation d'hydroxypropanal, et une 1,3-PPD oxydoréductase, qui catalyse la réduction de l'intermédiaire aldéhyde en régénérant du NAD. Cette voie métabolique se rencontre chez un nombre limité d'espèces bactériennes : *Klebselliae pneumoniae* (Forage et Foster, 1982), *Citrobacter freundii* (Homann et al., 1990), certains *Clostridii* (Forsberg, 1987), comme *Clostridium butyricum*. J'ai par ailleurs montré au cours de mon stage de DEA que la bactérie anaérobie stricte *Clostridium acetobutylicum*, dépourvue de 1,3-PPD oxydoréductase, était incapable de croître sur glycérol comme seule source de carbone et d'énergie.

En parallèle, au cours de travaux portant sur la caractérisation du métabolisme de flores mixtes utilisées pour la dépollution de résidus de distilleries vinicoles –riches en glycérol-, des écosystèmes

microbiens issus de fermenteurs de méthanisation ont été décrits comme accumulant transitoirement du 1,3-PPD (Qatibi et Bories, 1988).

Compte-tenu de ces éléments, il nous est paru intéressant d'utiliser les capacités de cette flore microbienne à produire du 1,3-PPD à partir de glycérol comme point de départ de l'étude du métabolisme fermentaire ce composé. Ma démarche a donc consisté, dans un premier temps, d'établir la capacité du consortium microbien à utiliser le glycérol comme source de carbone et d'énergie, à le convertir 1,3-PPD et de déterminer les conditions environnementales les plus favorables à cette transformation. J'ai ensuite poursuivi cette approche par l'identification des espèces majeures impliquées dans cette bioconversion et par la caractérisation de leur métabolisme.

Synthèse de 1,3-PPD par une flore microbienne mixte

Les profils métaboliques et bilans de conversion du glycérol ont permis de montrer que le 1,3-PPD était le principal produit formé par la flore microbienne, et cela quel que soit le pH de la culture (Tableau II), confirmant la présence au sein de la flore de bactéries possédant les deux enzymes (glycérol déshydratase, 1,3-PPD oxydoréductase) nécessaires à la réduction du glycérol. Des profils similaires sont obtenus pour des concentrations en glycérol variant entre 20 et 100 g/L.

Tableau II. Rendement de conversion de glycérol, vitesse de consommation de glycérol et de production de 1,3-PPD par une flore microbienne anaérobie. Les bilans ont été réalisés lors de cultures sur 20 g/L de glycérol à différents pHs.

pH	7.5	7	6	5
1,3-PPD (mM/mM_{GLY})	0.60	0.67	0.58	0.57
Acétate (mM/mM_{GLY})	0.08	0.05	0.08	0.05
Butyrate (mM/mM_{GLY})	0.05	0.05	0.16	0.18
CO_2 (mM/mM_{GLY})	0.02	0.02	0.35	0.33
H_2 (mM/mM_{GLY})	0.01	0.02	0.22	0.35
Biomasse (mM/mM_{GLY})	0.05	0.06	0.07	0.05
r_{GLY} (g/L/h)	2.9	3.9	3.5	1.9
$r_{1,3\text{-}PPD}$ (g/L/h)	1.8	2.6	2.1	1.2

La production de 1,3-PPD ainsi que la vitesse de consommation de glycérol sont optimales à pH 7. Cela semble indiquer que la réduction du glycérol est la voie métabolique la plus efficace pour régénérer l'excès d'équivalents réducteurs produits lors de l'oxydation du glycérol en acétate, butyrate et CO_2 via la synthèse de pyruvate (figure 3). Cette étape d'oxydation est toutefois nécessaire au fonctionnement cellulaire car elle apporte l'énergie et les précurseurs nécessaires à la croissance. Lorsque le pH

diminue, la flore réoriente son métabolisme vers l'acidogénèse, au cours de laquelle le squelette carboné du glycérol est converti en acides (butyrate, acétate) et CO_2 ; l'excès d'équivalents réducteurs est alors éliminé sous forme de dégagement de dihydrogène (H_2).

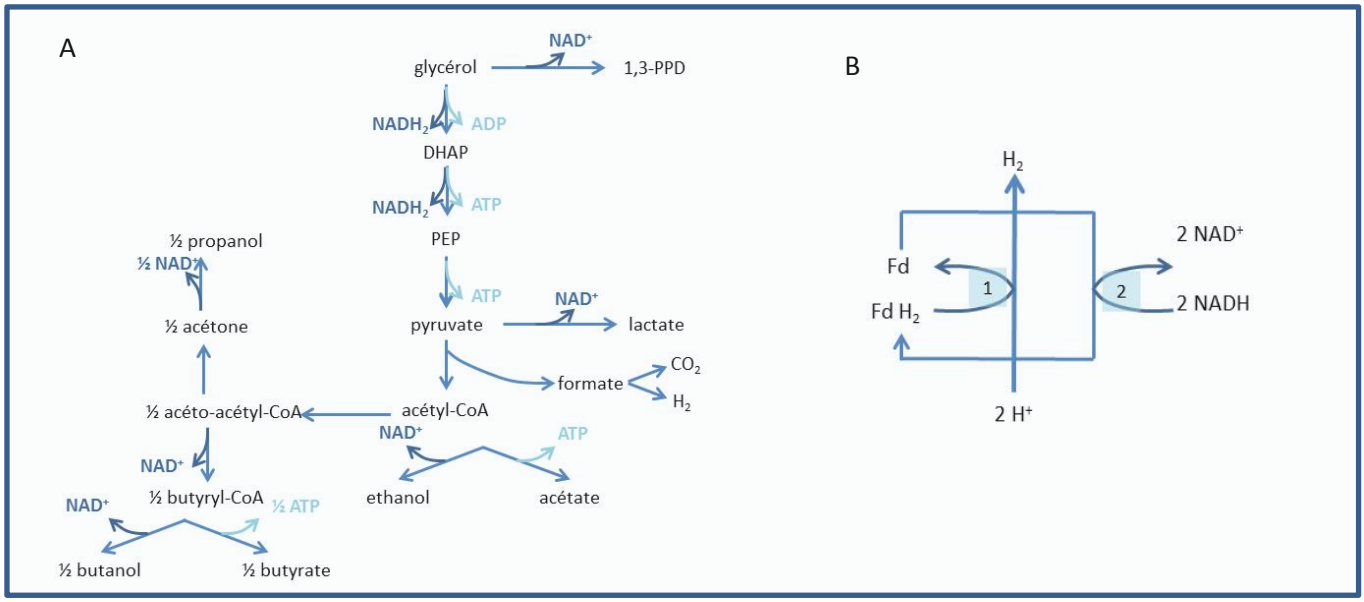


Figure 3. Conversion du glycérol en anaérobiose. A. Principales voies de conversion du glycérol en anaérobiose. Ce mode d'assimilation correspond en particulier au métabolisme anaérobie du glycérol des Clostridies. B. Système de régénération du NAD par le système à ferrédoxine. La réduction des ferrédoxines est souvent associée à la conversion du pyruvate en acétyl-CoA. 1. hydrogénase ; 2. NADH ferredoxine oxydoréductase.

Identification des bactéries responsables de la conversion du glycérol en 1,3-PPD

J'ai ensuite décidé d'isoler et d'identifier les principaux microorganismes responsables de la production de 1,3-PPD au sein de la population microbienne. Ce choix a été motivé tout d'abord par le nombre limité d'organismes décrits pour réaliser cette conversion. Parmi eux, certains sont anaérobies stricts ou pathogènes, ce qui rend difficile leur utilisation en biotechnologie. D'autre part, la mise en œuvre d'une population mixte dans un procédé industriel de bioconversion présente des inconvénients majeurs, liés au risque de déstabilisation de l'équilibre entre les différentes espèces du consortium microbien.

Ainsi, l'enrichissement de la flore en microorganismes capables de réduire le glycérol en 1,3-PPD a été réalisé par repiquages successifs (24 h) sur un milieu contenant 20 g/L de glycérol à pH 7, et deux espèces microbiennes ont pu être identifiées (par des techniques d'identification microbiologique classique) : la bactérie anaérobie stricte *Clostridium butyricum*, déjà citée dans la littérature comme productrice de 1,3-PPD, et l'entérobactérie anaérobie facultative *Enterobacter agglomerans* (qui a été déposée à l'Institut Pasteur sous le n° CNCM 1.1210) dont les potentialités à réduire le glycérol en 1,3-PPD ont été établies pour la première fois par notre étude.

Synthèse de 1,3-PPD par Cl. butyricum et E. agglomerans

Suite à l'isolement et l'identification de ces deux micro-organismes, j'ai initié une thématique de recherche visant à caractériser leurs voies d'assimilation du glycérol et à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'orientation de leur métabolisme, et en particulier le rôle joué par la nécessité de maintenir l'équilibre d'oxydoréduction cellulaire. Ce travail, que j'ai débuté à la fin de ma formation doctorale et qui a été poursuivi dans le cadre d'une thèse (F. Barbirato), a été mené par la détermination des profils métaboliques et bilans de conversion du glycérol par ces souches, combinée, dans le cas d'*E. agglomerans* dont le métabolisme du glycérol n'avait jamais été décrit, à des expériences de filiation de ^{13}C-glycérol, des dosages d'activités enzymatiques et de métabolites intracellulaires.

Nous avons ainsi tout d'abord montré que le métabolisme du glycérol de la souche isolée de *Cl. butyricum* se différenciait de celui des autres Clostridies par l'absence de formation d'acétate (Forsberg, 1987 ; Bielb, 1992)). Ainsi, la production de l'ATP requis pour la croissance est exclusivement assurée par l'oxydation de glycérol en butyrate. Ce schéma métabolique permet de limiter la quantité d'équivalents réducteurs produits par mole d'ATP (2/5 mole d'équivalents réducteurs formés par mole d'ATP au cours de la synthèse de butyrate contre 2/3 dans le cas de l'acétate, figure 3A). Par contre, le fraction de glycérol nécessaire à la formation d'ATP (2/5 mole de glycérol / mole ATP) est plus importante lorsque du butyrate est formé, par rapport à la voie de biosynthèse de l'acétate (1/3 mole de glycérol / mole d'ATP).

Tableau III. Profil de conversion de glycérol par *Cl. butyricum*. Les bilans ont été réalisés lors de cultures sur 20 g/L de glycérol à différents pHs.

pH	7.5	7	6	5.5
Glycérol consommé mM	201	211	193	199
1,3-PPD mM	132	140	128	105
Butyrate mM	29	27	27	28
CO_2 mM	12.5	31	51	71
H_2 mM	1.5	1.5	8	52

Au cours du catabolisme du glucose, *Cl. butyricum* utilise classiquement un système à ferrédoxine, qui met notamment en jeu une NADH ferredoxine oxydoréductase et une hydrogénase (figure 3B), pour régénérer l'excès d'équivalents réducteurs (NADH) en libérant de l'hydrogène gazeux. Ce système ne suffit pas à maintenir l'équilibre d'oxydoréduction cellulaire lors de la croissance sur glycérol, le catabolisme de ce substrat générant une formation d'équivalent réducteurs deux fois plus importante

que celui du glucose. Ainsi, cette bactérie dispose d'un système alternatif propre au catabolisme du glycérol, qui consiste en la réduction NADH-dépendante de ce composé en 1,3-PPD.

Nous avons montré que la contribution de système au maintien de l'équilibre rédox variait avec le pH de la culture (tableau III). A pH élevé, les équivalents réducteurs sont exclusivement régénérés par la production de 1,3-PPD, comme l'indique l'absence de dégagement d'hydrogène, ce qui conduit à une croissance optimale. Par contre, à pH plus bas, la formation de 1,3-PPD est diminuée et le système a ferrédoxine participe à la régénération du NAD.

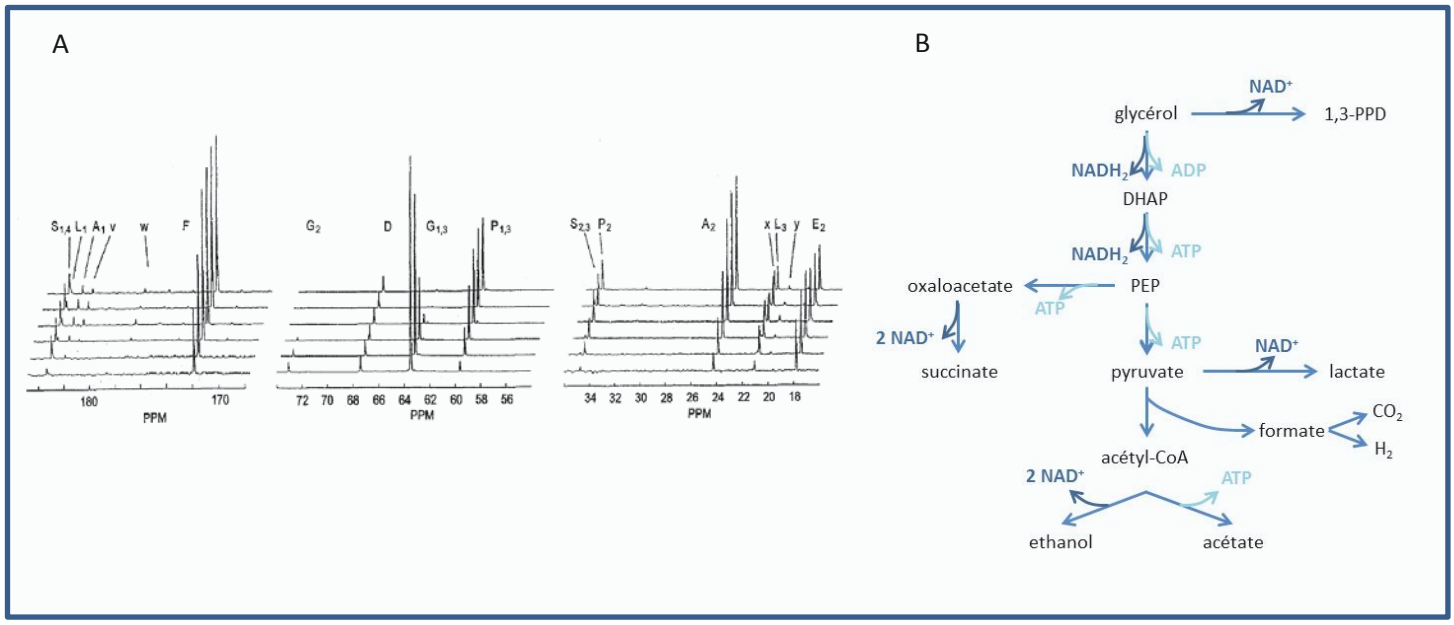


Figure 4. Métabolisme du glycérol chez *E. agglomerans*. A. Spectres RMN d'extraits d'acide perchlorique provenant de surnageants de culture de *E. agglomerans* sur 30 g/L de glycérol dont 10 % de 1, 3 - [13C] glycérol. Les échantillons ont été prélevés après 10.5 ,13.5, 16.5, 19.5, 23 et 49 heures (de bas en haut). Les signaux principaux ont été assignés comme suit : A, acétate ; G, glycérol ; P, 1,3-PPD ; L, lactate ; S, succinate ; E, éthanol ; F, formate ; v, w, x, y, inconnues. B. Voies métaboliques impliquées dans l'assimilation du glycérol.

Les voies métaboliques impliquées dans la conversion du glycérol chez *E. agglomerans* ont été également démontrées, en utilisant notamment des approches de traçage à partir de ^{13}C-glycérol (30 g/L) vers les produits de fermentation (figure 4). Au niveau de la distribution des flux au travers de ces voies, nous avons ainsi montré que la production d'acétate était la voie majoritaire de production d'énergie pour la croissance. L'excès de cofacteurs réduits formés au cours de cette conversion est régénéré par la formation de 1,3-PPD (54 %) et dans une moindre mesure par la synthèse d'éthanol (32 %) et de lactate (9%). Le bilan global de conversion du glycérol chez E. agglomerans peut ainsi être résumé par l'équation :

l glycérol ⇨ 0.51 1,3-PPD + 0.18 acétate + 0.33 formate + 0.09 lactate + 0.02 succinate + 0.15éthanol + 0.04 biomasse

Nous avons également attribué l'augmentation du rendement de production en 1,3-PPD, observée lorsqu'on augmente la teneur en glycérol du milieu ou pour des cultures continues à taux de dilution élevés, à une augmentation importante de la proportion relative de glycérol déshydratase (qui catalyse la première étape de formation de 1,3-PPD) par rapport à la glycérol déshydrogénase (qui conduit à la formation de l'intermédiaire pyruvate).

6. Vers une vision intégrée du métabolisme et de la physiologie des levures œnologiques.

En 1993, en intégrant l'équipe MTF de l'Institut des Produits de la Vigne (INRA, Montpellier) dirigé par Pierre Barre, j'ai changé de modèle d'étude, des bactéries vers les levures œnologiques. Toutefois, j'ai gardé une continuité dans les questionnements scientifiques abordés et les approches mises en œuvre : le fil conducteur de mes activités de recherche est toujours resté la compréhension de la physiologie, du métabolisme microbien et de leur régulation.

1. Quelques éléments de contexte

L'activité de recherche de mon laboratoire d'accueil est focalisée sur l'étude de l'implication de *S. cerevisiae* dans la filière œnologique, en tant que principal agent de la fermentation des sucres en éthanol, CO_2 et autres métabolites. La mise en œuvre de micro-organimes dans ce secteur présente des spécificités liées aux conditions environnementales, qui sont relativement stringeantes vis-à-vis du développement microbien. En effet, le moût de raisin est un milieu acide (pH de l'ordre de 3.3), faiblement oxygéné et contenant de fortes teneurs en sucres (200 à 260 g/L d'un mélange équimolaire de glucose et de fructose), qui expose les cellules à des stress acide, osmotique et d'anaérobiose dès le début du procédé. De plus, les faibles concentrations en azote et en vitamines conduisent rapidement à des limitations nutritionelles. Enfin, l'accumulation d'alcool génère un stress éthanol en fin de fermentation. Cela a amené le vinificateur à recourrir de plus en plus à la pratique du levurage. Cette technique consiste à inoculer massivement le moût de raisin par une souche de levure sélectionnée. Initialement, ces souches, dites commerciales œnologiques, étaient choisies pour leur adapatation au milieu et leurs performances fermentaires. Mais des souches présentant d'autres propriétés technologiques, notamment en lien avec la qualité du produit comme par exemple des levures faibles productrices d'acétate, ont ensuite été recherchées.

Dans ce cadre, les objectifs globaux des travaux réalisés dans mon unité de rattachement sont de définir, à partir de l'acquisition de connaissances génériques sur la fermentation alcoolique par les levures œnologiques, des stratégies visant à mieux contrôler ce procédé et à l'optimiser. Deux types d'approches, qui sont complémentaires, sont priviligiées :

- agir sur le mode de conduite de fermentation, en jouant par exemple sur les conditions environnementales (ajouts d'éléments nutritifs, d'oxygène…)
- intervenir sur la souche de levure utilisée, en selectionnant/modifiant/améliorant ses propriétés.

Pour mener à bien ces projets, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'orientation du métabolisme fermentaire de la levure ainsi que les bases moléculaires responsables des propriétés spécifiques des souches œnologiques. Ces deux thématiques ont donc constitué le cœur de mon activité de recherche depuis j'ai rejoint l'INRA. Cependant, les projets que j'ai développés et les approches que j'ai mises en œuvre ont évolué tout au long de mon parcours scientifique avec, d'une part, la demande de la filière vers des critères de production durable et de qualité des produits, et d'autre part, les outils et méthodologies d'étude du métabolisme et de la physiologie levurienne.

Par souci de clarté, je retracerai par la suite mon activité de recherche de façon non exhaustive. En effet, compte-tenu du positionnement de mes thématiques de recherche et de mes compétences au sein de mon unité, je suis amenée à intervenir sur les aspects liés à la physiologie et au métabolisme de la levure, de façon plus ou moins ponctuelle, dans un nombre assez important de programmes. Les projets retenus me permettront d'illustrer l'évolution de mon activité, des approches réductionnistes d'étude d'une voie métabolique ciblée, vers une démarche globale d'analyse du fonctionnement du métabolisme de la levure au cours de la fermentation œnologique.

2. Métabolisme des acides organiques

Une des problématiques majeures de la recherche en œnologie au moment de mon recrutement à l'INRA portait sur la gestion de l'acidité des vins, et notamment des teneurs en acides malique et lactique. L'acide malique est un diacide, décrit comme ayant un goût astringent et agressif (Ribérau-Gayon et al., 2012). De plus, n'étant que très partiellement consommé par *S. cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique, il est considéré comme un facteur d'instabilité pour les vins, notamment les vins rouges : sa présence peut permettre le développement de contaminants bactériens leur apportant des défauts organoleptiques. A l'inverse, l'acide lactique est un monoacide, qui apporte des sensations de rondeur et de douceur, et contribue à l'équilibre gustatif du vin.

Réaliser la fermentation malolactique en utilisant une souche de S. cerevisiae

Les bactéries lactiques des genres *Lactococcus Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont capables de réaliser la fermentation malo-lactique, c'est-à-dire de décarboxyler l'acide malique en acide lactique (Kunkee, 1991). Cette transformation est fortement recherchée au cours de l'élaboration de

certains vins, car elle conduit à la fois à leur stabilisation microbiologique et à leur désacidification naturelle. Toutefois, cette fermentation spontanée par les bactéries lactiques, reste difficile à contrôler et maîtriser dans le contexte œnologique.

La stratégie qui a alors été développée par Sylvie Dequin et Pierre Barre pour fiabiliser le procédé de fermentation malolactique en œnologie a été de construire par ingénierie métabolique une souche de levure capable de convertir l'acide malique en acide lactique simultanément à la fermentation alcoolique. Pour cela, le gène hétérologue de l'enzyme malolactique de *Lactococcus lactis, mleS,* a été cloné, séquencé et exprimé chez *S. cerevisiae* à l'aide d'un plasmide multi-copies (souche *S. cerevisiae* / pM1, Ansanay et al., 1993). Toutefois, la conversion de l'acide malique exogène en acide lactique par la souche génétiquement modifiée reste très, bien que l'expression hétérologue de l'enzyme malolactique dans ce microorganisme soit satisfaisante. Des problèmes d'ordre physiologique semblent donc être à l'origine de la limitation du transfert de l'activité malolactique dans les souches de *S. cerevisiae*.

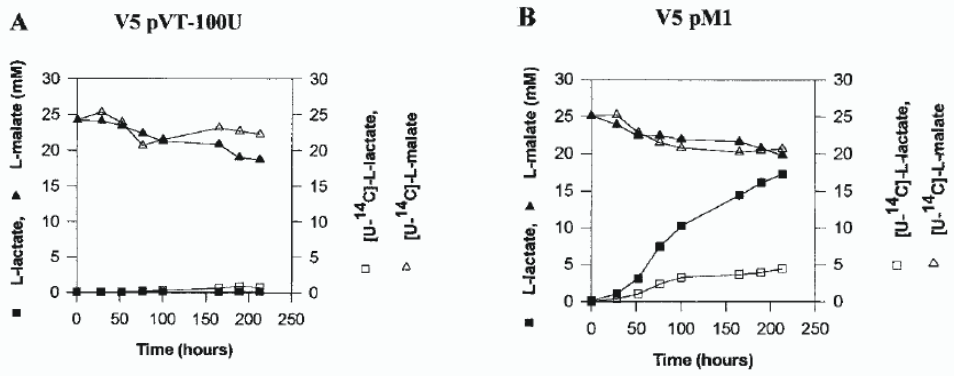
Dans ce contexte, j'ai initié une thématique de recherche visant à étudier le métabolisme et l'utilisation de l'acide malique par des souches *S. cerevisiae* génétiquement modifiées ou non.

FLUX METABOLIQUES DE PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR LA SOUCHE *S. CEREVISIAE* EXPRIMANT LE GENE DE L'ENZYME MALOLACTIQUE BACTERIENNE

D'un point de vue phénotypique, la souche *S.cerevisiae* / pM1 se caractérise par une production notable d'acide lactique (0.52 g/L), qui ne peut être expliquée par la seule dégradation de l'acide malique exogène qui lui est simultanée (0.13 g/L). J'ai utilisé des approches de filiation isotopique réalisées soit à partir de ^{14}C-acide malique, soit à partir ^{13}C(2)-glucose pour déterminer, de façon quantitative, l'origine de l'acide lactique produit par les souches recombinantes (Ansany et al. 1996). Les expériences de traçage par du ^{13}C se sont inscrites dans le cadre de l'AIP "RMN-Microorganismes anaérobies" (n° 93/4934), et ont fait l'objet d'une collaboration avec le Pr. J.P. Grivet, spécialiste de la RMN métabolique (Laboratoire de biophysique moléculaire, CNRS Orléans), qui a assuré la partie analytique du programme.

La combinaison des données quantitatives (figure 5) a permis de montrer que, chez les souches recombinantes :

- seule une fraction limitée de l'ordre de 25 % de l'acide lactique est formée à partir d'acide malique exogène (traçage ^{14}C)
- l'acide lactique est majoritairement formé (75 %) à partir de glucose via la formation d'acide malique endogène (filiation à partir de ^{13}C-glucose).



C

Culture harvest time (h)	Malate (mM) 1-13C labelling	2-13C labelling	3-13C labelling	4-13C labelling	Total	Lactate (mM) 1-13C labelling	2-13C labelling	3-13C labelling	Total
Without labelled glucose									
0	0·2	0·2	0·2	0·2	21	0	0	0	0
192	0·2	0·2	0·2	0·1	17	0·4	0·3	0·2	23
With labelled glucose									
0	0·3	0·3	0·2	0·3	20	0	0	0	0
192	0·4	0·3	0·3	0·3	15	0·3	9	0·4	29

Figure 5. Analyse quantitative de métabolisme de l'acide malique chez *S. cerevisiae* par filiation isotopique. Filiation à partir de ^{14}C-malate exogène vers l'acide lactique par les souches de *S. cerevisiae* V5 pVT100-U –souche témoin (A) et V5 pM1, exprimant une enzyme malolactique hétérologue (B). Les cultures ont été réalisées sur un milieu minimal contenant 200 g/L de glucose et 3 g/L de [U-^{14} C]-malate (radioactivité spécifique : 0,04 mCi / mmol). C. Traçage ^{13}C à partir de glucose vers les acides malique et lactique au cours de la fermentation par la souche recombinante V5 pM1. Les cultures ont été réalisées sur milieu minimal contenant soit 20 % de glucose non marqué, soit 10% de [2 – ^{13}C] glucose et 10% de glucose non marqué, en présence de 0,3% d'acide malique. L'incorporation de l'isotope ^{13}C dans les acides malique (C1 à C4) et lactique (C1 à C4) a été déterminée par spectroscopie RMN (C1, C2, C3, C4). Pour réaliser les bilans de conversion, les concentrations totales en acides sont mesurées par dosage enzymatique.

