

VIGNE ET LEVURES OENOLOGIQUES « SUR-MESURE » POUR UNE INDUSTRIE VINICOLE AXÉE SUR LE MARCHÉ ET SUR LA QUALITÉ DEUXIÈME PARTIE : LES LEVURES

I.S. Pretorius

Institute for Wine Biotechnology, Department of Viticulture and Oenology, Stellenbosch University
Stellenbosch 7600, South Africa

3. Le potentiel des souches oenologiques génétiquement modifiées.

3.1 Espèces et souches de levures

Les levures sont prédominantes pendant la fermentation du vin. Dans les fermentations spontanées, il y a une croissance progressive des levures indigènes provenant de la surface des baies de raisin et de l'équipement de la cave. Les levures des genres *Kloeckera*, *Hanseniaspora* et *Candida* prédominent en début de fermentation. Suivent ensuite plusieurs espèces de *Metschnikowia* et *Pichia* dans les étapes intermédiaires, lorsque l'éthanol augmente jusqu'à 3-4%. Ces dernières étapes dans les fermentations de vins spontanées sont invariablement dominées par les souches de *S. cerevisiae* tolérantes à l'alcool, qui est ainsi connue comme LA « souche œnologique ». Les levures indigènes présentes dans les fermentations de vin spontanées sont censées produire des vins dont la structure est plus pleine, plus ronde en bouche. Cependant les fermentations spontanées sont généralement plus longues et le résultat est très improbable. Les fermentations spontanées sont ainsi plus fréquentes dans certaines « caves boutiques » qui argumentent plus sur la variabilité des millésimes et qui acceptent de prendre le risque de produire des styles de vins différents qui reflètent la diversité des levures de leur région spécifique.

Dans les caves modernes, qui produisent à grande échelle et où les fermentations rapides et sûres sont essentielles pour que les vins présentent des arômes constants et une qualité définie, des souches de culture starter *S. cerevisiae*, spécialement sélectionnées et dont les aptitudes sont connues, sont utilisées. En plus de la fonction de base de ces souches de culture starter de levures sèches actives œnologiques qui consiste à catalyser la conversion rapide, efficace et complète des sucres du raisin (glucose et fructose) en alcool sans développer de mauvais arômes, les viticulteurs d'avant-garde actuels exigent de leurs souches de culture starter toute une palette de propriétés spécialisées qui peuvent ajouter de la valeur au produit final. Cette quête pour des souches de levures œnologiques optimisées pour réaliser les tâches spécifiques exigées par les viticulteurs a mené au croisement (breeding) ciblé de levure et au génie génétique.

3.2 Les caractéristiques génétiques et les techniques d'analyse et d'amélioration de levures œnologiques

La majorité des souches de *S. cerevisiae* de laboratoire sont soit haploïdes, soit diploïdes, alors que les souches de levures rencontrées dans les vins à grande échelle sont à majorité diploïdes ou aneuploïdes, et parfois polyploïdes. La séquence nucléotidique de tout le génome de *S. cerevisiae* est connue. *S. cerevisiae* a un génome relativement petit et compact (environ 13 000 kb) et présente un grand nombre de chromosomes (16 chromosomes linéaires variant par leur longueur, qui s'étale de 200 à 2200 kb), un petit nombre de gènes (environ 6000 gènes codant pour les protéines), peu d'ADN répétitif et quelques introns.

Des méthodes de génétique classiques et moléculaires avec un fort potentiel existent et grâce à elles, les souches de levure œnologiques peuvent être analysées et modifiées. A

l'origine, l'analyse des tétrades après sporulation était utilisée pour l'identification génétique, la caractérisation et le positionnement des gènes de levure. Récemment, une technologie a été mise au point permettant de faire le lien direct entre le génome (tous les gènes) et le transcriptome (tous les transcrits = intermédiaire entre gènes et protéines) d'une souche de levure œnologique. La séquence génomique a été utilisée pour créer et synthétiser des puces contenant des oligo-nucléotides à haute densité afin d'étudier les niveaux d'expression de pratiquement tous les gènes de cellules de levures élevées dans des conditions de fermentation. En outre, lorsque le déchiffrement, actuellement en cours, de la fonction des 6000 gènes de *S. cerevisiae* sera complété très prochainement, le protéome entier (toutes les protéines) deviendra accessible et permettra de révéler le métabolome (activités métaboliques et métabolites) complexe de la levure œnologique.

