

**Résumé de l'évaluation des risques effectuée conformément au *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)* de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement, 1999*
EAU-224 : souche ML01 de *Saccharomyces cerevisiae***

Le présent document vise à expliquer la décision réglementaire prise en vertu de la partie 6 de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement, 1999* (LCPE 1999) concernant la fabrication de la souche ML01 de *Saccharomyces cerevisiae* par Van Vuuren and Associates, en vue de son introduction sur le territoire canadien.

Les renseignements pertinents concernant la souche ML01 de *Saccharomyces cerevisiae* ont été fournis conformément au paragraphe 3(1) du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)* de la LCPE 1999.

Le Bureau de l'évaluation et du contrôle des substances nouvelles de Santé Canada a évalué l'information soumise par Van Vuuren and Associates ainsi que d'autres données scientifiques disponibles en vue de déterminer si la souche ML01 de *S. cerevisiae* est *toxique*¹ ou est capable de devenir *toxique*, selon la définition donnée à l'article 64 de la LCPE 1999.

Décision réglementaire :

En tenant compte des questions de danger et d'exposition et d'après l'évaluation des risques, Santé Canada a conclu que la souche ML01 de *S. cerevisiae* n'est pas considérée comme *toxique* pour l'environnement ou la santé humaine au Canada au sens de l'article 64 de la LCPE 1999. Conséquemment, la fabrication de la souche ML01 de *S. cerevisiae* en vue de son introduction sur le territoire canadien est permise après le 14 février 2006.

Cette évaluation ne comprend pas une évaluation des risques pour la santé humaine dans un environnement professionnel ni de l'exposition et des risques possibles pour la santé humaine associés à l'utilisation de l'organisme dans un produit assujéti à la *Loi sur les aliments et drogues* ou en tant qu'élément d'un produit assujéti.

Annexe du RRSN(O) : 1 (fabrication d'un micro-organisme destiné à être introduits sur le territoire canadien)
Identification de l'organisme : Souche ML01 de *Saccharomyces cerevisiae*
Déclarant : Van Vuuren and Associates, 20 Kelvin Grove Way
(PO Box 715), Lions Bay (C.-B.) V0N 2E0

¹ Conformément à l'article 64 de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement, 1999* (LCPE 1999), est toxique toute substance qui pénètre ou peut pénétrer dans l'environnement en une quantité ou concentration ou dans des conditions de nature à : a) avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sur la diversité biologique; b) mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie; c) constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaines.

Date de la décision : 14 février 2006
Utilisation proposée : Levure sèche active servant à la conversion du L-malate en L-lactate durant la production commerciale de boissons alcoolisées

Historique de la souche /modification génétique :

La souche ML01 de *Saccharomyces cerevisiae* a été obtenue à partir de la souche d'origine naturelle S92 de *S. cerevisiae*, qui a été isolée dans la région de Champagne, en France (collection de levures LeSaffre) et est couramment utilisée dans l'industrie vinicole. La création de la souche ML01 de *S. cerevisiae* vise à permettre la conversion du L-malate en L-lactate durant la fermentation de l'alcool.

L'identification de la souche S92 a été faite à partir de ses caractéristiques morphologiques, de tests d'utilisation des glucides (API20C AUX), de la quantification des protéines par la technique iTRAQ et d'une analyse du transcriptome au moyen du GeneChip^{MD} Yeast Genome S98 Array d'Affymetrix.

La souche ML01 de *S. cerevisiae* a été obtenu par transformation à l'aide de polyéthylèneglycol (PEG) afin d'introduire, par recombinaison homologue, une cassette d'expression dans la souche S92 de *Saccharomyces cerevisiae*. La séquence introduite comprend les gènes *mleA* et *mae1*, sous le contrôle des séquences promoteur et terminateur du gène PGK1 de *S. cerevisiae*, nécessaires à l'expression de cette cassette dans la levure.

Le gène *mleA* a été isolé à partir de la souche Lo 8413 de la bactérie du vin *Oenococcus oeni* (GenBank X82326); codant pour l'enzyme malolactique qui convertit le L-malate en L-lactate. Le gène *mae1* a été isolé à partir de la souche NCYC 1913 de *Schizosaccharomyces pombe* (GenBank U21002); codant pour la protéine malate perméase, qui permet au malate de pénétrer dans la levure. La souche AB972 de *S. cerevisiae* (ATCC 204511) est la source des séquences promoteur et terminateur du gène PGK1 utilisé dans la construction génique. La souche GC210 de *S. cerevisiae* est la source des régions flanquantes du gène URA 3 (SGD S000747) utilisées pour l'intégration de la construction génique par recombinaison homologue.

