



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2013/01/24
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2013/08/01
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2021/06/08
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2014/07/23
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: IB 2013/050623
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2013/111091
(30) Priorité/Priority: 2012/01/25 (FR1250717)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 1/19* (2006.01),
C07K 14/395 (2006.01), *C12N 9/10* (2006.01),
C12P 3/00 (2006.01), *C12P 7/24* (2006.01)
(72) Inventeurs/Inventors:
BLONDIN, BRUNO, FR;
NOBLE, JESSICA, FR;
SANCHEZ, ISABELLE, FR
(73) Propriétaires/Owners:
INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT, FR;

(54) Titre : METHODE DE CONTROLE DE LA PRODUCTION DE SULFITES, D'HYDROGENE SULFUREUX ET
D'ACETALDEHYDE PAR DES LEVURES.
(54) Title: METHOD FOR CONTROLLING THE PRODUCTION OF SULPHITES, OF HYDROGEN SULPHIDE AND OF
ACETALDEHYDE BY YEASTS

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne l'identification d' allèles des gènes MET2 et SKP2 ayant pour effet de diminuer la production de sulfites, d'hydrogène sulfureux et d'acétaldéhyde par *Saccharomyces*, et l'utilisation de ces allèles dans des méthodes de contrôle de la production de ces composés au cours de la fermentation alcoolique.

(73) **Propriétaires(suite)/Owners(continued):**

INSTITUT NATIONAL D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR POUR L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT, FR

(74) **Agent:** ROBIC

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
1 août 2013 (01.08.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/111091 A3

(51) Classification internationale des brevets :

C12N 1/19 (2006.01) C12G 1/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) C12P 3/00 (2006.01)
C07K 14/395 (2006.01) C12P 7/24 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/IB2013/050623

(22) Date de dépôt international :

24 janvier 2013 (24.01.2013)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1250717 25 janvier 2012 (25.01.2012) FR

(71) **Déposants** : INSTITUT NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; Etablissement
public à caractère scientifique et technologique, 147 rue de
l'Université, F-75007 Paris (FR). CENTRE INTERNA-
TIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES
AGRONOMIQUES (MONTPELLIER SUPAGRO)
[FR/FR]; 2 place Viala, F-34060 Montpellier (FR).

(72) **Inventeurs** : BLONDIN, Bruno; 5 rue des Cigales, F-
34070 Montpellier (FR). NOBLE, Jessica; 11 rue des
Bleuets, Bâtiment B, F-34070 Montpellier (FR). SAN-
CHEZ, Isabelle; 101 impasse du Muscadet, F-34090
Montpellier (FR).

(74) **Mandataires** : VIALLE-PRESLES, Marie-José et al.;
Cabinet Ores, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris
(FR).

(81) **États désignés** (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) **États désignés** (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec la partie de la description réservée au listing des sé-
quences (règle 5.2.a))

(88) **Date de publication du rapport de recherche internatio-
nale :**

27 décembre 2013

(54) **Title** : METHOD FOR CONTROLLING THE PRODUCTION OF SULPHITES, OF HYDROGEN SULPHIDE AND OF ACETALDEHYDE BY YEASTS

(54) **Titre** : MÉTHODE DE CONTRÔLE DE LA PRODUCTION DE SULFITES, D'HYDROGÈNE SULFUREUX ET D'ACÉ-
TALDÉHYDE PAR DES LEVURES

(57) **Abstract** : The present invention relates to the identification of alleles of the MET2 and SKP2 genes having the effect of redu-
cing the production of sulphites, of hydrogen sulphide and of acetaldehyde by *Saccharomyces*, and to the use of these alleles in meth-
ods for controlling the production of these compounds during alcoholic fermentation.

(57) **Abrégé** : La présente invention concerne l'identification d'allèles des gènes MET2 et SKP2 ayant pour effet de diminuer la pro-
duction de sulfites, d'hydrogène sulfureux et d'acétaldéhyde par *Saccharomyces*, et l'utilisation de ces allèles dans des méthodes de
contrôle de la production de ces composés au cours de la fermentation alcoolique.



WO 2013/111091 A3

MÉTHODE DE CONTRÔLE DE LA PRODUCTION DE SULFITES, D'HYDROGÈNE SULFUREUX ET D'ACÉTALDÉHYDE PAR DES LEVURES.

La présente invention concerne le contrôle de la production de sulfites, d'hydrogène sulfureux et d'acétaldéhyde lors de la fermentation alcoolique par des levures.

Le dioxyde de soufre(SO_2) et ses différentes formes en équilibre en solution (HSO_3^- , SO_3^{--}), collectivement désignés sous l'appellation de sulfites, sont utilisés comme additifs en œnologie, principalement pour améliorer la conservation des vins, du fait de ses propriétés anti-oxydantes et anti-bactériennes. Toutefois, une quantité trop importante de sulfites dans le vin peut entraîner des intolérances et des allergies chez certains consommateurs ; elle peut également être préjudiciable à ses qualités organoleptiques, vu qu'ils communiquent s'ils sont en excès, des sensations asséchantes. Des quantités trop élevées de sulfites à la fin de la fermentation alcoolique peuvent aussi être pénalisantes quand le vinificateur souhaite réaliser la fermentation malolactique. Les bactéries lactiques, responsables de cette fermentation sont inhibées par de faibles teneurs en sulfites, et un excès en retarde le déclenchement.

L'hydrogène sulfuré est également un métabolite formé par les levures en fermentation qui est préjudiciable pour la qualité de vins quand il est présent en excès en raison des goûts « d'œuf pourri » ou de « réduit » qu'il communique.

Il est donc important de pouvoir optimiser la quantité de sulfites et d'hydrogène sulfureux dans les vins et en cours de vinification. Une difficulté majeure dans ce cadre provient du fait qu'une partie des sulfites et de l'hydrogène sulfureux présents dans le vin provient du métabolisme fermentaire des levures, où ils constituent des intermédiaires dans la synthèse des acides aminés soufrés. Le sulfate inorganique pénètre dans la cellule par l'intermédiaire d'une sulfate perméase. Il est activé en adénosylphosphosulfate (APS) par l'ATP-sulfurylase, puis l'APS est phosphorylé par l'adénosylphosphosulfate kinase pour produire du phosphoadénosylphosphosulfate (PAPS). Le PAPS est ensuite réduit en SO_2 par la PAPS réductase. Le SO_2 est réduit en H_2S par la sulfite réductase. L'homocystéine, qui est le précurseur des acides aminés soufrés, est synthétisée par réaction de l' H_2S avec l'O-acétylhomosérine, catalysée par l'O-acétylhomosérine sulfhydrylase.

