

## UTILISATION DE SOUCHES DE LEVURES GENETIQUEMENT MODIFIEES EN OENOLOGIE

Dorit Schuller - Margarida Casal

Centre de Biologie, Université de Minho, 4710-057 Braga, Portugal

Departement de Biologie, Université de Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

### Introduction

L'ensemencement de cultures pures de levures sélectionnées dans le moût est une pratique œnologique établie depuis les années 70, pour produire des vins avec des qualités organoleptiques souhaitées et garantir l'homogénéité des millésimes successifs. Aujourd'hui, la plupart de la production européenne de vin s'appuie sur l'utilisation de ces levures starter, sélectionnées d'abord pour leurs bonnes performances fermentaires. Des études biogéographiques conduites sur des années et l'identification de la flore microbienne naturelle de régions viticoles données ont été le point de départ de programmes plus poussés de sélection et amélioration de souches. Toutefois, l'existence naturelle de levures possédant une combinaison idéale de caractéristiques œnologiques est improbable. Au cours des années suivant la publication de la séquence génomique de *Saccharomyces* (Goffeau et al. 1996), de nouveaux outils génétiques ont fait de la construction de souches de levures génétiquement modifiées un grand défi. Actuellement, de nombreux laboratoires de recherche dans le monde ont obtenu des souches capables d'améliorer l'efficacité fermentaire et la qualité sensorielle du vin. Leurs performances en conditions œnologiques ont aussi été testées de façon extensive. Une introduction future de levures OGM requiert aussi, en conformité avec la législation actuelle, une estimation précise de l'impact sanitaire et environnemental. Les souches obtenues par auto-clonage, technique basée sur l'utilisation de matériel génétique issu de l'hôte, sont plus à même d'être approuvées. Cependant, l'attitude hostile des consommateurs envers les levures OGM pour la vinification n'a pas changé notablement au cours des 10 dernières années, et c'est la principale raison expliquant l'absence de souches recombinantes dans l'industrie du vin. Ce travail fait une analyse globale des avancées récentes et des implications de l'usage de levures génétiquement modifiées en œnologie. Il considère plusieurs aspects tels que les stratégies utilisées pour la construction de souches conformément aux exigences de la législation en vigueur, les estimations du risque environnemental lié à la dissémination délibérée de souches OGM, les méthodes les plus sensibles et pertinentes pour la détection d'ADN et protéines recombinants, et les raisons expliquant l'attitude critique des consommateurs.

### Selection de souches œnologiques commerciales

De récentes découvertes ont montré que les résidus prélevés sur l'une des plus anciennes amphores à vin découvertes en Egypte contenaient de l'ADN ribosomal de *cerevisiae*, indiquant que cette levure était responsable de la fermentation alcoolique déjà en 3150 av. J-C, au moins. (Cavaliere et al. 2003). La sélection au cours des millénaires de vinification a pu créer des propriétés œnologiques intéressantes, mais qui n'ont ni été disséminées très largement, ni été combinées dans une unique souche. La sélection clonale de souches de *Saccharomyces* isolées de milieux naturels appartenant à des zones viticoles d'intérêt est toujours le point de départ d'un programme de sélection de levures naturelles. Les starters de levures sélectionnées sont aujourd'hui largement utilisés car ils ont de très bonnes propriétés fermentaires, contribuant à la fois à la standardisation du processus de fermentation et de la qualité du vin. Actuellement, environ 150 souches de levures œnologiques différentes, principalement *S. cerevisiae*, sont commercialisées. Si on considère la tendance actuelle vers une production de vins très qualitatifs avec des propriétés distinctives, la demande des vinificateurs de « levures spéciales

pour des profils originaux » reste encore à satisfaire (Mannazzu et al. 2002; Pretorius 2000; Romano et al. 2003b).

Le choix de la stratégie appropriée de sélection dépend toujours des caractéristiques que la souche œnologique doit posséder et le nombre de souches à passer au crible. Les nombreux composés synthétisés diffèrent beaucoup selon les souches de *S. cerevisiae*. Comme récapitulé dans le tableau 1, de multiples caractéristiques œnologiques ont subi une évaluation. Des données technologiquement pertinentes peuvent être obtenues en contrôlant le déroulement de la fermentation, et en déterminant les profils quantitatifs par analyse chimique en fin de fermentation.

Caractéristiques Oenologiques	Commentaires
Vigueur de la fermentation	Quantité maximum d'éthanol (% v/v) produit en fin de fermentation Souhaitable: bonne production d'éthanol
Taux de fermentation	Grammes de CO <sub>2</sub> produit au cours des premières 48 h de la fermentation Souhaitable: lancement rapide de la fermentation
Mode de multiplication en milieu liquide	Croissance dispersée ou floculante, vitesse de sédimentation Souhaitable: Multiplication levurienne dispersée pendant, mais sédimentation en fin de fermentation
Production de mousse	Hauteur de mousse produite pendant la fermentation Non souhaitable: production de mousse excessive
Optimum de la température de fermentation	Thermotolérance et cryotolérance sont liées aux propriétés œnologiques. La température optimale de fermentation se situe entre 18 et 28°C
Acidité volatile, production d'acide acétique	Les souches sélectionnées ne doivent pas en libérer plus de 100 à 400 mg/L pendant la fermentation Non souhaitable: production en excès
Dégradation ou production d'acide malique	L'aspect désirable ou pas de la production ou dégradation dépend des caractéristiques du moût. La dégradation d'acide malique varie entre 0 et 20% selon la souche de <i>S. cerevisiae</i>
Production de glycérol	Sous-produit favorable et majeur de la fermentation (5–8 g/l) contribuant à la sucrosité, au corps et au volume du vin
Production d'acétaldéhyde	Métabolite favorable dans les Xeres, vins de dessert et portos, critère important de sélection pour les souches destinés à l'élevage du vin
Esters, alcools supérieurs et composés volatiles	Métabolites favorables, influencent fortement la flaveur du vin et dépendent de la présence de précurseurs liés à la fois au cépage et à la maturité du raisin. Des quantités limitées contribuent positivement aux caractéristiques sensorielles globales.
Tolérance au SO <sub>2</sub> et production	Agent antioxydant et antimicrobien. Souhaitable: vigueur et capacité fermentaires élevées en présence de teneurs en SO <sub>2</sub> usuelles en œnologie. Non souhaitable: production excessive de SO <sub>2</sub>
Production de H <sub>2</sub> S	Déterminée par la coloration des colonies formées sur milieu indicateur à base de bismuth, i.e. BIGGY Agar H <sub>2</sub> S, préjudiciable à la qualité du vin, est un défaut avec un seuil de détection très bas (50 à 80 µg/l)
Résistance au stress	Tolérance aux stress acides et osmotiques combinés
Résistance au cuivre	De fortes concentrations en cuivre peuvent entraîner des arrêts de fermentations. Souhaitable: Forte résistance au cuivre et capacité à réduire la teneur en cuivre