Les souches de *S. cerevisiae* recombinantes sont donc capables de réaliser la fermentation malolactique à un niveau conséquent à partir d'acide malique endogène. La limitation du flux de conversion de l'acide malique exogène ne peut donc être due à un niveau d'expression trop faible de l'enzyme hétérologue codée par *mleS* dans la levure ou à des problèmes de disponibilité en cofacteurs. En parallèle, nous avons mesuré de faibles concentrations intracellulaires en acide malique chez *S. cerevisiae* tout le long de la fermentation alcoolique. Nous avons alors envisagé l'hypothèse d'une d'accessibilité réduite de l'enzyme malolactique à l'acide malique exogène, liée à un faible flux global d'entrée de cet acide organique dans les cellules. De ce fait, j'ai orienté mes recherches vers la caractérisation des phénomènes d'échange d'acide malique entre la cellule et le milieu extérieur.

De plus, en marge des réponses aux problèmes initialement posés, les approches de filiation nous ont apporté certaines indications quant à la contribution de certaines voies au métabolisme fermentaire de la levure. Ces données suggèrent en effet que l'acide malique est majoritairement

produit à partir de l'acide oxaloacétique obtenu par carboxylation de l'acide pyruvique (pyruvate carboxylase) et que le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) n'est pas entièrement fonctionnel. Ces observations ont été le point de départ d'un projet de recherche dédié à la caractérisation du fonctionnement du cycle TCA en fermentation.

SYSTEMES D'ECHANGE DE L'ACIDE MALIQUE AU TRAVERS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

Il s'agissait tout d'abord d'établir l'existence et de caractériser les systèmes de transport de l'acide malique chez *S. cerevisiae* (entrée et sortie) au cours de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques. Dans un premier temps, l'usage de vésicules reconstituées de membranes plasmiques a été envisagé pour mettre en évidence les échanges transmembranaires de d'acide malique chez *S. cerevisiae*. Cet outil biologique, utilisé pour des mesures de flux, autorise une caractérisation séparée des deux composantes potentielles (entrée et sortie) du transport et présente l'avantage de s'affranchir de tout métabolisme. En effet, l'acide malique peut être catabolisé par la levure en tant qu'intermédiaire du cycle TCA ou par l'enzyme malique, qui le convertit en acide pyruvique (Boles et al., 1998), ce qui peut interférer avec les mesures d'activité de transport sur cellules entières.

Pour cela, j'ai implanté cette technique au laboratoire et établi sa validité pour étudier les flux transmembranaires chez *S. cerevisiae* au cours de la fermentation œnologique. Au cours de cette mise au point méthodologique, qui a été couteuse en terme de temps, j'ai pu mettre en évidence pour la première fois l'existence d'un système d'échange K^+/H^+, localisé dans la membrane plasmique de *S. cerevisiae*. La caractérisation physiologique de ce transporteur, réalisée en appliquant une méthode de mesure de flux de protons par sondes fluorescentes à des vésicules reconstituées, a permis de montrer qu'il fonctionnait en tant qu'antiport et qu'il était impliqué dans la régulation du pool intracellulaire en potassium (Camarasa et al., 1996).

Pour mettre en évidence des flux (entrée ou sortie) d'acide malique chez la levure, la méthodologie de vésicules reconstituées a ensuite été combinée soit à des mesures de flux directes, par suivi de l'incorporation ou de l'efflux de ^{14}C-malate, soit à des mesures de flux de protons associés au transport d'une des deux formes anioniques de l'acide malique détectés par spectro-fluorimétrie. Toutefois, dans aucun des cas, l'existence de système de transport de l'acide malique (entrée ou sortie) n'a pu être mise en évidence. Ces résultats indiquent que, s'ils existent, les échanges d'acide malique restent limités dans les souches de *S. cerevisiae*, et ne peuvent donc par être détectés à partir de vésicules membranaires. Ils vont donc dans le sens d'une limitation du flux global d'entrée de l'acide malique due à une composante d'entrée peu active (probablement par simple diffusion de la forme protonée de l'acide).J'ai donc développé une autre approche, consistant à étudier le flux global d'acide malique sur cellules entières par traçage direct en utilisant de l'acide malique marqué au ^{14}C. L'entrée de l'acide malique chez *S. cerevisiae* a ainsi été caractérisée comme étant un phénomène de diffusion passive peu efficace de la

forme libre de l'acide. Cette étape a donc été définie comme étant un site potentiel d'intervention de la biologie moléculaire. La levure *Schizosaccharomyces pombe* dispose d'un système de transport de l'acide malique efficace, caractérisé comme étant un symport acide malique/proton (Sousa et al. 1992). En conséquence, une souche, exprimant le gène hétérologue de la malate perméase *MAE1* de *Sc. pombe* (mis à notre disposition par H. Van Vuuren) a alors été construite par l'équipe Génétique et Biologie Moléculaire par transformation de la souche de levure V5 par un plasmide multicopie YEp *MAE1*. J'ai ensuite établi que les capacités de transport de l'acide malique de la souche V5 YEp *MAE1* étaient fortement accrues par rapport à la souche de référence V5, et que dans cette souche, la protéine membranaire hétérologue Mae1p était le seul médiateur du transport de l'acide malique.

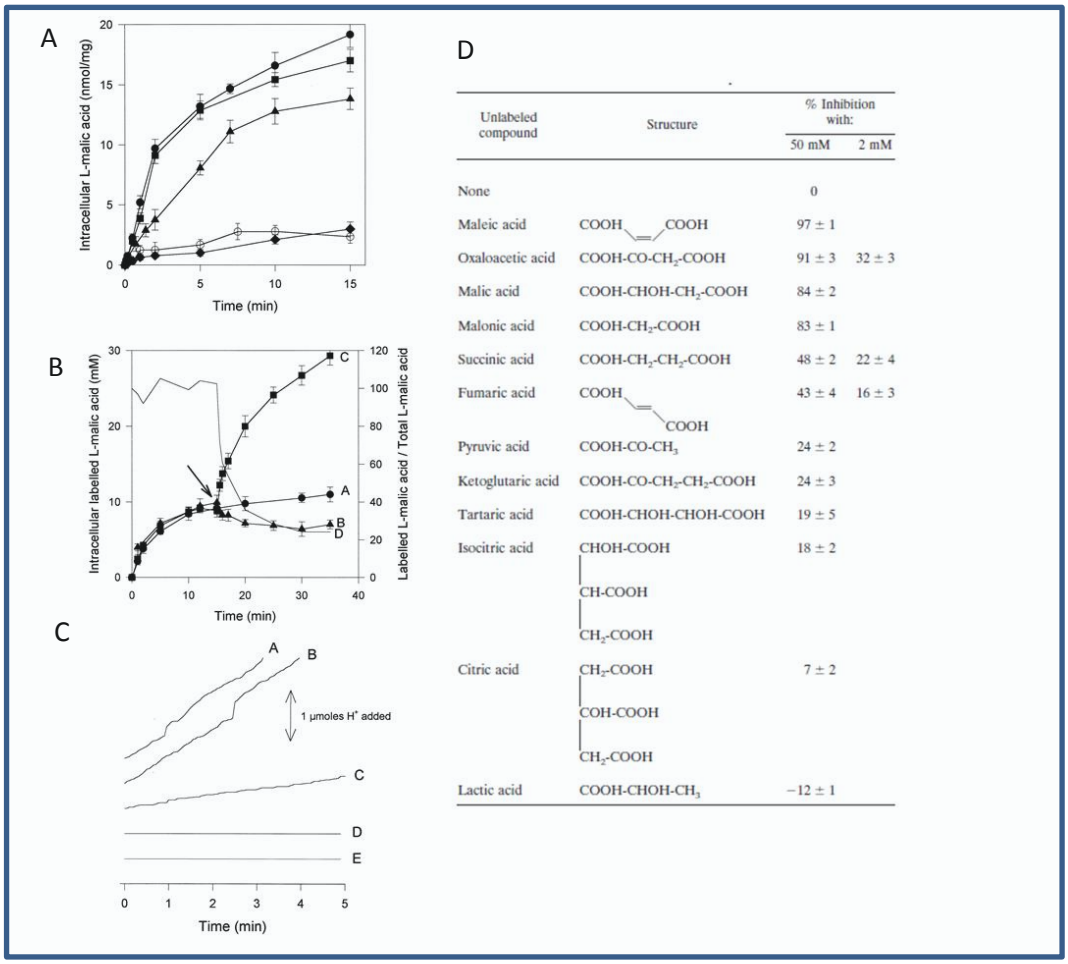


Figure 6. Caractéristiques du transport de l'acide malique par le transporteur hétérologue *MAE1* chez *S. cerevisiae*. A. Cinétique de transport de l'acide L-malique (16,6 mM), pH 3,5. L'ajout d'ionophores montre un transport dépendant de la force protomotrice. ○, V5 YEp, 10 mM de glucose; ▲, V5 YEp *MAE1*; ●, V5 YEp *MAE1*, 10 mM de glucose. ◆, V5 YEp *MAE1*, 10 mM de glucose et 100 pM CCCP; ■, V5 YEp *MAE1* 10 mM de glucose et 1 pM valinomycine. B. Réversibilité du transport de l'acide malique (2 mM) par Mae1p. V5 YEp *MAE1*, contrôle(A) ; la flèche indique l'addition d'acide malique non marqué (B) ou marqué au 14C ; évolution du ratio acide malique marqué par rapport à l'acide malique total. C. Flux de protons associés à l'entrée de à l'absorption d'acide L-malique (A) *Sc. pombe*, 16,6 mM acide malique (B) *Sc. pombe*, 10 mM de glucose, 16,6 mM acide malique (C) *Sc. pombe*, 10 mM de glucose, 1 mM acide malique malique (D) *S. cerevisiae* V5 YEp *MAE1*, 16,6 mM acide malique (B) *S. ceevisiae*, V5 YEp *MAE1*10 mM de glucose, 16,6 mM acide malique. D. Spécificité du transport par MAE1 dans la souche V5 YEp *MAE1.* Mesure de la vitesse spécifique d'entrée de 2mM de ^{14}C-malate en présence de 2 ou 50 mM d'acide organique. Les valeurs indiquent le pourcentage de diminution de vitesse d'entrée de l'acide malique marqué.

Cette souche constituait donc un outil biologique approprié pour l'étude des caractéristiques cinétiques et de fonctionnement du transporteur *MAE1*. Une part importante de mon activité de recherche a alors porté sur cette thématique (figure 6), ce qui m'a permis de valoriser les compétences que j'avais acquises dans le domaine de l'étude des transporteurs de levures depuis mon arrivée au laboratoire MTF, notamment la caractérisation des caractéristiques de fonctionnement des transporteurs par mesure de l'incorporation de molécules marquées au ^{14}C, et la détermination des flux de protons associés au transport de molécules ioniques (Camarasa et al., 2001).

Cette perméase transporte la forme mono-anionique de l'acide malique, en association avec un transport de proton (système de symport), avec une vitesse maximale apparente V_{max}^{ap} de 8.7 nmol/mg/min, une affinité apparente K_m^{ap} de 1.6 mM) et un pH optimal de 3.5. Ces propriétés, déterminées à partir la souche *S. cerevisiae* V5 YEp *MAE1*, sont proches de celles mesurées chez *Sc. pombe* (Osothsilp et al., 1986). Cela montre que les caractéristiques de la malate perméase sont conservées lorsque la protéine est synthétisée par l'organisme hôte. J'ai également établi que le transport de l'acide malique par Mae1p était accumulatif, réversible et dépendait à la fois du gradient transmembranaire en forme mono-anionique de l'acide malique et de la composante ΔpH de la force protomotrice membranaire. Les acides dicarboxyliques présentant un encombrement stéarique proche de l'acide malique, comme les acides maléique, oxaloacétique, malonique, succinique et fumarique, inhibent le transport de l'acide malique par Mae1p.

METABOLISME DE L'ACIDE MALIQUE CHEZ DES SOUCHES PRESENTANT UNE FORTE CAPACITE DE TRANSPORT DE L'ACIDE MALIQUE

En parallèle à ce travail de caractérisation du transporteur Mae1p, j'ai également analysé quelles étaient les conséquences de l'augmentation des capacités de transport de l'acide malique chez *S. cerevisiae* sur son métabolisme ultérieur dans la cellule.

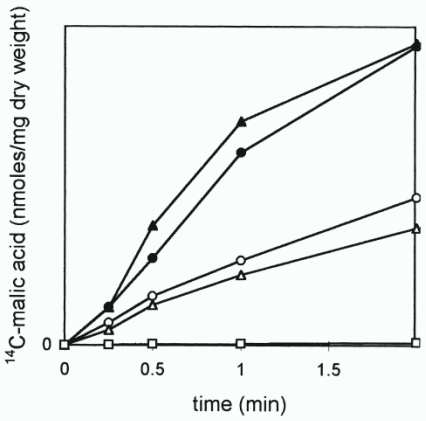
Une capacité de transport de l'acide malique accrue se traduit par une augmentation de la consommation de ce composé par la levure durant la fermentation alcoolique, de l'ordre de 2 g/L (comparaison des profils d'assimilation des souches V5 -témoin- et V5 YEp *MAE1*), sans affecter la croissance cellulaire. Toutefois, la consommation de l'acide exogène par cette souche n'est pas complète (présence de 1 g/L d'acide malique résiduel) et n'induit pas de modification notable du profil de production des métabolites. Cela indique que les souches sauvages de *S cerevisiae* ne possèdent pas de voie métabolique permettant un catabolisme efficace de l'acide malique.

Nous nous sommes alors intéressés au métabolisme de l'acide malique dans les souches dites 'malolactiques', co-exprimant les gènes *MAE1* (malate perméase) et *mleS* (enzyme malolactique) (Bony et al., 1997). Ce métabolisme présente un certain degré de complexité, tout d'abord parce qu'il existe

deux composantes contribuant à la formation du pool d'acide malique intracellulaire : le flux d'entrée de composé exogène par la malate perméase et la voie de biosynthèse endogène, à partir du glucose que nous avons précédemment caractérisée par traçage isotopique au ^{13}C. D'autre part, dans la cellule, cette molécule peut être utilisée par les voies propres de dégradation de la levure, qui existent bien qu'étant peu actives (cycle TCA, enzyme malique) et l'enzyme malolactique hétérologue.

Des études filiations ^{14}C ont permis de préciser les flux métaboliques autour de l'acide malique dans ces souches. Nous avons établi d'une part que plus de 90 % du flux total d'acide malique métabolisé était dégradé par l'enzyme malolactique. Cette donnée confirme un résultat que nous avions précédemment établi (Ansanay et al., 1996) qui indiquait que la compétition entre les enzymes endogènes de dégradation du malate et l'enzyme malolactique hétérologue était favorable à l'enzyme hétérologue. D'autre part, le niveau de formation d'acide lactique à partir de malate endogène (qui reste toutefois inférieur à 20%) dépend du ratio entre le nombre de copies du transporteur MAE1 et celui de l'enzyme malolactique de la souche.

A



B

Strain	^{14}C-lactate (mM) / ^{14}C-malate (mM/mM)	^{14}C lactate/ total lactate (mM /mM)	Total lactate (mM)
OL1a	95±3	84±3	25.2±0.5
OL1b	92±1	97±2	20.3±0.4
OL1e	104±4	83±1	25.3±0.9
OL1f	98±3	102±3	18.9±0.3

Figure 7. Métabolisme de l'acide malique chez des souches de S. cerevisiae exprimant une malate perméase et une enzyme malolactique hétérologues. . Cinétiques d'entrée de l'acide malique (traçage [^{14}C]-malate) (A) et bilan de conversion de l'acide malique (B) par des souches de *S. cerevisiae* co-transformées par les gènes *mleS* (enzyme malolactique bactérienne, contrôle promoteurs *PGK*) et *MAE1* (malate perméase de *Sc. pombe*, contrôle promoteurs *ADH1*).

OL1a (•, *MAE1* multi-copie, *mleS* multi-copie); OL1b (▲, MAE1 multi-copie, *mleS* mono-copie); OL1e (○, MAE1 mono-copie, *mleS* multi-copie), OL1f (△, MAE1 mono-copie, *mleS* mono-copie), OL1p (□, souche témoin).

Valeurs : moyennes et écart-type d'expériences en triplicat.

Ces résultats ont ouvert des perspectives technologiques intéressantes puisqu'ils ont contribué à préciser le nombre de copies des deux gènes à intégrer pour la construction d'une souche industrielle. Ainsi, une souche modèle, co-exprimant les gènes *MAE1* (malate perméase) et *mleS* (enzyme malolactique) et capable de réaliser une fermentation malolactique complète a été construite (Contrat de Recherche Société LALLEMAND n° B 3099). Cette souche n'a toutefois pas été commercialisée du fait des problèmes sociétaux d'acceptabilité des OGMs.

Déviation du flux carboné vers la formation d'acide lactique

En œnologie, la formation d'acides organiques, intermédiaires du cycle TCA, est souvent souhaitée car elle apporte une stabilité microbiologique au vin. D'autre part, le manque d'acidité peut entraîner un déséquilibre organoleptique du produit : on parle de manque de souplesse des vins. De tels problèmes sont fréquemment rencontrés lors de l'élaboration des vins dans les pays chauds. Malgré la possibilité d'une correction chimique de l'acidité, par ajout (règlementé) d'acide tartrique, une acidification biologique, et notamment la production d'acide lactique et succinique, est préférable.
La solution qui a été envisagée Sylvie Dequin, responsable des programmes de Génétique et de Biologie Moléculaire de mon unité, a été la construction, par ingénierie métabolique, d'une souche réalisant à la fois la fermentation alcoolique et la fermentation lactique (Dequin and Barre, 1994): il s'agit de dévier, à partir de l'acide pyruvique, une partie du flux carboné de la production d'éthanol vers celle d'acide lactique. Pour cela, le gène *ldh* de la lactate déshydrogènase NAD-dépendante de *Lactobacillus casei* a été exprimé, par l'intermédiaire d'un vecteur plasmidique multi-copie, chez la souche *S. cervisiae* V5. Sur le plan applicatif, outre son intérêt en tant qu'agent 'acidifiant', cette souche présente l'avantage de réduire la formation d'éthanol pour une même quantité de sucres consommés. Cela répond, dans un contexte d'augmentation du degré alcoolique des vins qui commençait à s'amorcer dans les années 1990, aux attentes qualitatives et de santé du consommateur et économiques du vinificateur.

Ma participation à ce projet a été de caractériser la physiologie et le métabolisme d'une souche *S. cerevisiae LDH*. Ce travail a été mené dans le cadre d'un DEA que j'ai encadré (Eric Rosenfeld, 1996). Nous avons, en premier lieu, quantifié la déviation du flux carboné induite par l'activité lactate déshydrogénase hétérologue chez la levure, qui est un système accepteur d'électrons compétitif du système endogène –production d'éthanol- au niveau de l'utilisation de l'acide pyruvique et de la régénération du NAD : ce système conduit à une déviation de 16 % (mM/mM) du flux de glucose vers la formation d'acide lactique au détriment de celle d'alcool. Toutefois, un brusque arrêt de la production d'acide lactique au cours de la phase stationnaire indique une limitation *in vivo* de l'activité lactate déshydrogénase. Nos travaux ont alors été orientés vers la compréhension des mécanismes intervenant *in vivo* dans la régulation de cette activité. D'un point de vue physiologique, la surproduction d'acide

lactique peut se traduire par une acidification cytoplasmique importante, inhérente à une accumulation intracellulaire d'acide lactique, mais aussi par une modification de l'état énergétique de la cellule.

Une accumulation transitoire, de l'ordre de 20 mM d'acide lactique a été mise en évidence. Toutefois, l'acide lactique a été décrit comme n'ayant qu'un très faible effet inhibiteur sur l'activité LDH (Hensel et al., 1977), et sa concentration intracellulaire ne peut contribuer au contrôle *in vivo* de l'activité. De la même façon, les hypothèses d'une limitation en fructose-di-phosphate, ou d'une inhibition par la dihydrxyacetone-phosphate ont été exclues , compte-tenu des concentrations intracellulaires de ces métabolites. Finalement, en lien avec le faible niveau d'accumulation d'acide lactique, le pH intracellulaire chez les souches V5 pVT LDH est comparable à celui de la souche contrôle tout le long de la fermentation. Le pH intracellulaire, qui varie entre de 7 en début de culture et à 5.75 en fin de fermentation, correspond à la gamme de pH optimal pour la LDH.

Par contre, les niveaux intracellulaires en NAD et en NADH mesurés chez la souche V5 pVT LDH, vont dans le sens d'une implication du ratio NAD/NADH (qui augmente d'un facteur 4 au moment de l'arrêt de la production d'acide lactique) dans la régulation de l'activité LDH *in vivo*. En effet, des mesures d'activités LDH réalisées *in vitro* nous ont permis de montrer que la lactate déshydrogénase de *L. casei* était inhibée par un fort ratio NAD/NADH, comme cela a été décrit pour la lactate deshydrogénase de *Lactococcus lactis* (Cocaign-Bousquet et al., 1997).

Cette étude m'a permis d'acquérir et/ou de renforcer mes compétences méthodologiques pour la caractérisation du métabolisme et de la physiologie des levures : mesure de pH intracellulaire, de concentrations intracellulaires en métabolites et cofacteurs, dosages enzymatiques *in vitro* …. Il m'a surtout conduit à mesurer l'importance de la disponibilité en cofacteurs rédox, et plus généralement, du maintien de l'équilibre rédox dans l'orientation du métabolisme chez la levure, comme je l'avais déjà observé dans le cas du métabolisme bactérien au cours de mon parcours doctoral.

Cycle des acides tri-carboxyliques et synthèse d'acide succinique au cours du métabolisme fermentaire de la levure

Durant mes premiers travaux sur le métabolisme fermentaire de la levure, des questionnements autour du fonctionnement du cycle des acides tricarboxyliques (TCA) sont souvent apparus : quelle est la contribution de cette voie métabolique au métabolisme de l'acide malique, comment répond-t-elle à une modification de l'équilibre d'oxydoréduction…. L'intérêt appliqué de cette voie réside dans sa contribution à la formation de l'acide succinique, dont la production est souvent recherchée dans les vins. Cet acide organique, de par ses propriétés acidifiantes, contribue à la stabilité microbiologique et organoleptique des vins (Dudley and Steele, 2005).

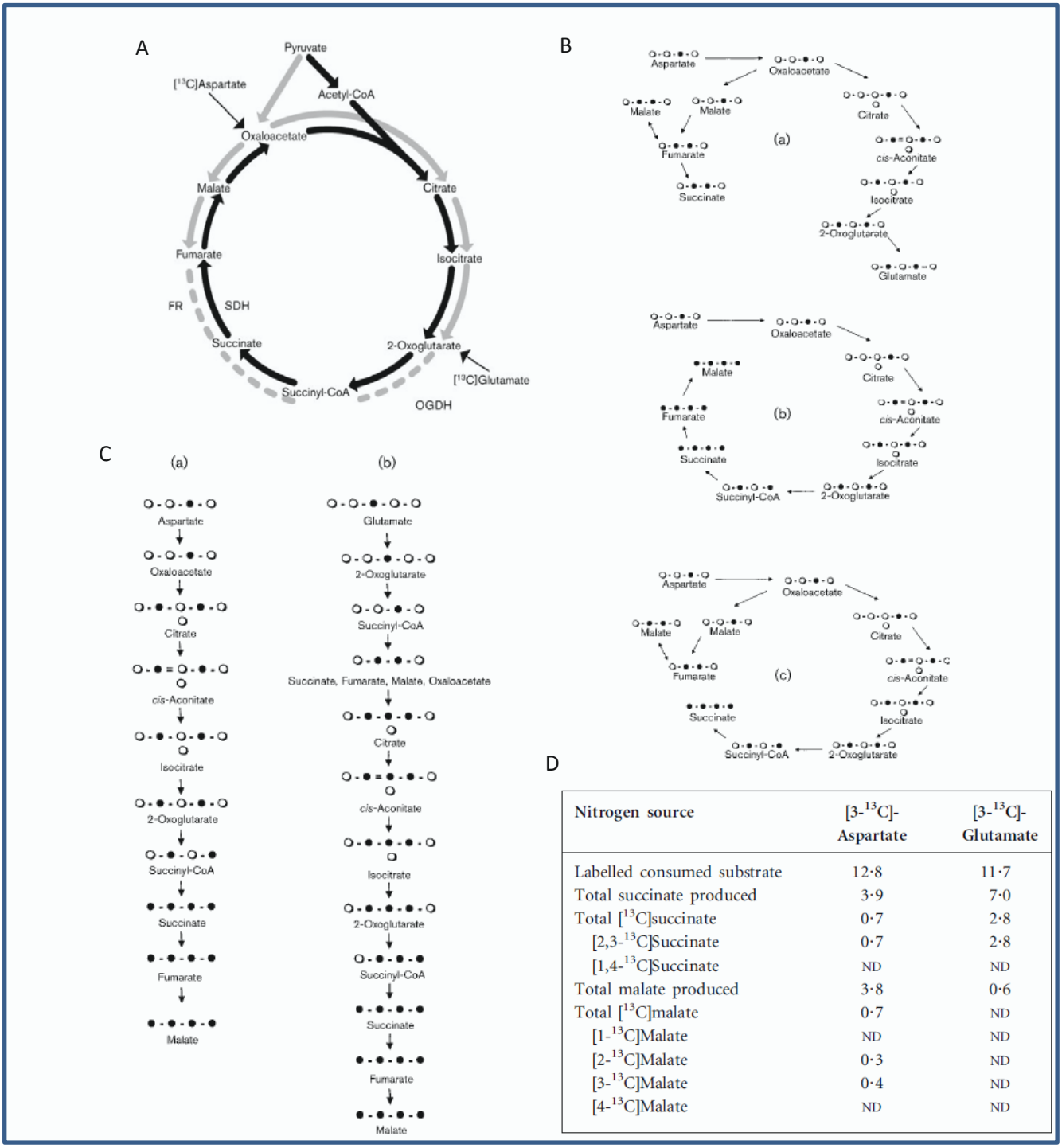
Au cours du métabolisme fermentaire de la levure, le cycle TCA est une voie métabolique quantitativement mineure par rapport à la glycolyse (90 % du flux carboné). Les données de la littérature font état du fait qu'en fermentation, la voie TCA n'est pas associée à la production de l'énergie nécessaire à la croissance cellulaire et ne fonctionne pas sous forme de cycle. Toutefois, son mode de fonctionnement, très différent du modèle respiratoire largement caractérisé, reste mal connu. Deux branches, réductrice et oxydative (Nunez de Castro et al., 1970 ; Sols et al., 1971), ont été décrites allant respectivement de l'acide pyrvique jusqu'à l'acide malique (via l'acide oxaloacétique) et de l'acide pyruvique à l'acide α-cétoglutarique (αKG), mais le point d'interruption du cycle et la contribution des deux branches à la formation d'acide succinique n'ont pas été définis. De plus, le rôle fonctionnel de ces deux branches n'est pas établi.