La quantité de sulfites produits par les levures pendant la fermentation variant d'une souche de levure à l'autre, ceci complique le contrôle de la teneur globale en sulfites. Il en est de même pour l'hydrogène sulfureux dont la quantité formée dépend fortement de la souche de levure.

Un autre composé, dont la présence dans le vin au-delà de certaines quantités est considérée comme non-souhaitable est l'acétaldéhyde. L'acétaldéhyde à concentration trop élevée communique aux vins des notes dites « d'évent » qui sont considérées comme négatives. Il est produit par les levures au cours de la fermentation, et sa production apparaît corrélée à la teneur en SO₂, et comme celle du SO₂, varie d'une souche de levure à l'autre.

Différentes approches ont été proposées pour obtenir des souches de levure produisant des quantités réduites de sulfites et/ou d'hydrogène sulfureux.

La Demande PCT WO2008/115759, et la Demande PCT WO2009/046485, ainsi que les publications de CORDENTE et al. (FEMS Yeast Res, 9, 446-59, 2009) et LINDERHOLM et al. (Appl Environ Microbiol, 76, 7699-707, 2010) décrivent différentes mutations dans les gènes MET5 ou MET10 (codant pour les 2 sous-unités catalytiques de la sulfite réductase), qui ont pour effet de diminuer la production d'hydrogène sulfureux. La Demande WO2009/030863 et la publication de MARULLO et al. (FEMS Yeast Res, 7, 1295-306, 2007), décrivent différents marqueurs associés à des caractères d'intérêt chez des levures œnologiques. L'un de ces marqueurs (YOL083w) situé sur le chromosome XV, est associé à une production réduite d'H₂S.

Les Inventeurs ont maintenant identifié des allèles de deux gènes impliqués dans le métabolisme du soufre chez *Saccharomyces*, comme étant associés à une production réduite de SO₂, d'acétaldéhyde, et dans le cas de l'un de ces gènes, de H₂S.

Le premier de ces gènes est le gène SKP2, situé sur le chromosome XIV (nt 49397 à 51688 dans la base « *Saccharomyces* genome database »). La séquence ADNc et la séquence polypeptidique correspondantes (pour la souche de référence de *Saccharomyces cerevisiae* S288C) sont disponibles dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès respectifs NM_001183149.1 (GI:296147470) et NP_014088.1 (GI:6324018). SKP2 code pour une protéine de type F-box qui intervient dans la stabilité de différentes protéines du métabolisme du soufre et en particulier de l'adénosylphosphosulfate kinase responsable de la transformation de l'APS en PAPS. Il a été récemment montré (YOSHIDA et al., Yeast, 28, 109-21, 2011) que l'inactivation du gène SKP2 conduisait à une stabilisation de l'adénosylphosphosulfate kinase, et à une augmentation de la production d'H₂S et de SO₂.

Les Inventeurs ont identifié dans le gène SKP2 deux polymorphismes mononucléotidiques qui différencient la souche JN10 de la souche JN17: l'un en position 50 618 du chromosome XIV, où la souche JN10 possède un G et la souche JN17 possède un A, et l'autre en position 50 640 pb où la souche JN10 possède un C, tandis que la souche JN17 a un T. Ces polymorphismes se reflètent par le changement d'une valine

pour JN10, en isoleucine pour JN17, à la position 350 de la protéine Skp2 (V350I), ainsi que d'une thréonine chez JN10 à la position 357 de Skp2, en isoleucine chez JN17 (T357I).

L'allèle du gène SKP2 présent chez la souche JN17 n'avait été identifié auparavant chez aucune autre souche de *Saccharomyces*. La séquence d'ADNc de cet allèle est indiquée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1, et la séquence polypeptidique déduite sous le numéro SEQ ID NO: 2.

Le second gène est le gène MET2, également situé sur le chromosome XIV (nt 117349 à 118809, coordonnées indiquées dans la base « *Saccharomyces* genome database »). La séquence ADNc et la séquence polypeptidique correspondantes (pour la souche de référence de *Saccharomyces cerevisiae* S288C) sont disponibles dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès respectifs NM_001183115.1 (GI:296147504) et NP_014122.1 (GI:6324052). MET2 code pour l'homosérine-O-acétyl transférase qui catalyse la conversion de l'homosérine en O-acétyl homosérine qui est ensuite condensée avec H₂S pour former l'homocystéine. Il a été montré (HANSEN & KIELLAND-BRANDT, J Biotechnol, 50, 75-87, 1996) que l'inactivation du gène MET2 chez *Saccharomyces* entraînait une augmentation de la production de sulfites et d'hydrogène sulfureux.

Les Inventeurs ont identifié en position 118 249 du chromosome XIV, un polymorphisme mononucléotidique qui différencie les gènes MET2 de deux souches de *Saccharomyces cerevisiae*, l'une (souche JN10) forte productrice de SO₂, H₂S et d'acétaldéhyde dans certaines conditions de fermentation, et l'autre (souche JN17) faible productrice de ces mêmes composés. La souche JN10 possède un C tandis que la souche JN17 possède (comme la souche de référence S288C) un G, ce qui entraîne un changement d'acide aminé et la conversion d'une arginine chez la souche JN10 en glycine chez la souche JN17 en position 301 de la protéine Met2 (R301G).

La présente invention a pour objet une méthode d'obtention d'une souche de levure du genre *Saccharomyces* produisant une quantité de SO₂, d'hydrogène sulfureux et d'acétaldéhyde plus faible que celle produite par la souche mère dont elle est issue, ladite méthode étant caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la sélection d'une souche mère contenant un allèle du gène SKP2, ci-après dénommé SKP2^{(350/357)X}, codant pour une protéine Skp2 dans laquelle l'acide aminé en position 350 et/ou l'acide aminé en position 357 est (sont) autre(s) qu'une (des) isoleucine(s), et/ou un allèle du gène MET2, ci-après dénommé MET2^{301X}, codant pour une protéine Met2 dans laquelle l'acide aminé en position 301 est autre qu'une glycine ;
- l'introduction dans ladite souche mère d'un allèle du gène SKP2, ci-après dénommé SKP2^{(350/357)I}, codant pour une protéine Skp2 dans laquelle l'acide aminé

en position 350 et/ou l'acide aminé en position 357 est (sont) une (des) isoleucine(s) et/ou d'un allèle du gène MET2, ci-après dénommé MET2^{301G}, codant pour une protéine Met2 dans laquelle l'acide aminé en position 301 est une glycine.