L'information obtenue par l'analyse des génomes entiers, des transcriptomes, des protéomes et des métabolomes des levures œnologiques augmentera indubitablement la spécificité des méthodes actuelles grâce auxquelles les souches starter sont sélectionnées génétiquement et « taillées sur mesure » pour la production de types et de styles de vins particuliers. Actuellement, la sélection de souche classique et les méthodes de modification, telle que la sélection de variants, la mutagenèse, l'hybridation (mating, spore-cell mating, rare mating, cytoduction et spheroplast fusion), sont basées sur une approche « shotgun ». Par cette approche, de larges régions génomiques ou des génomes entiers sont recombinaisonnés ou réarrangés. Ainsi, ces méthodes ne sont pas assez spécifiques pour modifier les levures œnologiques d'une façon très contrôlée et si elles peuvent apporter une amélioration à quelques unes des propriétés de la souche de levure, elles peuvent aussi compromettre d'autres caractéristiques souhaitées. Les seuls avantages que présentent ces méthodes sont qu'elles sont utilisées afin d'améliorer et de combiner des traits sous contrôle polygénique et qu'elles ne donnent pas naissance à des produits qui sont compris dans la définition légale des OGM. Ainsi, les variants, les mutants, les hybrides, les cytoductants, et les fusants ne sont pas sujets aux mêmes règles strictes et légales qui concernent les OGM et ne sont également pas traités avec le même degré de suspicion par le public que le sont les levures œnologiques modifiées avec de l'ADN exogène. Cependant, le génie génétique reste la seule méthode fiable offrant la possibilité de modifier une propriété existante, d'introduire une nouvelle caractéristique et d'éliminer un trait non voulu sans affecter d'autres propriétés désirables. Plusieurs méthodes de modification et vecteurs plasmidiques efficaces, ainsi que des cassettes d'expression et de sécrétion pour l'expression de gènes hétérologues et la sécrétion de leurs protéines correspondantes, ont été développés pour *S. cerevisiae*. Ces outils ont permis le développement spécifique, et pour un grand nombre d'applications, de levures œnologiques génétiquement améliorées.

3.3 Objectifs de l'amélioration génétique des levures œnologiques.

Généralement, les objectifs du développement d'une souche sont tous liés à l'amélioration du coût de production et de la qualité du vin. Le tableau 2 résume certaines améliorations qui peuvent être obtenues par l'utilisation des levures œnologiques modifiées génétiquement. Ces objectifs comprennent entre autres une meilleure efficacité du procédé de fermentation, du traitement du vin et du contrôle des contaminations microbienne, ainsi que la mise en valeur du caractère et des qualités sensorielles du vin.

Amélioration de la performance fermentaire : Les fermentations œnologiques se déroulent généralement plus rapidement que souhaité et sont habituellement contrôlées en abaissant la température de fermentation. Les fermentations « galopantes » ont des conséquences commerciales, la production de mousse réduisant l'optimisation de l'utilisation de la cuverie et les composés aromatiques volatiles étant entraînés par le flux de gaz carbonique. D'autre part, la fermentation œnologique s'arrête parfois de façon prématurée ou se déroule trop lentement. Les pertes financières provoquées par les fermentations

« arrêtées », « lentes » ou « incomplètes » sont habituellement attribuées à une utilisation inefficace de la cuverie et à la détérioration de la qualité du vin résultant d'une protection

réduite du au dégagement faible en dioxyde carbone et d'un contenu élevé en sucre résiduel. Ainsi, la connaissance du déroulement de la fermentation et la qualité finale du vin dépendent directement des propriétés de la levure œnologique qui à un rôle sur le contrôle de la flore en début de fermentation et qui détermine la régularité et l'efficacité de la fermentation. De nombreux facteurs affectent les performances des levures œnologiques. Parmi les objectifs visés généralement pour l'amélioration de ce performances, on trouve une élasticité accrue de la membrane et une meilleure résistance au stress des cellules de levure sèche active, une consommation et une assimilation des sucres des baies et de l'azote améliorées, une résistance accrue à l'éthanol et à d'autres métabolites microbiens et toxines, une résistance au sulfite, aux métaux lourds et aux résidus agrochimiques, ainsi qu'une formation de mousse réduite (Tableau 2).