J'ai donc décidé de développer une thématique de recherche visant à définir comment est assurée et régulée l'activité de la voie TCA et à préciser quel est son rôle au cours de la fermentation œnologique.

Ce travail a été réalisé en combinant deux approches complémentaires.

- traçage au ^{13}C des intermédiaires métaboliques

La stratégie développée consiste à suivre l'incorporation du ^{13}C dans les acides organiques du cycle TCA à partir de substrats enrichis au ^{13}C. Afin limiter les pertes de marquage vers des produits de fermentation autres que les acides organiques -comme cela avait été le cas lorsque du glucose avait été utilisé comme molécule marquée-, nous avons retenu comme substrats marqués le 3-^{13}C-glutamate et le 3-^{13}C-aspartate, qui après transamination sont métabolisés directement au niveau du cycle TCA. La détermination par RMN de la localisation du marquage ^{13}C sur les acides malique et le succinique, réalisée par le professeur J.P. Grivet (Laboratoire de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans), nous a renseignés sur les voies métaboliques impliquées dans la formation de ces produits. L'intérêt de cette technique est qu'elle permet d'avoir accès à la position du marquage sur les molécules produites, et ainsi de pouvoir discriminer entre les voies métaboliques potentiellement impliquées dans la synthèse d'un métabolite (figure 8). Toutefois, nous avons rencontré des limitations dans l'utilisation de cette approche et dans l'interprétation des résultats obtenus liées à une faible sensibilité au niveau du marquage dans les intermédiaires du cycle TCA, formés en faible quantité et à son coût (achat des composés marqués).

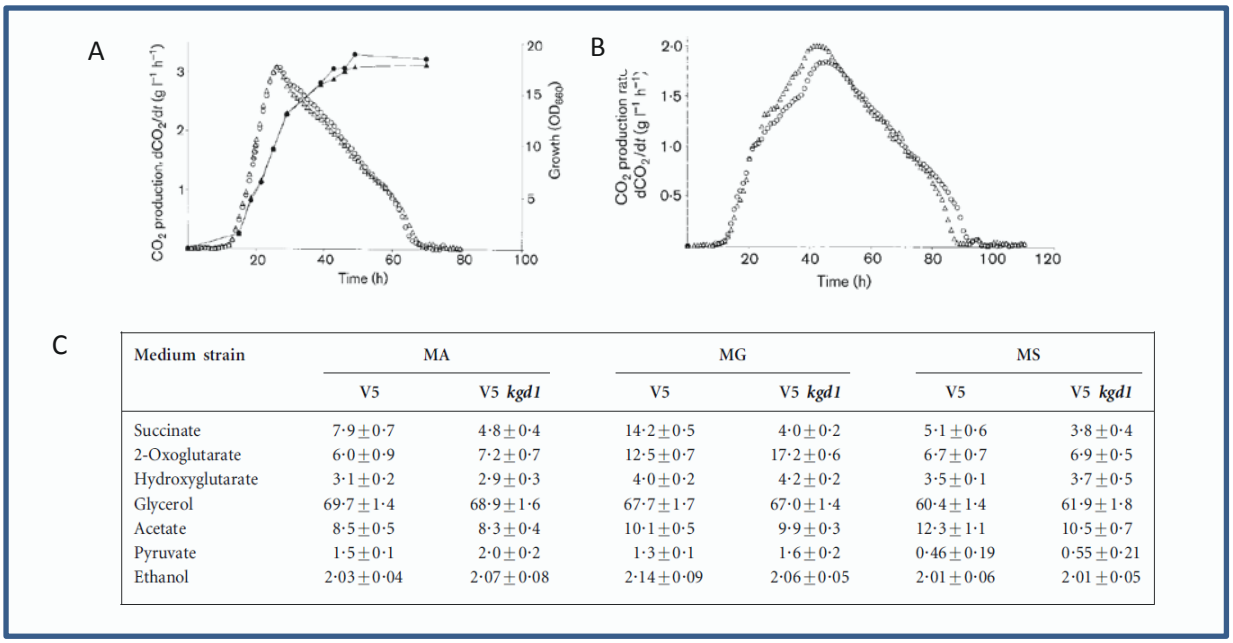


Nitrogen source	[3-^{13}C]-Aspartate	[3-^{13}C]-Glutamate
Labelled consumed substrate	12·8	11·7
Total succinate produced	3·9	7·0
Total [^{13}C]succinate	0·7	2·8
[2,3-^{13}C]Succinate	0·7	2·8
[1,4-^{13}C]Succinate	ND	ND
Total malate produced	3·8	0·6
Total [^{13}C]malate	0·7	ND
[1-^{13}C]Malate	ND	ND
[2-^{13}C]Malate	0·3	ND
[3-^{13}C]Malate	0·4	ND
[4-^{13}C]Malate	ND	ND

Figure 8. Etude du fonctionnement de la voie TCA par filiation isotopique de la voie TCA. A. La voie TCA en respiration (cyle en noir) et en fermentation (deux branches, lignes grises). Les lignes pointillées montrent les différentes possibilités d'interruption de la voie. Les flèches noires indiquent les réactions de transamination du glutamate et de l'aspartate. FR, fumarate réductase; SDH, complexe succinate déshydrogénase ; OGDH, complexe cétoglutarate déshydrogénase. B. Filiation du 13C à partir du malate ou de l'aspartate lors d'un fonctionnement cyclique du TCA : le marquage est randomnisé sur l'ensemble des carbones dès deux tours de cycle. C. Distribution du 13C dans les intérmédiaires du TCA à partir de de [3-13C] aspartate en fonction dun point d'interruption du cycle (a) malate et succinate sont formés par la branche réductrice de la voie de TCA. Cela conduit à la formation de [2,3-13C] malate et [2,3-13C] succinate. (b) Malate et succinate sont produits par la branche oxydative de la voie TCA impliquant les complexes OGDH et SDH. Malate et succinate sont marqués de manière uniforme. (c) Le malate est produit par la branche réductrice de la voie de TCA, tandis que le succinate est formé par la branche oxydative de la voie TCA (le complexe SDH n'est pas actif).Le succinate est uniformément marqué alors que seul du [2,3-13C] malate est détecté. D. Bilans molaires de conversion de [3-13C] aspartate et [3-13C] glutamate au cours de la fermentation œnologique par la souche K1
ND : pas détecté ; ○ : carbone non marqué ; ● : carbone marqué.

- approche moléculaire

La stratégie développée consiste à étudier l'incidence sur le comportement fermentaire et la physiologie de la levure, en conditions œnologiques, de l'inactivation par ingénierie métabolique des enzymes identifiées comme clefs vis à vis du fonctionnement de la voie TCA et de la formation de d'acide succinique. Ainsi, le phénotype des mutants délétés pour les gènes *FRDS* et/ou *OSM1* (codant pour les isoformes cytoplasmique et mitochondriale de la fumarate réductase ; Muratsubaki and Enomoto, 1998 ; Enomoto et al., 1996), *SDH1* (codant pour une des quatre sous-unités de la succinate déshydrogénase, Chapman et al., 1992) et *KGD1* (codant pour une des trois sous-unités de la αKG déshydrogénase, Repetto et al., 1989) en métabolisme fermentaire ont été caractérisés. En parallèle, des suivis d'expression de certains gènes en fermentation ont été effectués par la technique des Northern blots ainsi que des analyses courantes de caractérisation de l'état physiologique des cellules (dosage de concentrations intracellulaires en métabolites…).



C

Medium strain	MA		MG		MS	
	V5	V5 *kgd1*	V5	V5 *kgd1*	V5	V5 *kgd1*
Succinate	7·9±0·7	4·8±0·4	14·2±0·5	4·0±0·2	5·1±0·6	3·8±0·4
2-Oxoglutarate	6·0±0·9	7·2±0·7	12·5±0·7	17·2±0·6	6·7±0·7	6·9±0·5
Hydroxyglutarate	3·1±0·2	2·9±0·3	4·0±0·2	4·2±0·2	3·5±0·1	3·7±0·5
Glycerol	69·7±1·4	68·9±1·6	67·7±1·7	67·0±1·4	60·4±1·4	61·9±1·8
Acetate	8·5±0·5	8·3±0·4	10·1±0·5	9·9±0·3	12·3±1·1	10·5±0·7
Pyruvate	1·5±0·1	2·0±0·2	1·3±0·1	1·6±0·2	0·46±0·19	0·55±0·21
Ethanol	2·03±0·04	2·07±0·08	2·14±0·09	2·06±0·05	2·01±0·06	2·01±0·05

Figure 9. Etude du fonctionnement de la voie TCA par caractérisation de mutants de délétion. A. Conséquences de l'inactivation du complexe succinate déshydrogénase sur la croissance (symboles pleins) et la vitesse de dégagement de CO2. Les souches V5 (●) et V5 sdh1 (▲) sont cultivées sur milieu synthétique contenant 200 g/L de glucose et 300 mg/L d'azote. B. Conséquences de l'inactivation du complexe cétoglutarate deshydrogénase sur la cinétique fermentaire. La vitesse de dégagement de CO2 est mesurée au cours de fer mentations (mêmes conditions que décrites en A) par les souches V5 (●) et V5 kgd1 (▲). C. Profils des métabolites de conversion du glucose au cours de fermentationdes souches V5 et V5 kgd1. MS : milieu de référence contenant 300 mg N/L sous forme d'ammonium et d'un mélange d'acides aminés. MA : milieu pour lequel 300 mg/L d'azote sont amenés sous forme d'aspartate. MG : milieu pour lequel 2300 mg/L d'azote sont amenés sous forme de glutamate.

La combinaison de ces deux approches nous a permis d'établir que :

- le complexe succinate deshydrogénase ne participe pas au métabolisme fermentaire de la levure, ce qui confirme le fonctionnement non cyclique de la voie TCA dans ces conditions et précise le

point d'interruption du cycle. En conséquence, deux possibilités peuvent être envisagées pour la formation d'acide succinique : par la branche réductrice de la voie TCA, en impliquant l'activité fumarate réductase pour catalyser la conversion d'acide fumarique en acide succinique, ou par décarboxylation oxydative d'αKG (αKG déshydrogénase).

- l'implication de ces deux voies métaboliques dans la formation d'acide succinique dépend de la composition de la source d'azote, probablement parce qu'elle module le pool intracellulaire en αKG. Lorsque l'accumulation intracellulaire en αKG est faible, comme sur source d'azote mixte simulant la composition azotée d'un moût de raisin, environ 25 % de l'acide succinique produit (550 mg/l) est formé par décarboxylation oxydative d' αKG ; cet acide est alors essentiellement formé par la branche réductrice de la voie TCA (75 %). Au contraire, l'utilisation de glutamate en tant que seule source d'azote conduit à une augmentation de la teneur intracellulaire en αKG, qui se traduit par une activation de la formation d'acide succinique via le complexe αKG déshydrogénase. Dans ce cas, la production totale d'acide succinique est de 1400 mg/l dont 75 % sont formés par décarboxylation oxydative d' αKG (Camarasa et al., 2003).

Nous nous sommes ensuite attachés à caractériser le rôle au cours du métabolisme fermentaire de la branche réductrice du TCA (Camarasa et al., 2007). Par une approche d'analyse fonctionnelle (figure 10), nous avons montré que le flux au travers de cette voie est indépendant des conditions de culture. L'activité de la dernière étape, la fumarate réductase (FR) est essentielle pour la croissance de la levure en anaérobiose et la croissance d'un mutant inactivé pour les deux isoformes de cette enzyme est fortement réduite en conditions de limitation en oxygène (conditions œnologiques). Cette enzyme catalyse de façon irréversible la conversion de fumarate en acide succinique couplée à une oxydation de son cofacteur, le $FADH_2$ en FAD. Nous avons démontré que la limitation de croissance du mutant dont la FR est inactivée n'était pas due à des problèmes de disponibilité intracellulaire en acide succinique. Ce phénotype létal semble être lié au rôle essentiel de la FR dans la régénération du FAD. Il est en effet apparu que la FR est la seule enzyme capable de réoxyder le $FADH_2$ en FAD. Ce cofacteur est utilisé par certaines flavoprotéines nécessaires au développement cellulaire, qui interviennent dans le métabolisme des lipides, acides gras, acides aminés. Ces enzymes, notamment la thiol oxydase Ero1p (Frand and Kaiser, 1998) et la sulfhydryl oxidaseErv2p (Gerber et al., 2001), catalysent des réactions d'oxydation de substrats liée à une réduction de FAD en $FADH_2$, qui doit être régénéré. Toutefois, il existe quelques limites dans l'approche que nous avons menée, qui résident dans le fait que l'implication de la FR dans le contrôle de l'équilibre $FADH_2$ / FAD n'a pu être montré que de façon indirecte (restauration de la croissance du mutant FR^- par ajout d'accepteurs d'électrons exogènes, analyse bibliographique systématique des flavoprotéines de *S. cerevisiae*). Il aurait été intéressant de valider nos hypothèses par une démonstration directe en réoxydant in situ le $FADH_2$ par une activité autre que la réduction du fumarate, une enzyme répondant à ces critères n'a pu être identifiée chez les autres organismes.

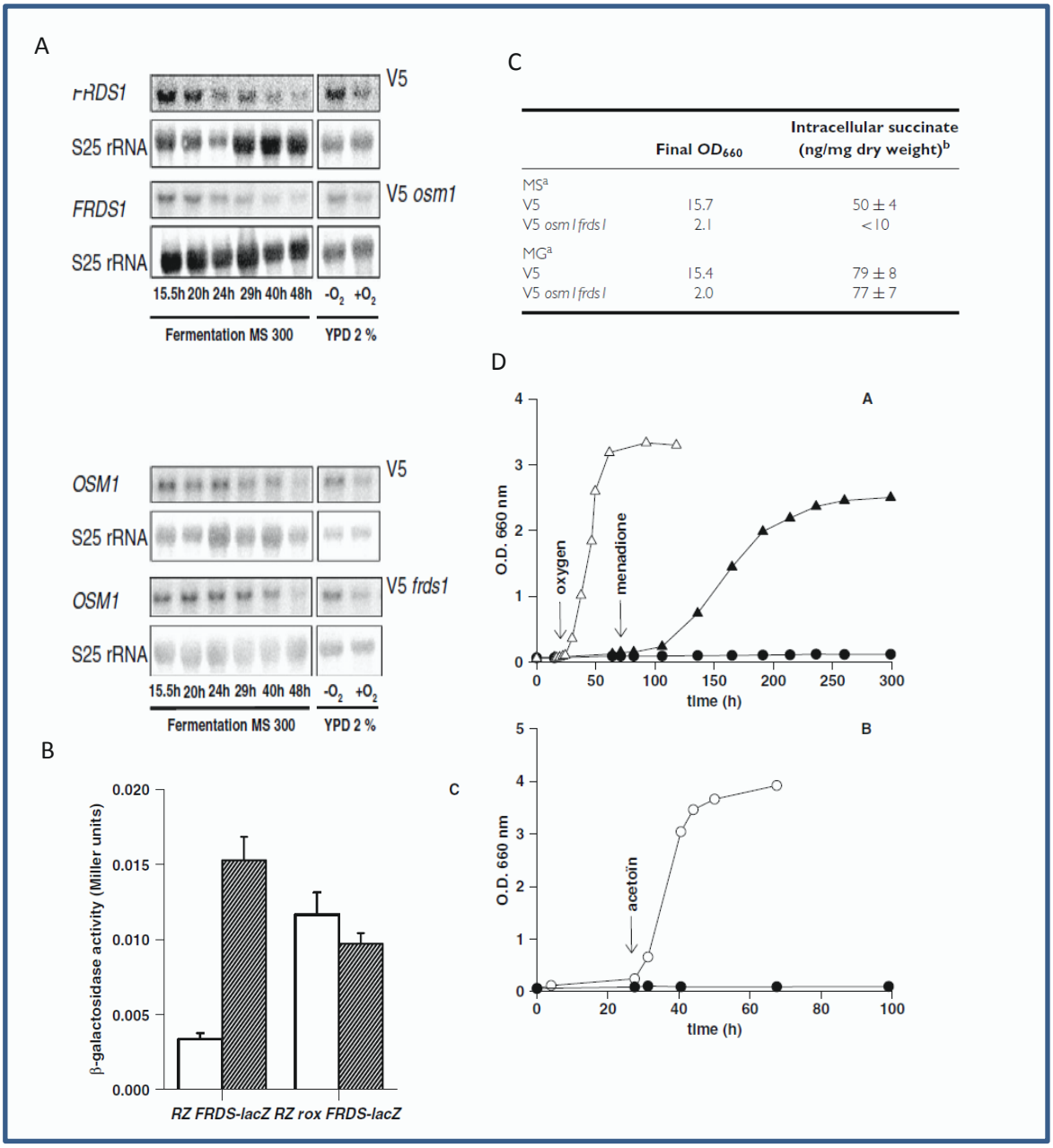


Figure 10. Rôle de la fumarate réductase au cours de la fermentation en anaérobiose. A. Analyse transcriptionnelle des gènes OSM1 et FRDS pendant la fermentation par Northern blot . B. Induction en anaérobiose du gène FRDS. L'activité β-galactosidase a été déterminée dans les souches RZ-53-6 et RZ-53-6 *rox1* contenant un plasmide portant la fusion pFRDS1-lacZ avant (barres blanches) et deux heures après un shift aérobiose /anaérobiose (barres hachurées). Les écarts-types ont été calculés à partir de trois expériences indépendantes. C. Concentrations intracellulaires en succinate des souches V5 et V5 frds osm1 cultivées sur milieu MS (azote sous forme d'ammonium et d'acides aminés) et MG (azote sous forme de glutamate). D. Restauration de la croissance d'un mutant V5 *frds osm1* par l'addition d'accepteurs d'électrons exogène. (A) V5 osm1 frds1, milieu MS, anaérobiose (●), suivi d'une addition d'oxygène (△) ou de ménadione (▲).. (B) De l' acétoïne (1 mM) a été ajoutée au cours de la croissance de mutants à V5 gpd1 gpd2 (○) et V5 osm1 frds1 (●) après 25 h de culture en milieu MS en anaérobiose

Métabolisme d'un acide aminé particulier : l'acide γ -amino butyrique (GABA)

La voie de l'acide γ-amino butyrique (GABA) est une voie alternative pour la conversion de αKG en succinate via le glutamate par la levure. Elle met en jeu une glutamate décarboxylase, une GABA

transaminase et une succinate semi-aldéhyde deshydrogénase, codées respectivement par *GAD1*, *UGA1* et *UGA2* (Coleman et al., 2001*)*. Des études d'analyse globale de l'expression génique chez *S. cerevisiae* menées au sein de mon unité (thèse de T. Rossignol) ont montré que l'ensemble des gènes de la voie « GAD/GABA » étaient exprimés au cours de la fermentation œnologique. Elle a d'autre part été décrite comme étant responsable de l'assimilation du GABA, acide aminé qui peut être présent dans le moût de raisin à des teneurs allant jusqu'à 500 mg/l (Andre and Jauniaux, 1990; Ramos, et al., 1985). Pour compléter nos travaux portant sur la production d'acide succinique en fermentation, nous nous sommes intéressés au rôle de cette voie en fermentation, et à sa possible implication dans la formation de cet acide organique. Ces travaux, réalisés dans le cadre de la thèse de Benoît Bach (2007) dont j'ai assuré l'encadrement (70 %) avec Sylvie Dequin (30 %), ont été menés suivant deux axes majeurs.

ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA VOIE GAD /GABA

Notre premier objectif était de préciser l'implication de la voie GAD/GABA dans l'assimilation de GABA et d'acide glutamique. Une approche d'analyse fonctionnelle de cette voie (figure 11), associant en particulier la détermination de profils fermentaires et métaboliques, la caractérisation de mutants, et le suivi de l'expression génétique par Northern blot a été mise en place. Cette analyse a montré qu'elle ne contribuait que de façon très limitée au catabolisme du glutamate au cours de la fermentation œnologique. Par contre, le GABA exogène est efficacement converti en succinate par Uga1p et Uga2p, avec un rendement maximal de l'ordre de 0.7 mol de succinate/mol de GABA consommé.

Nous avons alors cherché à déterminer quelles pouvaient être les autres possibilités d'utilisation du GABA consommé et non converti en succinate chez la levure, en infirmant ou validant différentes hypothèses émises à partir de données établies chez d'autres organismes (Bach et al., 2009). Pour mener à bien cette caractérisation, des compétences analytiques ont été requises, ce qui nous a conduits à mettre en place des collaborations avec V. Cheynier et E. Meudec (UMR SPO, Plateforme Polyphénols) pour le dosage du GHB par LC-MS et J.P. Lepoutre et R. Baumes (UMR SPO, équipe Innovation analytique) pour la détermination de la composition monomérique des PHB de levures par GC-MS.
Différentes alternatives pour l'utilisation du GABA par la levure ont été identifiées et les flux au travers ces voies ont été quantifiées chez la souche sauvage V5 et le mutant V5 *uga2* (Figure 11). Tout d'abord, une partie importante du GABA est accumulée dans la cellule sans être métabolisée, très probablement dans la vacuole. De plus, nous avons établi l'existence chez *S. cerevisiae* d'une voie alternative à Uga2p pour la conversion du SSA, qui permet sa réduction en acide γ-hydroxy butyrique (GHB). Ce composé est ensuite utilisé en tant que monomère pour la formation de polyhydroxybutyrate (PHB), polymère d'intérêt en industrie des plastiques (Saito et Doi, 1994).
Nous avons également tenté d'identifier le gène responsable de l'activité GHB deshydrogénase par plusieurs approches : recherche d'homologie de séquences avec des GHB-déshydrogénases

bactériennes, comparaison des profils d'expression génique entre souche sauvage et mutant *uga2*, pour lequel l'activité GHB déshydrogénase était augmentée. Aucun résultat concluant n'a été obtenu, et nous avons envisagé que cette activité n'est pas spécifique d'une seule protéine chez *S. cerevisiae*.

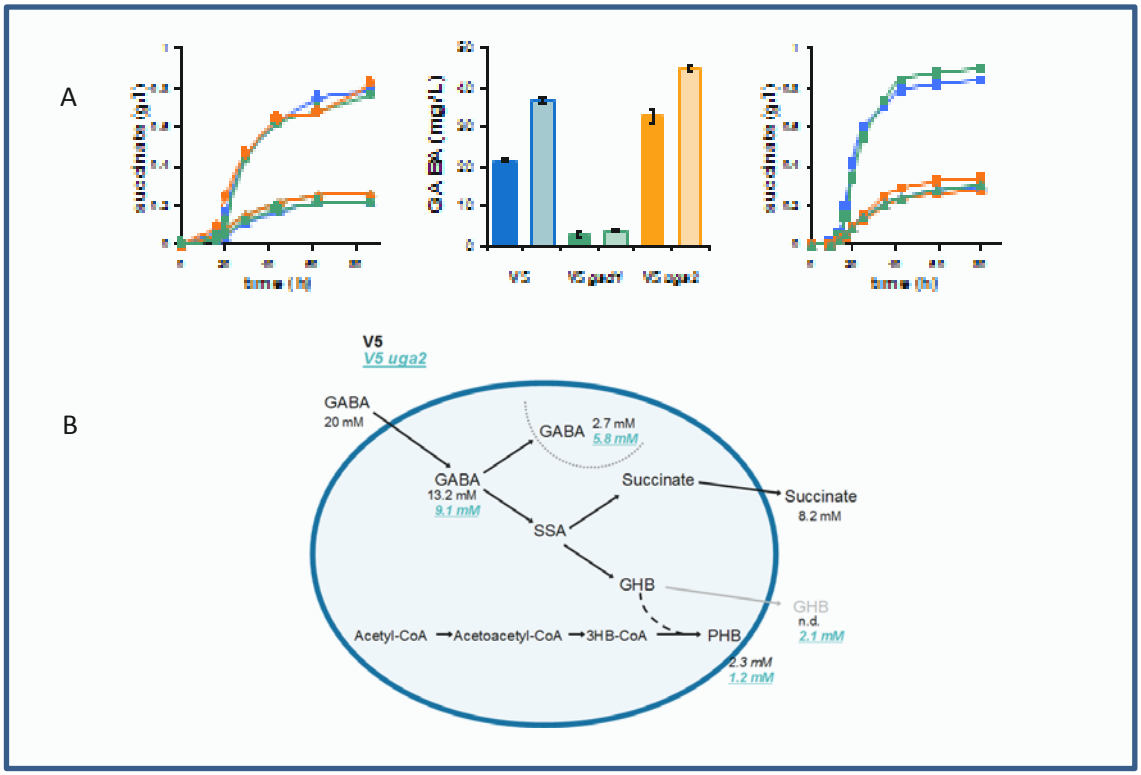


Figure 11. Métabolisme du GABA au cours de la fermentation alcoolique par *S. cerevisiae*. A. Analyse fonctionnelle de la voie GAD/GABA. Le premier graphe représente la production de succinate au cours de culture sur milieu synthétique MS (mimant la composition d'un jus de raisin, contenant 300 mg N/L sous forme d'ammonium et d'un mélange d'acides aminés, ▲) et sur milieu MG, pour lequel l'azote est apporté uniquement sous forme de glutamate (●). Le deuxième graphe montre la production de GABA sur milieu synthétique MS (barres foncées) et sur milieu glutamate MG (barres claires). Le dernier graphe présente la production de succinate sur milieu MS et sur milieu MS supplémenté par 4 g/L de GABA. Les souches étudiées sont la souche V5 (bleu) et les mutants V5 *gad1* (vert) et V5 *uga2* (orange) B. Analyse quantitative du devenir du GABA au cours de la fermentation œnologique des souches V5 (noir) et V5 uga2 (bleu).

