



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

N° série:

N° ordre:

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

par

LABBANI Fatima-Zohra-Kenza

Option : *Microbiologie Appliquée*

Spécialité: *Biotechnologies Microbiennes*

***Activité « Killer » chez des levures isolées des sols du Nord-Est Algérien :
Purification, caractérisation et effet sur les souches de levures indésirables.***

Soutenue le : 28/10/2015 à Constantine

Devant le jury :

Président : Mr. KACEM-CHAOUCH N. Prof. Université Frères MENTOURI, Constantine

Directrice de thèse : Mme. MERAIHI Z. Prof. Université Frères MENTOURI, Constantine

Examineurs : Mme BENDJEMANA K. M.C.A., Université LAGHROUR A., Khenchela

Mr. HARZALLAH Prof. Université FERHAT A., Sétif

Mr. SAKA S. Prof. Université BADJI M., Annaba

Année universitaire : 2014/2015

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications de l'Université frères MENTOURI à Constantine et au Département d'Agriculture, des Sciences de l'Alimentation et de l'Environnement, Collection des Levures Industrielles (DBVPG), à l'Université degli Studi di Perugia en Italie.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame le professeur MERAIHI Zahia, ma directrice de thèse, pour l'encadrement scientifique, les critiques et les suggestions pertinentes qu'elle a apportées au présent travail afin de le rendre beaucoup meilleur. Merci pour sa compétence, sa patience et sa franchise à mon égard. Je lui dois toute ma profonde gratitude.

Je remercie également Monsieur BUZZINI Pietro, Professeur et directeur du Laboratoire de la Collection des Levures Industrielles (DBVPG) de l'Université degli Studi di Perugia pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein de son équipe de recherche et m'a permis la réalisation d'une grande partie de ce travail dans son laboratoire. Merci pour ses nobles discussions et ses judicieux conseils et pour son intérêt à ce travail.

Je me fais également un immense plaisir d'adresser mes remerciements à Monsieur KACEM-CHAOUCH N., Professeur à l'Université des Frères MENTOURI à Constantine, pour le grand honneur de présider le jury de cette thèse.

Je tiens également à remercier les membres du jury, Madame BENDJEMANA K., Maître de Conférence à l'Université LAGHROUR Abbes de Khenchela ; Messieurs HARZALLAH D., Professeur à l'Université FERHAT Abbes de Sétif ; SAKA S., Professeur à l'Université BAJI Morkhtar de Annaba d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes remerciements vont aussi au Professeur ROBERTI Rita et Professeur CORAZZI Lanfranco du Département de Médecine Expérimentale de l'Université degli Studi di Perugia pour m'avoir aidé à réaliser les parties « purification de la toxine killer » et « SDS-PAGE ». Merci pour leur gentillesse et leur disponibilité. Je remercie également le technicien RICCI Carlo pour son aide et sa bonne humeur.

Ma profonde gratitude au Docteur TURCHETTI Benedetta et au doctorante GORETTI Marta du Laboratoire de la Collection des Levures Industrielles DBVPG pour leur précieuse aide et leur collaboration scientifique et amicale.

J'aimerais pouvoir dire un grand merci à mes chères collègues et amies, BENNAMOUN Leila et DAKHMOUCHE Scheherazad pour leur gentillesse, leurs conseils et leurs encouragements.

Le bouquet de mes remerciements je le présente affectueusement à ma famille pour leur patience et leur confiance en moi. Merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue au cours de mes études, mais aussi pour leur amour, leur sacrifice et leur compréhension au cours de toutes ces années d'études depuis ma scolarité jusqu'à ce jour.... Je leur dois toutes mes sincères reconnaissances.

Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes chers parents,
pour tout votre amour, votre soutien et votre stimulante fierté.
Que Dieu vous garde et vous procure santé et longue vie...*

*A mes chers frères Mohamed-lamine, Souheil, Zoheir Zine Eddine et Djellel pour leur confiance et
leur disponibilité*

*A mes nièces Assala, Salsabil, Lina, Ranim et Sajaet mes neveux Younes et Abdelmouiz pour la joie
qu'ils apportent dans ma vie*

*A mon mari Mohamed-lamine pour son soutien moral, sa générosité, sa patience et ses
encouragements*

A toutes mes belles sœurs, j'espère que vos rêves se réaliseront !