Tableau 1: Critères œnologiques considérés pour la sélection de souches de *Saccharomyces cerevisiae*

Trouver des souches de levure ayant une combinaison idéale de caractéristiques œnologiques reste hautement improbable, et la sélection s'est donc étendue à des levures non-*Saccharomyces* comme *Candida*, *Kloeckera*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces* ou *Rhodotorula*. Les espèces non-*Saccharomyces* manquent de compétitivité en conditions œnologiques parce qu'elles ne sont pas vigoureuses pour la fermentation et qu'elles présentent une plus faible résistance au stress que *S. cerevisiae*. Cependant, les cultures starter mélangées ou la fermentation séquentielle (i.e. *Candida cantarellii*/*S. cerevisiae*) pour orienter les fermentations vers une production accrue de glycérol et moindre d'acide acétique, ont été utilisées avec succès (Toro et Vazquez 2002). Les levures *Torulaspora delbrueckii* et *Candida stellata* sont considérées comme des contributrices positives à la qualité aromatique d'ensemble du vin, tandis que les levures apiculées comme *Kloeckera apiculata* ont une influence négative à cause de l'association entre faible production d'alcool et formation importante d'acide acétique et d'acétate d'éthyle (Ciani et Maccarelli 1998).

D'innombrables références font état des influences positives et néfastes des levures non-*Saccharomyces* sur la composition volatile des moûts de différents cépages (Ciani et Maccarelli 1998; Clemente-Jimenez et al. 2004; Granchi et al. 2002; Mingorance-Cazorla et al. 2003; Plata et al. 2003; Romano et al. 2003c), et des différences considérables à propos de ces composés ont aussi été trouvées parmi les souches commerciales ou autochtones *S. cerevisiae* (Patel et Shibamoto 2003; Romano et al. 2003a; Steger et Lambrechts 2000).

Les souches non-*Saccharomyces* produisent et sécrètent plusieurs enzymes, telles que des pectinases (augmentent le volume de jus d'extraction, améliorent la clarification et facilitent la filtration du vin), des  $\beta$ -glycosidases (hydrolysent les précurseurs aromatiques glycosidiques non volatiles issus du raisin), des estérases (contribuent à la formation de composés aromatiques) ou des lipases (dégradent les lipides du raisin ou interviennent sur les réactions d'autolyse des levures) (Esteve-Zarzoso et al. 1998; Fernandez et al. 2000; Fleet et Heard 1993; Otero et al. 2003). *S. cerevisiae* n'est pas une levure significativement productrice d'enzymes pour un impact effectif sur la production de vin. Sa principale contribution est une sécrétion de  $\beta$ -glycosidase (Restuccia et al. 2002; Rodriguez et al. 2004). Les levures non-*Saccharomyces* sont commercialisées, comme par exemple des cellules immobilisées de *Schizosaccharomyces pombe* (Société PROENOL) pour la désacidification du moût par consommation d'acide malique (Silva et al. 2003).

### **Génie génétique de souches œnologiques de *S. cerevisiae***

En raison de la nature exigeante des pratiques œnologiques modernes, on constate un intérêt sans cesse croissant pour des souches spécialisées de *S. cerevisiae* possédant un large éventail de propriétés nouvelles ou optimisées. L'amélioration génétique des souches industrielles par la génétique classique (i.e. mutagenèse ou fusion protoplastique) a été suivie par l'utilisation des technologies d'ADN recombinant au cours des 20 dernières années. La publication du génome complet de *S. cerevisiae* (Goffeau et al. 1996) et un arsenal croissant de technologies ont permis des avancées majeures dans les domaines de la génétique moléculaire, de la physiologie et des biotechnologies. La construction de souches commerciales spécialisées est devenue possible, principalement par l'expression de gènes hétérologues ou par modification de l'équilibre des gènes (surexpression ou suppression). Les objectifs principaux pour l'amélioration des souches sont une amélioration du processus de production et de la qualité, telle que l'amélioration des performances fermentaires, une plus forte tolérance à l'éthanol, une meilleure utilisation du sucre et assimilation de l'azote et des qualités organoleptiques accrues à travers une modification du profil sensoriel. Ces points sont développés par plusieurs auteurs (Blondin et Dequin 1998; Dequin 2001; Dequin et al. 2003;

Pretorius 2000; Pretorius et Bauer 2002; Pretorius et al. 2003) comme figuré dans le tableau 2 (voir en fin d'article)

En général, tout le matériel génétique utilisé pour la construction de micro-organismes destinés à la fermentation alimentaire doit provenir des espèces hôtes (auto-clonage) ou d'organismes classés GRAS (Generally Regarded As Safe – *généralement considérés inoffensifs*) avec un historique d'utilisation saine en agro-alimentaire, tandis que doit être évitée l'utilisation de séquences d'ADN issues d'espèces taxonomiquement proches d'espèces pathogènes. L'expression de gènes hétérologues était utilisée dans la plupart des cas, que ce soient des gènes d'intérêt, isolé par exemple de *Lactobacillus casei* (*LDH*), *Lactobacillus plantarum* (*pdC*), *Bacillus subtilis* (*padC*), *Pediococcus acidilactici* (*pedA*), *Schizosaccharomyces pombe* (*mae1* and *mae2*), de peuplier hybride (*4CL216*), de vigne (*vst1*), d'*Aspergillus* sp. (*egl1*, *abfB*, *xlnA*, *rhaA*) ou de *Fusarium solani* (*peIA*), ou bien d'autres comme *ATF1*, *GPD1* ou *PGU1* issus de *S. cerevisiae* (Tableau 2).