REORIENTATIONS METABOLIQUES LIEES A L'ASSIMILATION DE GABA PAR LA LEVURE

L'assimilation du GABA par Uga1p et Uga2p affecte deux éléments clefs du métabolisme cellulaire. D'une part, les besoins en αKG, précurseur jouant un rôle central dans la synthèse d'acide glutamique et l'ensemble métabolisme azoté, sont augmentés du fait de la réaction de transamination du GABA. D'autre part, l'oxydation de l'intermédiaire succinate semi-aldéhyde (SSA) en acide succinique par la SSA deshydrogénase Uga2p génère un excès de cofacteurs réduits, qui déséquilibre la balance d'oxydoréduction de la cellule. Une part importante des travaux de thèses réalisés par Benoît Bach ont donc été d'évaluer les conséquences de l'assimilation du GABA de façon plus globale sur l'ensemble du métabolisme cellulaire (figure 12).

Compte-tenu des données précédemment acquises, nous avons sélectionné deux souches pour mener cette approche : la souche de référence V5 et le mutant *uga2*, dont les caractéristiques d'utilisation du GABA diffèrent significativement de celles de la souche sauvage (pas d'oxydation du SSA, demande en αKG moins importante). L'impact de l'utilisation du GABA a été évalué au niveau métabolique, par la détermination du profil des produits de fermentation et au niveau transcriptomique (collaboration avec B. Blondin).

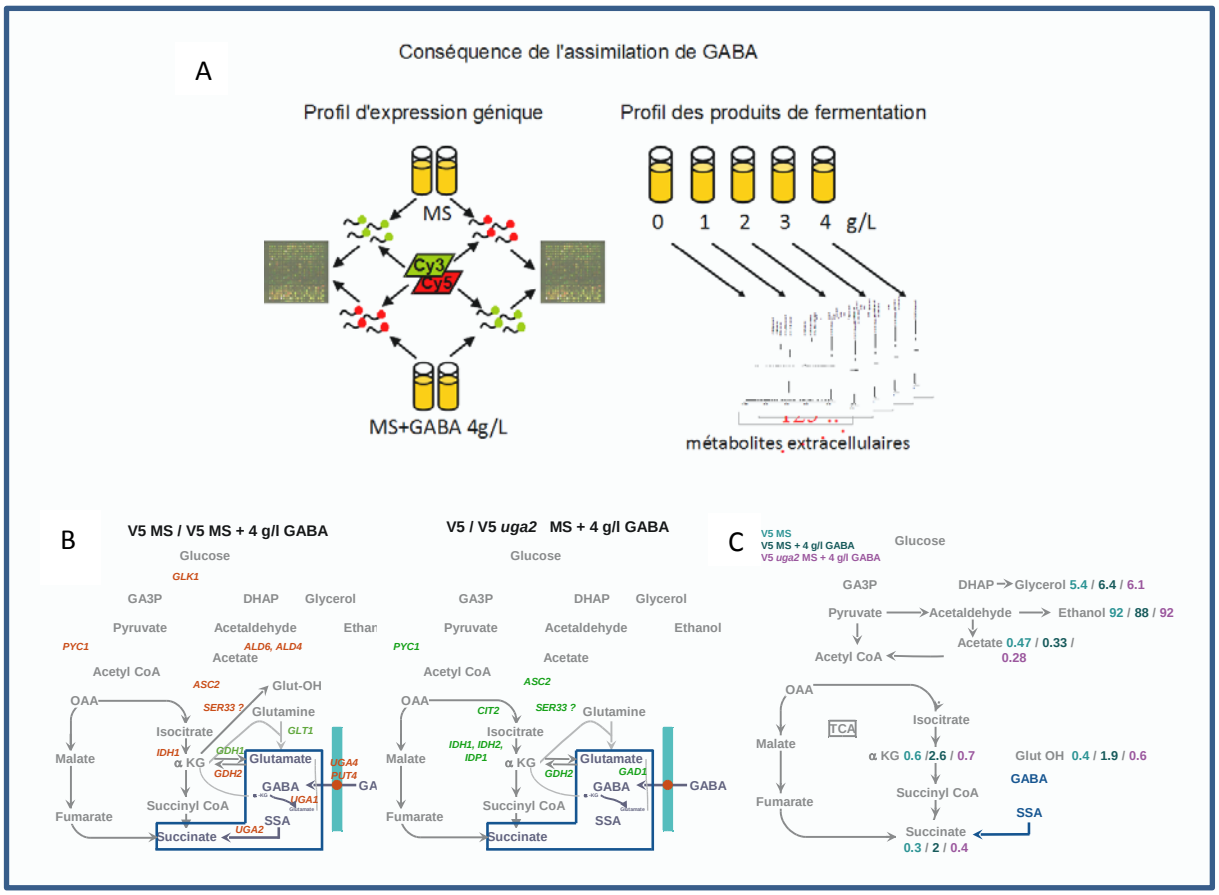


Figure 12. Analyse de la réponse de la levure à l'assimilation de GABA au cours de la fermentation alcoolique. A. Schéma expérimental. La réponse transcriptomique de la levure a été analysée par comparaison des profils d'expression géniques obtenus au cours de la phase de croissance de fermentations réalisées sur milieu synthétique MS en absence ou en présence de 4 g/L GABA. La réponse métabolique a été mesurée en comparant les profils des produits de fermentations obtenus au cours de cultures en présence de concentration croissante de GABA de 0 à 4 g/L. B. Gènes différentiellement exprimés en absence et présence de GBA, pour les souches V5 et V5 *uga2*. Gènes surexprimés : rouge ; gènes réprimés : vert. C. Variations dans les productions des principaux métabolites au cours de fermentations de la souche V5 en absence de GABA et des souches V5 et V5 uga2 en présence de 4 g/L de GABA.

Cette étude a montré que le catabolisme du GABA avait de larges répercussions sur l'ensemble du métabolisme carboné central de la levure. Il induit une réponse ciblée de l'expression génique, avec une modification de l'expression de gènes impliqués essentiellement dans des fonctions métaboliques (voie GABA, métabolisme des acides carboxyliques, des composés azotés et des stérols). Ces variations sont cohérentes avec la réorientation des flux autour du nœud du pyruvate, qui favorise la voie TCA au détriment de la voie de formation de l'acétate et de l'éthanol. Ces modifications, tant au niveau de

l'expression génique qu'au niveau de la formation des produits de fermentation, traduisent une réponse métabolique de la levure à une demande accrue en αKG pour la transamination du GABA, et à l'augmentation de la disponibilité en cofacteurs réduits liée à l'activité de la déshydrogénase Uga2p. Ces résultats soulignent, une fois de plus, le rôle joué par le maintien de l'équilibre rédox dans l'orientation globale du métabolisme.

Certaines pistes quant à la régulation du métabolisme carboné central ont pu être dégagées de ce travail, comme le rôle central joué par le maintien de l'équilibre NADP/NADPH dans la réponse métabolique au catabolisme du GABA ou la contribution de Hap4p dans le contrôle de la formation d'αKG. En effet, il semble qu'en présence de GABA, la transcription du gène *HAP4,* codant pour la principale sous-unité du complexe activateur des gènes respiratoire Hap2p/3p/4p/5p (Forsburg and Guarente, 1989) soit augmentée, ce qui pourrait permettre une réorientation métabolique afin d'augmenter la synthèse d'αKG (Raghevendran, et al., 2006).

Sur le plan appliqué, ces travaux ont révélé que le GABA, qui est un acide aminé présent dans les moûts de raisin à des concentrations comprises entre 0 et 500 mg/l, pouvait constituer une source d'azote quantitativement importante pour la levure lors de la fermentation alcoolique (Bach et al., 2010). Il est également apparu que le GABA peut être à l'origine d'une large part (jusqu'à 50 %) du succinate de certains vins.

3. Vers une analyse intégrée et quantitative du métabolisme de la levure

Les travaux de recherche que j'ai menés sur la caractérisation du métabolisme des acides organiques et sa régulation chez *S. cerevisiae* ont fréquemment souligné le rôle que pouvait jouer le maintien de l'équilibre redox intracellulaire sur l'orientation du métabolisme et sa régulation. Cette problématique est également apparue comme récurrente lors de projets visant à définir des stratégies, biologiques ou physiques, conduisant à une diminution de la teneur en alcool des vins, ce que j'illustrerai tout d'abord brièvement à l'aide de quelques exemples.

Une contrainte majeure du métabolisme fermentaire est en effet d'assurer l'homéostasie redox, ou en d'autres termes, de maintenir constants les ratios entre les deux partenaires des couples d'oxydoréduction, dont les principaux sont les cofacteurs NAD/NADH et NADP/NADPH. En absence de chaîne respiratoire fonctionnelle, ces équilibres sont gérés via le métabolisme : la consommation d'un cofacteur par une réaction enzymatique doit être 'compensée' par sa production au travers d'une ou d'un ensemble d'autres voies métaboliques. Les approches réductionnistes, focalisées sur l'analyse ciblée d'une voie métabolique en dehors du contexte cellulaire, que j'avais développées jusqu'à présent au cours de mes travaux de recherche, ont rapidement montré des limites lorsqu'il s'agit d'appréhender des questionnements scientifiques liées au maintien de l'équilibre d'oxydoréduction. En effet, elles ne

permettent pas de prendre en compte la forte connectivité entre les réactions impliquant les cofacteurs d'oxydoréduction, et qui interviennent dans différentes branches du réseau métabolique.

Cela m'a alors conduit, en collaboration avec Sylvie Dequin de mon unité et Vincent Fromion, du laboratoire MIG (INRA, Jouy-en-Josas) à mettre en place une démarche plus globale d'étude du métabolisme redox de la levure par une approche de biologie des systèmes.

Rôle majeur du maintien de l'équilibre d'oxydoréduction dans les réorientations métaboliques liée à la diminution de la production d'alcool en fermentation

L'augmentation significative de la teneur en alcool des vins observée depuis une dizaine d'années (réchauffement climatique, sélection variétale, pratiques viticoles) constitue un frein pour la filière œnologique, en raison des attentes santé/sécurité des consommateurs et de la taxation sur l'alcool imposée par certains pays. Le développement de stratégies, physiques ou biologiques visant à réduire la formation d'éthanol durant la fermentation pour répondre aux besoins des vinificateurs, est un axe de recherche majeur de l'équipe Microbiologie. J'ai ainsi été amenée à évaluer l'incidence sur le métabolisme fermentaire de la levure des diverses méthodes développées pour diminuer de la teneur en éthanol des vins. Au travers de ma participation à ces projets, j'ai appréhendé le fonctionnement du métabolisme fermentaire de la levure par des approches de plus en plus intégratives, à une échelle se rapprochant de plus en plus de l'entité cellulaire.

Les approches biologiques, menées par le groupe Physiologie intégrative sous la responsabilité de Sylvie Dequin, visaient à construire, par ingénierie métabolique ou par évolution dirigée, des souches de levure à rendement abaissé en éthanol en déviant une partie du flux vers la formation d'un ou plusieurs composés.

La première stratégie a consisté à dévier une partie du flux carboné de la formation d'éthanol vers la production de glycérol par surexpression des gènes *GPD1* et *GPD2* codant pour la glycérophosphate déshydrogénase - programme européen 'Biotechnology, Cell Factory'- (Remize et al., 2001). Cette surexpression a conduit effectivement à une augmentation de la production de glycérol par la levure, qui s'accompagne d'une diminution allant jusqu'à 15 % du rendement en éthanol. Toutefois, cette amplification génère également une modification de l'ensemble du profil des produits de fermentation du glucose, avec une augmentation des productions d'acide acétique, acétoïne et acétaldéhyde. A partir de ce modèle biologique, j'ai réalisé, dans le cadre d'une collaboration avec Claude-Gilles Dussap et Agnès Pons (Laboratoire de Génie Chimique, Université de Clermont-Ferrand), une première tentative de quantification des flux intracellulaires, en utilisant un modèle mathématique très réduit (une quinzaine de réactions), et des bilans de conversion du glucose en fermentation (souche hyper-productrice de glycérol, souche témoin). Cette démarche, bien que préliminaire, m'a permis de montrer

que les effets secondaires, non ciblés, sur la distribution des flux métaboliques, étaient liés à la modification des pools intracellulaires en cofacteurs induite par la surexpression du gène *GPD1*. L'acide acétique et l'acétoïne sont des composés considérés comme indésirables dans le vin (impact négatif sur la perception sensorielle du produit). L'inactivation de l'acétaldéhyde deshydrogénase cytosolique (Ald6p) a permis de limiter l'accumulation d'acétate, mais le problème lié à la surproduction d'acétoïne reste à être résolu dans ces souches (Cambon et al., 2006).

L'inconvénient majeur de des approches d'ingénierie métabolique réside dans l'acceptabilité de l'utilisation des OGM dans la filière agro-alimentaire par les différents acteurs économiques. Pour faire face à ce problème, dans le cadre de la thèse d'Axelle Cadière (ANR/PNRA, thèse CIFRE société Lallemand), une stratégie d'évolution adaptative (induction de mutations spontanées par une forte pression de sélection, Gresham et al., 2008) a été développée afin d'obtenir une souche présentant un rendement de production d'éthanol abaissé. La voie métabolique cible, dans ce cas, était la voie des pentoses phosphate (VPP). En effet, une déviation du flux carboné vers cette voie, qui est une alternative à la glycolyse, permet d'éliminer une part des carbones sous forme de CO_2. La démarche a consisté à adapter une souche commerciale à la croissance sur gluconolactone, intermédiaire de la VPP faiblement assimilé par *S. cerevisiae*. Le processus d'adaptation devrait conduire à une amplification du flux carboné au travers de la VPP, limitant ainsi la disponibilité en carbone pour la production d'éthanol.

Pour caractériser le métabolisme des souches évoluées, obtenues après 70 et 250 générations, il m'est paru approprié de mettre en place une méthodologie d'analyse globale du métabolisme. En effet, la stratégie d'évolution dirigée ne se focalise pas sur la modulation de l'activité d'une enzyme ou voie métabolique bien définie ; les mutations spontanées induites au cours de ce procédé peuvent affecter n'importe quel élément du réseau métabolique. De plus, un point central de ce projet est d'accéder à la distribution des flux glycolyse/VPP, qui ne peut être quantifiée par les méthodes classiques, notamment par mesure d'activités enzymatiques. Dans ce cadre, j'ai implanté dans mon groupe une méthodologie d'analyse de flux : l'analyse ^{13}C-flux. Cette technique, développée par Jens Nielsen (DTU, Danemark) permet de quantifier la répartition des flux au travers du métabolisme carboné central *in vivo* (Gombert et al., 2001). Elle repose à la fois sur un modèle mathématique qui décrit de façon appropriée le réseau métabolique d'un organisme et sa stœchiométrie, et sur des données expérimentales de filiation du ^{13}C du substrat (glucose) dans les acides aminés, mesurées par GC-MS. Par rapport aux autres méthodes post-génomiques globales et quantitatives, qui décrivent uniquement la composition et la structure du réseau, l'analyse des flux métaboliques donne une image quantitative directe du phénotype, en prenant en compte l'ensemble des niveaux de régulations. La comparaison de la distribution des flux, déterminée par analyse ^{13}C-flux, a montré une augmentation significative du flux au travers de la VPP chez les souches évoluées, qui représente 17 % du flux carboné, contre 11 % dans le cas de la souche sauvage (Cadière et al., 2011). D'un point de vue physiologique, cette voie métabolique fournit à la

cellule des précurseurs pour la synthèse des acides aminés, des purines et des pyrimidines. Le segment oxydatif de cette voie faisant intervenir deux déshydrogénases NADP-dépendantes, elle est également largement impliquée dans la production du NADPH nécessaire à l'anabolisme. De façon intéressante, d'autres voies métaboliques liées à la production / consommation de ce cofacteur, ont un niveau d'activité modifié chez les levures évoluées : diminution de la production d'acétate, associée à une synthèse accrue de lipides. Les souches évoluées possèdent également de nouvelles propriétés d'intérêt technologique, comme une vitesse de fermentation plus élevée et une forte production de composés aromatiques. Nous avons établi, par analyse transcriptomique, que l'ensemble de ces modifications étaient liées à d'importantes reprogrammations génétiques. Toutefois, leur impact sur la production d'éthanol est resté très limité, voire non significatif.

En parallèle, des approches technologiques, dont l'objectif est une élimination partielle de l'éthanol en début de fermentation, sont développées par le groupe Maîtrise du procédé fermentaire. L'étude, menée à l'échelle pilote, inclut à la fois l'optimisation de la technique d'extraction (stripping ou distillation sous vide), l'évaluation de sa faisabilité lorsqu'elle est appliquée en cours de fermentation et l'analyse de l'impact du procédé physique d'extraction sur le métabolisme levurien et les caractéristiques du produit final. Je suis intervenue dans ce projet, qui faisait également partie du programme ANR/PNRA *Vins de qualité à teneur réduite en éthanol*, de façon plus ponctuelle. Mon travail a porté sur la caractérisation du métabolisme de *S. cerevisiae* au cours de fermentations mettant en œuvre ces procédés d'extraction. Nous avons établi que les deux traitements physiques d'élimination d'éthanol permettaient une diminution de 2° de la teneur en alcool du vin, tout en diminuant de façon significative la durée de fermentation, ce qui présente un intérêt industriel conséquent. Ces deux techniques n'altèrent pas l'activité fermentaire, qui est même augmentée en fin de procédé du fait de la diminution de la teneur en alcool et de l'évaporation de molécules toxiques pour le cellule (acides gras). L'inconvénient majeur de l'extraction d'éthanol par stripping ou évaporation sous vide en cours de fermentation est que certaines molécules (alcools supérieurs, esters, acétate) sont éliminées au cours de traitement (Aguera et al. 2010). L'altération de l'arôme fermentaire peut alors engendrer des problèmes d'acceptabilité du produit par les consommateurs.

Démarche de Biologie des Systèmes pour comprendre la régulation du métabolisme du NADPH

La VPP est considérée comme la source majeure de NADPH lors du métabolisme fermentaire de la levure et participe donc au maintien de l'équilibre d'oxydoréduction qui est un élément clef de la physiologie cellulaire. Une étude menée précédemment dans notre groupe (Heux et al., 2008) a montré l'existence d'une variabilité importante de la capacité de la VPP chez *S. cerevisiae* (15 souches). D'autre part, les travaux sur la caractérisation du métabolisme de levures obtenues par adaptation dirigée

durant la thèse d'Axelle Cadière, ont mis en évidence, chez ces souches évoluées, une modification des flux carbonés au travers de la VPP, mais aussi au travers d'un nombre important de voies liées au NADPH. Ces réactions interviennent dans des parties indépendantes du réseau métabolique : production d'acétate, synthèse lipidique... La problématique de la contribution de la VPP au contrôle de l'équilibre NADP/NADPH, et de façon plus générale, de l'analyse du rôle de l'homéostasie NADP/NADPH dans l'orientation du métabolisme fermentaire, se pose alors clairement. Ce système biologique apparaît comme un modèle approprié pour initier une approche de biologie intégrative visant à analyser de façon quantitative et dans sa globalité le métabolisme fermentaire de la levure et sa régulation. Dans ce contexte, la caractérisation du métabolisme du NADPH et de sa régulation chez la levure a été réalisée en mettant en œuvre une démarche itérative, qui associe des expérimentations permettant de produire des données à différents niveaux de l'échelle cellulaire (profils métaboliques, transcriptome, métabolites intracellulaires, flux) et de la modélisation en tant qu'outil prédictif et d'aide à l'analyse des données. Cette thématique a été essentiellement menée dans le cadre de la thèse de Magalie Celton, dont j'ai participé à l'encadrement (35 %), avec Sylvie Dequin et Vincent Fromion (MIG, INRA Jouy-en-Josas) et d'un projet INRA AgroBI.

Le point de départ de ce projet a été de développer, en collaboration avec l'équipe de V. Fromion (MIG, Jouy en Josas), un modèle métabolique explicatif, dédié à la description du métabolisme fermentaire et redox de la levure, DynamoYeast. Il combine :

- une description stœchiométrique du métabolisme carboné central de la levure. Une caractéristique de ce modèle est qu'il fournit une vision intégrée du métabolisme du NADPH, en incluant la centaine de réactions identifiées comme NADP(H)-dépendantes. D'autre part, la distribution des masses à travers de ce réseau peut être prédite de façon dynamique, par un outil de calcul spécifique, qui s'appuie sur des contraintes mesurées expérimentalement.
- une description détaillée des lois de régulation transcriptionelles et métaboliques, qui constitue une aide à l'analyse de la réponse de la cellule à des perturbations et à l'identification des mécanismes de régulation impliqués.

J'ai été fortement impliquée dans la conception de ce modèle, en apportant mon expertise en métabolisme pour la définition du réseau, des réactions et des lois de régulation à intégrer dans DynamoYeast.

En parallèle, une approche génétique a été développée afin de pouvoir ajuter spécifiquement et *in vivo* la demande en NADPH (figure 13). Pour cela, une butanediol déshydrogénase NADPH-dépendante, précédemment obtenue au laboratoire par mutagénèse dirigée, a été exprimée chez la levure. La souche recombinante obtenue, V5 BDH-NADPH, réalise la conversion équimolaire de l'acétoïne exogène en 2,3-butanediol en utilisant spécifiquement du NADPH comme cofacteur redox,

cette réaction étant complétement indépendante du reste du métabolisme fermentaire de la levure. Ainsi, la demande intracellulaire en NADPH de cette souche peut être modulée par les apports en acétoïne du milieu.

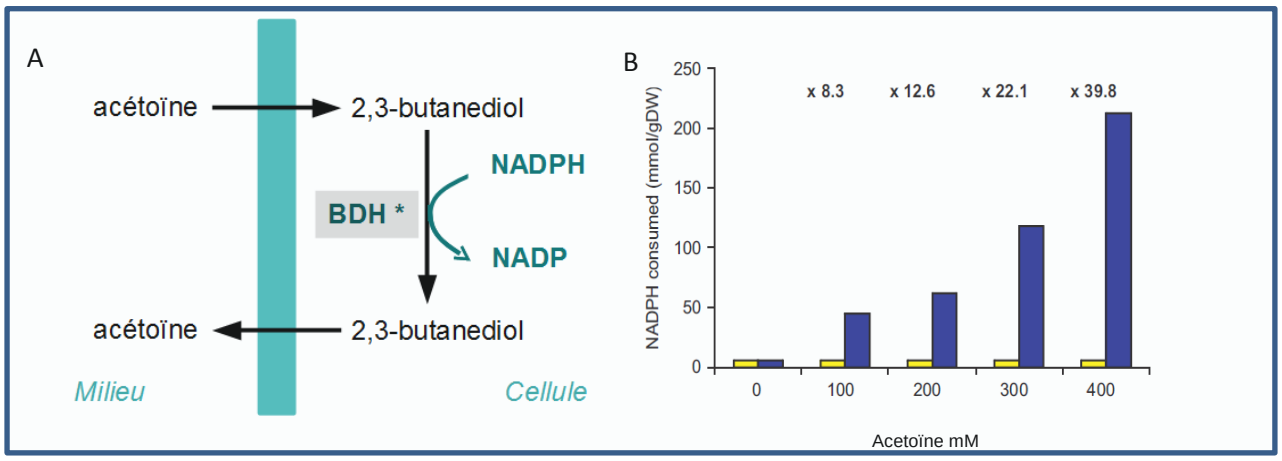


Figure 13. Modification de la demande intracellulaire en NADPH chez *S. cerevisiae*. A. Le système BDH : un outil biologique original permettant de moduler spécifiquement la demande en NADPH par ajout d'acétoïne dans le milieu. La particularité de ce système, basé sur la surexpression d'une butanediol déshydrogénase dont la spécificité vis-à-vis du cofacteur d'oxydoréduction a été changée, est de n'induire aucune autre modification métabolique. B. L'expression de la é ? »-butanediol NADPH-dépendante couplée à des ajouts d'acétoïne permet à augmenter d'un facteur 40 la demande en NADPH (bleu) par rapport aux besoins anaboliques (jaune) c alcules à partir de la composition de biomasse.

Ce système biologique original a ensuite été utilisé pour analyser l'incidence d'une demande croissante en NADPH (fermentations en présence de 0 à 400 mM d'acétoïne) sur les profils de fermentation et les caractéristiques de croissance de la levure (figure 14).

De façon surprenante, la croissance cellulaire n'est affectée que pour des niveaux de perturbation supérieurs à 3 fois la demande anabolique. Les données produites ont été utilisées pour contraindre le modèle DynamoYeast et prédire la répartition des flux dans chaque condition. La comparaison des différentes distributions de flux obtenues montre une très grande capacité d'adaptation de la levure à une augmentation des besoins en NADPH, et la mise en place d'une réponse graduelle. Pour des demandes modérées, la perturbation est compensée par une augmentation du flux au travers de la voie des pentoses phosphate, et dans une moindre mesure, par une augmentation de la production d'acétate (Aldp6). Pour des demandes extrêmes (40 fois la demande anabolique), le modèle propose une saturation de la VPP et la mise en place de cycles d'échange entre le NADH et le NADPH. Ce résultat est très novateur, puisqu'il est généralement admis que les métabolismes du NAD(H) et du NADP(H) sont fortement compartimentés chez S. cerevisiae (Celton et al., 2012b).