Par exemple, si la souche mère contient un allèle SKP2^{(350/357)X} et un allèle MET2^{301G}, on pourra y introduire un allèle SKP2^{(350/357)I}. Inversement, si la souche mère contient un allèle SKP2^{(350/357)I} et un allèle MET2^{301X}, on pourra y introduire un allèle MET2^{301G}. Si la souche mère contient un allèle SKP2^{(350/357)X} et un allèle MET2^{301X}, on peut choisir d'y introduire soit un allèle SKP2^{(350/357)I}, soit un allèle MET2^{301G}. De préférence, on choisira d'y introduire à la fois un allèle SKP2^{(350/357)I} et un allèle MET2^{301G}.

Dans le cadre de l'exposé de la présente invention, la dénomination « allèle SKP2^{(350/357)I} » englobe: un allèle (plus spécifiquement dénommé allèle SKP2^{350I/357X}) codant pour une protéine Skp2 dans laquelle l'acide aminé en position 350 est une isoleucine et l'acide aminé en position 357 est autre qu'une isoleucine ; un allèle (plus spécifiquement dénommé allèle SKP2^{350X/357I}) codant pour une protéine Skp2 dans laquelle l'acide aminé en position 350 est autre qu'une isoleucine ; un allèle (plus spécifiquement dénommé allèle SKP2^{350I/357I}) dans lequel l'acide aminé en position 350 et l'acide aminé en position 357 sont tous deux des isoleucines, ce dernier allèle étant particulièrement préféré.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ladite souche mère contient un allèle du gène SKP2, ci-après dénommé SKP2^{350V/357T}, codant pour une protéine Skp2 dans laquelle l'acide aminé en position 350 est une valine et/ou l'acide aminé en position 357 est une thréonine et/ou un allèle du gène MET2, ci-après dénommé MET2^{301R}, codant pour une protéine Met2 dans laquelle l'acide aminé en position 301 est une arginine.

Avantageusement ladite souche de levure appartient à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

L'allèle SKP2^{(350/357)I} et/ou l'allèle MET2^{301G} peuvent être introduits dans la souche mère par différentes méthodes, bien connues en elles-mêmes de l'homme du métier. Ils peuvent être introduits par exemple par croisement avec une souche possédant l'allèle SKP2^{(350/357)I} et/ou l'allèle MET2^{301G} recherché, et sélection parmi les descendants de ce croisement, de ceux auxquels ledit allèle a été transmis.

L'allèle SKP2^{(350/357)I} et/ou l'allèle MET2^{301G} peuvent également être introduits en remplacement de l'allèle initial (respectivement SKP2^{(350/357)X} et MET2^{301X}) ou en supplément de celui-ci, en utilisant des techniques classiques de génie génétique (cf. par exemple AMBERG et al., *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005).

Si la méthode conforme à l'invention est mise en œuvre à partir d'une souche mère haploïde portant l'allèle SKP2^{(350/357)X}, l'introduction dans la dite souche d'une copie de l'allèle SKP2^{(350/357)I} par croisement produit une souche hétérozygote SKP2^{(350/357)X}/SKP2^{(350/357)I}, produisant une quantité de sulfites, d'hydrogène sulfureux et d'acétaldéhyde plus faible que celle produite par la souche mère dont elle est issue. Il est aussi possible d'obtenir des descendants haploïdes de cette souche qui possèdent l'allèle SKP2^{(350/357)I} et produisent donc de faibles quantités de sulfites, d'hydrogène sulfureux et d'acétaldéhyde. Par des séries de croisements en retour entre des descendants possédant l'allèle SKP2^{(350/357)I} et la souche mère, il est ainsi possible d'obtenir une souche avec un génome proche de celui de la souche mère, ayant acquis l'allèle SKP2^{(350/357)I} et produisant de faibles quantités de sulfites, d'hydrogène sulfureux et d'acétaldéhyde. De même, si la méthode conforme à l'invention est mise en œuvre à partir d'une souche mère portant l'allèle MET2^{301X}, le croisement de la dite souche avec une souche possédant l'allèle MET2^{301G} produit une souche hétérozygote MET2^{301X}/MET2^{301G}, produisant une quantité de sulfites, d'hydrogène sulfureux et d'acétaldéhyde plus faible que celle produite par la souche mère dont elle est issue. Il est également possible, comme dans le cas de SKP2, d'obtenir des descendants haploïdes de cette souche possédant l'allèle MET2^{301G}, et par rétro-croisements avec la souche mère, d'obtenir une souche possédant l'allèle MET2^{301G} dans le fond génétique de la souche-mère.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide isolé codant pour la protéine Skp2 de séquence SEQ ID NO: 2, qui correspond à l'allèle SKP2^{350I/357I}.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ce polynucléotide est défini par la séquence SEQ ID NO: 1.

Ce polynucléotide peut être utilisé pour dans le cadre de la méthode conforme à l'invention décrite ci-dessus, pour introduire dans une souche de levure l'allèle SKP2^{350I/357I}.

La présente invention a également pour objet un vecteur d'acide nucléique contenant un polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 1, ou un fragment de celui-ci contenant au moins la région 1045-1075 de SEQ ID NO: 1.

Ledit vecteur peut être tout type de vecteur utilisable chez la levure, notamment chez *Saccharomyces*. De tels vecteurs sont bien connus en eux-mêmes. On peut utiliser par exemple des vecteurs réplcatifs extrachromosomiques, tels que les vecteurs Yep ou les vecteurs Yrp. On peut également utiliser des vecteurs intégratifs tels que les vecteurs Yip.

Dans le cas d'un vecteur intégratif, le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 1, ou ledit fragment est flanqué en amont et en aval de séquences d'au

moins 20pb, de préférence de 40 à 60 pb, homologues à celles flanquant le gène SKP2 ou la région 1045-1075 dudit gène chez la souche dans laquelle on souhaite introduire l'allèle SKP2^{350I/357I}.

- Le fragment d'ADN contenant la séquence SEQ ID NO: 1, ou au moins
- 5 la région 1045-1075 de SEQ ID NO: 1, sera associé éventuellement à un gène marqueur (gène codant pour une protéine conférant la résistance à un inhibiteur ou gène permettant de compléter une mutation responsable d'une auxotrophie de la souche réceptrice) facilitant la sélection des clones ayant acquis le fragment par transformation.