A toute la famille et la belle famille LABBANI

A tous ceux que j'aime

LABBANI Fatima-Zohra Kenza

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1. Généralités sur les levures.....	3
2. Phénomène killer des levures.....	9
3. Ecologie du phénomène killer.....	10
4. Bases génétiques du système killer des levures.....	12
4.1. Génomes viraux cytoplasmiques à ARN double brins.....	13
4.2. Plasmides linéaires à ADN double brins.....	13
4.3. Gènes chromosomiques codant pour le phénotype killer.....	13
5. Caractéristiques des toxines killer.....	14
6. Mode d'action des toxines killer.....	18
6.1. Fixation.....	18
6.2. Action toxique.....	19
7. Paramètres déterminant l'intensité de l'interaction.....	21
7.1. Sensibilité.....	21
7.2. Quantité de toxine.....	21
7.3. Etat physiologique.....	21
7.4. Environnement.....	22
8. Applications.....	22
8.1. Industries alimentaire et de fermentation.....	23
8.2. Taxonomie.....	23
8.3. Médecine.....	24
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	25
1. Echantillonnage.....	25
2. Isolement des levures.....	25
3. Purification et conservation des levures isolées.....	27
4. Méthodes d'identification des souches de levures.....	27
4.1. Méthode conventionnelle.....	27
4.1.1. Etude des caractères cultureux.....	27

4.1.2. Etude des caractères morphologiques.....	27
4.1.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques.....	28
4.2. Méthode d'identification moléculaire.....	29
4.2.1. Extraction d'ADN.....	30
4.2.2. Amplification de l'ADN extrait par PCR.....	30
4.2.3. Séquençage de l'ADN.....	31
5. Test de la mise en évidence de l'activité killer chez les souches isolées.....	32
6. Production de la toxine killer brute.....	33
6.1. Souche killer d'intérêt.....	33
6.2. Milieu de production.....	33
6.3. Pré-culture.....	33
6.4. Culture principale.....	33
7. Test d'activité killer de la toxine brute.....	33
8. Traitement protéasique de la toxine killer brute.....	34
9. Cinétique de production de la toxine killer.....	35
10. Purification de l'extrait brute de la toxine killer par gel filtration.....	35
11. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE).....	36
12. Effet du pH et de la température sur l'activité de la toxine killer purifiée.....	37
13. Détermination de la CMI de la toxine killer purifiée.....	37
14. Détermination de la CMI du métabisulfate de potassium, du sorbate de potassium et de l'éthanol.....	38
15. Détermination de la concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et de l'indice CIF (Σ CIF) de la protéine killer purifiée associée avec le métabisulfate de potassium lesorbate de potassium ou l'éthanol.....	39
16. Evaluation de l'activité killer de la toxine killer purifiée sur des contaminants de boissons.....	40
17. Etude de la stabilité de la toxine killer purifiée dans des boissons.....	41
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	42
1. Isolement des souches de levures.....	42
2. Identification des souches isolées.....	43

2.1. Identification moléculaire.....	43
2.2. Identification conventionnelle.....	48
2.2.1. Caractères cultureux.....	48
2.2.2. Caractères morphologiques.....	51
2.2.3. Caractères biochimiques et physiologiques.....	54
3. Mise en évidence de l'activité killer.....	56
4. Spectre d'action de la protéine killer de <i>P. kluyveri</i>	58
5. Cinétique de production de la protéine killer brute par <i>P. kluyveri</i> (L5).....	62
6. Purification de la protéine killer brute	63
7. Effets du pH et de la température sur l'activité killer de la protéine purifiée.....	67
8. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), des concentrations inhibitrices fractionnaires (FICs) et l'indice FIC (Σ FIC) de la protéine killer purifiée seule et en association avec le métabisulfate de potassium le sorbate de potassium ou l'éthanol.....	69
9. Evaluation de l'activité de la toxine killer purifiée sur des contaminants deboissons	73
CONCLUSION	76
RESUMES.....	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	81
ANNEXES.....	91

Liste des abréviations

YMA :Yeast Malt Agar

YPGA :Yeast Peptone Glucose Agar

PDA : Potato Dextrose Agar

YNB :YeastNitrogen Base

YCB :YeastCarbon Base

YP :YeastExtract Peptone

rpm :Rotation per minute

PCR :PolymerasechainReaction

TAE : Tris Acétate EDTA

EDTA :Éthylène Diamine Tétra-Acétique

dNTPs :Désoxynucléotides triphosphates

BET : Bromure d’Ethidium

BLAST : Basic Local AlignmentSearchTool

YPG-MB :Yeast Peptone Glucose-Methylene Blue

Ua : Unité arbitraire

UI : Unité Internationale

PEG : Polyéthylène glycol

DO : Densité Optique

HR : High Resolution

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-sodium dodécyl sulfate)