Le plus souvent, nous utilisons des promoteurs et terminateurs forts, dérivant d'enzymes glycolytiques et qui sont exprimés en conditions fermentaires (*ADH1*, *ADH2*, *PGK*) mais aussi du gène actine (*ACT*). Les levures industrielles n'ont habituellement pas de marqueurs autotrophiques (*LEU2*, *URA2*), donc le gène levurien *CYH2* de résistance au cycloheximide ou des marqueurs hétérologues de résistance aux toxines comme *ble* (Tn5) ou *G418* (Tn903) étaient employés, conférant respectivement une résistance à la phléomycine et à la généticine. Développer des souches industrielles avec des vecteurs navettes multi-copies portant les marqueurs de résistance à l'ampicilline d'*Escherichia coli* et aux toxines levuriennes n'est pas recommandé parce que la possibilité de transfert d'ADN à la microflore intestinale est considérée comme improbable mais pas inexistante. Néanmoins, pour les levures œnologiques, cela n'est pas pertinent car les cellules sont éliminées après la fermentation. Les gènes plasmidiques devraient être préférablement intégrés, puisque les éléments insérés doivent être stables dans le nouvel organisme construit. De telles approches ont cependant eu lieu dans certains cas (Lilly et al. 2000; Malherbe et al. 2003; Volschenk et al. 2001). Une disruption génique en une étape avec des marqueurs autotrophiques comme effectuée pour le gène *GPD* (Michnick et al. 1997) résulte en une souche auto-clonée, comme définie précédemment (ILSI 1999), ce qui est une approche considérablement moins problématique en terme d'évaluation d'acceptabilité. La sécrétion de protéines extracellulaires, par exemple la pédiocine encodée par le gène *pedA* ou la glucose oxydase encodée par le gène *gox*, était habituellement soumise au signal sécrétoire du facteur phéromone  $\alpha$  d'accouplement (*MFa1s*) (Malherbe et al. 2003; Schoeman et al. 1999).

Les modifications introduites ne doivent pas changer les caractéristiques essentielles de l'hôte dans le process de fermentation. Pour la plupart des modifications génétiques, on pourrait montrer qu'à part le changement métabolique introduit, aucune différence significative n'a été relevée entre les vins produits avec une souche commerciale et ceux produits avec la souche correspondante modifiée, en termes de caractéristiques œnologiques. A l'inverse, la production accrue de glycérol due à l'expression modulée de *GPD* a conduit à une baisse du rendement en éthanol (1%, v/v) et une accumulation de produits secondaires tels que le pyruvate, l'acétate, l'acétoïne et le 2,3-butanediol (Michnick et al. 1997). La délétion de *ALD6* a entraîné une production réduite d'acide acétique (-40 à 70%) au profit du glycérol, du succinate et du butanediol. (Remize et al. 2000). Il a aussi été montré que l'acidification du moût due à l'expression accrue de *LDH* et la production conséquente d'acide L(+) lactique dépend des antécédents génétiques de *S. cerevisiae* et également du cépage utilisé pour la préparation du moût. (Dequin et al. 1999). Des vins contenant 1.8 à 2.0% d'alcool en moins ont été obtenus grâce à des souches surexprimant la glucose oxydase, car cette enzyme produit du L-glucono- $\delta$ -lactone et de l'acide gluconique à partir du glucose (Malherbe et al. 2003).

Récemment, une souche de levure utilisée pour le saké a été approuvée en tant que levure auto-clonée par le gouvernement japonais et n'a pas besoin d'être considérée comme une levure OGM (Akada 2002). Un remplacement génique en deux étapes a été utilisé pour construire une souche dénuée de séquences marqueurs bactériennes et de résistance aux toxines. Une mutation ponctuelle (Gly1250Ser) dans le gène codant pour la synthétase d'acides gras levuriens *FAS2* confère une résistance à la céruléine et est associée avec une plus forte production d'éthyl caproate, un composé à flaveur de pomme dans le saké japonais. Un nouveau marqueur de contre-sélection a été utilisé, consistant en un promoteur de surexpression galactose-inductible, et la séquence inhibitrice de croissance *GIN11* (*GALp-GIN11*). Les cellules retenant le marqueur ne croissent pas sur le galactose en raison de l'inhibition causée par la surexpression de *GIN11*. Un plasmide contenant le gène *FAS2* muté, un marqueur de résistance aux toxines et le marqueur contre-sélectionnable a été intégré sur le locus de type sauvage *FAS2*, et la perte de séquences plasmidiques issues des intégrants a été conduite par la croissance sur galactose, permise par la perte de *GALp-GIN11*. Les souches contre-sélectionnées contenaient soit la version sauvage, soit la version mutée de l'allèle *FAS2*, mais pas les séquences de plasmides, et la différence qui en résulte entre le mutant décrit et la souche sauvage correspondante est une seule base. (Akada et al. 1999; Aritomi et al. 2004). Le type de contre-sélections évoqué peut aussi s'utiliser pour des introductions multiples de gènes chromosomaux, comme cela est nécessaire pour travailler sur les voies métaboliques. D'autres stratégies, comme par exemple la mutagenèse dirigée du gène *MET10* de la sulfite-réductase, ont permis de développer des levures produisant moins de sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S (Sutherland et al. 2003). L'allèle *LEU4-1* confère une résistance à la 5,5,5-trifluoro-DL-leucine et les souches correspondantes produisent une quantité double d'alcool isoamyle en fermentation à l'échelle du laboratoire, par rapport aux souches mères (Bendoni et al. 1999).