Etant donné que les stérols, le tréhalose, le glycogène et les aquaporines remplissent des rôles multiples dans la survie des cellules de *S. cerevisiae* exposées à plusieurs stress physiques et chimiques, elles ont des implications importantes dans la tolérance générale au stress, dans l'élasticité membranaire, sur l'état de forme et de vigueur des cultures starter de levure œnologique sèche active lors de la réactivation. En conséquence, il existe des raisons importantes pour développer des souches de levure œnologique possédant une capacité supérieure à accumuler ces composés. Cependant, en raison des mécanismes de réponses au stress complexes rencontrés dans la levure, il n'est pas encore clair que la suppression du gène tréhalase *ATH1* et la modification des niveaux d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du tréhalose (*TPS1*, *TPS2*, *ATH1*), du glycogène (*GSY1*, *GSY2*) et des stérols (*SUT1* et/ou *SUT2*), ainsi que la synthèse des aquaporines (*AQY1*, *AQY2*) (Tableau 2) amènent à une amélioration de la viabilité et de la vitalité de la levure.

Un déséquilibre entre des niveaux élevés en sucres (carbone) et des niveaux faibles en azote (assimilable) dans le moût de raisin est la cause la plus fréquente d'apparition de fermentation difficile. Les fermentations lentes ou arrêtées sont en effet souvent dues à une diminution de la concentration en azote assimilable limitant de façon irréversible le transport des sucres (hexoses). Il est donc essentiel, pour augmenter l'efficacité d'utilisation des sucres du raisin (glucose et fructose) dans des conditions de carence en azote, d'accroître le flux glycolytique en remplaçant tout allèle de gènes mutants non fonctionnels et codant pour des enzymes glycolytiques clés dans le but d'optimiser l'efficacité de la consommation des hexoses (le fructose particulièrement) et de diminuer l'assimilation de la proline et de l'arginine (qui représentent de 30 à 65% du contenu en acide aminé total d'un jus de raisin) par la répression catabolite de l'azote (Tableau 2). Dans le cas des fermentations incomplètes, la préférence des levures œnologiques pour le glucose sur le fructose peut amener à des niveaux excessifs de fructose résiduel qui compromettent la qualité du vin. L'hypothèse émise est que le taux de production d'alcool par la levure œnologique est limité principalement par le taux de consommation de sucre, et plus particulièrement par la consommation de fructose en présence de niveaux de sucre élevés en début de fermentation et lorsque la concentration en azote devient limitée et couplée avec une limitation en nutriments. Ainsi, plusieurs laboratoires travaillent aujourd'hui sur la phosphorylation des sucres par les hexokinases codées par *HXK1* et *HXK2* et par la glucokinase codée par *GLK1*, ainsi que sur les transporteurs d'hexose codés par les gènes *HXT1-HXT18* et *SNF3*. Il existe une preuve anecdotique que la surexpression chez *S. pastorianus* du gène *FSY1* codant pour le transport fructose/ H⁺ couplé avec certains autres transporteurs d'hexose codés par *HXT1-HXT18* et *SNF3* ainsi que l'hexokinase codée par *HXK1* a pour résultat une consommation améliorée du glucose et du fructose lors des fermentations œnologiques. En outre, la suppression du répresseur codé par *URE2* des gènes *PUT1* codant pour la proline oxydase et *PUT2* codant pour la pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase représente la première étape vers le développement de levures œnologiques qui pourront assimiler efficacement la proline et l'arginine des moûts de raisin en conditions de fermentation.