- La présente invention a également pour objet une méthode pour évaluer
- 10 la capacité d'une souche de *Saccharomyces*, de préférence de *Saccharomyces cerevisiae* à produire du SO₂, de l'hydrogène sulfureux et de l'acétaldéhyde, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- le génotypage de ladite souche pour le gène SKP2, et la détection de la présence d'un allèle SKP2^{(350/357)X} et notamment de l'allèle SKP2^{350V/357T}, et/ou d'un
- 15 allèle SKP2^{(350/357)I}, et notamment de l'allèle SKP2^{350I/357I}, et/ou
- le génotypage de ladite souche pour le gène MET2, et la détection de la présence d'un allèle MET2^{301X} et notamment de l'allèle MET2^{301R}, et/ou d'un allèle MET2^{301G}.

- La présente invention a également pour objet une méthode d'obtention
- 20 d'une souche de levure du genre *Saccharomyces* produisant une quantité de SO₂, d'hydrogène sulfureux et d'acétaldéhyde plus faible que celle produite par la souche mère dont elle est issue, ladite méthode étant caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la sélection d'une souche mère contenant un allèle du gène SKP2, ci-après dénommé SKP2^{(350/357)X}, codant pour une protéine Skp2 dans laquelle l'acide aminé en position 350 et l'acide aminé en position 357 en référence à la séquence SEQ ID NO: 2 sont autres que des isoleucines,
- l'introduction dans ladite souche mère d'un allèle du gène SKP2, ci-après dénommé SKP2^{(350/357)I}, codant pour une protéine Skp2 dans laquelle l'acide aminé en position 350 et l'acide aminé en position 357 en référence à la séquence SEQ ID NO:
- 25 2 sont des isoleucines.
- 30 2 sont des isoleucines.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide isolé codant pour la protéine Skp2 définie par la séquence SEQ ID NO: 2.

La présente invention a également pour objet un vecteur d'acide nucléique contenant le polynucleotide selon l'invention.

La présente invention a également pour objet une méthode pour évaluer la capacité d'une souche de *Saccharomyces* à produire du SO₂, de l'hydrogène sulfureux, et de l'acétaldéhyde, caractérisée en ce qu'elle comprend le génotypage de ladite souche pour le gène SKP2, et la détection de la présence d'un allèle SKP2^{(350/357)X} en référence à la séquence SEQ ID NO: 2 et/ou d'un allèle SKP2^{(350/357)I} en référence à la séquence SEQ ID NO: 2.

La présente invention a également pour objet des réactifs permettant la mise en œuvre de la méthode de génotypage conforme à l'invention.

Ces réactifs comprennent notamment :

- 10 - des sondes oligonucléotidiques allèle-spécifiques, permettant de différencier l'allèle SKP2^{350V/357T} d'un allèle SKP2^{(350/357)I}, et notamment de l'allèle SKP2^{350I/357I} ou de différencier l'allèle MET2^{301R} de l'allèle MET2^{301G}, en s'hybridant sélectivement avec l'un ou l'autre des allèles à différencier.
- des amorces spécifiques, permettant de différencier l'allèle SKP2^{350V/357T} d'un allèle SKP2^{(350/357)I}, et notamment de l'allèle SKP2^{350I/357I}, ou de différencier l'allèle MET2^{301R} de l'allèle MET2^{301G}, ainsi que des kits d'amorces contenant au moins une amorce spécifique conforme à l'invention. Généralement, ces kits d'amorces comprennent une amorce spécifique pour chaque allèle à détecter, et une amorce commune, capable de s'hybrider, dans les mêmes conditions d'amplification, avec tous les allèles du gène concerné.

Des sondes conformes à l'invention permettant de différencier l'allèle SKP2^{350V/357T} d'un allèle SKP2^{(350/357)I}, et notamment de l'allèle SKP2^{350I/357I} peuvent par exemple être constituées par des fragments de 15 à 30 pb de la séquence :

CTAGAAAATGTAACGRTAGACACCGAATCGCTAGATAYTCCAATGGAATTCT
 25 T (SEQ ID NO:4, où A, T, C, G, R, et Y ont leur signification usuelle en code IUPAC)

lesdits fragments contenant au moins le locus du polymorphisme G/A, ou au moins le locus du polymorphisme C/T, et le cas échéant les 2 loci polymorphes de ladite séquence, ou par leurs complémentaires.

- Les sondes dans lesquelles R=G, ainsi que les sondes dans lesquelles Y=C peuvent s'hybrider sélectivement avec l'allèle SKP2^{350V/357T} tandis que les sondes dans lesquelles R=A et celles dans lesquelles Y= T peuvent s'hybrider sélectivement avec un allèle SKP2^{(350/357)I}, et notamment l'allèle SKP2^{350I/357I}.

- Des sondes conformes à l'invention permettant de différencier l'allèle MET2^{301R} de l'allèle MET2^{301G} peuvent par exemple être constituées par des fragments de 15 à 30 pb de la séquence :

- ATTCTCTGGGCAAAAASGTCAAAGCGTGGTGT (SEQ ID NO: 3, où A, T, C, G, et S ont leur signification usuelle en code IUPAC), lesdits fragments contenant le locus du polymorphisme C/G de ladite séquence, ou par leurs complémentaires. Les sondes dans lesquelles S=C peuvent s'hybrider sélectivement avec l'allèle MET2^{301R} tandis que les sondes dans lesquelles S=G peuvent s'hybrider sélectivement avec l'allèle MET2^{301G}.

- Des amorces spécifiques conformes à l'invention permettant de différencier SKP2^{350V} de SKP2^{350I} peuvent par exemple être constituées par des fragments de 15 à 30 pb de la séquence SEQ ID NO: 4 contenant au moins le locus du polymorphisme G/A ou son complémentaire. Les amorces dans lesquelles R=G peuvent être utilisées pour l'amplification sélective de SKP2^{350V} tandis que les amorces dans lesquelles R=A peuvent être utilisées pour l'amplification sélective de SKP2^{350I}. Des amorces spécifiques conformes à l'invention permettant de différencier SKP2^{357T} de SKP2^{357I} peuvent par exemple être constituées par des fragments de 15 à 30 pb de la séquence SEQ ID NO: 4 contenant au moins le locus du polymorphisme C/T, ou leurs complémentaires.

Les amorces dans lesquelles Y=C peuvent être utilisées pour l'amplification sélective de SKP2^{357T} et celles dans lesquelles Y= T peuvent être utilisées pour l'amplification sélective de SKP2^{357I}.