*S. cerevisiae* a été le premier génome eucaryote séquencé, et sera probablement le premier organisme dont le transcriptome, le protéome et le métabolome seront révélés. Du fait que de nombreux aspects physiologiques sont soumis à une régulation multigène complexe, la compréhension du déroulement de l'expression des gènes au cours de la fermentation du vin contribuera à la connaissance de la composition génétique des souches de levure commerciales et influera l'amélioration des souches œnologiques par génie génétique. Ces approches sont aussi les plus adaptées pour démontrer que les changements introduits n'entraînent pas d'effets collatéraux inattendus ou adverses, tels que la production de substances toxiques.

Dans le futur, des souches spécifiques pourront servir de réservoir génétique naturel pour les programmes d'amélioration des levures, puisque la liaison entre les phénotypes observés et l'analyse globale de l'expression apporte des informations utiles pour la construction de souches de levures auto-clonées. Les gènes pourraient être découplés de leurs régulateurs et induits seulement sous des conditions spécifiques de fermentation. De telles souches pourraient par exemple posséder une activité  $\beta$ -glycosidase (Rodriguez et al. 2004) ou être capables de réduire le cuivre du moût par accumulation intracellulaire (Brandolini et al. 2002), ou bien encore être privées d'activité sulfite-réductase (Mendes-Ferreira et al. 2002; Spiropoulos et al. 2000), ou produire de faibles quantités d'acide acétique (Romano et al. 2003a).

## Réglementations concernant les organismes génétiquement modifiés à usage alimentaire

En mai 1997, le règlement européen EC258/97 sur les nouveaux aliments et ingrédients alimentaires (EC 1997) est entré en vigueur et inclut les aliments et ingrédients contenant ou consistant en des organismes génétiquement modifiés (OGM) ou bien produits par des organismes génétiquement modifiés, que ces derniers soient présents ou pas dans l'aliment. La sécurité alimentaire d'un aliment dérivé d'un OGM doit être évaluée par comparaison avec l'aliment le plus proche dont la consommation est reconnue saine. Ceci signifie que si un aliment dérivé d'OGM s'avère équivalent en substance, il est "aussi sûr" que l'aliment conventionnel

correspondant, et doit être considéré de la même façon, tandis que des différences identifiées feront l'objet d'investigations toxicologiques, analytiques et nutritionnelles plus approfondies. Une connaissance détaillée à la fois des caractéristiques d'ensemble et du patrimoine génétique des organismes, de l'origine de(s) gène(s) transféré(s) et de la fonction du (des) gène(s) modifié(s), est essentielle pour cette évaluation. Considérant que le résultat final d'une modification génétique repose sur des processus contrôlés par de nombreux gènes différents, et que la fonction de nombreux gènes reste très mal connue, de puissantes méthodes d'identification et de caractérisation des effets indésirables à l'échelle génomique, protéomique et métabolomique sont actuellement testées pour leur usage de routine. (Corpillo et al. 2004; Kuiper et Kleter 2003; Kuiper et al. 2002).

Le nouveau règlement sur l'alimentation a été récemment amendé par trois décrets concernant les organismes génétiquement modifiés et les aliments qui en dérivent pour la nutrition humaine et animale: EC1829/2003 (EC 2003a), 1830/2003 (EC 2003b) et 65/2004 (EC 2004), et qui définissent les procédures pour l'autorisation, l'étiquetage et la traçabilité. Le règlement 1829/2003 détaille les informations à fournir pour une demande d'autorisation de mise en marché d'un produit. Le demandeur doit prouver que l'aliment en question (1) ne doit pas avoir d'effets indésirables sur la santé humaine et animale, ni sur l'environnement, (2) ne doit pas tromper le consommateur et (3) ne doit pas différer de l'aliment qu'il vise à remplacer au point que sa consommation normale serait nutritionnellement désavantageuse pour le consommateur. De tels produits doivent subir une évaluation sanitaire avant d'être mis en marché, avec un dossier technique contenant des informations détaillées sur les résultats obtenus aux essais de recherche et développement afin d'évaluer l'impact de l'OGM sur la santé humaine et l'environnement. L'Annexe III de la Directive 2001/18/EC (EC 2001) sur l'utilisation délibérée d'OGM pour une mise en marché ou tout autre objectif, abroge ainsi l'ancienne Directive du Conseil 90/220/EC (EC 1990). Comme la mise en marché d'un produit sur le marché implique sa libération dans l'environnement, une évaluation du risque environnemental doit être menée, en accord avec l'Annexe II de la Directive 2001/18/EC (EC 2002). Le produit subit ensuite une procédure d'approbation entre l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA) à Bruxelles, la Commission Européenne et ses états membres. L'étiquetage est obligatoire, même si l'ADN recombinant de la protéine correspondante n'est pas détectable dans le produit final. Les aliments contenant des OGM doivent être étiquetés "modifié génétiquement" ou bien "produit à partir de (nom de l'ingrédient) génétiquement modifié(e)". L'étiquetage n'est pas obligatoire pour les aliments contenant des traces d'OGM, qui sont fortuits et techniquement inévitables, dans une proportion inférieure à 0,9% des ingrédients alimentaires (rapport entre ingrédient recombinant et non-recombinant). Tandis que la réglementation alimentaire s'appuyait sur le principe des preuves, au sens où l'étiquetage obligatoire pour les produits alimentaires contenant plus de 1% d'OGM, le règlement EC1829/2003 s'appuie lui sur le principe d'application, imposant une déclaration d'utilisation d'OGM au cours de la production de l'aliment, mais cette déclaration ne se base pas sur la détection d'ADN ou de protéine recombinante dans le produit final. Selon les règlements N° 1830/2003 (EC 2003b) et 65/2004 (EC 2004), les OGM et produits dérivés d'OGM doivent être traçables à chaque étape de leur mise en marché, à travers la chaîne de production et de distribution, afin de faciliter le retrait des produits si nécessaire et pour faciliter la mise en oeuvre des mesures de gestion des risques.