Une autre façon d'améliorer les performances fermentaires des levures œnologiques est d'augmenter leur résistance aux métabolites microbiens toxiques (tels que l'éthanol, l'acide acétique, les acides gras moyenne chaîne, etc...), les zymocines (toxines killer des levures), les conservateurs chimiques (tel que le SO₂) et les produits agrochimiques qui contiennent des métaux lourds (tel que le cuivre) (Tableau 2). Par exemple, la modification de

l'expression des gènes SUT1, SUT2, PMA1 et PMA2 a pour résultat d'accroître l'accumulation de stérols et l'activité ATPase de la membrane de la cellule, augmentant ainsi la résistance à l'éthanol. En outre, les déterminants génétiques et mycoviraux ainsi que d'autres gènes codants pour des toxines killer (peptides zymocidaux) et des facteurs d'immunité peuvent être incorporés dans les levures œnologiques afin de les rendre insensibles aux zymocines des levures sauvages contaminantes. En ce qui concerne la résistance aux produits agrochimiques, une augmentation du nombre de copies du gène permettant la chélation du cuivre, CUP1, permet aux levures œnologiques de tolérer des niveaux plus élevés de résidus cuivriques dans le moût de raisin.

Amélioration dans l'efficacité du traitement : Les objectifs principaux du collage (ajout des composés absorbants suivi d'étapes de débouillage ou de précipitation) et de la clarification (tel que la sédimentation, le soutirage, la centrifugation, la filtration etc...), au cours de l'élaboration du vin, sont l'élimination soit de certains composants en quantité excessive soit de cellules microbiennes afin d'obtenir un vin clair et limpide et d'en assurer la stabilité physico-chimique. Le collage et la clarification du vin impliquent souvent des pratiques chères et laborieuses qui génèrent de larges volumes de lies à éliminer, entraînant également une perte de vin et de composés aromatiques et gustatifs important pour la qualité finale du produit. Afin de minimiser les désavantages de ces pratiques difficiles de collage et de clarification, des préparations enzymatiques commerciales relativement onéreuses (telles que les protéases, pectinases, glucanases, xylanases, arabinofuranosidases, etc...) et dont la palette d'activités est plus en plus variée, sont fréquemment ajoutées au moût de raisin et au vin. Comme stratégie alternative à l'addition de préparations enzymatiques chères qui contiennent souvent des activités contaminantes et secondaires non désirables, des levures œnologiques sont développées afin de sécréter des enzymes protéolytiques et polysaccharolytiques qui supprimeront respectivement les protéines responsables de la turbidité et les polysaccharides entraînant le colmatage des filtres. Dans ce but, la surexpression de plusieurs gènes bactériens, fongiques et de levures a eu comme résultat le développement de souches de levures œnologiques protéolytiques, pectinolytiques, glucanolytiques et xylanolytiques. (Tableau 2).

Un second objectif pour l'amélioration de la clarification et de la filtration vise à supprimer de façon efficace toutes les cellules de levure de la phase liquide de la cuve ou de la barrique. Une expression régulée des gènes de floculation est importante pour garantir d'une part une bonne suspension des cellules permettant une vitesse de fermentation rapide, et d'autre part pour faciliter en fin de process le débouillage afin de minimiser les problèmes de la clarification du vin. La floculation de la levure est particulièrement importante pour la production de vins mousseux fermentant en bouteilles et le début contrôlé de la floculation de la levure au moment approprié lors de la production de vins mousseux peut simplifier ce procédé coûteux. L'expression du gène flocline FLO1, lié au promoteur tardif de fermentation HSPO3 peut être provoquée par un choc thermique, confirmant que la floculation peut être contrôlée. L'agrégation des cellules joue également un rôle clé dans la production de levure impliquée dans l'élaboration de vin jaune, lors duquel les levures forment un velum (biofilm) à la surface du vin. En plaçant le gène MUC1 codant pour la mucine (également connu comme FLO11) sous le contrôle du promoteur HSP30, la formation du biofilm peut être initié à la fin de la fermentation, simplifiant ainsi le développement de cette levure.