- Selon un mode de réalisation préféré d'un kit d'amorces conforme à l'invention permettant de différencier l'allèle SKP2^{350V/357T} d'un allèle SKP2^{(350/357)I}, il comprend une paire d'amorces spécifiques permettant de différencier SKP2^{350V} de SKP2^{350I}, et une paire d'amorces spécifiques permettant de différencier SKP2^{357T} de SKP2^{357I}.

- Des amorces spécifiques conformes à l'invention permettant de différencier l'allèle MET2^{301R} de l'allèle MET2^{301G} peuvent par exemple être constituées par des fragments de 15 à 30 pb de la séquence SEQ ID NO: 3 contenant au moins le locus du polymorphisme C/G de ladite séquence, ou par leurs complémentaires. Les

amorces dans lesquelles S=C peuvent être utilisées pour l'amplification sélective de l'allèle MET2^{301R} tandis que les amorces dans lesquelles S=G peuvent être utilisées pour l'amplification sélective de l'allèle MET2^{301G}.

Des amorces communes pouvant être utilisées en association avec les
5 amorces spécifiques permettant de différencier l'allèle MET2^{301R} de l'allèle MET2^{301G} dans les kits d'amorces conformes à l'invention peuvent par exemple être constituées par des fragments de 15 à 30 pb de la séquence suivante :

ATGTTATGCCTGAGGTATGTGTGGTATCTA (SEQ ID NO: 5, où A, T, C, et G ont leur signification usuelle en code IUPAC), ou par leurs complémentaires.

10 Des amorces communes pouvant être utilisées en association avec les amorces spécifiques permettant de différencier SKP2^{350V} de SKP2^{350I} et/ou avec les amorces spécifiques permettant de différencier SKP2^{357T} de SKP2^{357I} dans les kits d'amorces conformes à l'invention peuvent par exemple être constituées par des fragments de 15 à 30 pb de la séquence suivante :

15 AGTCCACTACAAAAAGTCATTTATTTTGC (SEQ ID NO: 6, où A, T, C, et G ont leur signification usuelle en code IUPAC), ou par leurs complémentaires.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant les effets des allèles des gènes MET2 et SKP2 sur la production de SO₂, d'hydrogène sulfureux, et
20 d'acétaldéhyde.

EXEMPLE 1 : EFFET DES ALLÈLES DU GÈNE MET2 SUR LA PRODUCTION DE SO₂, D'HYDROGÈNE SULFUREUX, ET D'ACÉTALDÉHYDE.

La souche JN10 de *Saccharomyces cerevisiae* (forte productrice de SO₂, H₂S et acétaldéhyde), possède un allèle du gène MET2 qui code pour une protéine
25 Met2 dans laquelle l'acide aminé en position 301 est une arginine, alors que la souche JN17 (faible productrice de ces mêmes composés) possède un allèle du gène MET2 codant pour une protéine Met2 dans laquelle l'acide aminé en position 301 est une glycine.

L'impact du remplacement de l'allèle MET2 de JN10 (MET2^{JN10}) par
30 celui de JN17 (MET2^{JN17}), ou inversement, celui du remplacement de l'allèle MET2 de JN17 par celui de JN10 ont été évalués.

Dans un premier temps l'allèle initial MET2^{JN10} ou MET2^{JN17} a été délété et remplacé par une cassette contenant un gène de résistance à la généticine (KANMX4), selon la méthode décrite par WACH et al. (Yeast, 10, 1793-808, 1994). Les
35 cellules transformées sont sélectionnées sur la base de leur résistance à l'antibiotique, et de leur auxotrophie pour la méthionine.

L'allèle MET2^{JN17} amplifié à partir de l'ADN génomique de la souche JN17 a été ensuite introduit en remplacement de la cassette de résistance à la généticine dans la souche JN10, et réciproquement, l'allèle MET2^{JN10} amplifié à partir de l'ADN génomique de la souche JN10 a été introduit en remplacement de la cassette de résistance à la généticine dans la souche JN17. Les souches transformées sont sélectionnées sur la base de la restauration de leur prototrophie pour la méthionine.

Les impacts du changement allélique sur la formation de SO₂, de H₂S, et d'acétaldéhyde ont été évalués lors de fermentations alcooliques en conditions œnologiques.

Les résultats sont représentés sur la Figure 1. A : production de SO₂ ; B : production de H₂S ; C : production d'acétaldéhyde.

Le remplacement de l'allèle MET2^{JN10} par MET2^{JN17} dans la souche JN10 (souche JN10-MET2^{JN17}) entraîne une réduction de la concentration en SO₂ formé d'environ 40 %. De même, la production de H₂S est réduite de manière significative, 1 sur une échelle allant de 0 à 2. Le niveau d'acétaldéhyde est également diminué de près de 40%. Le remplacement allélique inverse (allèle MET2^{JN10} dans le fonds génétique de la souche JN17 : souche JN17 MET2^{JN10}) n'a pas d'impact sur la production de SO₂, ni sur celle d'acétaldéhyde ; en revanche, on observe une augmentation de la production de H₂S par rapport à la souche parentale JN17.

20 **EXEMPLE 2 : EFFET DES ALLÈLES DU GÈNE SKP2 SUR LA PRODUCTION DE SO₂, D'ACÉTALDÉHYDE, ET D'HYDROGÈNE SULFUREUX.**

L'allèle du gène SKP2 présent chez la souche JN10 de *Saccharomyces cerevisiae* (SKP2^{JN10}) code pour une protéine Skp2 dans laquelle l'acide aminé en position 350 est une valine et l'acide aminé en position 357 est une thréonine, alors que l'allèle présent chez la souche JN17 (SKP2^{JN17}) code pour une protéine Skp2 dans laquelle les acides aminés en positions 350 et 357 sont des isoleucines.

L'impact de la forme allélique du gène SKP2 (SKP2^{JN10} ou SKP2^{JN17}) a été évalué par construction d'hémizygotés. Le remplacement allélique était en effet une méthode plus délicate à mettre en œuvre que dans le cas du gène MET2 car l'inactivation du gène SKP2 ne conduit qu'à un retard de croissance sur milieu minimum (YOSHIDA et al., 2011, précité), phénotype qui contrairement à l'auxotrophie à la méthionine observée dans le cas du gène MET2, n'est pas aisément utilisable comme marqueur de sélection.