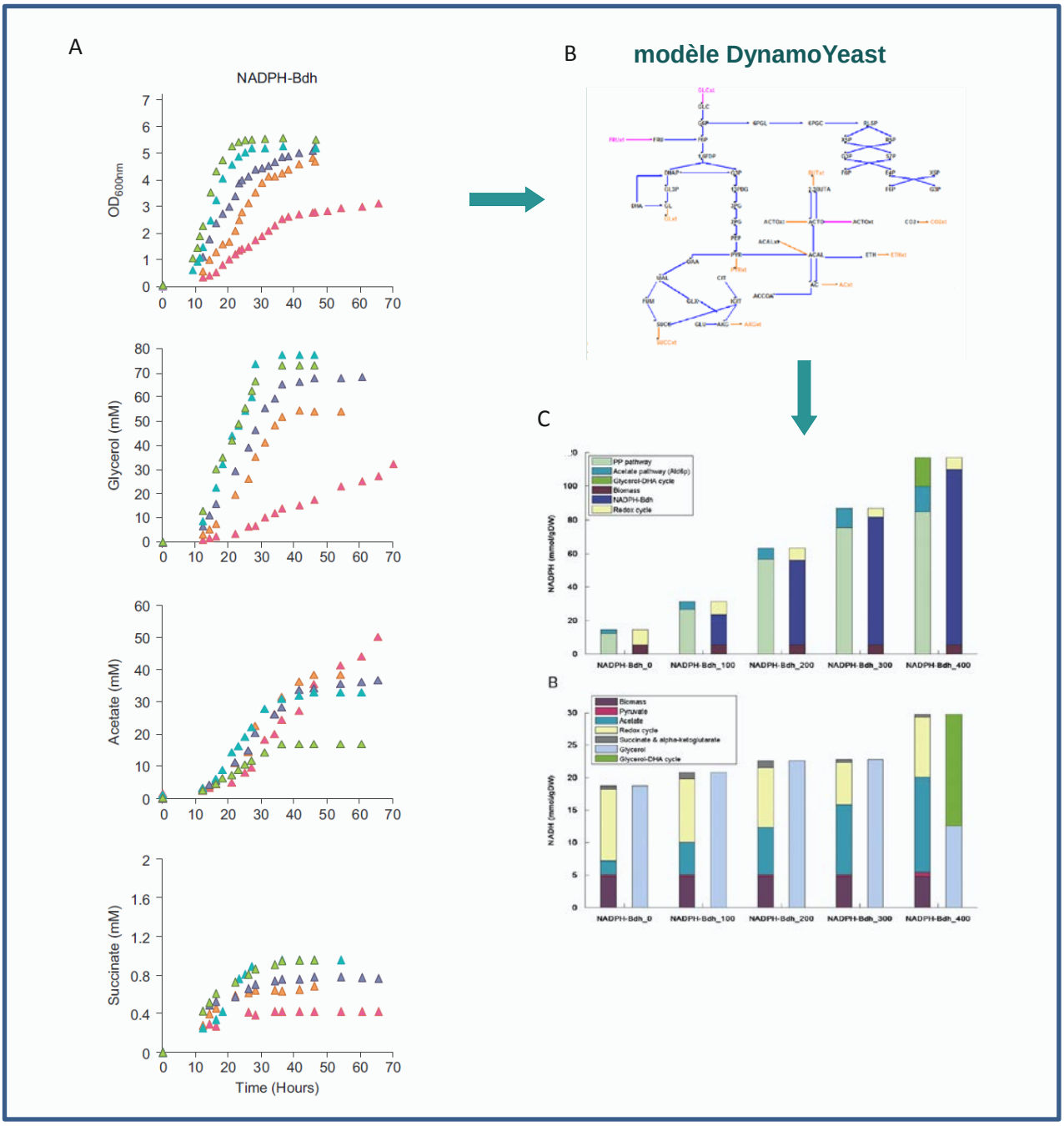


Figure 14. Démarche de biologie des systèmes pour analyser la réponse métabolique de la levure à une perturbation NADPH. A. Le système BDH* est utilisé avec des concentrations croissantes en acétoine pour modifier la demande en NADPH de la souche V5. Les cinétiques de croissance, de consommationde glucose et d'acétïne et de production des principaux métabolites sont déterminées. 0 MM acétoïne : ert ; 100 mM : turquoise ; 200 mM : violet ; 300 mM : orange ; 400 mM : rose. B. Le jeu de données est ensuite utilisé pour contraindre le modèle DynamoYeast. C. La distribution des flux au travers du réseau du métabolisme carboné centrl est alors prédite pour chaque conditions, ce qui permet de déterminer la contribution de chaque voie métabolique à la production/ consommation de NAD(P)H à chaque stade de la fermentation.

Ces prédictions ont ensuite été validées et complétées par des analyses fluxomiques (^{13}C), métabolomiques et transcriptomiques, qui ont notamment montré la mise en place de différents niveaux de régulation en fonction de l'intensité de la perturbation (figure 15). Pour des augmentations modérées de la demande en NADPH, un contrôle enzymatique permet à lui seul la réorientation des

flux. Par contre, pour des fortes demandes, on observe un contrôle transcriptionnel de plusieurs gènes de la VPP, mais aussi d'un nombre important de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des acides aminés. Ces données suggèrent que la modification de la disponibilité en NADPH peut affecter la distribution des flux au travers du métabolisme carboné central mais aussi au travers du métabolisme de l'azote (Celton et al, 2012a).

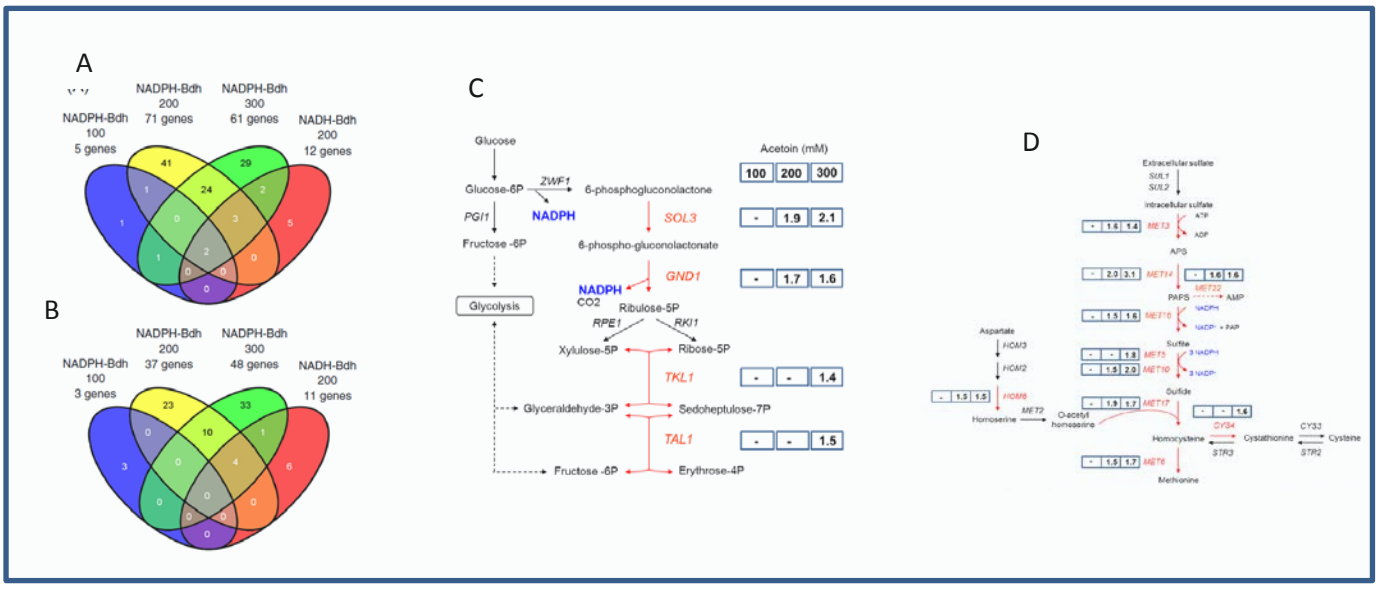


Figure 15. Réponse transcriptomique de la levure à une perturbation NADPH. Diagramme de Venn des gènes surexprimés (A) et réprimés (B) en réponse à une modification de la demande en NADPH (3 conditions) ou NADH.Gènes de la VPP (C) ou de la voie d'assimilation des sulfures dont l'expression est modifiée par une perturbation de la demande en NADPH (souche V5 BDH*, en présence de 0, 100 200 et 300 mM d'acétoïne). Les facteurs d'induction sont indiqués dans les boîtes. Gènes surexprimés en rouge.

4. Vers la prise en compte de la diversité de l'espèce S. cerevisiae

Jusqu'alors, mes travaux de recherche portaient sur l'étude du fonctionnement et de la régulation du métabolisme d'une souche de levure bien définie, en général la souche haploïde V5 utilisée comme levure œnologique modèle. Toutefois, l'espèce *S. cerevisiae* regroupe des souches d'origine écologique et géographique très diverses (Liti et al., 2009). On peut tout d'abord citer les levures naturelles, provenant du sol ou d'écorces de chêne et de certains végétaux et fruits. Un grand nombre de souches de *S. cerevisiae* proviennent de procédés de fermentation artisanaux ou industriels, en lien avec l'activité humaine: élaboration de vin et de bière, panification, production de vin de palme, de saké… D'autres souches ont été isolées au cours d'infections de malades immunodéprimés (présences de levures en tant que micro-organisme opportuniste). En dernier lieu, les souches de laboratoire présentent la particularité d'avoir été conservées par les chercheurs dans des conditions très favorables à leur croissance. La grande variété des environnements à partir de laquelle ces souches ont été

collectées représentent un ensemble de conditions et de facteurs de stress, qui a probablement conduit à la divergence de certains de leurs caractères phénotypiques et contribué à l'émergence de propriétés spécifiques d'une niche écologique.

Dans ce contexte, j'ai décidé de focaliser mon activité sur l'analyse de la diversité phénotypique de l'espèce *S. cerevisiae*, qui n'a été que peu explorée et qui peut générer des connaissances nouvelles, par exemple sur les relations phénotype / adaptation à l'environnement, ou sur les origines de la diversité métabolique. Cette évolution de mon projet de recherche est en synergie avec les nouvelles orientations thématiques de mon unité dont l'objectif global est d'obtenir une vision intégrée du fonctionnement cellulaire et la physiologie de la levure dans son environnement. Cela inclut notamment la compréhension des mécanismes qui participent aux processus évolutifs au sein de l'espèce *S. cerevisiae*, et l'identification des bases moléculaires des propriétés des souches.

Analyse de la diversité phénotypique chez S. cerevisiae en relation avec l'origine des souches

Un bilan des données de la littérature a révélé que la diversité phénotypique au sein de *S. cerevisiae* n'a été abordée que de façon très parcellaire, en évaluant l'incidence des conditions environnementales (résistance à la température, à l'éthanol ou aux toxines, limitations nutritionnelles) sur les capacités de croissance des souches (Steinmetz et al., 2002; Sinha et al., 2006 ; Hu et al., 2007 ; Perlstein et al., 2007; Kim et al., 2009). Les rares travaux portant sur la variabilité de traits phénotypiques ont été réalisés soit à partir d'un nombre limité de souches (Spor et al., 2009), soit en se restreignant à l'étude d'un seul caractère (Homann 2005). J'ai donc initié un projet visant à appréhender de façon plus systématique la diversité intra-spécifique chez *S. cerevisiae*, et plus particulièrement sa variabilité métabolique. Nos objectifs étaient de quantifier l'étendue de la diversité métabolique au sein de l'espèce S. cerevisiae, d'identifier s'il existe des traits phénotypiques spécifiques de souches provenant d'une même niche écologique et enfin d'évaluer si des facteurs environnementaux peuvent contribuer à l'évolution phénotypique d'un groupe de souches.

L'approche que j'ai mise en œuvre repose :

- sur la caractérisation d'une population de *S. cerevisiae* contenant un grand nombre d'individus (72), d'origine très diverses incluant des souches industrielles, des isolats cliniques et naturels, des levures de laboratoire et dont la séquence génomique est disponible.
- sur l'utilisation d'une seule condition de croissance, celle de la fermentation œnologique. Ces conditions, outre le fait qu'elles constituent le modèle d'étude de mon unité, ont été retenues car elles sont considérées comme extrêmes pour la levure. La succession de stress (stress acide, osmotique, éthanol, limitations en nutriments) à laquelle la cellule est soumise durant ce procédé, doit permettre d'amplifier les différences entre souches.

- sur la détermination, pour chaque souche de 18 traits phénotypiques cinétiques, métaboliques et de croissance.

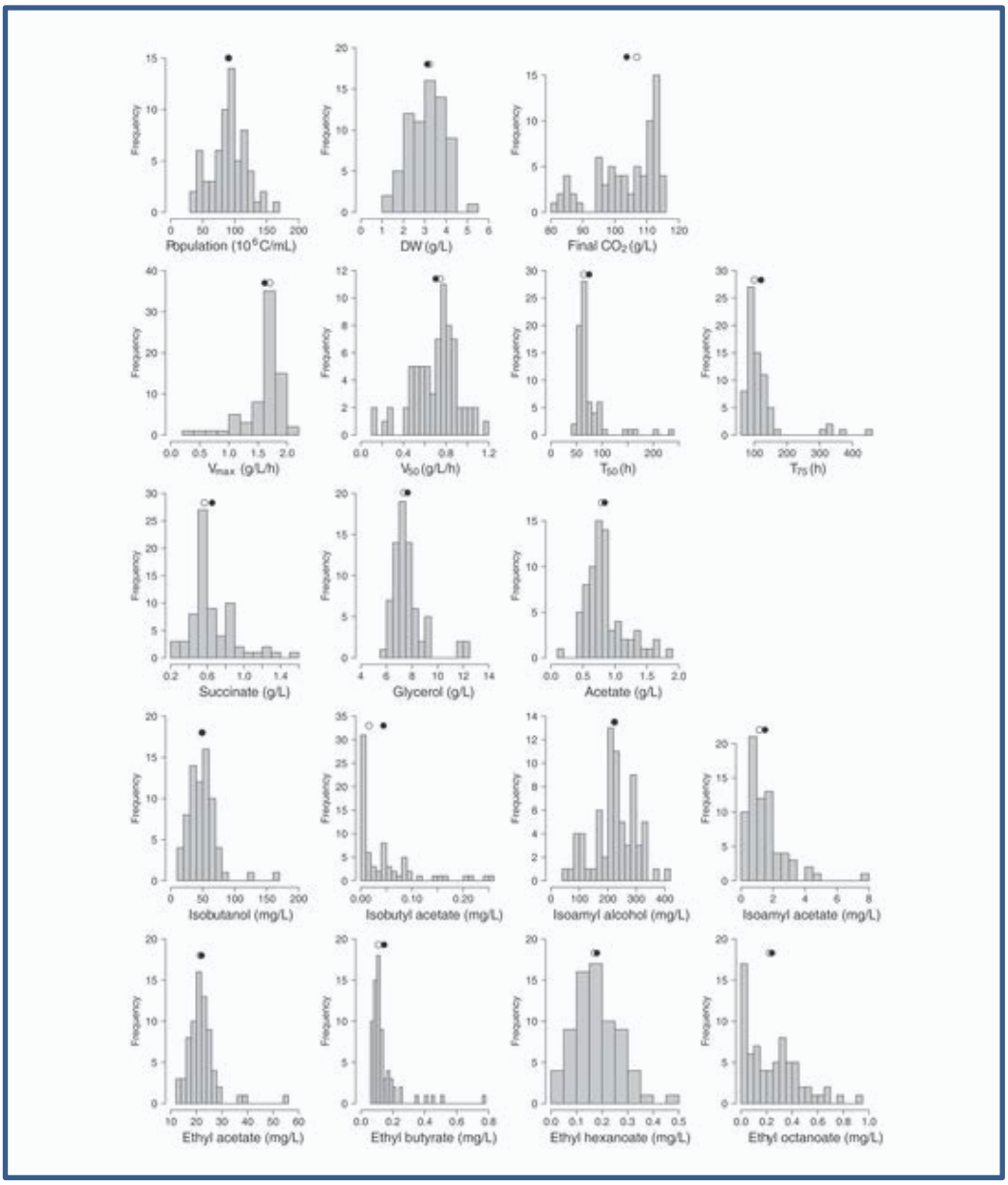


Figure 16. Etendue de la diversité phénotypique eu sein de l'espèce *S. cerevisiae*. A. Distribution de fréquence des variables phénotypiques dans une population de 70 souches de S. cerevisiae d'origines différentes. La valeur moyenne (•) et la valeur médiane (○) sont reportées sur chaque graphe. Les valeurs des variables cinétiques (CO_{2F} –quantité finale de CO_2 dégagé- V_{max} –vitesse maximale de dégagement de CO_2-, V_{50} –vitesse de dégagement de CO_2 lorsque 50 % des sucres sont consommés-, T_{50} –temps nécessaire à la consommation de 50 % des sucres-et T_{75} –temps nécessaire à la consommation de 75 % des sucres-) ont été déterminés à partir des courbes de fermentation (suivi en ligne du dégagement de CO_2). La croissance cellulaire (population et poids sec) et les traits métaboliques (glycérol, acétate, succinate, alcools supérieurs, esters d'acétate, esters éthyliques) ont été mesurés lorsque 75% des sucres sont consommés (180 g / L).

Le jeu de données que nous avons obtenu (1296 mesures distinctes) a fourni une image détaillée de la diversité métabolique chez *S. cerevisiae*. A l'exception de la production d'éthanol, l'ensemble des paramètres que nous avons mesurés varient présentent une grande variabilité entre souches, avec des facteurs de variation sur la population compris entre 2 et 15 suivant la variable considérée (Figure 16). En règle générale, les variations des traits phénotypiques, notamment de la

totalité des caractères métaboliques, sont indépendantes. Cela traduit une diversité importante dans les stratégies, plus ou moins efficaces, mises en œuvre par les différentes souches pour faire face aux conditions de stress de la fermentation œnologique. Cela reflète également une flexibilité importante du réseau métabolique au sein de l'espèce.

La capacité fermentaire s'est avérée être un facteur clef pour la discrimination des souches : 45% des souches n'ont pas consommé en totalité les 240 g/L du milieu, conduisant à des arrêts de fermentation. Une analyse de corrélation nous a permis de montrer que les capacités des souches à fermenter de fortes teneurs en sucre étaient liées à leur niveau de formation de biomasse (figure 17). Cette observation est en accord avec les données de la littérature, qui souligne le rôle déterminant joué par la production de biomasse dans le déroulement de la fermentation (Varela et al., 2004).

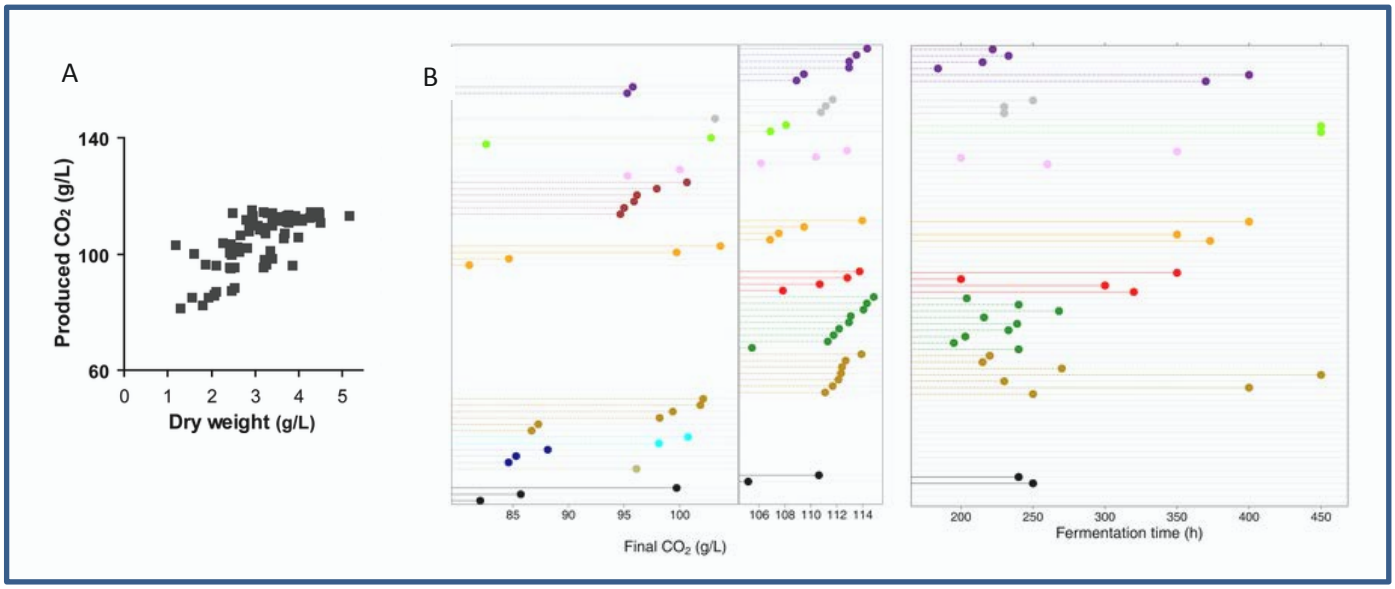


Figure 17. Capacité des 72 souches de *S. cerevisiae* d'origines diverses à fermenter efficacement de fortes concentrations en sucres. A. Corrélation entre la production de biomasse. et la production finale de CO_2 –la conversion totale des 240 g/L de sucres conduisent à un dégagement de CO_2 de l'ordre de 110 g/L. ; des productions inférieures traduisent l'incapacité des souches à fermenter la totalité des sucres du milieu-. B. Production de CO_2 en fonction du groupe d'origine des souches. Dans le cas de dégagement supérieur à 105 g/L, la durée totale de fermentation est indiquée dans la partie droite du graphe. Légende des symboles, vignoble: violet; sol: gris; sake: vert; vin de palme: rose, chêne: brun; laboratoire: jaune, fruits: rouge, commerciale œnologique : vert foncé, clinique: bronze, cactus: bleu; Bertam palmier: bleu foncé; bière: beige, boulangerie: noir.

Cette dernière relation entre origine et propriétés des souches peut être expliquée par une évolution des phénotypes en réponse aux contraintes environnementales. En effet, une meilleure adaptation au stress osmotique et à la toxicité des produits de fermentation des souches isolées sur des milieux riches en sucres pourrait leur conférer des avantages sélectifs, contribuant à leur prévalence dans ces environnements et à leur capacité à fermenter de fortes quantités de sucres. Au contraire, les souches issues de milieux pauvres en sucres - écorces de chêne, végétaux- et les souches de laboratoire, qui n'ont pas été soumises à cette pression de sélection, perdent leur viabilité au cours de la fermentation et ne sont pas capables de fermenter de fortes concentrations en sucres. Il apparaît ainsi que les contraintes et les conditions d'habitats particuliers peuvent avoir façonné le métabolisme et la

physiologie de souches de levures via un processus d'adaptation, entrainant l'émergence de traits spécifiques liés à leur environnement.

La sélection humaine est un autre facteur qui a pu contribuer à l'évolution phénotypique des souches utilisées dans les procédés industriels (Diezmann et al., 2009). Les souches œnologiques commerciales se différencient des autres groupes, y compris des levures isolées dans le vignoble (figures 17, 18), par une faible production d'acétate, une production de composés aromatique importante, une forte capacité de croissance et une durée de fermentation courte. Ces phénotypes sont clairement les conséquences de la sélection humaine, ces souches ayant été sélectionnées puis utilisées par le vinificateur en raison de leurs caractéristiques cinétiques et métaboliques avantageuses. La faible production d'acétate, succinate de glycérol et sous-produits des souches utilisées en panification reflète aussi probablement la sélection humaine : des faibles niveaux de formation de ces métabolites conduisent à des taux de production de CO_2 élévés, qui est recherché pour la fabrication du pain (Argueso et al., 2009 ; Codon et al ;1998).

Ainsi, l'analyse de l'émergence de propriétés propres à une niche écologique nous a permis de montrer que l'évolution des phénotypes pouvait être conduite soit par les contraintes spécifiques d'un environnement, soit par la sélection par l'homme. (Camarasa et al., 2011).

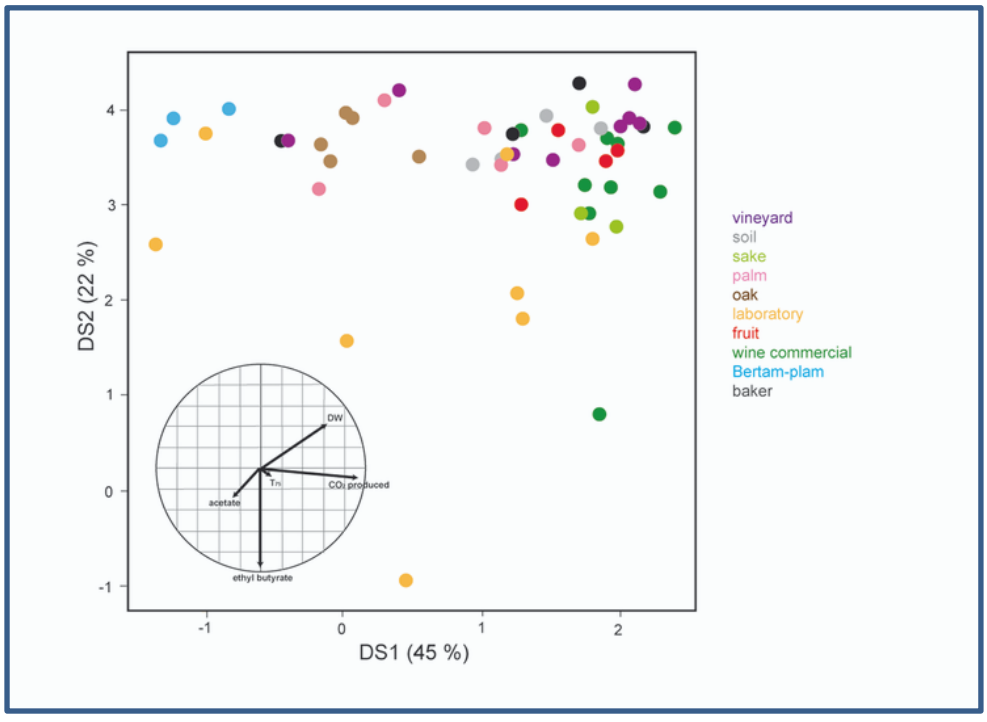


Figure 18. Analyse discriminante linéaire (ADL) de la population à partir des cinq traits phénotypiques les plus discriminants. L'analyse a été appliquée aux variables les plus discriminantes: poids sec, T_{75}, CO_{2F}, l'acétate et le butyrate d'éthyl,e mesurée pour 53 souches représentant 10 groupes différents. Les isolats cliniques n'ont pas été inclus, en raison de la grande variabilité phénotypique observée au sein de ce groupe. De même, les groupes bière et cactus, avec seulement deux souches de chacun, ont été retirés de cette analyse.