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CLSI :Clinical and Laboratory Standard Institute

RPMI :Roswell Park Memorial Institut

MOPS :3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid

CIF : Concentration Inhibitrice Fractionnaire

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1. Présentation d'une cellule de levure.....	3
Figure 2. Filamentisation des levures. (A) : Pseudomycélium. (B) : Vrai mycélium. Barre = 10 µm.....	4
Figure 3. Reproduction sexuée des levures.....	4
Figure 4. Bourgeonnement d'une cellule de levure. Barre = 500 nm.....	5
Figure 5. Mise en évidence sur milieu gélosé du phénotype killer contre deux isolats de <i>Candida albicans</i>	9
Figure 6. Structure dimère de la toxine killer SMKT produite par <i>Millerozyma farinosa</i> (<i>Pichiafarinosa</i>) KK1.....	14
Figure 7. Voie de sécrétion de la toxine K28 chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
Figure 8. Structure de la paroi cellulaire des levures.....	18
Figure 9. Mode d'action de la toxine K1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Figure 10. Localisation géographique de deux régions de récolte des échantillons de sol (A). (H.B : Hamma Bouziane ; C.N.T : Constantine). Images satellite du site d'échantillonnage du sol agricole (B) et du sol forestier (C).....	26
Figure 11. Schéma représentatif du gène de l'ARNr 26S et la localisation de la région hypervariable D1/D2.....	29
Figure 12. Courbe d'étalonnage de Sérum Albumine Bovine avec une solution mère de 2 mg/ml.....	36
Figure 13. Détermination de la CMI de la protéine killer sur la microplaque. (TC : Témoin de culture).....	38
Figure 14. Arbre phylogénétique basée sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr, et montrant la relation des isolats L14 et L15 (Ordre des Filobasidiales) avec les espèces types du genre <i>Cryptococcus</i> et <i>Filobasidium</i> . Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux de Bootstrap (1000 répliques), la barre 0.005 indique le nombre de substitution par position de nucléotide.....	46
Figure 15. Arbre phylogénétique basée sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 26S, et montrant la relation des isolats L1-L13 (ordre des Saccharomycétales) avec les espèces types des genres <i>Candida</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Pichia</i> , <i>Meyerozyma</i> , <i>Nadsonia</i> et <i>Saccharomyces</i> . Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux de Bootstrap (1000 répliques), la barre 0.01 indique le nombre de substitution par position de nucléotide.....	47

Figure 16. Mise en évidence de l'activité killer chez la <i>Pichiakluyveri</i> (L5) après une incubation de 5 jours sur milieu YPG-BM (pH 4.5) à 25°C. Développement de zones d'inhibition dans les boîtesensemencées avec <i>Dekkerabruxellensis</i> DBVPG 6706 (A) ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBVPG 6500 (B) et <i>S. cerevisiae</i> DBVPG 6173 (C).....	57
Figure 17. Effet de l'extrait brut de la protéine brute contre les dix souches sensibles retenues.(A) : <i>Dekkera anomala</i> DBVPG 3766 ; (B) : <i>Dekkera anomala</i> DBVPG 4075 ; (C) : <i>Dekkerabruxellensis</i> DBVPG 6704 ; (D) : <i>Dekkerabruxellensis</i> DBVPG 6705 ; (E) : <i>Dekkerabruxellensis</i> DBVPG 6710 ; (F) : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBVPG 6173 ; (G) : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBVPG 6500 ; (H) : <i>Zygosaccharomycesbisporus</i> DBVPG 6382 ; (I) : <i>Zygosaccharomycesbisporus</i> DBVPG 6382. (J) : <i>Dekkerabruxellensis</i> DBVPG 6706 (la souche la plus sensible).....	61
Figure 18. Production de la protéine killer brute par <i>Pichiakluyveri</i> (L5). Les histogrammes gris indiquent la zone d'inhibition de <i>Dekkerabruxellensis</i> DBVPG 6706 (la souche cible) par la méthode de diffusion en puits. La courbe représente la DO ₅₈₀ . Les données sont exprimées en moyenne ± SD, n = 3.....	63
Figure 19. Effet killer de la protéine purifiée contre la souche d'altération des aliments et des boissons, <i>D. bruxellensis</i> DBVPG 6706. 100 µl de la protéine killer purifiée sont introduits dans le puits puis incubés pendant 5 jours à 25°C.....	64
Figure 20. Profil électrophorétique en SDS-PAGE : révélation d'une seule bande de la protéine killer purifiée, par le nitrate d'argent (A) et par le bleu de Coomassie(B), obtenue après filtration sur Sephacryl S-200. (C) : Détermination de la masse moléculaire de la protéine killer purifié.....	66
Figure 21. Effet du pH (A) et de la température(B) sur l'activité killer de la protéine purifiée, testée contre <i>Dekkerabruxellensis</i> DBVPG 6706 (souche sensible). Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type, n = 3.....	68
Figure 22. Effet dose de la toxine killer sur la croissance de <i>Dekkerabruxellensis</i> DBVPG 6706 (A) après 7 jours d'incubation dans la boisson gazeuse et <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBVPG 6500 (B) après 3 jours d'incubation dans le jus de poire. Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type, n = 3.....	74
Figure 23. Stabilité de la toxine killer dans la boisson gazeuse rafraichissante (A) et dans le jus de poires(B). Les souches sensibles utilisées dans le test de diffusion parpuits sur gélose : <i>Dekkerabruxellensis</i> DBVPG 6706 pour la boisson gazeuse et <i>Saccharomycescerevisiae</i> DBVPG 6500 pour le jus de poire. Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type, n = 3.....	74

