

Développement d'outils de modification génétique chez la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis*.

Organisme d'accueil

Le stage proposé est d'une durée de 6 mois et se déroulera dans l'UMR SPO (Sciences pour l'œnologie) au sein des équipes FLAM (Fermentation alcoolique : Levures, Arômes, Métabolisme) et ADEL (Adaptation, Diversité, Écologie des Levures) sur le campus de l'Institut Agro Montpellier.

Responsables de stage

Virginie Galeote, chargée de recherche INRAE

Anita Boisramé, Professeur AgroParisTech

Paul Bodin, doctorant

Thérèse Marlin, technicienne

Présentation du sujet

La levure *Brettanomyces bruxellensis* qui est associée à des milieux fermentés d'origine anthropique (Smith et Divol, 2016), cohabite fréquemment avec *Saccharomyces cerevisiae* lors de la vinification mais s'en distingue par un métabolisme spécifique. Sa capacité à produire des phénols volatils, bien que recherchée dans certaines bières ou dans le kombucha (Harrouard et al., 2023, Schifferdecker et al., 2014), est considérée comme un défaut majeur en œnologie. En effet, en métabolisant les acides hydroxycinnamiques (AHC), naturellement présents dans le moût de raisin, elle produit des phénols volatils responsables d'arômes indésirables donnant un goût de cheval ou d'écurie (Agnolucci et al. 2017). Le contrôle de cette production constitue un défi majeur pour les viticulteurs soucieux de préserver la qualité aromatique de leurs vins. Cependant, les connaissances actuelles sur la physiologie des *Brettanomyces* sont encore limitées, rendant difficile la mise en place de stratégies efficaces.

À ce jour, la manipulation génétique des levures *B. bruxellensis* reste un défi en raison du manque d'outils d'édition de génomes. Ainsi, bien que l'intérêt pour les *Brettanomyces* ne cesse de croître, les outils d'édition génomique n'ont été que peu appliqués à cette levure (Miklenic et al. 2015; Ishchuk et al. 2016; Schifferdecker et al. 2016, Varela et al, 2018). Une stratégie courante pour la modification stable des gènes chez de nombreuses espèces de levures est l'intégration chromosomique, ciblée sur un locus spécifique, de cassettes d'ADN hétérologues par recombinaison homologue (HR). Cette intégration peut se faire également par jonction non homologue (NHEJ), dans laquelle la cassette s'insère au hasard dans le génome. Bien que la transformation génétique de *B. bruxellensis* développée très récemment soit fonctionnelle, des études récentes ont montré que l'ADN hétérologue introduit dans le génome de *B. bruxellensis* s'intégrait de manière aléatoire (Varela et al, 2018). Ainsi, l'objectif de ce stage vise à développer des outils d'édition génomique spécifiquement adaptés aux *Brettanomyces*. Pour cela, trois axes ont été définis pour structurer ce travail :

- Développement de vecteurs d'expression réplcatifs. Des plasmides construits à partir de différentes espèces de levures seront introduits dans *B. bruxellensis* afin d'évaluer leur capacité à se répliquer de manière autonome et à exprimer les gènes d'intérêt. Différents marqueurs de sélection seront utilisés pour suivre l'efficacité de la transformation et la stabilité des plasmides.

- Développement du système CRISPR-Cas9 (ou équivalent) après transformation des levures avec des RiboNucléoProtéines (RNP). La méthode consiste à « forcer » par électroporation l'introduction dans les levures de la protéine Cas9 et des ARN guide, directement produits et préalablement assemblés (Miklenić et al. 2015; Varela et al. 2020). Une fois introduits, ces éléments devraient cibler le site de modification du génome.
- Développement du système CRISPR-Cas9 (ou équivalent) après transformation des levures avec des fragments de PCR permettant l'expression de Cas9 et des ARN guide sous le contrôle de promoteurs forts de *B. bruxellensis*.

Les deux derniers axes pourront être mis en œuvre en l'absence de plasmides réplcatifs fonctionnels. Pour chacun, une cassette de réparation apportant la modification souhaitée associée à un marqueur de sélection sera également apportée par transformation sous forme de fragment de PCR pour favoriser l'intégration par recombinaison homologue au locus ciblé par l'ARN guide.