Analyse de la diversité phénotypique chez S. cerevisiae en relation avec l'origine des souches

L'analyse de la diversité phénotypique au sein de l'espèce *S. cerevisiae* a notamment mis en évidence des différences marquées dans les niveaux de production de biomasse au cours de la fermentation œnologique, qui varient entre 1 et 5 g/L suivant la souche. Se pose alors la question de l'origine de cette variabilité, dont la compréhension présente un intérêt technologique réel, puisque nous avons montré que l'achèvement de la fermentation alcoolique, qui est un facteur déterminant pour le vinificateur, était fortement corrélé à la formation de biomasse.

La disponibilité en azote du milieu est très fréquemment le facteur limitant la croissance des levures au cours de la fermentation œnologique (Bely et al., 1990). Dans cet environnement, les sources d'azote que peut utiliser *S. cerevisiae* sont présentes sous forme d'un mélange complexe, composé d'environ 1/3 d'azote minéral (ions ammonium) et de 2/3 d'azote organique, apporté par les acides aminés du moût de raisin, à des concentrations comprises entre 100 et 500 mg /L d'azote total assimilable par la levure. L'efficacité de chacun de ces composés pour assurer la croissance (source d'azote unique) a permis de différencier les sources d'azote riches, qui conduisent à un fort taux de croissance, des sources d'azote pauvres (Cooper et al., 2002 ;Godard et al., 2007). En parallèle, les systèmes de transport et les voies responsables de l'anabolisme et du catabolisme de chaque source d'azote ont été identifiés et caractérisés. De même, les principaux mécanismes de régulation contrôlant l'utilisation des sources d'azote par la levure ont été largement décrits (pour revue, Ljungdahl, 2009). De façon très schématique, on différencie les acides aminés transportés par une perméase spécifiquement induite par la présence de ces acides aminés dans le milieu via un système de senseurs SPS pour Ssy1p Prt3p Ssy5p (Forsberg and Ljungdahl, 2001). Les autres acides aminés et l'ammonium sont importés dans la cellule par l'intermédiaire de transporteurs soumis au contrôle de répression catabolique par l'azote (Nitrogen Catabolic Repression NCR) : l'expression des gènes codant pour ces protéines est réprimée en présence d'une source d'azote riche (Magasanik and Kaiser, 2002). Toutefois, le mode d'assimilation d'une ressource azotée complexe, comme cela est le cas dans le contexte œnologique, reste mal caractérisé.

Ainsi, le travail de thèse de Lucie Crépin, dont j'ai assuré l'encadrement, a eu pour objectif principal d'obtenir une meilleure compréhension du métabolisme de l'azote et de sa diversité au cours de la fermentation œnologique, en lien avec la formation de biomasse. Il s'agissait notamment de d'intéresser à l'origine de la diversité de rendement de production de biomasse par rapport à l'azote consommé, d'expliquer la séquence de consommation des sources d'azote du jus de raisin et de quantifier le devenir dans la cellule de cette ressource azotée complexe.

Ce projet m'a permis d'intégrer une problématique autour du métabolisme de l'azote dans les questionnements scientifiques que j'aborde, jusque-là focalisés sur le métabolisme carboné central. J'ai souhaité conduire cette évolution thématique à plusieurs titres. Tout d'abord, ces deux métabolismes

sont fortement connectés, par l'intermédiaire de précurseurs et de cofacteurs communs : ainsi, une analyse intégrée et quantitative du fonctionnement du métabolisme au cours de la fermentation œnologique passe nécessairement par la prise en compte de l'assimilation des ressources carbonée et azotée. D'autre part, le catabolisme de certaines sources d'azote peut conduire à la formation de molécules aromatiques, dont la maîtrise de la production est un enjeu actuel de la recherche dans la filière œnologique. Ce dernier volet, portant sur le lien entre métabolisme azoté et métabolisme de production des composés volatils, n'a été que partiellement abordée à la fin du projet de thèse de Lucie Crépin. Par contre, j'ai choisi de l'approfondir quand il s'est agi de définir un modèle d'étude permettant d'évaluer les apports d'un mode de fermentation particulier, la fermentation continu bi-étagée, au cours d'un projet de thèse que j'ai co-encadrée avec Jean-Marie Sablayrolles (qui anime l'équipe de mon unité) et que je présenterai par la suite.

CONTROLE DE LA SEQUENCE DE CONSOMMATION DES SOURCES D'AZOTE

Dans un premier temps, nous avons analysé le profil de consommation des 18 composés azotés majeurs du jus de raisin par 14 souches de *S. cerevisiae* d'origine diverse. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une consommation séquentielle des sources d'azote, qui reste similaire pour l'ensemble des souches (figure 19). Une analyse statistique (test de Tukey) a permis de classer les sources d'azote en fonction de leur ordre d'assimilation : la lysine est toujours consommée prématurément ; le second groupe (Asp, Thr, Glu, Leu, His, Met, Ile, Ser, Gln, Phe) correspond aux acides aminés consommés en début de croissance alors que les composés du dernier groupe sont consommés de façon tardive (ammonium, Val, Arg, Ala, Trp, Tyr). Cette séquence de consommation ne peut être expliquée par la concentration des sources d'azote dans le milieu. L'arginine et la glutamine, qui sont les acides aminés les plus abondants sont consommés respectivement de façon tardive et précoce. Il en est de même pour deux acides présents à des faibles teneurs dans le moût : la tyrosine et la méthionine.

Les profils d'assimilation de la ressource azotée par la souche œnologique EC1118, utilisée comme modèle, sur des milieux pour lesquels les proportions relatives entre les différentes sources varient, montre que la concentration initiale de ces composés ne modifie pas l'ordre dans lequel ils sont consommés, à l'exception de l'arginine et de l'ammonium. Par contre, le mode de régulation des transporteurs des acides aminés et de l'ammonium (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012) a été identifié comme étant le principal facteur contrôlant la séquence d'assimilation de ces composés (figure 19). Les acides aminés consommés en début de phase de croissance sont transportés par des perméases spécifiques induites via les senseurs SPS, alors que la plupart des composés azotés assimilés plus tardivement pénètrent dans la cellule via des perméases soumises à la répression catabolique par l'azote (NCR). Les caractéristiques cinétiques des perméases sous contrôle SPS Bap2p/Bap3p et Tat1p/Tat2p, impliquées respectivement dans l'import des acides aminés branchés et aromatiques, en

lien avec la disponibilité de ces acides aminés dans le milieu permettent d'expliquer l'utilisation tardive de tyrosine, tryptophane et valine. Cela est détaillé dans l'article Crépin et al., 2012, qui rapporte le nouvel éclairage sur les mécanismes régissant l'assimilation séquentielle des différents composés azotés dans des environnements complexes.

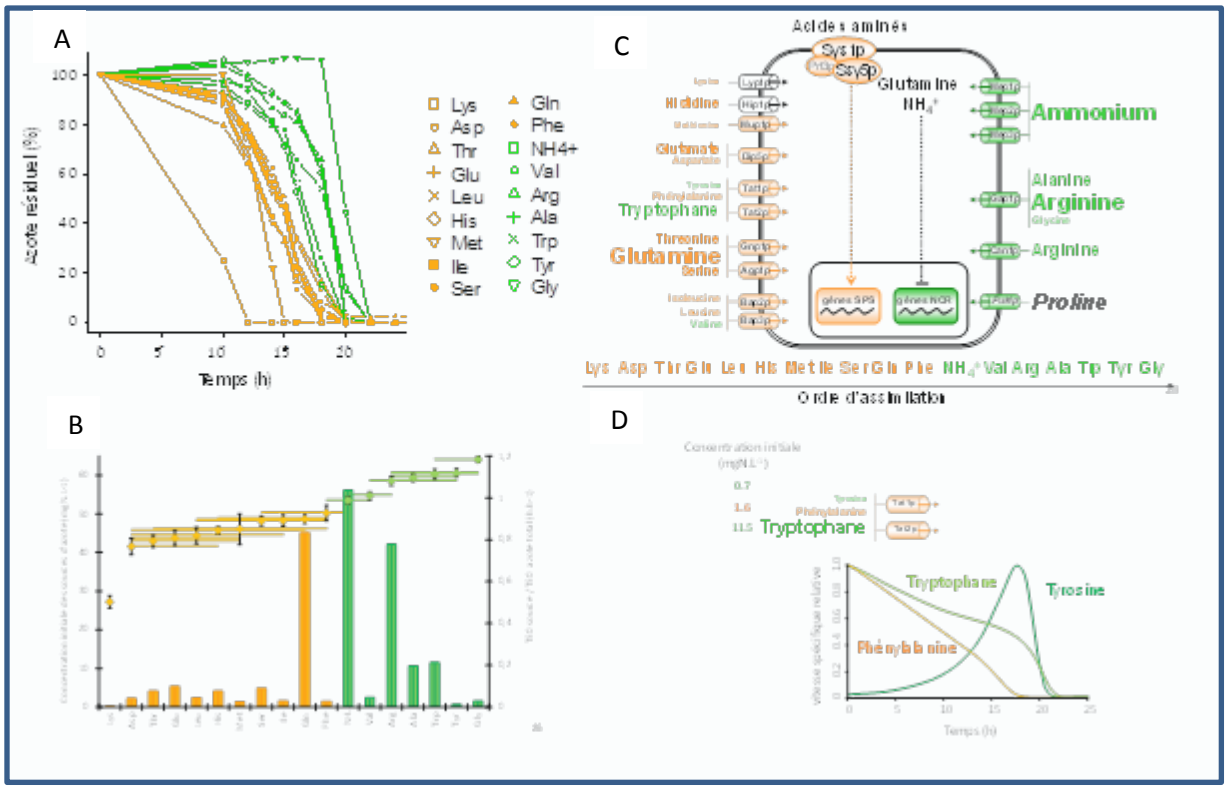


Figure 19. Séquence d'assimilation des acides aminés et de l'ammonium par la levure au cours de la fermentation œnologique. A. Consommation des 18 sources d'azote au cours de la fermentation (milieu MS, 200 mg N/L). Les concentrations sont représentées en % de la teneur initiale de chaque compsé. Les composés consommés en début de fermentation sont représentés en orange, les plus tardifs en vert. B. Représentation graphique du test de Tukey permettant de différencier les sources d'azote en trois groupes : consommation prématurée, précoce et tardive. Les histogrammes représentent les concentrations initiales de chaque composés dans le milieu. C. Schéma récapitulatif des transporteurs des sources d'azote et de leur mode de régulation. La partie gauche du graphique regroupe perméases sous contrôle SPS, la partie droite les acides aminés sous contrôle NCR. La séquence d'assimilation est reportée sur l'axe en bas du graphique. D. Transport des acides aminés aromatiques. L'évolution relative des vitesses spécifiques montre que le tryptophane et la tyrosine sont transporés efficacement après épuisement de la phénylalanine.

ORIGINE DES DIFFERENCES DE CROISSANCE ENTRE SOUCHES

La comparaison des cinétiques de consommation de l'azote et des caractéristiques de croissance (14 souches, fermentations réalisées en triple) a permis d'établir l'existence d'une relation directe entre capacité de production de biomasse (fortes / faibles productrices) et vitesse d'assimilation de l'azote. Le

comportement de trois souches, représentatives de chaque groupe, a été caractérisé plus en détail afin d'essayer d'identifier l'origine des différences de croissance entre souches.

Une analyse en composante principale (ACP) des caractéristiques fermentaires, de croissance et de consommation de l'azote (vitesse d'assimilation de l'azote total et des 3 principales sources d'azote du milieu : ammonium, glutamine et arginine) montre que le lien entre production de biomasse et la vitesse de consommation de l'azote est retrouvé quelle que soit la teneur (de 50 à 500 mg N/L) en azote du milieu (Figure 20). Globalement, ces deux paramètres augmentent avec la disponibilité en azote. Toutefois, les variables les plus explicatives pour discriminer souches faibles et fortes productrices de biomasse varient avec la teneur en azote du milieu.

Pour de fortes teneurs en azote, nous avons montré que les souches 'faibles productrices' avait une capacité limitée à assimiler l'ammonium qui se traduisait par une consommation incomplète ce composé, qui est une source d'azote riche et favorable à la croissance. Ainsi, une plus faible vitesse de consommation de l'ammonium est le principal facteur qui contribue à la moindre efficacité de croissance de ces souches en condition d'excès d'azote.

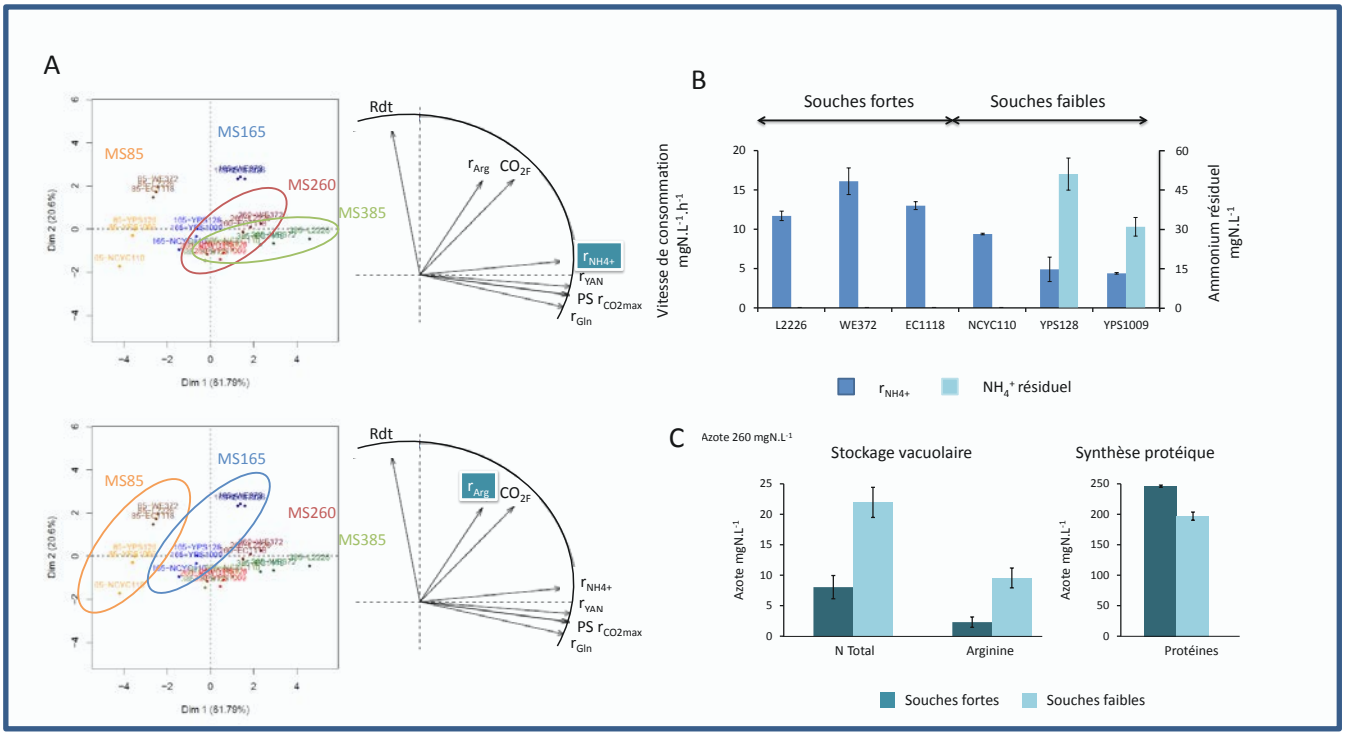


Figure 20. Différents mécanismes sont à l'origine des différences de capacité de production de biomasse des souches. A. Analyse en composante principale de 6 souches (3 fortes productrices / 3 faibles productrices de biomasse) au cours fermentation sur des milieux contenant des concentrations variables en azote (85, 165, 260, 385 mg N/L). Sur le cercle des corrélations, sont portés en bleu les paramètres contribuant à la discrimination des souches sur milieu à forte (partie haute) et faible (partie basse) concentration en azote. B. Vitesse de consommation de l'ammonium et ammonium résiduel pour les 6 souches lors de fermentations sur milieu contenant 385 mg N/L. C. Détermination de l'azote utilisé pour la synthèse protéique et de l'azote stocké dans la vacuole au cours de la fermentation/

Lorsque l'azote est limitant, les souches se différencient essentiellement par leur vitesse de consommation de l'arginine. L'arginine est un acide aminé basique, qui peut être stocké dans la vacuole (ref). Nous avons alors décidé de réaliser une analyse détaillée du devenir de l'arginine chez les deux souches EC1118 (forte productrice) et YPS128 (faible productrice) au cours de la phase de croissance (détermination des fractions cytoplasmiques et vacuolaires en arginine, quantification de la part d'arginine incorporée dans les protéines). Un bilan quantitatif a permis de montrer une capacité plus importante des souches 'fortes productrices' à métaboliser, dans les derniers stades de la croissance, l'arginine qui est accumulée dans la vacuole pendant la phase exponentielle (tableau IV). Ainsi, un stockage plus important d'arginine est observé chez les souches faibles productrices en fin de croissance, qui est probablement à l'origine de leur moindre rendement de production de biomasse par rapport aux souches 'fortes productrices'. (Crépin et al., en préparation).

ANALYSE QUANTITATIVE DU METABOLISME DE L'AZOTE EN FERMENTATION

Le réseau décrivant le métabolisme de l'azote au cours de la fermentation œnologique est particulièrement compliqué du fait de la nature de la ressource azotée, qui regroupe 18 composés différents. Une analyse de ce réseau et de son fonctionnement potentiel conduit à s'interroger :

- sur le devenir des sources d'azote exogènes. Une fois dans la cellule, ces composés peuvent être soit directement incorporés dans les protéines, soit stockés (vacuole) soit catabolisés par trans-amination avec de l'αKG, qui sert d'accepteur du groupement amine, pour former du glutamate et un α-céto acide qui rejoint le métabolisme carboné central ou sert de précurseur pour la synthèse d'alcools supérieur.
- sur l'origine des acides aminés protéinogéniques. Les acides aminés de la fraction protéique peuvent provenir d'une incorporation directe des acides aminés exogènes. Ils peuvent également être issus d'une synthèse *de novo*, à partir d'un groupement amine provenant de l'ammonium ou d'un autre acide aminé via le glutamate, et d'un squelette carboné α-céto acide (provenant du métabolisme carboné central et/ou dans certains cas, du catabolisme d'un autre acide aminé.

Pour répondre à ce double questionnement, j'ai mis en place un projet qui s'est inscrit dans un cadre plus large que la thèse de Lucie Crépin et qui a bénéficié d'un soutien du département MICA (Master 2 de Nhat-My Truong). A terme, l'objectif est d'apporter une vision quantitative du métabolisme de l'azote au cours de la fermentation œnologique, en précisant notamment la part de la synthèse de novo des acides aminés pour la synthèse protéique, la contribution du catabolisme des acides aminés pour la formation des alcools supérieurs et de leurs dérivés estérifiés…

Compte-tenu de la complexité du réseau à analyser, j'ai choisi de développer une approche qui combine des expériences de filiation isotopique à partir d'acides aminés marqués soit sur le squelette carboné (^{13}C) soit sur leur groupement amine (^{15}N). Le taux d'incorporation de marquage est mesuré dans les acides aminés protéinogéniques et dans le cas d'un marquage C, dans les composés aromatiques, plus spécifiquement dans les alcools supérieurs. Le premier type de marquage apportera des informations sur le devenir des acides aminés exogènes et sur la contribution de la synthèse *de novo* au pool d'acide aminés protéinogéniques, alors que le second devrait permettre d'évaluer l'implication de chaque source d'azote pour fournir l'azote nécessaire à la formation d'un acide aminé protéinogénique cible. A terme, la réconciliation des données de marquages produites à partir des 18 sources d'azote devrait donner une image fonctionnelle du réseau métabolique de l'azote et de formation des alcools supérieurs au cours de la fermentation (figure 21). Les fermentations sont réalisées dans des conditions standardisées dans un milieu contenant toutes les sources d'azote mais dont une seule est marquée. La reproductibilité des profils de consommation des sources d'azote et de formation de biomasse dans ces conditions de culture a été établie.

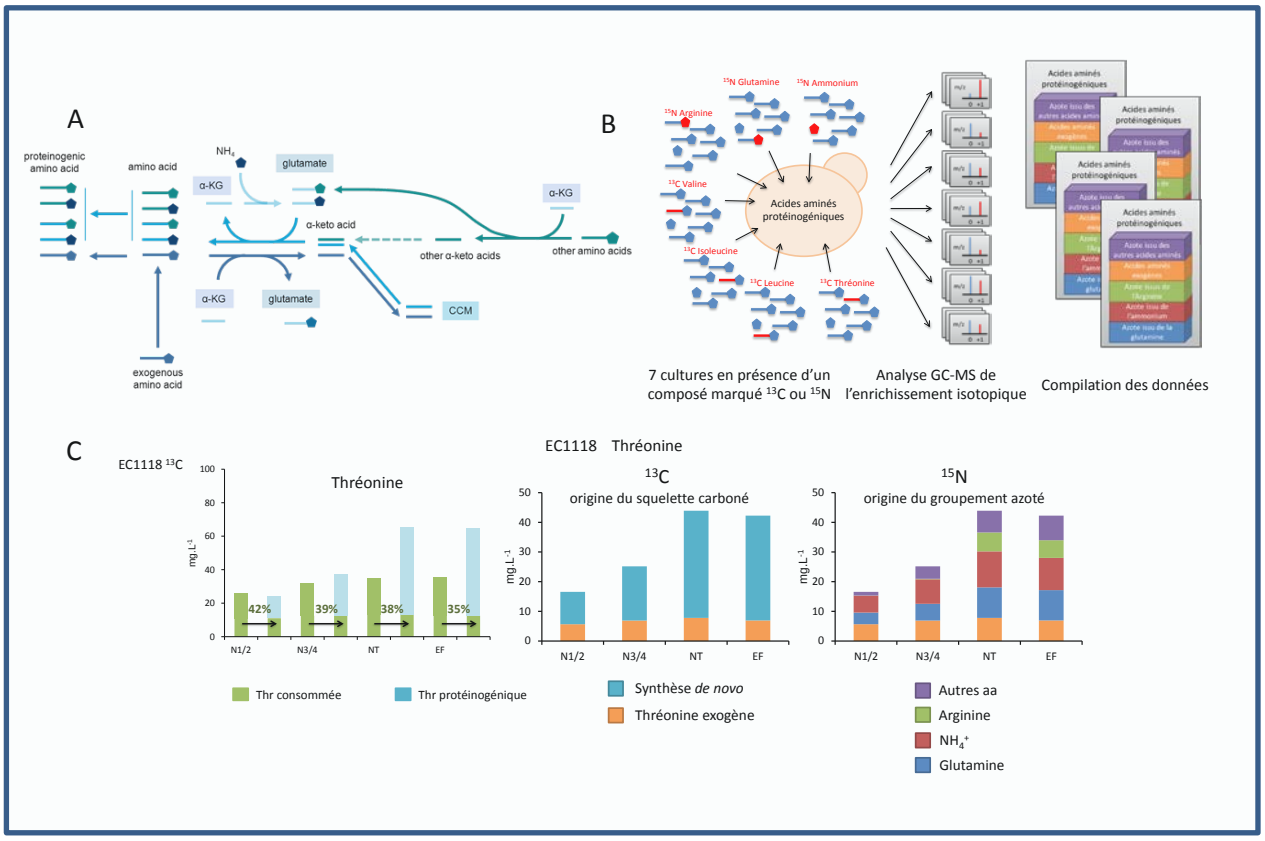


Figure 21. Analyse quantitative du métaboliseme de l'azote . A. Devenir possible de la fonction amine et du squelette carboné des composés azotés dans la cellule . B. Schéma de==récapitulatif de l'approche utilisée pour quantifier la distribution des flux au travers du réseau métabolique azoté. C. Quanfification des flux d'utilisation de la thréonine exxogène et de formation de la thréonine protéinogénique à partir des données de filiation.

Pour débuter ce programme, de large envergure, nous avons choisi de réaliser les filiations ^{15}N à partir des trois sources d'azote les plus abondantes (ammonium, glutamine et arginine) et ^{13}C à partir

des acides aminés précurseurs des alcools supérieurs les plus abondants (valine, leucine, isoleucine, et thréonine). Je présenterai ici quelques exemples des informations qui peuvent être obtenues, à partir de l'analyse, pour le moment intermédiaire, des données.

Tout d'abord, à partir des données de filiation ^{13}C, nous avons pu établir que pour la plupart des acides aminés étudiés (Val, Ile, Gln, Thr), seule une fraction d'acide aminé exogène consommé est directement incorporé dans les protéines (figure 21). Cela indique tout d'abord une forte activité du catabolisme des acides aminés, dont une grande part - entre 49 % de l'isoleucine consommée et 62 % de la thréonine consommée - sont transaminés pour former du glutamate et libérer un squelette carboné α-céto acide. La leucine, qui est en totalité incorporée dans les protéines, constitue un cas à part.