Dans un premier temps, le gène SKP2 a été inactivé chez chacune des souches parentales JN10 et JN17, par insertion de la cassette HPH qui confère la résistance à l'hygromycine B, pour obtenir respectivement les souches JN10skp2Δ::HPH

et la souche JN17skp2Δ::HPH. La souche JN10skp2Δ::HPH a ensuite été croisée avec la souche JN17, et la souche JN17skp2Δ::HPH avec la souche JN10, pour obtenir respectivement les souches diploïdes JN17/JN10skp2Δ::HPH et JN10/JN17 skp2Δ::HPH, qui ne possèdent qu'un seul allèle fonctionnel de SKP2 (respectivement l'allèle SKP2^{JN17} et l'allèle SKP2^{JN10}). La production de sulfites, d'acétaldéhyde et d'hydrogène sulfureux par ces souches hémizygotes pour SKP2 a été évaluée en conditions de fermentations alcooliques œnologiques. Les résultats sont illustrés par la Figure 2. A : production de SO₂ ; B : production d'acétaldéhyde ; C : production d'hydrogène sulfureux.

On constate que la production de SO₂ est plus faible chez l'hémizygote qui possède l'allèle SKP2^{JN17} que chez celui qui possède l'allèle SKP2^{JN10}. De même, la teneur en acétaldéhyde est plus faible quand l'allèle SKP2^{JN17} est actif que lorsque c'est celui issu de la souche JN10. Enfin la teneur en hydrogène sulfureux est plus faible quand l'allèle SKP2^{JN17} est actif que lorsque c'est celui issu de la souche JN10. L'allèle SKP2^{JN17} conduit donc à une réduction des teneurs en SO₂, en acétaldéhyde et en hydrogène sulfureux.

EXEMPLE 3 : EFFET COMBINÉ DES ALLÈLES DES GÈNES MET2 ET SKP2 SUR LA PRODUCTION DE SO₂ ET D'HYDROGÈNE SULFUREUX

L'impact d'une combinaison des deux formes alléliques SKP2^{JN17} et MET2^{JN17} a été évalué grâce à la construction de souches quasi-isogéniques possédant plus de 93% du génome de la souche JN10 suite à des cycles de rétro-croisements. Les rétro-croisements consistent en une série de croisements successifs avec la même souche, (ici JN10). La souche JN17 est tout d'abord hybridée avec la souche JN10. L'hybride obtenu, possédant 50% du génome de la souche JN10 et 50 % du génome de la souche JN17 et présentant le génotype suivant : SKP2^{JN17}/SKP2^{JN10} et MET2^{JN17}/MET2^{JN10}, est induit à sporuler. Après sporulation les spores haploïdes possédant le génotype suivant : SKP2^{JN17} et MET2^{JN17} sont sélectionnées par des PCR allèle-spécifique pour ces deux gènes. Ces spores sont alors croisées à nouveau avec la souche JN10. Un nouvel hybride est obtenu, possédant 75% du génome de la souche JN10 et 25% du génome de la souche JN17 et présentant le génotype suivant : SKP2^{JN17}/SKP2^{JN10} et MET2^{JN17}/MET2^{JN10}, cet hybride est à son tour induit à sporuler. Les asques sont disséqués et une spore possédant le génotype suivant : SKP2^{JN17} et MET2^{JN17} est sélectionnée. Les cycles de croisement/sporulation/sélection d'une spore sont poursuivis jusqu'à obtenir des dérivés présentant un pourcentage du génome de la souche JN10 très élevé, ici 93.25%.

Par sporulation des clones diploïdes obtenus lors du dernier cycle, on obtient des dérivés haploïdes (Spores 4^{ème} backcross 1 à 4) présentant les combinaisons d'allèles suivantes : SKP2^{JN17}/MET2^{JN17} ; SKP2^{JN10}/MET2^{JN17} ; SKP2^{JN17}/MET2^{JN10} ;

SKP2^{JN10}/MET2^{JN10} dans des fonds génétiques quasi-identiques. La production de SO₂, d'H₂S, et d'acétaldéhyde de ces différents dérivés a été évaluée en conditions de fermentation alcoolique œnologique. Les résultats sont illustrés par le Tableau I ci-dessous, et par la Figure 3.

5

Tableau I

Allele SKP2	Allele MET2	SO ₂ (mg/l)	H ₂ S	Acétaldéhyde (mg/L)
JN10	JN10	46	2	43
JN10	JN17	28	1	20
JN17	JN10	5	1	6
JN17	JN17	5	0	6

Echelle H₂S : 0 = production non détectée, 1 = production moyenne, 2 = production forte

On constate que la production de SO₂ d'un dérivé possédant les deux allèles SKP2^{JN10}/MET2^{JN10} est identique à celle de la souche initiale JN10, alors qu'un dérivé possédant une combinaison d'allèles de type SKP2^{JN10}/MET2^{JN17} produit des quantités de SO₂ intermédiaires. Par ailleurs, des dérivés possédant soit la combinaison d'allèles SKP2^{JN17}/MET2^{JN10} soit les deux allèles de la souche JN17, SKP2^{JN17}/MET2^{JN17}, produisent tous deux des quantités de SO₂ très faibles et identiques à celles de la souche initiale JN17.

L'effet des différentes combinaisons d'allèles sur la production d'acétaldéhyde est identique à celui observé sur la production de SO₂.

D'autre part, les dérivés possédant les deux allèles de la souche JN10 produisent de fortes quantités d'H₂S, identiques à la souche parentale JN10, tandis que les dérivés possédant un des deux allèles de la souche JN17, possédant donc les génotypes suivants : SKP2^{JN17}/MET2^{JN10} ou SKP2^{JN10}/MET2^{JN17}, produisent de l'H₂S en quantités intermédiaires et seul le dérivé possédant les deux allèles SKP2^{JN17}/MET2^{JN17} ne produit pas d'H₂S détectable, de la même manière que la souche parentale JN17.

REVENDICATIONS

1) Méthode d'obtention d'une souche de levure du genre *Saccharomyces* produisant une quantité de SO₂, d'hydrogène sulfureux et d'acétaldéhyde plus faible que celle produite par la souche mère dont elle est issue, ladite méthode étant caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la sélection d'une souche mère contenant un allèle du gène SKP2, ci-après dénommé SKP2^{(350/357)X}, codant pour une protéine Skp2 dans laquelle l'acide aminé en position 350 et l'acide aminé en position 357 en référence à la séquence SEQ ID NO: 2 sont autres que des isoleucines,

- l'introduction dans ladite souche mère d'un allèle du gène SKP2, ci-après dénommé SKP2^{(350/357)I}, codant pour une protéine Skp2 dans laquelle l'acide aminé en position 350 et l'acide aminé en position 357 en référence à la séquence SEQ ID NO: 2 sont des isoleucines.