Ce stage s'inscrit dans le cadre de deux thèses visant à mieux comprendre le rôle de *B. bruxellensis* dans la qualité du vin. Spécifiquement, ce stage a pour objectif de générer des souches de *B. bruxellensis* modifiées génétiquement. L'une des modifications envisagée est l'expression d'une protéine fluorescente afin de pouvoir suivre la dynamique des populations de *Brettanomyces*, à des niveaux faibles dans le vin, par cytométrie en flux. D'autre part, la délétion de gènes impliqués dans la voie de production des éthyls phénols sera réalisée afin de mieux comprendre leur métabolisme. Enfin, ces outils permettront à terme, de tester l'implication de certaines protéines de surface dans l'interaction avec d'autres micro-organismes par inactivation des gènes.

Mots clés : levure, microbiologie, biologie moléculaire, génétique, CRISPR-Cas9

Méthodologies principales : microbiologie (culture cellulaire), biologie moléculaire (extraction d'acides nucléiques, transformation levure/bactérie, construction plasmidique par Gibson assembly), analyse statistique des données (R), ...

Profil recherché :

Nous recherchons un/une étudiant(e) en dernière année d'école d'ingénieur ou en M2 en microbiologie, génie biologique ou biotechnologies.

Le/la candidat(e) idéal(e) devra au minimum maîtriser la théorie et la pratique en génie biologique (travail en conditions stériles, transformation de levure/bactéries, extraction d'ADN, construction de plasmide, traitement des données). Il/Elle devra également faire preuve d'une bonne capacité rédactionnelle et de synthèse (rapports bibliographiques et rapports d'expérience). Enfin, nous recherchons avant tout une personne forte de proposition avec une bonne capacité d'apprentissage et d'adaptation.

Conditions du stage

Durée : 6 mois à l'UMR SPO à Montpellier (Institut Agro, Campus de La Gaillarde)

Gratification : 4,35 € / heure (soit environ 650€ par mois) sur une base de 35 h par semaine.

Contact

Virginie Galeote (virginie.galeote@inrae.fr), Anita Boisramé (anita.boisrame@agroparistech.fr), Paul Bodin (paul.bodin@inrae.fr)

Bibliographie

- Agnolucci, Monica, Antonio Tirelli, Luca Cocolin, and Annita Toffanin. 2017. 'Brettanomyces Bruxellensis Yeasts: Impact on Wine and Winemaking'. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 33 (10): 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2345-z>.
- Harrouard, Jules, Chris Eberlein, Patricia Ballestra, Marguerite Dols-Lafargue, Isabelle Masneuf-Pomarede, Cécile Miot-Sertier, Joseph Schacherer, and Warren Albertin. 2023. 'Brettanomyces Bruxellensis: Overview of the Genetic and Phenotypic Diversity of an Anthropized Yeast'. *Molecular Ecology* 32 (10): 2374–95. <https://doi.org/10.1111/mec.16439>.
- Ishchuk, Olena P., Tanja Vojvoda Zeljko, Anna J. Schifferdecker, Sofia Mebrahtu Wisén, Åsa K. Hagström, Elżbieta Rozpędowska, Mikael Rørdam Andersen, et al. 2016. 'Novel Centromeric Loci of the Wine and Beer Yeast *Dekkera bruxellensis* CEN1 and CEN2'. *PloS One* 11 (8): e0161741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161741>.
- Miklenić, Marina, Bojan Žunar, Anamarija Štafa, and Ivan-Krešimir Svetec. 2015. 'Improved Electroporation Procedure for Genetic Transformation of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*'. *FEMS Yeast Research* 15 (8): fov096. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov096>.
- Schifferdecker AJ, Siurkus J, Andersen MR et al. Alcohol dehydrogenase gene *ADH3* activates glucose alcoholic fermentation in genetically engineered *Dekkera bruxellensis* yeast. *Appl Microbiol Biot* 2016;100:3219–31.
- Varela C, Lleixa J, Curtin C, Borneman A (2018) Development of a genetic transformation toolkit for *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast Res* 18(7):foy070. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy070>
- Varela, Cristian, Caroline Bartel, Cristobal Onetto, and Anthony Borneman. 2020. 'Targeted Gene Deletion in *Brettanomyces bruxellensis* with an Expression-Free CRISPR-Cas9 System'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (16): 7105–15. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10750-5>.