

HYBRIDATION ET OGM :

LE POINT SUR LES STRATÉGIES D'AMÉLIORATION DES LEVURES

B. BLONDIN

Prof. Montpellier SupAgro
UMR Sciences Pour l'Oenologie INRA-SupAgro-UM1
Equipe Microbiologie
2 place Viala, 34060 Montpellier, France

Introduction

Le souci d'une meilleure maîtrise des procédés ainsi que des caractéristiques des vins, associé à des connaissances plus fines de leurs déterminants, biologiques, biochimiques, se sont traduit par des exigences plus fortes et plus précises vis à vis des levures de fermentation. Jusqu'à présent les réponses à ces exigences ont été principalement apportées par la sélection de nouvelles souches à partir d'isolats de flores fermentation. Ceci a conduit à une large offre de souches avec des propriétés spécifiques aujourd'hui disponibles sur le marché. Toutefois, les souches issues de la sélection ne répondent pas toujours aux demandes des œnologues, celles-ci toujours plus précises, et qui correspondent souvent à des combinaisons de propriétés rares ou extrêmes. Des réponses à ces demandes pourront être apportées par des travaux de génétique classique (l'hybridation) qui visent à introduire dans des levures œnologiques des caractères spécifiques pour disposer de souches mieux adaptées aux conditions de vinification. D'un autre côté, il existe un fort potentiel d'amélioration des souches par les voies de l'ingénierie génétique. Ces approches sont plus précises que les techniques d'hybridation et s'affranchissent des barrières d'espèces. Elles permettent d'introduire des aptitudes totalement nouvelles, absentes chez l'espèce *S. cerevisiae*, dans les souches œnologiques. Ces techniques sont donc à même d'apporter des solutions nouvelles, inaccessibles par l'hybridation, qui peuvent être très utiles pour aider la filière à faire face aux nouveaux défis qu'elle devra affronter.

1. L'hybridation : le retour de la génétique classique

L'amélioration des souches de levures industrielles par hybridation n'est pas nouvelle. Divers travaux de génétiques des années 70 – 80 ont montré qu'il était possible de d'améliorer certains caractères par des stratégies basées sur le croisement de souches (Snow, 1984). Toutefois, l'amélioration des souches par ces méthodes s'est rapidement heurtée à différentes difficultés : la faible capacité de sporulation des souches œnologiques, la prépondérance de l'homothallisme qui rend délicats les croisements, le caractère polygénique des traits technologiques qui rend complexe leur amélioration. D'un autre côté, les perspectives offertes par les techniques de génie génétique ont relégué un temps (1990 - 2000) les méthodes de génétique classique au second plan de la scène. Différents facteurs ont récemment conduit à un regain d'intérêt pour les approches génétiques. Le premier est lié aux questions d'acceptabilité des OGM qui ont fait reculer les perspectives d'applications immédiates de ces techniques dans les filières agro-alimentaires. D'un autre côté, différentes avancées ont redonné un nouvel élan aux approches de génétique conventionnelle. Les stratégies génétiques se sont affinées et de nouveaux outils, issus des techniques d'analyses des génomes (en particulier les puces à ADN) ont apporté des moyens puissants pour suivre les effets des interventions (identifier les régions de génomes transmises). Un autre élément important a été l'introduction, chez la levure, des concepts de la génétique quantitative, qui ont apporté les outils intellectuels nécessaires pour appréhender les caractères complexes que sont les propriétés technologiques.

D'abord expérimentées sur des objets d'intérêt théorique (Steinmetz et al, 2002), ces approches ont été par la suite appliquées à des levures œnologiques. Plusieurs travaux récents ont montré que des stratégies d'amélioration par croisement s'appuyant sur ces outils permettaient d'obtenir des souches améliorées pour des traits technologiques (Marullo et al, 2006, Marullo et al, 2007). Les stratégies mises en œuvre reposent sur l'identification de régions du génome ou QTL (pour Quantitative Trait Locus) qui affectent le caractère analysé que l'on veut transférer. Ceci

est généralement obtenu par des « rétro-croisements » qui permettent de réduire la part de génome « étranger » portant le (ou les) allèles (gènes) favorable(s) dans la souche d'intérêt. Cela peut directement conduire à des souches avec des propriétés modifiées mais, surtout, grâce aux outils de génomique, les puces à ADN, il est alors possible d'identifier les régions de génomes introduites et potentiellement, les gènes impliqués dans le caractère transféré. Cette information peut être ensuite utilisée pour suivre l'allèle (le gène) d'intérêt, on dispose de marqueurs, et les travaux d'hybridation deviennent alors dirigés et plus aisés. Ces approches devraient donc permettre, à la fois, une meilleure valorisation de la biodiversité naturelle, mais aussi, apporter des connaissances nouvelles sur les déterminants génétiques des propriétés technologiques des souches.