2) La méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite souche mère contient un allèle du gène SKP2, ci-après dénommé SKP2^(350V/357T), codant pour une protéine Skp2 de séquence SEQ ID NO : 2, dans laquelle l'acide aminé en position 350 est une valine et/ou l'acide aminé en position 357 est une thréonine.

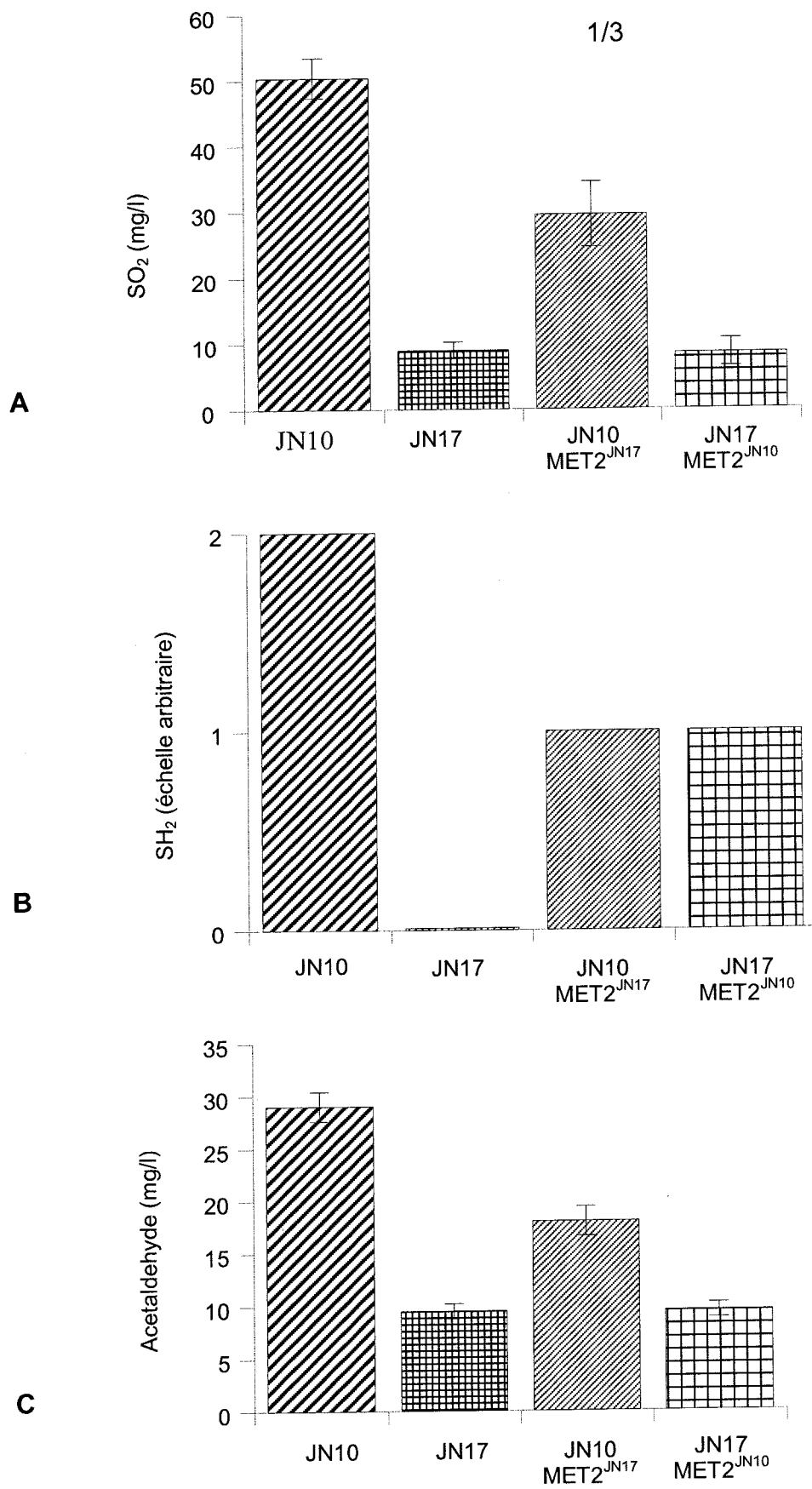
3) La méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite souche de levure appartient à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

4) Polynucléotide isolé codant pour la protéine Skp2 définie par la séquence SEQ ID NO: 2.

5) Le polynucléotide selon la revendication 4, défini par la séquence SEQ ID NO: 1.

6) Vecteur d'acide nucléique contenant le polynucléotide défini selon la revendication 4 ou 5.

7) Méthode pour évaluer la capacité d'une souche de *Saccharomyces* à produire du SO₂, de l'hydrogène sulfureux, et de l'acétaldéhyde, caractérisée en ce qu'elle comprend le génotypage de ladite souche pour le gène SKP2, et la détection de la présence d'un allèle SKP2^{(350/357)X} en référence à la séquence SEQ ID NO: 2 et/ou d'un allèle SKP2^{(350/357)I} en référence à la séquence SEQ ID NO: 2.