Si on se situe au niveau des acides aminés protéinogéniques, nos bilans de conversion montrent que moins de 20 % des acides aminés présents dans les protéines proviennent directement d'une incorporation directe des composés consommés. Ainsi, plus de 80 % des acides aminés protéinogéniques possèdent un squelette carboné synthétisé à partir du métabolisme carboné central (figure 21).

L'analyse combinée des données de filiation ^{13}C et ^{15}N nous a informé sur l'origine de l'azote utilisé pour la synthèse *de novo*. Les trois sources d'azote majoritaires du milieu de culture apportent environ 80 % de l'azote nécessaire à l'anabolisme. Toutefois, la la dynamique d'incorporation de ces sources dans les acides aminés synthétisés semble contrôlée par leur séquence d'assimilation : en début de culture, l'azote provient essentiellement de la glutamine et de l'ammonium, alors qu'en fin de croissance, la fraction des acides aminés synthétisés à partir de l'azote issu de l'arginine augmente (figure 21).

Incidence sur le métabolisme des ajouts d'azote en fermentation continu bi-étagée

Le point de départ de projet est le constat des difficultés souvent rencontrées lorsqu'il s'agit de comparer, au cours de la fermentation œnologique, les caractéristiques métaboliques ou le profil d'expression génique de deux souches de levures pour évaluer leur diversité ou pour analyser les conséquences d'une modification génétique, ou d'une souche dans des conditions environnementales différentes. Du fait de la dynamique du procédé batch utilisé et des différences dans les cinétiques de croissance et de fermentation, il est très souvent malaisé de définir les points de prélèvements permettant d'obtenir des cellules dans le même état physiologique. J'ai mené une réflexion sur cette problématique avec Jean-Marie Sablayrolles (responsable du groupe Conduite des Fermenations) et Sylvie Dequin, afin de définir un mode de conduite de la fermentation permettant d'étudier les levures au cours de la fermentation œnologique et en système stable. La mise en place d'un système chemostat, puisqu'il impose le taux de croissance, permettrait d'obtenir des cellules de différentes souches dans un état physiologique comparable. Toutefois, ce mode de culture n'est pas envisageable pour décrire la

totalité de la fermentation alcoolique, qui se déroule pour la majeure partie en phase stationnaire, avec des cellules non proliférantes. Un système de fermentation continue multi-étagée a alors été envisagé pour répondre à notre cahier des charges, qui conduit à transformer l'évolution temporelle de la fermentation œnologique en batch par une évolution spatiale. La thèse de Tiphaine Clément, que j'ai co-encadrée avec Jean-Marie Sablayrolles a porté sur cette thématique.

MISE AU POINT D'UN FERMENTEUR CONTINU MULTI-ETAGE

La stratégie que nous avons définie repose sur la mise en série de plusieurs cuves de fermentation, chacune d'elles étant alimentée, à vitesse constante, par du milieu provenant de la cuve précédente (figure 22). Ainsi, les premiers étages permettent la croissance des levures et l'épuisement du milieu en azote, qui est le nutriment limitant la croissance en batch, et alimentent en cellules les derniers étages, qui fonctionnent avec des « resting cells », mimant ainsi la phase stationnaire de la fermentation œnologique.

Un dispositif expérimental de fermenteur continu multi-étagé (de 2 à 4 étages), doté en particulier d'un système permettant d'ajuster de façon indépendante le débit d'alimentation de chaque étage et d'un système d'acquisition en ligne de la production de CO_2 a été développé par Tiphaine Clément et Marc Perez (Groupe Contrôle de la Fermentation).

Nous avons ensuite montré que la mise en œuvre de la fermentation œnologique en système continu nécessite un système comportant à minima 3 étages : un premier fermenteur correspondant à la phase de croissance, alimentant un deuxième étage permettant l'épuisement en azote du milieu et un troisième étage comportant des cellules en non-croissance, comparable à un état de phase stationnaire du procédé batch (Clément et al., 2011). La faisabilité d'un mode de conduite continu multi- étages pour miner les différents stades de la fermentation alcoolique batch a été établie par comparaison de paramètres cinétiques, métaboliques et de croissance mesurés pour les deux systèmes à même avancement de réaction. Ainsi, en appliquant des taux de dilution variables sur les différents étages, il est possible de décrire toute l'évolution dynamique du procédé batch (Figure 22B). D'autre part, la bonne répétabilité de ce mode de fermentation (qui est un élément clef par rapport aux contraintes qui ont été définies en début de projet : comparaison de souches dans un même état physiologique) a pu être établie, en reproduisant plusieurs fois une fermentation continue multi-étagée avec des points de fonctionnements définis (figure 22C).

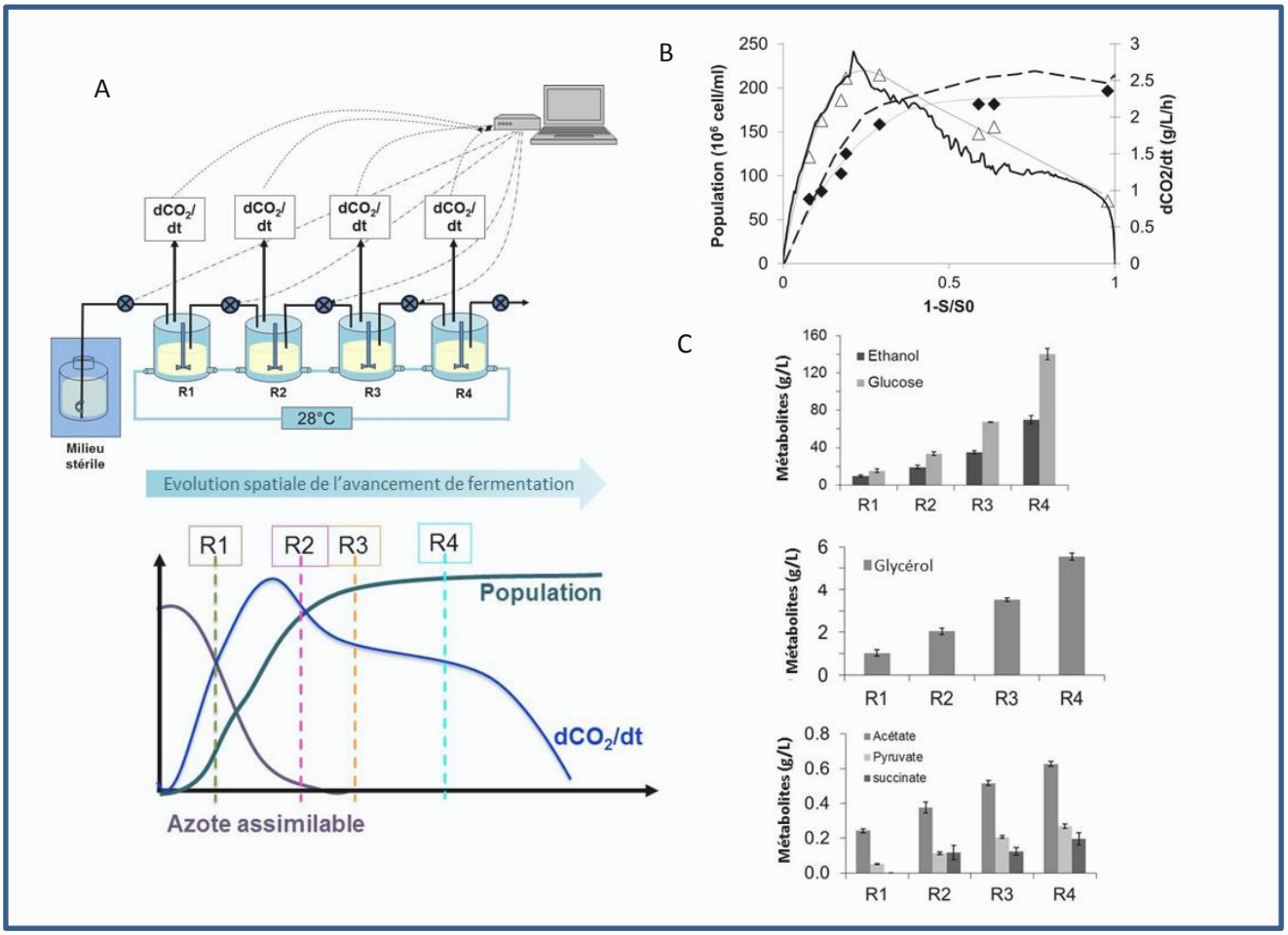


Figure 22. La fermentation continue multi-étagée : un outil de choix pour miner la fermentation œnologique à l'état stable. A. Principe du fermenteur continu multi étagée : 4 cuves sont reliées en série, chacune d'elle étant alimentée par le milieu issu de la cuve de fermentation précédente. Le taux de dilution appliqué à chaque fermenteur peut être ajusté indépendamment. D'autre part, le dispositif expérimental est équipé d'un système de suivi en ligne du dégagement de CO_2. Cet outil permet de transformer l'évolution dynamique du batch en une évolution spatiale. B. Comparaison des vitesses de dégagement de CO_2 (décrivant l'activité fermentaire) et de la population cellulaire entre fermentation batch et différents points de fonctionnement du FCME, aux mêmes stades d'avancement de la fermentation (fermentation réalisées avec des taux de dilution différents, paramètres mesurés sur les 4 étages). Batch : vitesse de fermentation ( ) ; croissance (- -). FCME : vitesse de fermentation (Δ) ; croissance (♦). C. Reproductibilité des fermentations continues multi-étagées : production des métabolites (moyenne et écart-type) obtenues au cours de 4 FCME réalisées dans des conditions expérimentales identiques (souche EC1118, milieu syntthétique, taux de dilution appliqués respectivement à chaque étage de : 0.22 h^{-1}, 0.3 h^{-1}, 0.13 h^{-1}, 0.07 h^{-1}.

AJOUTS D'AZOTE EN PHASE STATIONNAIRE D'UNE FERMENTATION CONTINUE MULTI-ETAGEE

La deuxième partie de ce projet consistait à évaluer les apports de la FCME pour des études sur le métabolisme de la levure en fermentation œnologique. Plusieurs éléments m'ont amenée, en accord avec Jean-Marie Sablayrolles, à utiliser ce mode de conduite pour analyser les conséquences d'un ajout d'azote au cours de la phase stationnaire.

En industrie, les ajouts d'azote en cours de vinification (sous forme d'azote ammoniacal) sont largement pratiqués afin de maintenir la vitesse de fermentation à un niveau élevé pendant la phase stationnaire

de la fermentation alcoolique, et ainsi de diminuer la durée du procédé. Par contre, il n'existe que peu d'études analysant les conséquences métaboliques de ces ajouts. En particulier, les données de la littérature concernant les répercussions d'un ajout d'azote sur la production de composés volatils, dont la formation est étroitement liée au métabolisme de l'azote, sont peu nombreuses et souvent contradictoires. Il convient donc d'élucider les mécanismes impliqués dans la réponse directe de la levure à un ajout d'azote, afin de mieux comprendre les ré-orientations métaboliques qui en découlent. Le système de FCME, dont la particularité est de pouvoir obtenir des cellules dans un état physiologique stable et correspondant à la phase stationnaire de la fermentation œnologique, apparaît être un outil de choix pour traiter cette problématique.

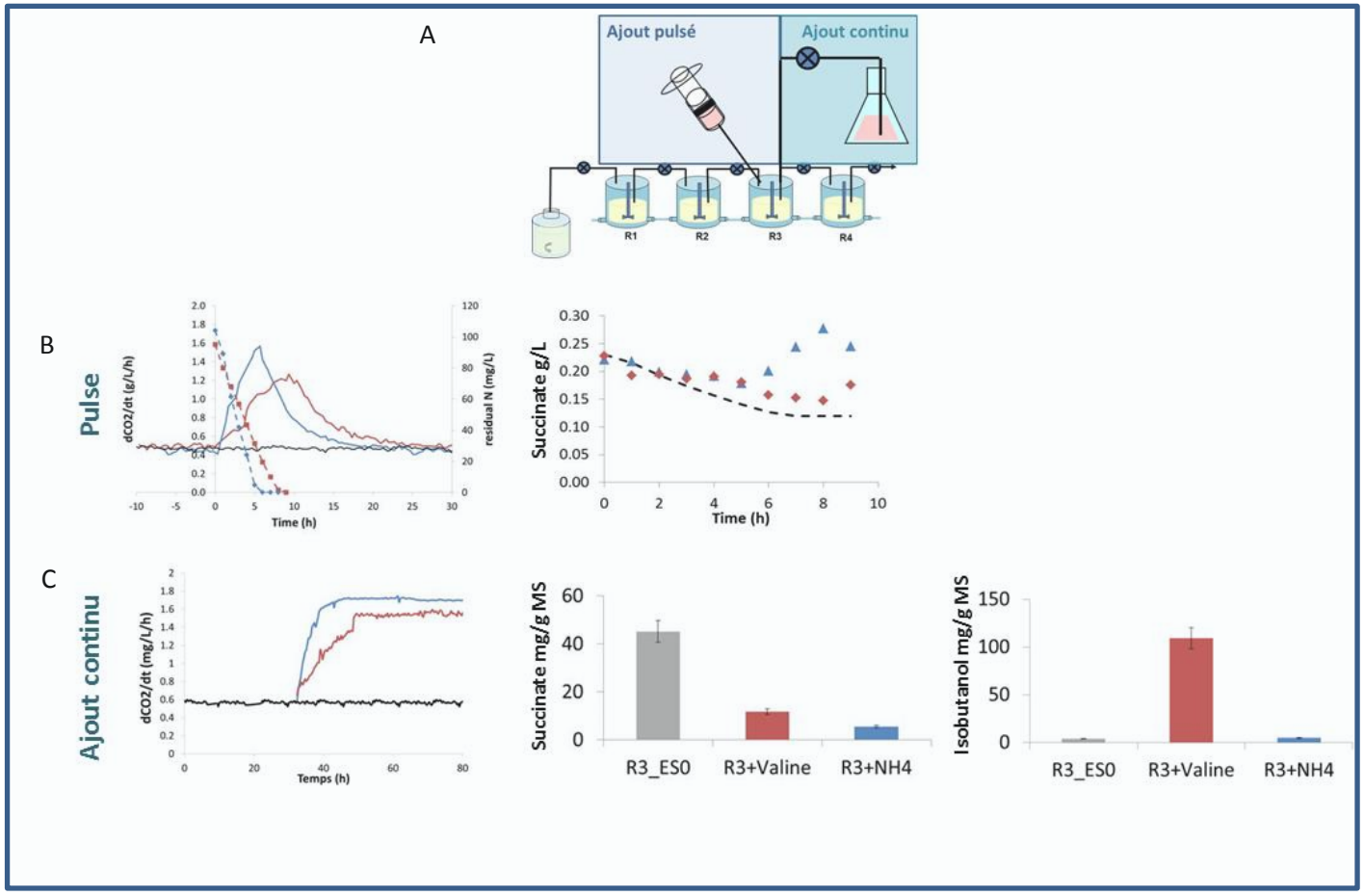


Figure 23. Ajouts d'azote pendant la phase stationnaire d'une fermentation continue multi-étagée. A. Schéma du protocole expérimental utilisé : de l'azote sont apportés sous forme d'ammonium ou de valine dans le troisième étage d'une FCME (souche EC1118, milieu synthétique mimant un moût de raisin contenant 200 g/L de glucose et 100 mg/L d'azote ; taux de dilution respectifs de chaque étage 0.27 h^{-1}, 0.24 h^{-1}, 0.11 h^{-1}, 0.10 h^{-1}). Les ajouts sont réalisés sous forme d'un ajout massif de 100 mg N/L (pulse) ou de façon progressive, de façon à apporter 10 mg N/L/h) B. Conséquence d'un pulse d'ammonium (bleu) ou de valine (rouge) sur la vitesse de dégagement de CO_2 (trait plein) et la consommation d'azote (tirets) et sur la concentration en succinate dans le milieu –la ligne pointillée correspond à la cinétique de lavage dans le troisième étage-.. C. Conséquences d'un ajout continu d'ammonium (bleu) et de valine (rouge) sur la vitesse de dégagement de CO_2 et sur la production de succinate (la barre grise correspond à la production de succinate avant ajout).

Pour obtenir une vision globale de la réponse de levure à un ajout d'azote en phase stationnaire et des mécanismes de régulation mis en jeu, une démarche intégrée (figure 23) a été développée, basée sur :

- l'étude de la dynamique de la réponse, par suivi de l'évolution de la formation des métabolites suite à un ajout pulsé d'azote
- la comparaison de deux états physiologiques stables, caractérisés notamment par les profils d'expression génique et de métabolites intra et extra cellulaires, sans et avec ajout continu d'azote.

Les conditions de FCME ont été standardisées à un état de fonctionnement, et les ajouts sont effectués dans le troisième étage, qui correspond au moment de l'entrée en phase stationnaire, et sous forme d'ammonium, comme cela est pratiqué en œnologie, ou de valine, choisi comme modèle d'acide aminé précurseur de la synthèse d'alcool supérieur (isobutanol).

L'analyse intégrée des modifications des paramètres cinétiques, de croissance, de production des métabolites et d'expression génique a tout d'abord montré une réponse coordonnée de la levure aux ajouts d'azote en phase stationnaire, principalement pilotée par la synthèse *de novo* des acides aminés liée à l'augmentation de la disponibilité en azote. Cela se traduit par une augmentation de la croissance et de la vitesse fermentaire, mais aussi par des ré-orientations métaboliques vers la formation des précurseurs pour la synthèse des acides aminés, induisant des changements importants du profil des produits de fermentation. Par exemple, une diminution de la formation de pyruvate est induite à la fois par les ajouts continus et pulsés d'ammonium et de valine, qui traduit une utilisation massive d'αKG pour la synthèse de glutamate (figures 23, 24). De même, une augmentation de la production de propanol est observée, qui est probablement en lien avec l'activation du l'ensemble du métabolisme des acides aminés soufrés liée aux ajouts d'azote. De façon inattendue, les ajouts d'azote en phase stationnaire n'induisent pas une augmentation globale de la synthèse des alcools supérieurs : seule une augmentation de la synthèse d'isobutanol est observée lors d'un ajout de valine. Cela va dans le sens d'une utilisation préférentielle des précurseurs α-céto acides vers la synthèse *de novo* d'acides aminés au détriment de la formation de composés volatils.

La comparaison de la réponse de la levure à des ajouts d'ammonium et de valine a montré une adaptation plus rapide de la levure à un ajout d'ammonium, par rapport à la valine. Cela peut être expliqué par un niveau d'expression plus élevé des gènes *MEP1,2,3* codant pour des transporteurs d'ammonium que des gènes *BAP2,3* impliqués dans l'entrée la valine dans les cellules en phase stationnaire. En effet, les gènes *MEP1,2,3* sont soumis à un contrôle NCR et donc exprimés en conditions de limitation d'azote, comme cela est le cas en phase stationnaire. Par contre, les gènes *BAP2,3* sont spécifiquement induits par la présence de valine (non exprimés en phase stationnaire), et

un temps nécessaire à leur resynthèse est requis suite au pulse de valine. Nous avons ensuite établi que des modifications spécifiques, dépendantes de la nature de la source d'azote ajoutée, pouvaient également être induites. Par exemple, l'ajout de valine conduit à une forte augmentation de la synthèse d'isobutanol, liée à l'assimilation de cet acide aminé par la voie d'Erlich.

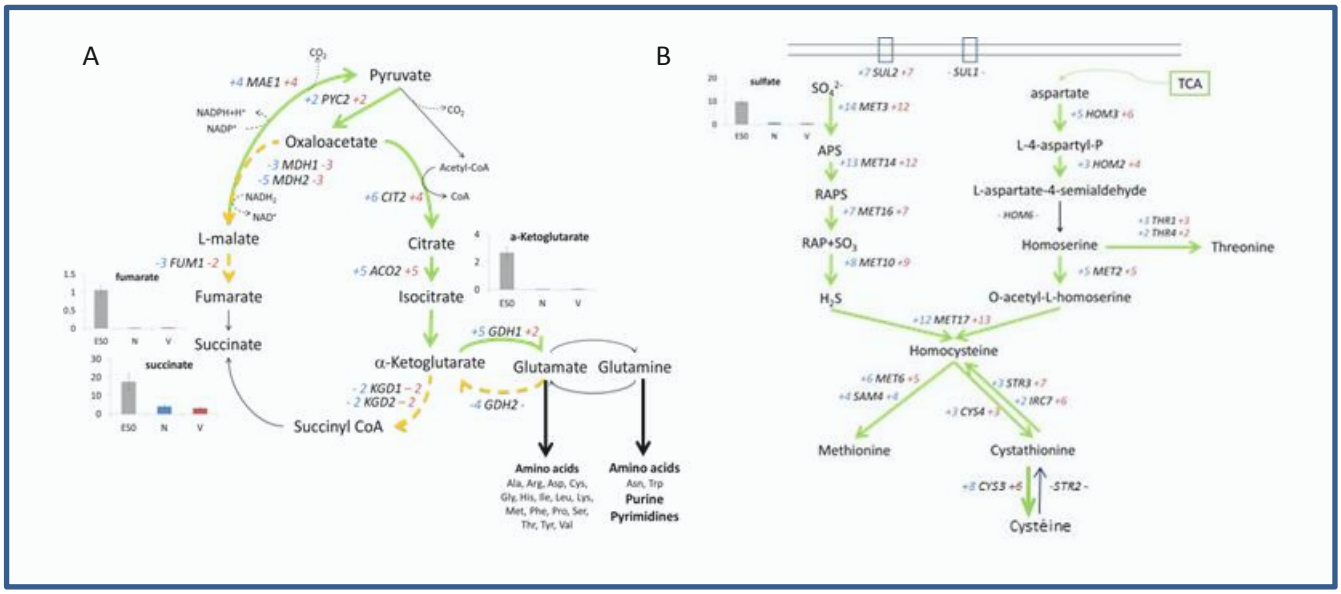


Figure 24. Principales réorientations métaboliques induites par un ajout continu d'ammonium ou de valine. A. Au niveau du du cycle des acides tri-carboxyliques et de a synthèse de glutamate. B. Au niveau du métabolisme des acides aminés soufrés et de leurs dérivés. Les variations d'expression des gènes sont exprimées sous forme de coefficient de variation par rapport à l'état d'équilibre sans ajout d'azote (Fc : fold change) pour les additions de valine (rouge) et d'ammonium (bleu). Induction : trait continu vert, signe positif. Répression : trait pointillé orangé, signe négatif. Les teneurs en métabolites intracellulaires sont présentées sous forme d'histogrammes, et sont exprimées en mg/g de matière sèche. Condition de contrôle (ES0) sans ajout : gris ; ajout d'ammonium : bleu ; ajout de valine : rouge.

De façon globale, ce travail a montré que la définition de stratégies permettant de contrôler la production de composés volatils pendant la fermentation œnologique ne pouvait se concevoir qu'en considérant à la fois les caractéristiques de la matière première (notamment la composition du jus de raisin en sources d'azote) et un petit nombre de molécules aromatiques cibles.

D'autre part, à l'issue de ce projet, nous disposons d'un dispositif original, permettant d'analyser les conséquences de modifications génétiques et environnementales sur la physiologie de la levure indépendamment de l'évolution dynamique des cultures batch et qui sera mis en œuvre dans le cadre d'autres projets de recherche de l'équipe.

7. Projets actuels et à venir.

Mon activité de recherche a toujours été focalisée sur la compréhension du métabolisme de la levure au cours de la fermentation œnologique. J'ai abordé cette thématique, tout d'abord, lors de mon intégration à l'UMR Sciences pour l'œnologie (anciennement Institut des Produits de la Vigne), par la caractérisation ciblée d'une étape ou d'une voie métabolique, puis, de plus en plus, par une analyse globale du fonctionnement et de la régulation du métabolisme. La seconde transition importante au cours de mon parcours scientifique a été la prise en compte, ces dernières années, de la diversité, génétique et phénotypique qui existe au sein de l'espèce *S. cerevisiae*. Cette variabilité ouvre de larges perspectives tant au niveau cognitif, pour l'identification des mécanismes sous-jacents à des traits phénotypiques spécifiques, qu'au niveau applicatif pour une meilleure exploitation du potentiel qu'elle offre.

J'envisage maintenant d'utiliser les compétences que j'ai acquises au niveau de la compréhension du métabolisme fermentaire de la levure mais aussi au niveau des approches et méthodologies qui peuvent être mises en œuvre pour l'étudier pour développer une démarche d'**analyse globale**, **quantitative et compréhensive** de la **diversité métabolique** chez *S. cerevisiae*. Cette problématique s'inscrit bien évidemment dans les priorités de recherche de mon unité. Elle permettra également de répondre à des demandes actuelles de la filière œnologique, dont l'un des enjeux majeurs est de produire des vins ayant un profil aromatique et organoleptique défini. Ce contrôle ne peut se faire qu'à partir d'une connaissance précise du fonctionnement du métabolisme et de sa régulation.

Dans ce contexte, les projets de recherches sur lesquels je travaille ou à venir portent sur deux thématiques principales :

- la quantification du métabolisme de la levure
- l'analyse de la diversité métabolique chez les levures

Analyse quantitative du métabolisme de la levure et de sa régulation

A l'issue de la thèse de Magalie Celton, nous disposions d'un outil, le modèle stœchiométrique DynamoYeast, permettant de prédire la distribution des flux au travers du métabolisme carboné central. Les travaux que nous avons menés récemment autour de l'assimilation de l'azote (thèses de Lucie Crépin et Tiphaine Clément), m'ont permis de souligner la forte dépendance entre métabolisme carboné central et de production des molécules aromatiques et métabolisme azoté au cours de la fermentation œnologique. En particulier, nous avons établi que les acides aminés synthétisés *de novo* représentaient une part importante des acides aminés protéinogéniques, part qui dépend notamment de la ressource azotée disponible -nature, quantité- pour la levure. Or, la synthèse de novo d'acides

aminés nécessite des précurseurs carbonés issus du métabolisme carboné central : le profil d'assimilation de l'azote va donc être une contrainte vis-à-vis du fonctionnement du métabolisme carboné central. De plus, la fraction des sources d'azote exogènes catabolisées en α-cétoacides pour céder leur fonction amine pour la synthèse *de novo*, va très probablement avoir une incidence sur le niveau de formation des alcools supérieurs et de leurs dérivés estérifiés, qui sont formés à partir de ces α-cétoacides.