2. L'ingénierie génétique : un potentiel d'amélioration des souches important

On rassemble sous la terminologie d'ingénierie génétique toutes les opérations de transfert de gènes qui nécessitent la manipulation d'ADN *in vitro*. Ces techniques permettent, d'une part de transférer des gènes nouveaux isolément, quelle que soit leur origine, mais aussi d'intervenir de manière très précises sur un génome existant, pour en modifier un gène ou son fonctionnement. Elles permettent donc d'aller bien au delà de ce qu'offre la biodiversité naturelle et le spectre des applications est beaucoup plus large que celui de l'hybridation. De nombreux travaux de recherche ont été conduits dans cette perspective au cours des 15 dernières années. La plupart d'entre eux en sont restés au stade de la démonstration de faisabilité et de modèle de laboratoire, toutefois, dans quelques cas ces améliorations ont conduit à des souches OGM sur le marché, exclusivement nord-américain.

Les applications peuvent se décliner en trois catégories : - l'amélioration des processus de vinification, - l'amélioration de la qualité organoleptique, - l'amélioration de la qualité hygiénique (Dequin, 2004). Différents travaux relèvent d'applications du premier groupe, et parmi eux, une des premières cibles de l'ingénierie des levures, l'obtention d'une souche de levure réalisant la fermentation malolactique. Une souche finale avec cette aptitude a été construite et commercialisée au USA. Différentes applications basées sur l'introduction d'activités enzymatiques nouvelles, pectinases, cellulases, destinées à faciliter l'extraction ou la filtration ont été aussi proposées. La possibilité d'améliorer la cinétique fermentaire par ingénierie du transport des sucres a été aussi explorée (Guillaume et al, 2007). La modification des caractéristiques sensorielles des vins a fait l'objet de nombreux travaux. Parmi ceux-ci on peut mentionner, le contrôle de l'acidité des vins par production d'acide lactique, l'augmentation de la formation des esters par action sur des enzymes impliquées dans la biosynthèse ainsi que la production d'enzymes hydrolytiques, glucosidases, visant à libérer des précurseurs variétaux. Des souches avec un rendement en alcool abaissé ont été aussi obtenues par sur-production de glycérol. Du point de vue de l'amélioration de la qualité hygiénique des vins, les travaux les plus aboutis concernent la réduction de l'urée, et donc de carbamate d'éthyle potentiel, par modification de la voie endogène de dégradation. Une souche œnologique avec cette aptitude a été autorisée sur le marché nord-américain.

La gamme des applications de l'ingénierie génétique est donc vaste. Elles traitent le plus souvent de questions qui ne sont pas accessibles par la génétique classique. Toutefois, dans certains cas les deux options peuvent être envisagées (cas de transfert de gènes au sein de l'espèce *S. cerevisiae*) et si l'une a l'avantage d'une meilleure image, l'autre apporte une précision dans les interventions bien supérieure. Les techniques d'ingénierie seront vraisemblablement indispensables pour répondre à

certaines enjeux. Les souches obtenues par ces techniques relèvent des OGM, aussi il sera indispensable qu'elles soient précisément validées du point de vue de leurs propriétés. L'ensemble des outils disponibles chez les levures et, en particulier, les nouveaux outils d'analyse globale, génomique, protéomique, métabolomique, qui permettent des analyses extensives et précises devraient être très utiles pour ces évaluations.

Références

Dequin S. (2001). The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56:577-88.

Guillaume, C. Sablayrolles, J.M. and B. Blondin. (2007). Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Appl. Env. microbiol.*

73 :2432-2439.

Marullo, P. Bely, M. Masneuf-Pomarède, I. Pons, M, Aigle, M. Dubourdieu, D. (2006) breeding strategies for combining fermentative quality and reducing off-flavour production in a wine yeast model. *FEMS yeast Research.* 6:268-279.

Marullo, P. Yvert, G. Bely, M. Aigle, M. Dubourdieu, D. (2007). Efficient use of DNA molecular markers to construct industrial yeast strains. *FEMS yeast Research.* 7:1295-1306.

Snow, R. (1984) Genetic improvement of wine yeast. In *Yeast Genetics*, Spencer, J.F.T., Spencer, D.M., Smith, A.R.W., Edts. P. 440-459.

Steinmetz et al (2002). Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature* 416:326-330.