**Figure 1**

2/3

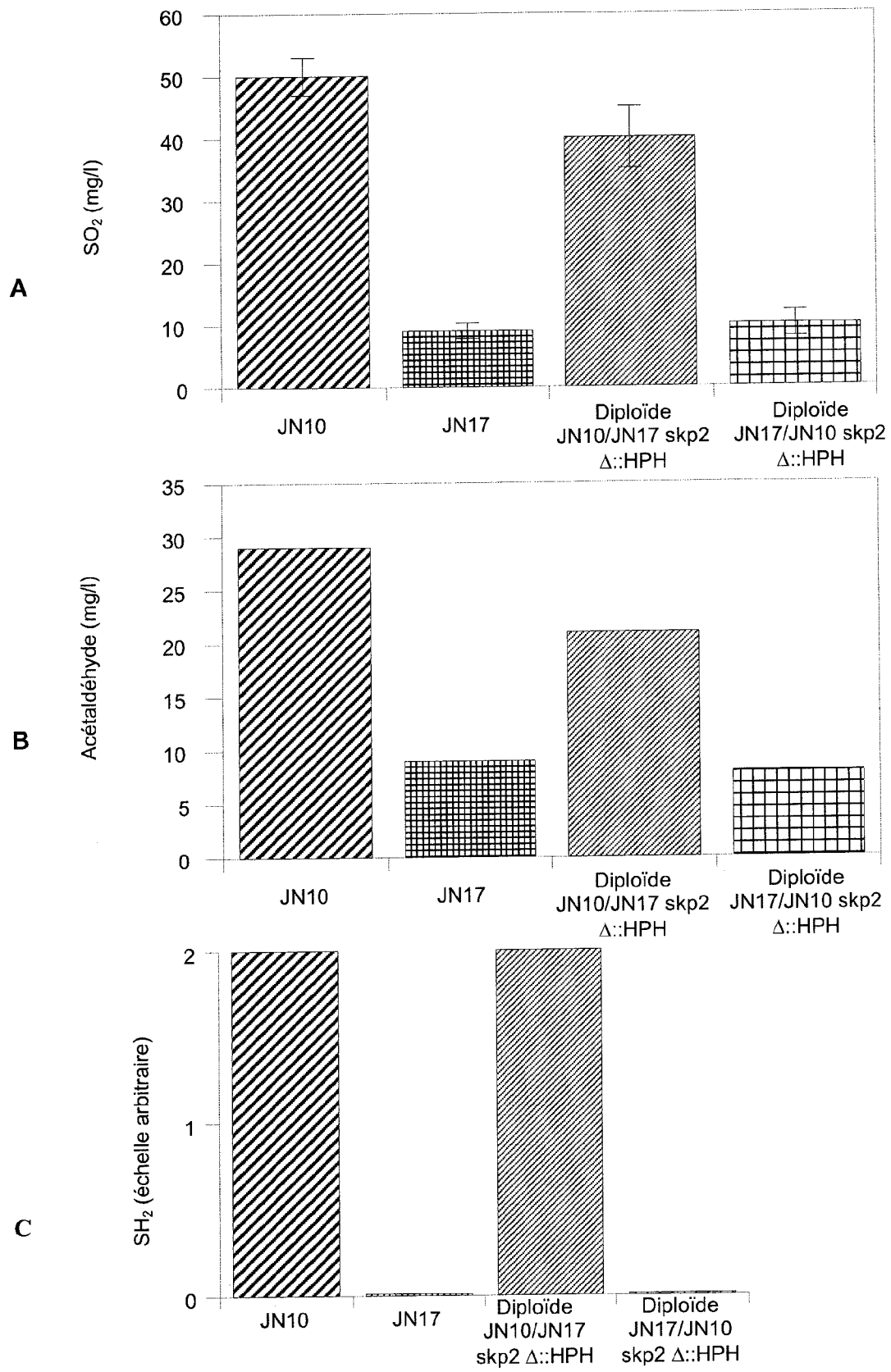


Figure 2

3/3

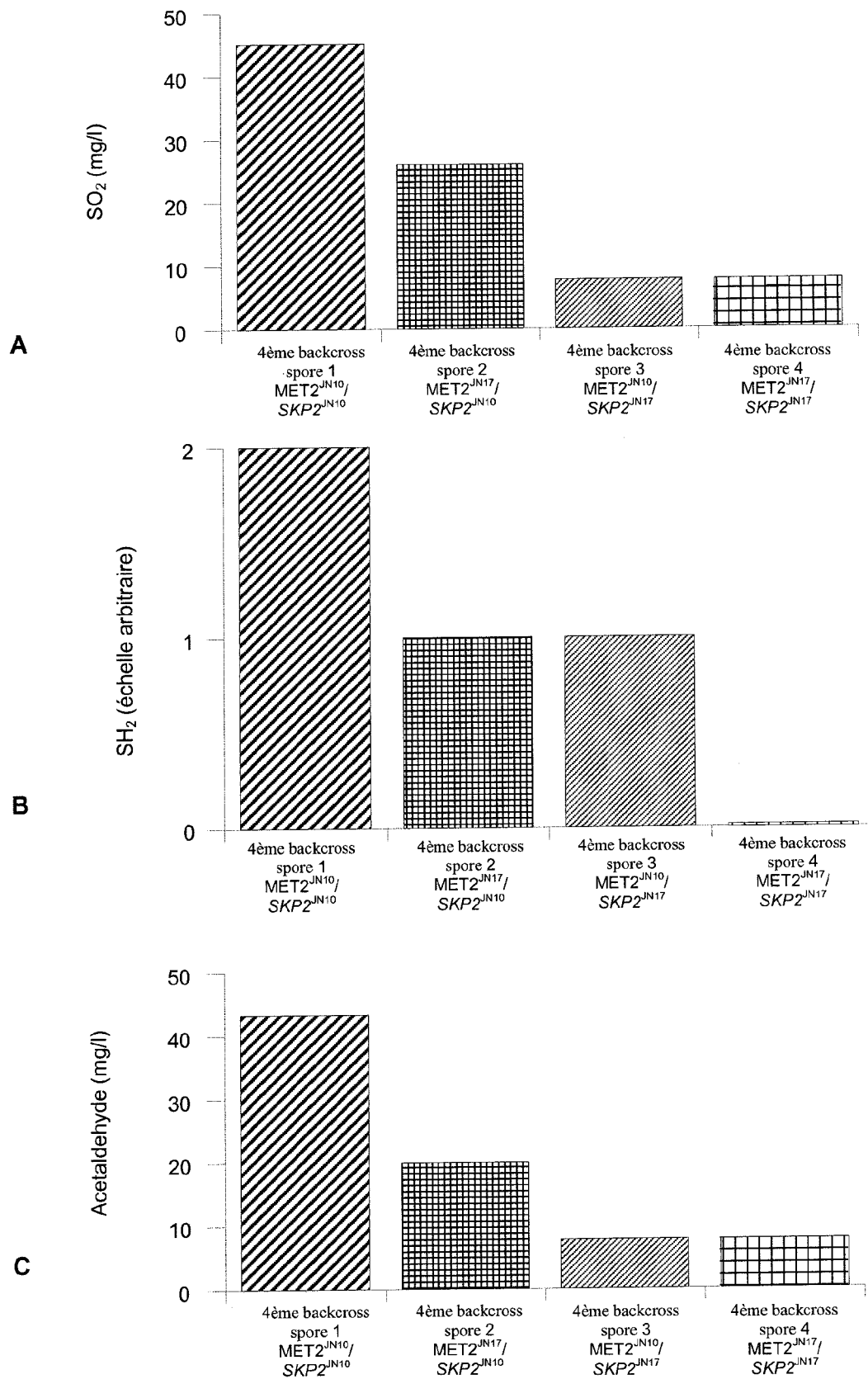


Figure 3