Amélioration du contrôle biologique des microorganismes de contamination : Une croissance microbienne non contrôlée avant, pendant ou après la fermentation du vin peut altérer la composition chimique du produit fini, et en diminuer les propriétés sensorielles d'apparence, d'arômes et de goût. Des raisins ayant une bonne qualité sanitaire, une bonne hygiène de cave et des pratiques œnologiques sérieuses sont les fondements de la stratégie contre la prolifération des microorganismes de contamination. Une sécurité supplémentaire est apportée par l'ajout de conservateurs chimiques, tels que le dioxyde de soufre, le diméthyle dicarbonate, l'acide benzoïque, l'acide fumarique et l'acide sorbique qui contrôlent

la croissance de contaminants microbiens non désirés. Cependant, une utilisation excessive de ces conservateurs chimiques altère la qualité du vin et va à l'encontre de la demande des consommateurs. En effet les consommateurs préfèrent des vins de haute qualité, naturels et bons pour la santé, ne contenant donc pas trop de produits chimiques, et qui n'ayant pas subis de traitement lourd. Ainsi, la bio préservation avec des métabolites dérivés de la levure (tel que la formation de SO₂ ou le peroxyde d'hydrogène lors des fermentations œnologiques), avec des enzymes antimicrobiens (tels que le lysozyme, les chitinases, les endoglucanases, etc...) et des peptides (zymocines et bactériocines) est actuellement considérée comme une stratégie alternative à la conservation chimique. Cependant, l'utilisation d'enzymes antimicrobiens purifiés et de bactériocines est onéreuse, et augmente le prix de vente du vin. Ce problème pourrait être contourné en exprimant des enzymes antimicrobiens efficaces et des peptides dans les souches de levure œnologique, permettant de répondre ainsi aux besoins actuels du marché pour des vins de plus grande qualité et pureté. A cette fin, le gène du lysozyme de blanc d'œuf (HEL1), le gène pédiocine *Pediococcus acidilactici* (PED1) et le gène leucocine *Leuconostoc carnosum* (LCA1) ont été utilisés afin de mettre au point des levures bactéricides. Les gènes de levure antifongique *CTS1* codant pour la chitinase et *EXG1* codant pour l'exoglucanase ont également été exprimés dans *S. cerevisiae*. L'approche principale dans la construction de souches zymocidales est basée sur l'introduction d'une combinaison de gènes codant pour des toxines killer mycovirales de *S. cerevisiae* (tels que K₁/K₂ double killer) et de gènes codant pour la zymocine d'autres levures (tels que *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, etc...) dans des levures œnologiques. L'idéal serait d'incorporer toutes ces activités antimicrobiennes dans une seule et même levure œnologique, contrecarrant ainsi le développement de toutes bactéries (telles que *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, etc.), de levures (telles que *Brettanomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, etc.) et de moisissures (tels que *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Trichoderma*, etc.) rencontrés dans le vin.

Amélioration du caractère du vin : Il est reconnu que boire du vin modérément peut être bénéfique socialement et peut être efficace dans la gestion du stress et la réduction des maladies coronariennes. Les composés protecteurs principaux trouvés dans le vin comprennent les composés phénoliques, le resvératrol, l'acide salicylique et l'alcool. Cependant, les buveurs de vin prudents sont de plus en plus exigeants en ce qui concerne la présence de composés indésirables. Les carcinogènes potentiels, tel que l'éthyl-carbamate, les neurotoxines, tels que les amines biogènes, les conservateurs chimiques causant l'asthme, tels que les sulfites font partie de ces composés non désirés. Les buveurs les plus tatillons parmi ces consommateurs de vin difficiles s'inquiètent même des hauts degrés d'alcool dans le vin. Lors du développement de nouvelles souches de levure œnologique, il est ainsi très important de se concentrer sur ses aspects de santé et de développer des levures qui favorisent les aspects bénéfiques d'une consommation modérée de vin (c'est-à-dire la production de resvératrol, carnitine, etc...) tout en réduisant les risques (c'est-à-dire élimination de l'éthyl carbamate et des amines biogènes, et réduction du degré alcoolique).