La réglementation américaine n'impose pas d'étiquetage ni de ségrégation des produits génétiquement modifiés. Aucun étiquetage spécifique n'est requis pour les aliments "bioengineered" (terme utilisé par la Food and Drug Administration pour les aliments dérivant de technologies de modification génétique), car ils "ne sont pas considérés comme significativement ou uniformément différents des autres aliments, ni comme présentant des problèmes de sécurité différents ou supérieurs aux aliments produits par amélioration génétique traditionnelle des plantes cultivées". (Registre Fédéral du 29 mai 1992, 57 FR 22984). L'évaluation et l'approbation avant mise en marché est exigée seulement lorsque les gènes

introduits codent pour un produit n'ayant encore jamais été un composant de tout autre aliment, tel qu'un nouvel agent édulcorant par exemple. Les exigences d'étiquetage qui s'appliquent aux aliments en général s'appliquent donc aussi aux aliments issus de biotechnologies. Une étiquette doit « expliciter tous les éléments matériels » d'un aliment, par exemple si un aliment génétiquement modifié diffère de son homologue traditionnel, possède des propriétés nutritionnelles significativement différentes, ou si un allergène potentiel est présent.

Les vins produits par des levures OGM devraient être considérés, en général, comme substantiellement équivalents aux vins "traditionnels". Des composés comme le glycérol, l'acétate d'éthyle, l'acide malique ou lactique sont des substances naturelles du vin et leur teneur serait simplement ajustée ou optimisée pour améliorer ses qualités organoleptiques. La concentration visée est très susceptible d'appartenir à la fourchette de concentration trouvable certains styles de vins. En outre, un process technologique facilité et plus économique tel que l'emploi de levures exprimant des enzymes pectolytiques n'aura pas d'impact sur la composition ou les propriétés du produit final, puisque l'ajout d'enzymes commerciales est une pratique œnologique habituelle. Quoi qu'il en soit, une étude soigneuse et au cas par cas est indispensable.

### **Evaluation des risques environnementaux associés à l'emploi de levures génétiquement modifiées.**

L'usage futur de levures génétiquement modifiées dépendra de la capacité à évaluer les risques potentiels ou théoriques liés à leur introduction dans des écosystèmes naturels.

Le suivi de la dissémination de souches industrielles de levure dans les vignobles environnant les caves ayant utilisé ces souches aux cours des 5 à 10 années précédentes a servi de modèle expérimental pour estimer la destinée des levures génétiquement modifiées dans des environnements naturels. Ces études de grande échelle menées sur des périodes de 3 ans dans des vignobles situés au nord du Portugal et dans le Sud de la France ont révélé que la dissémination de levures commerciales dans le vignoble est limitée à de courtes distances et périodes de temps, et est largement favorisée par la présence d'écoulements d'eau. Parmi les échantillons prélevés à des distances de la cave supérieures à 100 m, moins de 2% de la microflore fermentaire avait un profil génétique identique à celui des levures commerciales. Dans les échantillons prélevés très près de la cave et des écoulements d'eau, la proportion de levures commerciales a augmenté de 10 à 43%. La vaste majorité (94%) des levures commerciales ont été retrouvées à une distance de la cave comprise entre 10 et 200 m. Les souches commerciales, malgré leur utilisation intensive annuelle, ne semblent pas se développer franchement dans les vignobles, et ne prédominent pas sur la flore indigène, leur présence étant caractérisée par des fluctuations naturelles d'apparition/disparition périodique comme les souches autochtones (Valero, communication personnelle).

Le comportement des levures OGM au sein des populations microbiennes d'un chai confiné et d'un vignoble sous serre a aussi été évalué. A partir d'une souche commerciale X, différentes souches modifiées ont été construites, possédant des gènes hétérologues codant pour l' $\alpha$ -amylase (*LKA1*), l'endo- $\beta$ -1,4-glucanase (*end1*), la xylanase (*XYN4*) ou la pectate lyase (*peh1*) sous le contrôle de promoteurs et de terminateurs forts et en utilisant les marqueurs de résistance *kanMX* ou *SMR-410*. Après caractérisation initiale de la flore levurienne autochtone d'un vignoble sous serre nouvellement établi, les vignes de 4 blocs (chacun constitué de 20 pieds) ont été aspergées de suspensions de levures contenant  $2.5 \times 10^6$  CFU/mL selon un plan défini au préalable. Malgré la concentration cellulaire initiale élevée, peu de souches de *S. cerevisiae* ont été isolées pendant le contrôle hebdomadaire de la population levurienne sur les raisins, les feuilles, les tiges et le sol. Les résultats ont montré (1) qu'aucune différence significative n'est apparue concernant l'occurrence de souches modifiées par rapport aux souches commerciales "parentales", même pour les souches OGM supposées avoir un avantage sélectif sur les souches parentales, ce qui montre que les modifications mentionnées

n'ont conféré aucun avantage d'implantation environnementale; (2) que les populations levuriennes d'ensemble sur les blocs vaporisés étaient très semblables aux vignes témoins non traitées, conduisant à la conclusion que ni les souches commerciales, ni les souches OGM n'affectent l'équilibre écologique de la flore du vignoble dans un système confiné; (3) qu'aucune différence significative entre les souches n'a été décelée au sujet de leurs performances fermentaires au cours des micro-vinifications spontanées (Bauer et al. 2003).

Le transfert horizontal d'ADN peut survenir entre espèces de levures appartenant au complexe d'espèces sensu stricto, donnant naissance à des hybrides viables avec les deux équipements chromosomiques parentaux (Marinoni et al. 1999). La transformation naturelle des levures de boulangerie avec de l'ADN de plasmides a été observée en conditions naturelles de carences nutritives, lorsque les cellules en arrêt de croissance métabolisent les sucres sans ajout de nutriments. Ceci a été présenté comme un mécanisme d'évolution qui contribue à la diversité génétique, ce scénario étant plausible dans les milieux naturels. A présent, des études sont en cours pour estimer la vraisemblance de transferts de gènes à la fois horizontaux et verticaux parmi les levures commerciales œnologiques modifiées, en conditions de production de vin (Bauer et al. 2003).