Un autre élément reliant les métabolismes de l'azote et du carbone est l'utilisation de cofacteurs d'oxydoréduction communs. Par exemple, il a été largement décrit que le NADPH nécessaire à la formation des acides aminés était produit par deux étapes du métabolisme carboné central : la VPP et la production d'acétate. Ainsi, nous avons observé que les gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote (synthèse des acides aminés soufrés) étaient différentiellement exprimés en réponse à une perturbation de la demande en NADPH.

Ces observations nous ont conduits à initier un premier projet, portant sur l'analyse de l'impact d'une modification de la demande en NADPH sur la formation des composés volatils, dont le métabolisme est fortement lié à celui de l'azote. Ce travail, auquel je suis associée, constitue le projet d'Audrey Bloem, MDC rattachée depuis 1 an à notre équipe et dont les compétences se situent dans le domaine analytique. Notre démarche s'appuie sur l'utilisation du système BDH*, développé dans le cadre de la thèse de Magalie Celton, pour modifier la demande en NADPH au cours de la fermentation œnologique et sur l'analyse des profils aromatiques par une méthode GC-MS méthode développée par Audrey Bloem, qui permet la quantification précise de 10 alcools supérieurs, 16 esters et 10 acides. Une première comparaison des profils aromatiques en fin de fermentation indique qu'une augmentation de la demande en NADPH se traduit par une diminution de la formation des composés aromatiques, notamment des alcools supérieurs. Il s'agit maintenant d'analyser la dynamique de production de ces composés, en fonction de la demande en NADPH. Cela nous permettra de dégager des pistes pour identifier les mécanismes sous-jacents à la modulation de la formation des composés volatils par la disponibilité en NADPH, qui seront ensuite explorées.

Dans un cadre plus large, je souhaite prendre en compte le métabolisme de l'azote et les voies métaboliques impliquées dans la production des molécules aromatiques (alcools supérieurs et leurs esters d'acétate, esters d'éthyle) dans la démarche d'analyse quantitative du métabolisme. En effet, compte tenu des remarques précédentes, cette intégration apparaît maintenant être un pré-requis pour la compréhension du fonctionnement du métabolisme fermentaire de la levure. Ce projet s'articule suivant deux axes, car il s'agit tout d'abord de développer un outil de modélisation servant de cadre pour la prédiction de la distribution des flux au travers de ce réseau métabolique élargi, et ensuite de

produire les données biologiques pertinentes pour contraindre le modèle et prédire, de façon fiable, la répartition des flux.

Pour le développement d'un modèle général décrivant le métabolisme fermentaire de la levure, nous avons choisi de prendre comme point de départ le modèle DynamoYeast et d'y intégrer le réseau du métabolisme de l'azote (catabolisme et anabolisme des acides aminés, nœud glutamate/glutamine permettant l'assimilation de l'ammonium) et de formation des composés volatils, souvent connectés. L'ensemble des réactions à ajouter ont été sélectionnées comme pertinentes vis-à-vis des problématiques que nous souhaitons aborder, à partir d'une analyse bibliographique, et de notre expertise en métabolisme fermentaire de la levure. Une autre alternative aurait consisté à utiliser les modèles 'genome-scale', décrivant la totalité du réseau métabolique de la levure à partir des génes fonctionnels identifiés chez cet organisme et disponibles pour la communauté scientifique. Toutefois, des essais de modélisations utilisant ce type d'outil nous a fait prendre conscience que beaucoup de réactions qui le composent étaient a priori considérées comme non fonctionnelles ou fixées à des valeurs arbitraires, du fait de manque d'information biologique les concernant. Le développement de ce modèle constitue le projet de recherche principal de Thibault Nidelet (CR2), qui a rejoint notre équipe fin 2012, pour y apporter ses compétences en bio-informatique et modélisation.

A plus long terme, une mission que je souhaiterai confier aux modélisateurs pour répondre à nos besoins en ce domaine pour une analyse compréhensive du fonctionnement du métabolisme, sera l'intégration de données multi-échelles, notamment la prise en compte de données de régulation pour la prédiction des flux par notre modèle.

Le deuxième point clef pour pouvoir étendre DynamoYeast à la prédiction des flux au travers des métabolismes carboné et azoté est la production d'informations biologiques pertinentes pour contraindre le modèle. En effet, comme je l'ai présenté pour introduire le projet de thèse de Lucie Crépin, la description du métabolisme d'une ressource azotée multiple, comme dans le cas de la fermentation œnologique, fait appel à un grand nombre de réactions, et des données quantitatives sont nécessaires pour restreindre l'ensemble des « solutions possibles » calculées par le modèle et conduire à une prédiction fiable. Pour cela, j'envisage de poursuivre l'approche initiée dans le cadre de la thèse de Lucie Crépin, basée sur la combinaison d'expérience de filiation isotopique du ^{13}C et du ^{15}N à partir d'acides aminés. Il s'agit d'une part d'étendre la gamme des acides aminés utilisés pour le traçage, et d'autre part d'évaluer l'incorporation des isotopes ^{13}C et ^{15}N dans les composés aromatiques, notamment les alcools supérieurs et les esters. Ces expériences permettrons tout d'abord de préciser la contribution des différentes voies métaboliques à la formation d'un composé cible. Ensuite, dans un contexte plus global, ces données seront utilisées comme contraintes du modèle DynamoYeast étendu, afin de fournir une vision quantitative et intégrée des métabolismes carboné et azoté pendant la fermentation œnologique.

A plus long terme, j'envisage d'utiliser ce type de démarche pour mieux comprendre la régulation des métabolismes mis en jeu, à partir de données quantitatives de distribution des flux métaboliques, associées ou pas à d'autres données 'omics' : transcriptome, métabolome… obtenues dans des situations biologiques différentes. Il s'agira par exemple d'analyser l'adaptation métabolique de la levure à la disponibilité en ressources azotées - nature, quantité - et d'évoluer son impact sur le profil aromatique, ou d'évaluer sa réponse à une intervention technologique - ajout d'azote - en cours de fermentation. La diversité intra-spécifique chez *S. cerevisiae* pourra, également à l'aide de ces approches, être quantifiée au niveau de la fonctionnalité du réseau métabolique des différentes souches.

En ce qui concerne le modèle DynamoYeast, il pourra être étendu au métabolisme des lipides, dont certaines voies sont liées à la formation de composés aromatiques du vin, les esters éthyliques d'acides gras. Un autre enjeu sera de pouvoir intégrer dans cet outil de modélisation des données multi-échelle. Il s'agira en particulier de prendre en compte la régulation –au travers du profil d'expression génique-, comme contrainte pour la prédiction de la répartition des flux dans le réseau métabolique de la levure.

Diversité métabolique des levures

Le second volet sur lequel je désire orienter mes travaux de recherches est l'exploration de la diversité phénotypique de *S. cerevisiae* que nous avons évaluée dans le cadre du projet « Phénotypage ».

Ainsi, à court terme, les travaux menés pendant la thèse de Lucie Crépin sur l'origine des différences entre souches au niveau de leur capacité de production de biomasse vont être poursuivis. L'objectif général sera d'essayer de préciser les bases moléculaires sous-jacentes aux mécanismes métaboliques que nous avons établis.

Les différences entre souches de vitesse de consommation de l'ammonium peuvent être dues à une moindre efficacité des transporteurs de l'ammonium, ou encore à une plus faible expression des gènes codant ces transporteurs chez les souches faibles productrices de biomasse. Un alignement de séquence des gènes *MEP1,2,3* codant pour les 3 transporteurs de l'ammonium pour les 6 souches étudiées, a montré que la séquence protéique de ces transporteurs est conservée, mais des différences sont observées dans les régions promotrices. Une insertion (allant de 7 à 36 bp ; en général 16 pb) dans le promoteur du gène *MEP1* des souches faibles productrices – qui sont des isolats d'écorces de chêne- par rapport aux souches fortes productrices, d'origine œnologique, et à la souche de référence S288c. L'expression du gène *MEP1* est sous le contrôle NCR ; cette insertion, qui se trouve entre deux sites de fixation GATA des facteurs d'activation Gln3p et Gat1p du NCR, pourrait être à l'origine de différences d'expression du transporteur Mep1p. Cette insertion est absente chez de nombreuses souches œnologiques et chez la souche de brasserie NCYC110 qui consomme la totalité de l'ammonium en

condition d'excès d'azote, alors qu'elle est retrouvée chez plusieurs souches naturelles de chênes et de cactus. Cette hypothèse doit maintenant être validée par remplacement allélique.

Il conviendrait également de préciser l'origine de la plus grande efficacité des souches fortes productrices de biomasse à remobiliser l'arginine vacuolaire en fin de croissance. Plusieurs transporteurs de la vacuole permettent l'export des acides aminés de cette organelle (Sekito et al., 2008; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). Néanmoins, aucun n'a été identifié pour l'export de l'arginine. Ainsi, la sortie de l'arginine peut être catalysée via un transporteur non spécifique déjà décrit ou un transporteur encore non caractérisé. D'autre part, les mécanismes de régulation de l'activité de ces transporteurs restent encore peu connus. L'identification du ou des transporteurs impliqués et l'étude comparative de leur séquence et de leur niveau expression dans différentes souches pourrait permettre d'avancer dans la compréhension des bases génétiques de ces différences.

En dernier lieu, il semble important d'aborder de façon plus globale s'il existe des différences entre souches au niveau des mécanismes de régulation de l'utilisation de l'azote, dont les principaux (NCR et GAAC) sont dépendants de la concentration intracellulaire des acides aminés. Ainsi, la comparaison des profils transcriptomiques d'un groupe de souches fortes productrices avec ceux d'un groupe de souches faibles productrices permettrait d'obtenir une vision globale des différences entre souches d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote et de sa régulation. Ces données pourraient aussi être complétées par des analyses de teneurs intracellulaires en acides aminés libres. La disponibilité de la séquence complète du génome de ces souches permettra de rechercher des variations ciblées. A plus long terme, une approche de recherche de *loci* liés à des traits quantitatifs (QTL) pourrait être envisagée en utilisant un croisement entre une souche œnologique et une souche de chêne, et en phénotypant la descendance pour le caractère production de biomasse en conditions œnologiques.

L'analyse de la diversité phénotypique, amorcée dans le cadre de la thèse de Lucie Crépin en se focalisant sur un caractère phénotypique particulier : la capacité de production de biomasse, a reposé sur une démarche d'analyse physiologique comparative d'un petit groupe de souches ayant un comportement extrême vis-à-vis du phénotype étudié. Ce type d'approche pourra être mené pour l'étude des mécanismes sous-jacents à d'autres caractères phénotypiques.

Une autre approche apparaissant être un outil de choix pour identifier les bases moléculaires à l'origine de traits phénotypiques est la recherche de QTL. Il s'agit de rechercher, au sein d'une population, les variations alléliques liées à des variations phénotypiques. Dans ce contexte, les informations issues du phénotypage de 72 souches d'origines diverses en conditions œnologiques, constitue une base de données de référence pour mettre en place des approches de recherche de QTL visant à préciser les gènes impliqués dans des traits métaboliques d'intérêt technologique. Un projet est actuellement mené à partir d'un couple de souches, dont la séquence est disponible et présentant de

fortes variations dans les caractères métaboliques (production de glycérol, acétate, succinate). Il a été facilité par la mise à disposition, dans le cadre d'une collaboration, par G. Liti (Nottingham University, UK) d'une population de 96 ségrégants issus d'un croisement entre ces deux souches et pour lesquels environ 200 marqueurs génétiques aisément détectables ont été introduits, permettant de « baliser » le génome. L'ensemble de la descendance a déjà été phénotypé en conditions de fermentation oenologique et une recherche de polymorphismes de séquence associés notamment aux caractères métaboliques a été menée grâce à une méthode statistique « multiQTL » (Multiple Interval Mapping) en collaboration avec l'équipe de G. Liti. Une dizaine de loci ont été identifiés et sone en cours d'analyse.

Un de nos objectifs initiaux lors du projet « phénotypage » était de pouvoir définir s'il existait un lien entre le comportement phénotypique et le patrimoine génétique de chaque groupe de souches d'origine définie. Cela n'a pas pu être réalisé, du fait de la forte disparité dans le nombre d'individus composant chaque groupe (entre 2 et 10). D'autre part, un programme de séquençage haut débit de 56 souches de *S. cerevisiae* d'origine différentes est réalisé par le groupe Génomique (V. Galeote, F. Bigey, J.L. Legras) de mon unité. Chaque groupe : levures de voile, levures œnologique, levure de panification, levure de fromage, levure de rhum, levure de chêne est constitué de 7 individus. Cela m'a conduit à initier un projet de phénotypage de ces souches, en conditions œnologiques, mais aussi en conditions de fermentation de voile ou en conditions fromagères. En parallèle, les souches seront caractérisées vis-à-vis de leur résistance à certains stress rencontrés dans ces environnements industriels. L'objectif est de produire un jeu de données phénotypique complet de cette population afin :

- d'analyser la diversité au sein d'une population de souches dont la plupart (hormis le groupe chêne, considérée comme souches naturelles, non soumises à la pression de sélection par l'homme) proviennent de niches écologiques en lien avec l'activité humaine, donc très probablement contraintes vis-à-vis de caractères spécifiques ; des projets visant à l'identification de l'origine moléculaire de certains traits pourront alors être développés.
- de tester l'existence d'un lien génotype / phénotype entre chaque groupe
- de pouvoir prédire, à l'aide du modèle DynamoYeast, la distribution des flux dans le réseau métabolique de chaque souches et d'utiliser chaque flux comme variable pour l'analyse de la diversité ; à plus long terme, des approches QTLs de flux pourraient être envisagées.

8. Bibliographie

Aguera E., Bes M., Roy E., Camarasa C., Sablayrolles J.M. 2009. Partial removal of ethanol during fermentation to obtain reduced-alcohol wines. Am. J. Enol. Vit. 61:53-60.

Aiba S., Shoda M. 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotech. Bioeng. 10 :845-864.

Ameyama M., Matsushita K., Ohno Y., Shinagawa E., Adachi O. 1981. Existence of a novel prosthetic group PQQ in membrane-bound electron transport chain-linked primary dehydrogenases of oxidative bacteria. FEBS Lett. 130:170-183.

Andre B., Jauniaux J. 1990. Nucleotide sequence of the yeast *UGA1* gene encoding GABA transaminase. Nucleic Acids Res 18:3049.

Ansanay V., Dequin S., Blondin B., Barre P. 1993. Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis*. FEBS Lett. 332:74-80.

Ansanay V., Dequin S., Camarasa C., Schaeffer V., Grivet J.P., Blondin B., Salmon J.M., Barre P. 1996. Malolactic fermentation by engineered Saccharomyces cerevisiae as compared with engineered Schizosaccharomyces pombe. Yeast 12:215-225.

Argueso J.L., Carazzolle M., Mieczkowski P., Duarte F., Netto O., et al. 2009. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. Genome Res. 19: 2258–2270.

Bach B., Sauvage, F., Dequin S., Camarasa C. 2010. Role of GABA as a source of nitrogen and succinate in wine. . Am. J. Enol. Vit. 60: 508-516.

Bach, B., Meudec E., Lepoutre J.P., Rossignol T., Blondin B., Dequin S., Camarasa, C. 2009. New insights into gamma-aminobutyric acid catabolism: evidence for gamma-hydroxybutyric acid and polyhydroxybutyrate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microb. 75:4231-4239.

Bely M., Sablayrolles J.M., Barre P. 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. J. Ferment. Bioengin.70:246–252.

Beuchat L. 1983. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. J. Food. Protect. 46 :135-146.

Bielb H. 1991. Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH auxostat. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35 :701-705.

Blazejak S., Sobczak E. 1988. Bioconversion of glycerol into dihydroxyactone DHA using *Acetobacter xylinum*. Acta Alim. Polon. 14 :207-216.

Boles E., et al. Jong-Gubbels P., Pronk J. 1998. Identification and characterization of *MAE1*, the *Saccharomyces* cerevisiae structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. J. Bacteriol. 180:2875-82.

Bony M., Bidart F., Camarasa C., Ansanay V., Dulau L., Barre P., Dequin S. 1997. Metabolic analysis of *S. cerevisiae* strains engineered for malolactic fermentation. FEBS Lett. 410:452-456.

Cadière A., Ortiz-Julien A., Camarasa C., Dequin S. 2011. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. Metab Eng. 13:263-271.

Camarasa C., Bony M., Bidart F., BarreP., Dequin S. 2001. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microb. 67:4144-4151.

Camarasa C., Bony M., Bidart F., BarreP., Dequin S. 2001. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microb. 67:4144-4151.

Camarasa C., Faucet, V., Dequin, S. 2007. Role in anaerobiosis of the isoenzymes for *Saccharomyces cerevisiae* fumarate reductase encoded by *OSM1* and *FRDS1*. Yeast 24: 391-401.

Camarasa C., Grivet J.P., Dequin S. 2003. Investigation by ^{13}C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. Microbiology. 149 :2669-2678.

Camarasa C., Prieto S., Ros R., Salmon J.M., Barre P. 1996. Evidence for a selective and electroneutral K+/H+-exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. Yeast. 12:1301-1313.

Camarasa C., Sanchez I., Brial P., Bigey F., Dequin S. 2011. Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. PLoS One. 6:e25147

Cambon B., Monteil V., Remize F., Camarasa C., Dequin S. 2006. Effects of *GPD1* overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking ALD6 genes. Appl. Environ. Microb. 72 :4688-4694.

Celton M., Goelzer A., Camarasa C., Fromion V., Dequin S. 2012. A constraint-based model analysis of the metabolic consequences of increased NADPH oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab. Eng. 14:366-379.

Celton M., Sanchez I., Goelzer A., Fromion V., Camarasa C., Dequin S. 2012. A comparative transcriptomic, fluxomic and metabolomic analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to increases in NADPH oxidation. BMC Genomics 13:317.

Chapman K., Solomon S., Boeke J. 1992. *SDH1*, the gene encoding the succinate dehydrogenase flavoprotein subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 118:131-6.

Clement T., Perez M., Mouret J.R., Sablayrolles J.M., Camarasa C. 2011 Use of a continuous multistage bioreactor to mimic winemaking fermentation. Int. J. Food Microbiol. 150:42-49.

Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Lindley N., Loubière P. 1997. Régulation du métabolisme central de *Lactococcus lactis* : consolidation des cinétiques de fermentation et analyses intracellulaires. Colloque SFM. Paris, France.

Codon A., Benitez T., Korhola M. 1998. Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. Appl. Environ. Microbiol. 49: 154–163.

Coleman S., Fang T., Rovinsky S., Turano F., Moye-Rowley W. 2001. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 276:244-50.

Cooper T. 2002. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. FEMS Microbiol. Rev. 26:223–238.

Crépin L., Nidelet T., Sanchez I., Dequin S., Camarasa C. 2012. Sequential use of nitrogen compounds by yeast during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. Appl. Environ. Microbiol. 78 :8102-8111.

De Ley J., Dochy R. 1960. On the localisation of oxidase system in *Acetobacter* cells. Biochim. Biophys. Acta. 40 :277-289.

Dequin S., Barre P. 1994. Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH. Biotechnol. 12:173-7.

Diezmann S., Dietrich F. 2009. *Saccharomyces cerevisiae*: population divergence and resistance to oxidative stress in clinical, domesticated and wild isolates. PLoS One. 4: e5317.

Dudley E., Steele J. 2005. Succinate production and citrate catabolism by Cheddar cheese nonstarter *lactobacilli*. J. Appl. Microbiol. 98:14-23.

Enomoto K., Ohki R., Muratsubaki H. 1996. Cloning and sequencing of the gene encoding the soluble fumarate reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. DNA Res 3:263-7

Forage R., Foster M. 1982. Glycerole fermentation in *Klebsiella pneumoniae* : functions of the coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases. J. Bacteriol. 151:591-599.

Forsberg C. 1987. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. Appl. Environ. Microbiol. 53 :639-643.

Forsberg H., Ljungdahl, P. 2001. Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. Mol. Cell. Biol. 21:814–826.

Forsburg S., Guarente L. 1989. Identification and characterization of *HAP4*: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. Genes Dev. 3:1166-78.

Frand A., Kaiser C. 1998. The *ERO1* gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. Mol Cell 1:161-70.

Gerber J., Mühlenhoff U., Hofhaus G., Lill R., Lisowsky T. 2001. Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. J Biol Chem 276:23486-23491.

Godard P., Urrestarazu A., Vissers S., Kontos K., Bontempi G., Van Helden J., André B. 2007. Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 27:3065–3086.

Gombert A., Moreira dos Santos M., Christensen B., Nielsen J. 2001. Network identification and flux quantification in the central metabolism of Saccharomyces cerevisiae under different conditions of glucose repression. J. Bacteriol. 183:1441-1451.

Greenfield S. Clauss G. 1972. Non functional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in Aceobacter suboxydans. J. Bacteriol. 112:1295-1301.

Gresham D., Desai M., Tucker C., Jenq H., Pai D., Ward A., DeSevo C., Botstein D, Dunham M. 2008. The repertoire and dynamics of evolutionary adaptations to controlled nutrient-limited environments in yeast. PLoS Genet. 4: e1000303.

Hensel R., Mayr U., Stetter K., Kandler O. 1977. Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. I. Purification and kinetics of the allosteric L-lactic acid dehydrogenase *from Lactobacillus casei ssp casei* and *Lactobacillus curvatus*. Arch. Microbiol. 112:81-93.

Heux S., Cadiere A, Dequin S. 2008. Glucose utilization of strains lacking *PGI1* and expressing a transhydrogenase suggests differences in the pentose phosphate capacity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. FEMS Yeast Res. 8:217-224.

Homann O., Cai H., Becker J., Lindquist S. 2005. Harnessing natural diversity to probe metabolic pathways. PLoS Genet. 1: e80.
Homann T., Tag C., Bielb H., Deckwer W., Schink B. 1990. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33 :121-126.

Hu X., Wang M., Tan T., Li J., Yang H., Leach L., Zhang R., Luo, Z. 2007. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 175 :1479–1487.

Kim H., Huh J., Fay J.C. 2009. Dissecting the pleiotropic consequences of a quantitative trait nucleotide. FEMS Yeast Res. 9 :713–722.

Kunkee R. 1991. Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. FEMS Microbiol. Rev. 88:55-72.

Levenspiel O. 1980. The Monod equation : a revisit and generalization to product inhibition sitiations. Biotechnol. Bioeng. 22 :1671-1687.
Liti G., Carter D., Moses M., Warringer J., Parts L., James S., Davey R., Roberts I., Burt A., Koufopanou V., et al. 2009. Population genomics of domestic and wild yeasts. Nature 458:337–341.

Ljungdahl P. 2009. Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. Biochem. Soc. Trans. 37:242–247.

Ljungdahl P., Daignan-Fornier B. 2012. Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae*. Genetics. 190:885–929.

Magasanik B., Kaiser, C. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 290:1–18.

Meybeck A. 1977. A spectroscopic study of reaction products of dihydroxyacetone with aminoacids. J. Soc. Cosmet. Chem. 28 :25-35.

Muratsubaki H., Enomoto K. 1998. One of the fumarate reductase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the *OSM1* gene. Arch Biochem Biophys 352:175-81.

Nunez de Castro I., Ugarte M., Cano A., Mayor F. 1970. Effect of glucose, galactose, and different nitrogen-sources on the activity of yeast glutamate dehydrogenase (NAD and NADP-linked) from normal strain and impaired respiration mutant. Eur J Biochem 16:567–570.

Osothsilp C., Subden R. E. 1986. Malate transport in *Schizosaccharomyces pombe*. J. Bacteriol. 168:1439–1443.
Perlstein E., Ruderfer D., Roberts D., Schreiber S., Kruglyak L. 2007. Genetic basis of individual differences in the response to small-molecule drugs in yeast. Nat. Genet. 39 :496–502.

Qatibi A., Bories A. 1988. Glycerol fermentation and sulfate utilisation during the anaerobic digestion process. 5th International Symposium of Anaerobic Digestion. Bologna. 69-73.

Raghevendran V., Patil K., Olsson L., Nielsen J. 2006. Hap4p is not essential for activation of respiration at low specific growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 281:12308-14.

Ramos F., el Guezzar M., Grenson M., Wiame, J. 1985. Mutations affecting the enzymes involved in the utilization of 4-aminobutyric acid as nitrogen source by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 149:401-404.

Remize F., Barnavon L., Dequin S. 2001. Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab Eng. 3:301-312.

Repetto B., Tzagoloff A. 1989 Structure and regulation of *KGD1*, the structural gene for yeast alpha-ketoglutarate dehydrogenase. Mol. Cell. Biol. 9:2695-2705.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. 2012. L'évolution de la microflore bactérienne lactique. Incidence sur la composition du vin Traité d'oenologie - Tome 1 - 6e éd. - Microbiologie du vin. Vinifications. p 212-222.

Saito Y., Doi, Y. 1994. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in Comamonas acidovorans. Int. J. Biol. Macromol. 16:99-104.

Sinha H., Nicholson B., Steinmetz L., McCusker, J. 2006. Complex genetic interactions in a quantitative trait locus. PLoS Genet. 2:e13.

Sols A., Gancedo C., de la Fuente G. 1971. Energy-yielding metabolism in yeasts. In The Yeasts, vol. 2, pp. 271–307. Edited by A. H. Rose & J. S. Harrison. London: Academic Press.

Sousa M.J., Mota M., Leão C. 1992. Transport of malic acid in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for a proton-dicarboxylate symport. Yeast. 8:1025-31.

Spor A., Nidele, T., Simon J., Bourgais A., de Vienne D., Sicard D. 2009. Niche-driven evolution of metabolic and life-history strategies in natural and domesticated populations of *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Evol. Biol. 9:296.

Steinmetz, L.M., Sinha, H., Richards, D.R., Spiegelman, J.I., Oefner, P.J., McCusker, J.H., and Davis, R.W. (2002). Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. Nature 416, 326–330.

Varela C., Pizarro F., Agosin, E. 2004. Biomass Content Governs Fermentation Rate in Nitrogen-Deficient Wine Musts. Appl. Environ. Microbiol. 70:3392–3400.