En ce qui concerne la production de resvératrol lors de la fermentation, des progrès ont d'ores et déjà été réalisés par la mise au point d'une levure œnologique qui exprime le co-enzyme 4CL9/216 A ligase et les gènes synthase stilbene *VST1*. Le développement d'une levure bactéricide, dont le gène codant pour l'arginase *CAR1* (bloquant ainsi la sécrétion d'urée, précurseur de l'éthyl carbamate) serait éliminé ou qui serait transformée avec des gènes uréase hétérologues (permettant la dégradation de l'urée) réduirait les niveaux d'ajout de sulfite, et limiterait ainsi la production d'éthyl-carbamate ainsi que celles et de bioamines formées par des contaminants bactériens. La bio-réduction du degré alcoolique des boissons fermentées peut être réalisée en redirigeant une partie du flux de carbone de la fermentation vers la production de glycérol et d'acide gluconique. De façon similaire, une augmentation significative du glycérol sécrété et une réduction concomitante de la production d'éthanol peuvent être obtenues grâce à la surexpression des gènes *GPD1* et *GPD2* codant pour les isoenzymes de la glycerol-3-phosphate déshydrogénase de *S. cerevisiae*, et à l'expression constitutive du gène *FPS1* codant pour un facilitateur du transport du glycérol. Des

réductions du degré d'éthanol ont été également obtenues grâce à l'expression du gène de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* *GOX1* dans *S. cerevisiae*.

Amélioration des qualités sensorielles du vin : Le seul facteur très important dans la viticulture est la qualité organoleptique (apparence, arôme et goût) du produit final. La variété infinie des goûts provient d'un système totalement non linéaire et complexe d'interactions entre les plusieurs centaines de composés trouvés dans un vin. Le bouquet du vin est déterminé par la présence d'un rapport bien équilibré entre les composés et les métabolites aromatiques d'intérêt et l'absence de ceux qui sont indésirables. A l'exception des terpènes dans les variétés de raisin aromatiques et des alkoxyprazines des cépages herbacés, le goût perçu est le résultat de quantités absolues et de rapports spécifiques de nombreux de ces composés interagissant plutôt que le résultat d'un seul composé impactant. De subtiles combinaisons composés sous forme de trace (métabolites secondaires accumulés) dérivés du raisins sont habituellement responsables du goût caractéristique et aux notes aromatiques du vin, tandis que les sous-produits de fermentation de la levure (esters, alcools supérieurs, etc..) contribuent au goût et arôme de fond générique, tout comme à la complexité et à l'intensité des arômes et du goût du produit final. La levure peut également être responsable de la production de sous-produits non désirés, tel que l'H₂S.

Il y a un besoin évident en développement de levures œnologiques qui donneraient les caractéristiques spécifiques désirées au vin (Tableau 2). A cette fin, des progrès significatifs ont été réalisés dans la mise au point de levures produisant des enzymes libérant de la couleur et des arômes (tels que les pectinases, les glycosidases, les glucanases, les arabinofuranosidases, etc...) et des enzymes modifiant les esters (tels que les transférases d'acétyl-alcool, les estérases, l'enzyme hydrolisant l'acétate d'isoamyle, etc...). En outre, les levures produisant des concentrations optimales de glycérol (grâce à la surexpression des gènes *GPD1*, *GPD2* et *FPS1*, couplée avec la suppression du gène déshydrogénase acétaldéhyde *ALD6*), d'alcools supérieurs (tels que l'alcool isobutylique, l'alcool isoamylique, etc.), et d'acides phénoliques (expression modifiée du gène *PAD1* de levure codant pour la décarboxylase de l'acide phényl-acrylique, ainsi que l'expression des gènes bactériens *pdC* et *padC* codant respectivement pour la décarboxylase de l'acide ρ -coumarique et pour la décarboxylase d'acides phénoliques) ont été développés.

Des levures œnologiques portant des allèles inactivés du gène *MET14* codant pour l'adénosyl-phospho-sulfate kinase ou *MRX1* codant pour la méthionine sulphoxide réductase ont été mises au point