Un autre problème, tout aussi important pour estimer la sécurité des levures OGM en œnologie, est la mesure de la libération potentielle et de la stabilité de l'ADN recombinant et de(s) protéine(s) correspondante(s) pendant la fermentation et l'élevage sur lies. L'autolyse des cellules de levure se caractérise par une perte de perméabilité membranaire, une hydrolyse des macromolécules cellulaires comme l'ADN et les protéines, suivie par une fuite des produits de cette hydrolyse dans le milieu extracellulaire. Ce processus survient après que les cellules aient achevé leur cycle de vie. Des expérimentations sur l'autolyse ont eu lieu en milieux de cultures de laboratoire, et ont montré qu'une incubation à 40°C pendant 10 à 14 jours à des pH compris entre 4 et 7 conduit à une dégradation de 55% de l'ADN total, associé avec une fuite principalement de désoxyribonucléotides et dans une moindre mesure de polynucléotides dans le milieu extracellulaire (Zhao and Fleet 2003).

### **Méthodes de détection de l'ADN ou de protéines génétiquement modifiés.**

Jusqu'à présent, aucune donnée n'est disponible sur la présence et la concentration de cellules, d'ADN et de protéines recombinantes dans les vins « expérimentaux » produits à partir de levures génétiquement modifiées. On estime que le nombre de cellules recombinantes par bouteilles est assez petit (1 à 10 cellules), du fait qu'elles sont éliminées par filtration ou traitement thermique. Le traçage de l'ADN recombinant au cours de la chaîne de production et dans le vin fini requiert des techniques extrêmement sensibles. En considérant le récent règlement européen No. 1829/2003 et 1830/2003, il est clair que des méthodes analytiques fiables et précises sont nécessaires pour tout aliment contenant des OGM ou produit à partir d'OGM. Au cours des années passées, des méthodes à la fois pour les protéines et pour l'ADN ont été développées et mises en oeuvre surtout pour la détection de soja et de maïs transgénique et leurs dérivés.

Pour la détection de protéines, des anticorps spécifiques monoclonaux et polyclonaux ont été surtout développés pour la détection immunochimique, l'analyse Western blot et les tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays). Les tests immunochromatographiques, aussi appelés tests sur bandelettes à flux latéral, Reveal CP4 et Reveal Cry9C détectent du 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), dérivé de la souche CP4 d'*Agrobacterium* qui confère une résistance au glyphosate d'herbicides dans le maïs et le soja, et des protéines Cry de *Bacillus thuringiensis* Cry qui assurent une protection des plants, graines et grains de maïs. Les deux kits, commercialisés par Neogen, détectent la présence d'OGM en 5 à 20 min, à coût modique, avec une bonne sensibilité (fraction massique d'OGM <0,125%) ; les deux sont des tests opérationnels et fiables pour contrôler la distribution de produits dérivés de



biotechnologies (Ahmed 2002; Auer 2003; Brett et al. 1999; Rogan et al. 1999; Stave 1999; van Duijn et al. 1999, 2002).

Les méthodes basées sur la PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) sont aussi appliquées pour la détection d'OGM par amplification d'éléments génétiques présents dans la plupart des OGM actuellement disponibles en Europe. La limite de détection se situe entre 20 pg et 10 ng d'ADN cible, ce qui correspond à 0,0001 à 1% de la fraction massique d'OGM (Ahmed 2002; Auer 2003; ILSI 1998, 2001; Meyer 1999; van Duijn et al. 1999, 2002). La technique de QC-PCR (Quantitative-competitive PCR) repose sur l'amplification parallèle du transgène et d'un gène endogène de référence qui contrôle à la fois le manque d'inhibition et d'amplificabilité de l'ADN cible de l'échantillon. La quantification est possible en comparant les concentrations du produit de la PCR avec des proportions variables du rapport ADN cible/ADN standard. Cette approche a été testée avec succès lors d'un travail collaboratif impliquant 12 laboratoires européens de contrôle et a permis la détection de 0,1% d'ADN OGM. (Hübner et al. 1999; Lüthy 1999). Les technologies de PCR en temps réel sont hautement sensibles et conviennent pour une quantification précise d'ADN à bas seuils, en mesurant la production d'amplicons d'ADN au cours de la phase log-linéaire de l'amplification PCR (Ronning et al. 2003; Vaitilingom et al. 1999). La quantification de produits de PCR par test ELISA (ELISA-PCR) a été récemment décrite comme une alternative très sensible et économique à la PCR en temps réel (Liu et al. 2004; Petit et al. 2003).

Alors que les matières premières alimentaires peuvent facilement être identifiées comme des OGM, la détection est plus ardue quand elles sont transformées: les aliments contiennent alors en effet de l'ADN dégradé et des substances qui interfèrent même avec la réaction de PCR. L'évaluation inter-laboratoires des procédures a été essentielle et a donné naissance au développement de standards internationaux (DIN, ISO, EN) concernant l'échantillonnage (DIN 2003), l'extraction d'ADN (DIN 2002b), la détection d'OGM basée sur l'ADN (DIN 2002a) et sur les protéines (DIN 2002c).

L'évolution technologique des OGM, les modifications des réglementations gouvernementales et l'adoption de directives d'évaluation des risques vont continuer à orienter le développement de techniques d'analyse qui seront appliquées dans le futur à des organismes génétiquement modifiés. De nouvelles méthodes de profil basées sur la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique ont été proposées comme les approchées non ciblées les plus adéquates pour détecter les effets secondaires (Kuiper et Kleter 2003), et l'analyse du protéome a démontré une « équivalence substantielle » entre une tomate OGM résistante à un virus et les hybrides non transgéniques (Corpillo et al. 2004).