La souche hôte, souche S92 de *S. cerevisiae*, a été transformée avec un mélange de la cassette d'intégration et du plasmide pUT322 qui contient un marqueur de résistance à la phléomycine. Les transformants ont été isolés en fonction de leur capacité de croître sur des milieux sélectifs contenant de la phléomycine, puis par détermination de la production de L-actate par technique colorimétrique. La souche ML01 a perdu le plasmide pUT332 suite à des passages successifs sur un milieu non sélectif; l'absence du plasmide a été confirmée en sondant l'ADN total de levure avec des sondes du gène *Tn5Ble* et du gène *Amp^r* (présent pUT322).

On a analysé la souche ML01 afin de confirmer la stabilité des modifications génétique. On a eu recours à l'électrophorèse en champ pulsé suivi d'une hybridation pour vérifier que les motifs chromosomiques de la souche hôte S92 et de la souche ML01 sont identiques et qu'aucun réarrangement important des

séquences n'est survenu durant l'intégration de la cassette d'expression malolactique. La stabilité génétique a été établie sur plus de 100 générations en l'absence de pression sélective.

EXAMEN DES DANGERS :

Danger environnemental

S. cerevisiae est une levure saprophyte très répandue dans la nature. Elle a été isolée dans les sédiments, le sol, l'eau, ainsi que chez des animaux et des plantes dans diverses conditions écologiques. Ses besoins nutritionnels, ainsi que sa capacité de produire des ascospores dans des conditions de privation accroissent sa capacité de survivre dans la nature.

Même si *S. cerevisiae* est omniprésente dans la nature et couramment utilisée par les industries alimentaire et vinicole, les rapports concernant son effet pathogène sur les insectes, les oiseaux, les poissons, les animaux et les plantes sont extrêmement rares dans les publications scientifiques. Seul un cas associant *S. cerevisiae* à une diarrhée chronique chez un chien a été signalé [1]. L'Agence canadienne d'inspection des aliments, en vertu de la *Loi sur la protection des végétaux*, reconnaît que les espèces non recombinantes de *Saccharomyces* ne sont pas des phytoparasites et qu'il n'est pas nécessaire de détenir un permis pour les importer au Canada [2]. Par conséquent, *S. cerevisiae* n'est généralement pas considéré comme un phytopathogène.

Étant donné que, dans ce cas-ci, les éléments génétiques insérés ne semblent pas présenter de risques intrinsèques, on ne s'attend pas à ce que les incidences environnementales globales possibles découlant du rejet de la souche ML01 de *S. cerevisiae* diffèrent de celles associées aux autres souches connues de *S. cerevisiae* répandues dans la nature.

Danger pour la santé humaine

S. cerevisiae est principalement associée à des activités humaines, notamment à la production de pain et de boissons alcoolisées. *S. cerevisiae* a été isolée dans la flore intestinale chez l'humain et est considérée comme un agent pathogène opportuniste de faible virulence. La souche non recombinante de *S. cerevisiae* est considérée comme un agent du groupe de risque 1 par l'Agence de la santé publique du Canada. Les rapports de cas d'infection clinique par *S. cerevisiae* chez des populations en santé semblent rares. Cette levure a été mise en cause dans certaines maladies, en particulier chez des sujets avec certains à des facteurs prédisposants, notamment un long séjour à l'hôpital, une immunodépression, une antibiothérapie à large spectre ou le port d'une prothèse [3-6]. Des cas établis d'infection exogène, comme une vaginite, ont été signalés [7-9].

Le principal facteur de virulence des levures est la sécrétion de phospholipases; toutefois, comparativement à une vaste gamme de champignons soumis testés, *S. cerevisiae* présentait le plus faible taux d'activité des phospholipases [10]. Il a été établi que la capacité de croître à des températures élevées (jusqu'à 42 °C) était un facteur important associé à la virulence chez des souches cliniques de *S. cerevisiae* [11].

Pour le traitement des maladies causées par *S. cerevisiae*, il est recommandé d'avoir recours à une polythérapie antifongique, ainsi qu'à un traitement de longue durée [12]. Dans l'éventualité peu probable où la souche ML01 de *S. cerevisiae* causerait une infection chez les humains, il existe actuellement des traitements. L'amphotéricine B est considérée comme le traitement de choix pour les infections graves par *S. cerevisiae*, à moins que des affections sous-jacentes ne constituent une contre-indication [4]; dans ce cas, un traitement de longue durée par des antifongiques de la classe des azoles (par exemple, clotrimazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole) s'est également avéré efficace [13,14]. Étant donné que les gènes de résistance aux antibiotiques utilisés dans le processus de fabrication ont été retirés du génome de la souche finale, la dissémination de ces gènes dans l'environnement n'est pas possible.