L'ajustement biologique de l'acidité du vin peut être réalisé grâce à des levures œnologiques recombinantes contenant des gènes clonés de *Schizosaccharomyces pombe* et de bactéries lactiques. Une levure œnologique contenant le gène *mae1* codant pour la malate perméase chez *S. pombe* et le gène *mae2* codant pour l'enzyme malique convertit l'acide malique en éthanol (fermentation maloéthanolique), alors qu'une levure recombinante porteuse du gène *mae1* ainsi que du gène de l'enzyme malolactique d'*Oenococcus oeni* (*mleA*), ou de *Lactococcus lactis* (*mleS*) ou de *Lactobacillus delbrueckii* (*mleS*) convertit l'acide malique en acide lactique (fermentation malolactique). La levure œnologique maloéthanolique sera plus adaptée aux vins dont le pH est bas, provenant de régions septentrionales, tandis que la levure œnologique malolactique apportera une solution plus adaptée pour les vins à pH élevé élaborés dans des régions plus chaudes. Dans le cas des vins possédant un pH élevé, la production d'acide lactique supplémentaire pendant la fermentation peut être réalisée en incorporant le gène codant pour la lactico-déshydrogénase de *Lactobacillus casei* *LDH1* dans la souche de levure œnologique malolactique. Ces levures permettent d'éviter l'utilisation de bactéries malolactiques principale source de la formation des bioamines dans les vins rouges et dans certains styles de vins blancs qui sont nécessaires à la réalisation de la fermentation malolactique.

Reprinted from TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Vol 20, 2002, pp426-432, Pretorius et al, "Meeting the Customer..." and Vol 20, 2002, pp472-478, Vivier et al, "Genetically Tailored Grapevines..."

Copyright (2002), with permission from Elsevier

Continue ...

Tableau 2. Objectifs pour l'amélioration génétique des souches de levure oenologique