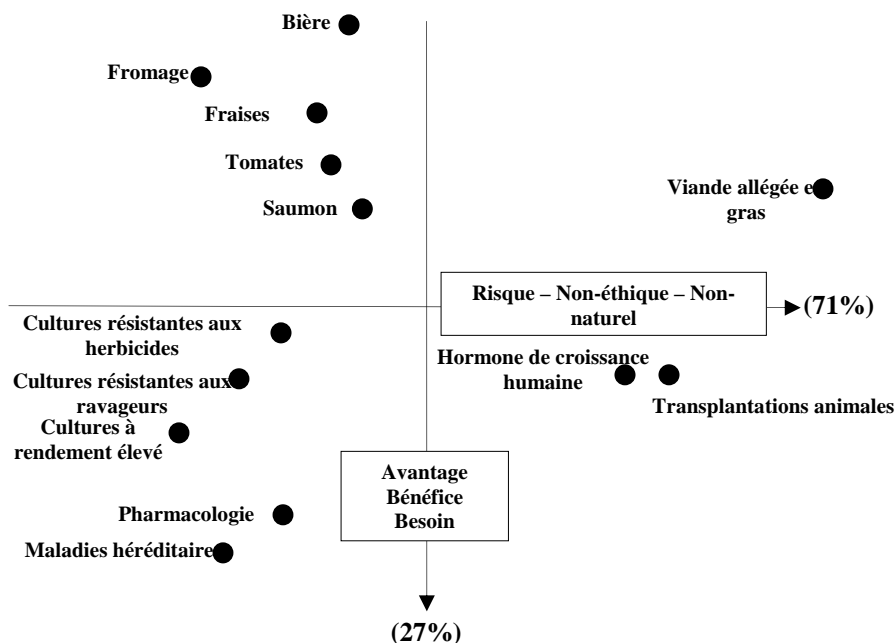
### **Perception et comportements du consommateur**

En 1988, Gist-Brocades a obtenu une souche de boulangerie dont les gènes codant pour la perméase au lactose et la maltase étaient substitués par un ensemble de gènes plus efficaces issus d'une autre souche. Du fait qu'aucun ADN non-*Saccharomyces* n'était présent, les autorités britanniques ont accordé leur consentement en 1989. Quelques années plus tard, une souche de brasserie recombinante, obtenue en 1993 par Brewing Research International, a été approuvée de la même façon. Cette souche de *S. cerevisiae* contenait un gène d'amylase issu de *Saccharomyces diastaticus* associé avec un gène de résistance au cuivre. En raison de la réticence des industries à affronter une réaction négative des consommateurs, aucune de ces souches n'a connu de production commerciale (Moseley 1999). Pour les mêmes raisons, aucune demande pour l'usage industriel de souches oenologiques génétiquement modifiées n'a été formulée ces dernières années, bien que de nombreuses souches aient été développées (Tableau 2) suite à la demande croissante de diversité et d'innovation au sein de l'industrie des boissons fermentées.

Une des plus vastes enquêtes d'opinion publique (en termes de nombre de personnes interrogées) conduite en Europe est l'enquête Eurobaromètre, qui a suivi les changements

d'attitude envers la biotechnologie dans différents Etats-membres européens depuis le début des années 90. La dernière enquête menée en 2001 (Anonymous 2001) auprès de 16000 sondés européens a montré une vision positive généralisée de la science et de la technologie, mais les avancées scientifiques ne sont pas considérées une panacée universelle pour tous les problèmes. Presque tous (95%) les sondés ont indiqué que le manque de choix laissé au consommateur au regard des aliments génétiquement modifiés est la principale raison de leur attitude négative et 60% ont exprimé le fait que les OGM sont potentiellement néfastes pour l'environnement. Considérant le fait que de nombreux concepts scientifiques sont méconnus du public, la perception du risque par le consommateur et son comportement diffèrent significativement de ceux défendus par les experts du risque scientifique qui rendent complexes les discussions sur les technologies transgéniques, augmentant du même coup la méfiance du public et la négativité sur les biotechnologies en général et les OGM en particulier. Les craintes des personnes critiquant les technologies de modification génétique incluent les dégradations de la qualité nutritionnelle des aliments, la toxicité potentielle, la possible résistance aux antibiotiques, l'allergénicité et la carcinogénicité potentielle issue de la consommation d'OGM, la pollution environnementale, les transferts de gènes indésirables, la création éventuelle de nouveaux virus et toxines, les considérations religieuses, culturelles et éthiques, de même que la peur de l'inconnu (Uzogara 2000).

Comme indiqué dans la Figure 1, les inquiétudes des consommateurs au sujet des modifications génétiques dépendaient de nombreux paramètres, c'est à dire que des modifications mineures sur les aliments ont été associées avec un faible degré d'inquiétude, tandis que l'attente exprimée pour de tels produits et leurs avantages a aussi été faiblement notée. Concernant l'application des biotechnologies à l'alimentation, les bénéfices ont été perçus comme marginaux, abstraits ou seulement intéressants pour le producteur. Ceci a été confirmé spécialement pour la bière génétiquement modifiée, suivie par les tomates, les fraises et le saumon. Pour le vin, en tant que boisson traditionnelle d'agrément, on peut estimer que sa production par technologie génétique obtiendrait une opinion des consommateurs comparable à celle de la bière. Tout modification impliquant des humains ou des animaux a été associée à des niveaux élevés de préoccupation éthique, tandis que les applications médicales telle que la pharmacologie et les soins de maladies héréditaires ont été perçues comme les plus importantes et nécessaires. (Frewer 2003; Frewer et al. 1997).



*Fig. 1 Perceptions publiques du risque ou du bénéfice des aliments génétiquement modifiés (adapté de Frewer 2003)*

En conclusion, la récente disponibilité de réglementations légales claires définissant des exigences pour la construction et l'évaluation de sécurité des OGM, de même que l'étiquetage de produits dérivés peut être considéré comme une étape cruciale pour aider le consommateur à faire des choix éclairés, et le futur proche dira si cette stratégie était une étape utile à franchir vers une attitude moins négative du consommateur. La construction de souches de levures oenologiques génétiquement modifiées doit se faire par des stratégies d'auto-clonage. Dans ce contexte, des souches spécifiques issues de l'environnement viticole aux propriétés oenologiques favorables peuvent servir dans le futur de réservoir génétique naturel pour la construction de telles souches, conférant ainsi une nouvelle dimension à l'exploration de la diversité des souches de levure.

### **Remerciements**

Cette étude a été soutenue par les projets ENOSAFE (No. 762, Programa AGRO, medida 8), l'Instituto Nacional de Investigação Agrária et LeVini (POCTI/AGR/56102/2004) Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal.