Le déclarant a montré que la souche parentale S92 est étroitement liée ou identique aux souches commerciales traditionnellement utilisées dans la vinification. On ne s'attend donc pas à ce que la souche ML01 se comporte différemment de la souche parentale non recombinante, mise à part sa nouvelle caractéristique permettant la fermentation malolactique. On s'attend donc à ce que le risque d'effets significatifs sur la santé humaine soit faible. En 2003, la souche de levure ECMo01 a reçu une affirmation GRAS (Generally Recognized as Safe) par la Food and Drug Administration des États-Unis [15].

Le déclarant affirme que des vérifications systématiques de chaque lot de levure garantiront l'absence de pathogènes d'origine alimentaire (*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Clostridium perfringens*); le risque que des contaminants microbiens soient présents dans le produit final exporté est donc négligeable. Avant l'expédition, le génotype des transposons TY de la souche ML01 sera comparé avec celui d'une culture de référence.

EXAMEN DES ASPECTS LIÉS À L'EXPOSITION :

Le micro-organisme déclaré sera importé de la société Bio Springer, située à Maisons Alfort, France. On estime que 400 kg, contenant $1,2 \times 10^{16}$ cellules viables de la souche ML01 de *S. cerevisiae*, seront importés au Canada annuellement par Van Vuuren & Associates. La levure sera expédiée dans des récipients scellés à vide de 500 g et vendue dans environ 200 établissements vinicoles en Ontario et en Colombie-Britannique.

Selon le procédé de fabrication utilisé, le vin embouteillé contiendrait entre 0 et 10 cellules/ml de la souche ML01 de *S. cerevisiae*. En général, on utilise entre 0,1 et 0,2 gramme de levure sèche active pour fabriquer un litre de vin. Toutefois, la clarification, suivie d'une filtration, permet de réduire la quantité de cellules à moins de 0,5 cfu/ml de vin, ainsi assurant l'absence d'une augmentation de la teneur en urée amidolyase. La filtration sur membrane (porosité 1,2 μm) permettrait l'élimination complète des cellules de levure.

Comme dans le cas des souches d'origine naturelle de *S. cerevisiae* utilisée dans la vinification, une exposition par inhalation est possible. On s'attend à ce que le niveau d'exposition chez l'humain soit comparable à celui attribuable aux souches

de *S. cerevisiae* normalement présentes dans la fabrication des aliments et des boissons.

L'exposition à la souche ML01 ou aux protéines nouvellement introduites, lors de l'élimination de vin inutilisé ou de la consommation de vin, est jugée extrêmement faible, étant donné que les procédés de transformation qui entrent dans la vinification permettront d'éliminer toutes les cellules de levure intactes, les débris associés aux cellules de levure autolysées et les protéines libérées pendant l'autolyse des cellules de levure.

L'entreposage de la levure ML01 ne nécessite aucune précaution spéciale, si ce n'est que la conservation se fait à la température ambiante et ne doit pas dépasser pas deux ans. Bien qu'il ne soit pas nécessaire d'adopter des méthodes particulières d'élimination des quantités inutilisées de levures, le déclarant a donné des précisions sur les procédures de désinfection de tous les déchets solides et liquides. Aucun plan d'urgence n'a été mis en place en cas de rejet accidentel. La méthode de traitement et d'élimination des déchets contenant des cellules de levure résiduelles variera selon la taille et l'emplacement de l'établissement vinicole. Les effluents liquides peuvent être traités dans une installation municipale de traitement des eaux usées ou sur les lieux. Étant donné que la souche non recombinante de *S. cerevisiae* est considérée comme un agent du groupe de risque 1, des exigences opérationnelles et physiques minimales de confinement pour les procédures à grande échelle sont nécessaires, conformément aux *Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire* de l'Agence de la santé publique du Canada [16].

Persistance et dispersion

On dispose actuellement de renseignements limités sur les caractéristiques écologiques de la souche ML01. Valero et coll. ont effectué une étude sur le terrain d'une durée de 3 ans portant sur la propagation et la survie des souches de levure industrielle dans les vignes du Nord du Portugal et du Sud de la France [17]. Les résultats révèlent que les souches commerciales ont un comportement semblable à celui des souches de levure d'origine naturelle.

On a également évalué le comportement des souches génétiquement modifiées de *S. cerevisiae* dans les populations microbiennes d'une cave à vin en confinement et d'une vigne en serre; aucune différence marquée entre les souches modifiées et les souches de levure commerciales n'a été observée [18]. L'introduction de la souche ML01 n'aurait pas d'incidence importante sur l'équilibre écologique de la flore associée à la vigne.

Une étude d'une durée de 48 jours visant à comparer la capacité de survie de la souche ML01 de *S. cerevisiae* à celle de quatre autres souches d'origine naturelle de *Cryptococcus* présentes dans les sols agricoles a révélé que la population de *Saccharomyces* diminuait vers la fin de la l'expérience, comparativement aux autres levures autochtones. De plus, la souche recombinante n'avait aucun avantage concurrentiel par rapport à la souche parentale et aux autres levures du sol.