<u>Propriétés souhaitées</u>	<u>Thème de recherches</u>	<u>Exemples de gènes ciblés actuels et potentiels</u>
Meilleure Performance de fermentation		
Meilleure élasticité générale de la membrane et meilleure tolérance au stress	Réponse au stress, accumulation de stérol, glycogène et de tréhalose	Modification du métabolisme du glycogène ou du tréhalose [par exemple agissant sur <i>GSY1</i> et <i>GSY2</i> (synthétase du glycogène), <i>TPS1</i> (synthétase du tréhalose-6-phosphate), <i>TPS2</i> (phosphatase du tréhalose-6-phosphate)]
Meilleure efficacité de l'utilisation des sucres	Transporteurs d'hexose et kinases d'hexose	Surexpression et modification of <i>HXT1-HXT18</i> , <i>SNF3</i> , <i>FSY1</i> et utilisation des transporteurs hétérologues et kinases
Meilleure efficacité de l'assimilation d'azote	Meilleure utilisation des sources d'azote moins efficaces	Catabolisme de la proline [<i>PUT1</i> (proline oxidase) et <i>PUT2</i> (pyrroline-5-carboxylate déhydrogénase)] et utilisation de gènes cataboliques hétérologues
Meilleure tolérance à l'éthanol	Formation de stérol, activité membranaire ATPase	Modification de l'expression de <i>PMA1</i> et <i>PMA2</i> (ATPase), gènes anaboliques de stérols
Tolérance accrue aux composés antimicrobiens	Résistance aux toxines killer, au dioxyde de soufre et aux produits agrochimiques	Introduction du gène <i>KIL2</i> (zymocine et "immunity factor"), surexpression de <i>CUP1</i> (chélation du cuivre)
Formation réduite de mousse	Protéines à la surface des cellules	Suppression de <i>FRO1</i> et <i>FRO2</i> (protéines de mousse)
Meilleure efficacité de traitement		
Meilleure élimination des protéines	Protéases	Surexpression de <i>PEP4</i> (protéase A) et sécrétion d'autres protéases
Meilleure élimination des polysaccharides	Glucanases, pectinases, xylanases, arabinofuranosidases	Surexpression de <i>END1</i> (endoglucanase), <i>EXG1</i> (exoglucanase), <i>CEL1</i> (cellodextrinase), <i>BGL1</i> (β-glucosidase, cellobiase), <i>PEL5</i> (pectate lyase) et <i>PEH1</i> (polygalacturonase), <i>XYN1-5</i> (xylanases), <i>ABF2</i> (arabinofuranosidase)
Sédimentation et floculation cellulaires contrôlées	Flocculines	Expression tardive des gènes de floculation (<i>FLO1</i> , <i>FLO5</i> , <i>MUC1/FLO11</i>) sous contrôle de promoteurs (<i>HSP30</i>) d'expression contrôlée
Flottation cellulaire et formation de voile contrôlée	Protéines hydrophobes de paroi cellulaire	Expression tardive de <i>MUC1/FLO11</i> sous contrôle de promoteurs inductibles (<i>HSP30</i>)
Meilleur contrôle biologique des microorganismes responsables de l'altération du vin		
Levures oenologiques produisant des enzymes antimicrobiens	Lysozyme, glucanases, chitinases	Expression de <i>HEL1</i> (lysozyme de blanc d'oeuf), <i>CTS1</i> (chitinase), <i>EXG1</i> (exoglucanase) et autres enzymes antimicrobiens
Levures oenologiques produisant des peptides antimicrobiens	Bactériocines	Expression de <i>PED1</i> (pédiocine), <i>LCA1</i> (leucocine) et autres gènes hétérologues de type bactériocines et zymocines
Levures oenologiques produisant du dioxyde de soufre	Métabolisme du soufre et formation de SO ₂	surexpression de <i>MET14</i> (adénosylphosphosulphate kinase) et <i>MET16</i> (phospho adénosylphosphosulphate réductase), et suppression de <i>MET10</i> (sulphite réductase)
Amélioration des caractéristiques du vin		
Production accrue de resvératrol	Synthèse du stilbene	Expression de <i>4CL9/216</i> (co-enzyme A ligase), <i>VST1</i> (synthétase de stilbene)
Formation réduite de l'éthyl-carbamate	Métabolisme des acides aminés et formation d'urée	Suppression de <i>CAR1</i> (arginase) ou expression de <i>URE1</i> (uréase)
Formation réduite d'amines biogènes	Enzymes bactériolytiques, bactériocines	Expression de <i>HEL1</i> (lysozyme de blanc d'oeuf), <i>PED1</i> (pédiocine), <i>LCA1</i> (leucocine) et autres bactériocines
Degré alcoolique plus faible	Flux du carbone, métabolisme du glycérol et oxydation du glucose	Surexpression de <i>GPD1</i> et <i>GPD2</i> (glycerol-3-phosphate déshydrogénase), modification de <i>FPS1</i> (« glycerol transport facilitator »), expression de <i>GOX1</i> (glucose oxydase)
Arôme du vin et autres qualités sensorielles améliorés		
Augmentation de la libération des terpénols du raisin	Glycosidases, glucanases, arabinofuranosidases	Surexpression de <i>END1</i> (endoglucanase), <i>EXG1</i> (exoglucanase), <i>CEL1</i> (cellodextrinase), <i>BGL1</i> (β-glucosidase, cellobiase), <i>PEL5</i> (pectate lyase) de <i>PEH1</i> (polygalacturonase), <i>ABF2</i> (arabinofuranosidase)
Augmentation de la production d'esters volatiles d'intérêt	Estérases	Expression modifiée de <i>ATF1</i> (alcool acetyl transférase) et autres alcool transférases, <i>IAH1</i> (estérase) et autres estérases
Production optimisée d'alcools supérieurs	Métabolisme des acides aminés	Suppression des gènes <i>ILE</i> , <i>LEU</i> et <i>VAL</i>

Meilleure production de glycérol	Métabolisme du glycérol	Surexpression de <i>GPD1</i> et <i>GPD2</i> (glycerol-3-phosphate déshydrogénase), <i>FPS1</i> (églycerol transport facilitatoré), et suppression de <i>ALD6</i>
Ajustement biologique de l'acidité du vin	Fermentation maloéthanolique et malolactique, production d'acide lactique	Expression de <i>MAE1</i> (malate permease), couplée avec <i>MAE2</i> (enzyme malique) ou <i>mleS</i> (enzyme malolactique), ou <i>LDH1</i> (lactico-déshydrogénase)
Optimisation des phénols	Métabolisme des acides phénoliques	Expression modifiée de <i>PAD1</i> (acide phényl acrylique décarboxylase), <i>pdc</i> (acide p-coumarique décarboxylase), <i>padc</i> (acide phénolique décarboxylase)
Production réduite de sulfite et de sulfide	Métabolisme du soufre, formation d'H ₂ S	Suppression de <i>MET14</i> (adénosylphosphosulphate kinase) et <i>MRX1</i> (méthionine sulphoxide réductase)