**Table de références disponibles sur demande (fra@infowine.com)**

Amélioration	Métabolisme / protéine(s)	Gène(s)	Origine	Construction					Référence	
				P	T	Pla	M	Chr		
Qualité sensorielle	Endoglucanase	<i>egl1</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	ACT	-	2μ	CYH2	-	(Pérez-González et al. 1993)	
	Enzymes libératrices	Arabinofuranosidase	<i>abfB</i>	<i>Aspergillus niger</i>	ACT	-	2μ	CYH2	-	(Sanchez-Torres et al. 1996)
Complexité et intensité de l'arôme global	d'arômes	Endoxylanase	<i>xlnA</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	ACT	-	2μ	CYH2	-	(Ganga et al. 1999)
		Rhamnosidase	<i>rhaA</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>	GPD	PGK		TRP	-	(Manzanares et al. 2003)
Ajustement de l'acidité	Malate perméase	<i>mae1</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	PGK1	PGK1	2μ	SMR1-140	+	(Volschenk et al. 2001)	
	Enzyme malolactique	<i>mae2</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	PGK1	PGK1	2μ	URA3		(Volschenk et al. 1997)	
Ajustement de l'acidité	Acetaldehyde deshydrogénase	<i>ALD6</i> (suppression)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				<i>kanMX4</i>		(Remize et al. 2000)	
	Lactate deshydrogénase	<i>LDH</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	ADH1	ADH1	2μ	G418 (Tn903)	-	(Dequin et al. 1999)	
Production de	Glycerol-3-	<i>GPD1</i>	<i>Saccharomyces</i>	ADH1	ADH1	2μ	<i>ble</i>	-	(Michnick et al.	

	glycérol	phosphate		<i>cerevisiae</i>				(Tn5)	1997,	
		deshydrogénase							Remize et al. 1999)	
Aspects santé et salubrité	<b>Formation de phénols volatils</b>	Acide phénolique	pdc	<i>Lactobacillus</i>						
		décarboxylase	padc	<i>plantarum</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2μ	URA3	(Smit et al. 2003)	
				<i>Bacillus subtilis</i>						
	<b>Production d'ester d'acétate</b>	Alcool	ATF1	<i>Saccharomyces</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2μ	LEU2	+	(Lilly et al. 2000)
		acétyltransférase		<i>cerevisiae</i>						
	<b>Production d'H2S</b>	Sulfite reductase	MET10	<i>Saccharomyces</i>						(Sutherland et al. 2003)
				<i>cerevisiae</i>						
<b>Production de resvératrol</b>	β-glucosidase	bg1N	<i>Candida molischiana</i>	<i>ACT</i>	<i>ACT</i>	2μ	CYH2	-	(Gonzalez-Candelas et al. 2000)	
	Resvératrol synthase	4CL216	<i>Hybrid poplar</i>	<i>ADH2</i>	<i>ADH2</i>	2μ	URA3	-	(Becker et al. 2003)	
	Coenzyme-A ligase	vst1	<i>Grapevine</i>	<i>ENO2</i>	<i>ENO2</i>	2μ	LEU2	-		
	<b>Elimination de l'éthyl carbamate</b>	Blocage de la secretion d'urée	CAR1 (suppression)	<i>Saccharomyces</i>					(Pretorius et al. 2003)	
			<i>cerevisiae</i>							
<b>Contrôle des micro-Production</b>	Pediocin	pedA	<i>Pediococcus</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	2μ	URA3	-	(Schoeman et al.	

<b>organismes</b>	<b>d'enzymes</b>			<i>acidilactici</i>					1999)
<b>contaminants</b>	<b>antimicrobiennes</b>								
		Chitinase	CTS1-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2 $\mu$	-	(Carstens et al. 2003)
		Leucocine	lcaB	<i>Leuconostoc carnosum</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	2 $\mu$	URA3	- (du Toit and Pretorius 2000)
		Glucose oxydase	gox	<i>Aspergillus niger</i>	<i>PGH1</i>	<i>PGK1</i>		URA3	+ (Malherbe et al. 2003)
<b>Fermentation performance</b>	<b>Tolérance au stress</b>	<b>Tréhalose</b>	TPS1,TPS2, ATH1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>					(Pretorius et al. 2003)
		<b>Glycogène</b>	GSY1, GSY2						
Achieving a complete conversion of sugar to alcohol and CO <sub>2</sub> without the development of off-flavors		<b>Stérols</b>	SUT1, SUT2						
	<b>Incorporation et assimilation du sucre</b>	<b>Transporteurs d'hexoses</b>	HXT1-18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>					(Pretorius et al. 2003)
		<b>Hexose kinases</b>	HXK1, HXK2						

	<b>Assimilation de l'azote</b>	<b>Proline oxydase</b>	PUT1	Saccharomyces cerevisiae					(Pretorius et al. 2003)
		<b>Pyrroline-5-carboxylate deshydrogénase</b>	PUT2						
		<b>Répresseurs PUT1 et PUT2</b>	ure2	Saccharomyces cerevisiae					(Salmon and Barre 1998)
	<b>Tolérance à l'éthanol</b>	<b>Accumulation de stérols</b>	SUT1, SUT2,	Saccharomyces cerevisiae					(Pretorius et al. 2003)
		<b>Activité des ATPase membranaires</b>	PMA1, PMA2						
	<b>Résistance agrochimique</b>	<b>Chélateur du cuivre</b>	CUP1	Saccharomyces cerevisiae					(Pretorius et al. 2003)
<b>Processing efficiency</b>	<b>Elimination des polysaccharides</b>	<b>Endopolygalacturonase</b>	PGU1	Saccharomyces cerevisiae	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	<i>LEU2</i>	-	(Vilanova et al. 2000)
Fining and clarification		<b>Pectate Lyase</b>	pelA	Fusarium solani	<i>ACT</i>	-	<i>CYH</i>	2 $\mu$	- (Gonzalez-Candelas et al. 1995)

<b>Durée de</b>	<b>Flocculine</b>	FLO1,	Saccharomyces		(Pretorius et al.
<b>floculation</b>		FLO11	cerevisiae	<i>HSP30</i>	2003)

Table 2 Objectifs pour l'amélioration de *S. cerevisiae* (adapté de Pretorius 2000 et Pretorius et al. 2003), avec indication si possible d'exemples de stratégies employées pour les modifications génétiques ;