Si le procédé de fabrication à grande échelle entraîne le rejet dans l'environnement de la souche déclarée, cette dernière peut être disséminée par le vent, par la faune présente dans les établissements vinicoles ou par ruissellement avec les eaux de surface. Puisque le déclarant a fourni les procédures détaillées de désinfection de tous les déchets solides et liquides, on s'attend à ce que la dispersion de la souche ML01 soit sur de courtes distances et au cours de périodes limitées dans les établissements vinicoles et les zones périphériques. La souche déclarée aurait sans doute aucun avantage concurrentiel par rapport aux levures naturellement présentes dans le sol, étant donné qu'elle est adaptée à des milieux bien définis.

Références :

- [1] Milner RJ, Picard J, and Tustin R. (1997). Chronic episodic diarrhoea associated with apparent intestinal colonization by the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida famata* in a German shepherd dog. *JS Afr Vet Assoc.* 68(4):147-9.
- [2] CFIA. (2005). Organisms that do not require a plant protection permit to import. Plant Products Directorate. Plant Health Division. Export/Import Section. Canadian Food Inspection Agency. <http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/oper/orqlste.shtml> [viewed on June 13, 2006].
- [3] Anaissie E, Bodey GP, Kantarjian H, Ro J, Vartivarian SE, Hopfer R, Hoy J, and Rolston K. (1989). New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Rev Infect Dis.* 11:369-78.
- [4] Aucott JN, Fayen J, Grossnicklas H, Morrissey A, Ledermann MM, and Salatta, R. (1990). Invasive infection with *Saccharomyces cerevisiae*: report of three cases and review. *Rev Infect Dis.* 12(3):406-411.
- [5] Belet N, Dalgic N, Oncel S, Ciftci E, Ince E, Guriz H, Barlas M, and Dogru U. (2005). Catheter-related fungemia caused by *Saccharomyces cerevisiae* in a newborn. *Pediatr Infect Dis J.* 24(12):1125.
- [6] Malgoire JY, Bertout S, Renaud F, Bastide JM, and Mallie M. (2005). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism. *J Clin Microbiol.* 43:1133-1137.
- [7] Posteraro B, Sanguinetti M, d'Amore G, Masucci L, Morace G, and Fadda G. (1999). Molecular and Epidemiological Characterization of Vaginal *Saccharomyces cerevisiae* Isolates. *J Clin Microbiol.* 37(7):2230-2235.
- [8] Saporiti AM, Gomez D, Levalle S, Galeano M, Davel G, Vivot W, and Rodero L. (2001) Vaginal candidiasis: etiology and sensitivity profile to antifungal agents in clinical use. *Rev Argent Microbiol.* 33: 217-222.
- [9] Al-Hedaithy SS. (2002). Spectrum and protease production of yeasts causing vaginitis in Saudi Arabian women. *Med Sci Monit.* 8: CR498-501.
- [10] BarrettBree K., Hayes Y, Wilson R.G., and Ryley J.F. (1985). A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 131(5):1217- 1221.

- [11] McCusker, J.H., Clemons, K.V., Stevens, D.A., and Davis, R.W. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42°C and form pseudohyphae. *Infect. Immun.* 62: 5447–5455.
- [12] Tiballi RN, Spiegel JE, Zarins LT, and Kauffmann CA. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* infections and antifungal susceptibility studies by colorimetric and broth macrodilution methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 23:135–40.
- [13] Sobel JD, Vazquez J, Lynch M, Meriwether C, and Zervos MJ. (1993). Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clin Infect Dis.* 16(1):93-99.
- [14] Swinne, D., Watelle, M., Van der Flaes, M., and Nolard, N. (2004). In vitro activities of voriconazole (UK-109, 496), fluconazole, itraconazole and amphotericin B against 132 non-albicans bloodstream yeast isolates (CANARI study). *Mycoses.* 47(5-6):177-83.
- [15] USFDA. (2003). Agency Response Letter: GRAS Notice No. GRN 000120. United States Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Food Additive Safety. <http://www.foodsafety.gov/~rdb/opa-g120.html>
- [16] PHAC (2004). Laboratory Biosafety Guidelines 3rd ed. Health Canada. Population and Public Health Branch. Center for Emergency Preparedness and Response. http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/lbg-ldmbl-04/pdf/lbg_2004_e.pdf
- [17] Valero E, Schuller D, Cambon B, Casal M, and Dequin S. (2005). Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Res.* 5(10):959-69.
- [18] Bauer F, Dequin S, Pretorius I, Shoeman H, Wolfaardt MB, Schroeder MB, and Grossmann MK. (2003). The assessment of the environmental impact of genetically modified wine yeast strains. Proceedings of the " Actes de 83ème Assemblée Générale de l'O.I.V".