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des levures Ascomycètes et Basidiomycètes	6
Tableau 2. Différents domaines d'utilisation industrielle des levures.....	8
Tableau 3. Espèces de levures pour lesquelles l'activité killer a été rapportée.....	11
Tableau 4. Bases génétiques de l'expression du phénotype killer chez les levures.....	12
Tableau 5. Comparaison entre les caractéristiques de différentes toxines killer.....	15
Tableau 6. Provenance des échantillons de sol utilisés pour l'isolement des levures.....	25
Tableau 7. Couples d'amorces utilisés dans la PCR.....	31
Tableau 8. Couples d'amorces utilisées dans le séquençage de la région D1/D2 du gène codant pour l'ARNr 26S de la grande sous-unité ribosomique.....	31
Tableau 9. Isolement des souches de levures.....	42
Tableau 10. Résultats du séquençage des amplicons obtenus après PCR, de la région D1/D2 du gène de l'ARNr 26S et comparaison aux séquences de la base de données GenBank.....	45
Tableau 11. Caractères cultureux des souches de levures isolées après une culture de 3 jours sur YPGA à 25°C.....	49
Tableau 12. Caractères cultureux sur milieu YPG liquide après 14 jours d'incubation à 25°C.....	51
Tableau 13. Caractères morphologiques des souches de levures cultivées pendant 3 jours à 25°C.....	52
Tableau 14. Résultats des tests d'assimilation des glucides et des sources azotées des souches de levures isolées.....	54
Tableau 15. Résultats du test de fermentation de différents sucres par les isolats de levures.....	55
Tableau 16. Effet de la température sur la croissance des levures isolées.	56
Tableau 17. Effet de l'extrait brut de la protéine killer sur les souches de levures d'altération des aliments et de boissons (test par la technique de diffusion par puits sur gélose).....	59
Tableau 18. Purification de la toxine killer produite par la souche <i>Pichiakluyveri</i> (L5). Les étapes de la purification sont décrites en détail dans la partie « Matériel et Méthodes ».	65
Tableau 19. Détermination de la CMI de la toxine killer contre les souches sensibles <i>Dekkeraanomala</i> , <i>Dekkerabruxellensis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Zygosaccharomyces</i> <i>bisporus</i>	70
Tableau 20. Détermination de la CMI de métabisulfate de potassium, de l'éthanol et de sorbate de potassium.....	71

Tableau 21. CMI, CIF et l'indice CIF (Σ CIF) de la protéine killer en présence

de métabisulfate de potassium, de sorbate de potassium et l'éthanol, vis-à-vis des

levures test: *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6706 et *Saccharomyces cerevisiae* DBVPG

6500.....72

INTRODUCTION

Les levures constituent un groupe important et hétérogène de microorganismes qui suscitent actuellement un intérêt grandissant de la part des scientifiques et des différents acteurs des secteurs bioalimentaire et médical (HATOUM, 2013). En plus de leur contribution majeure au développement du goût dans les aliments fermentés, leurs activités antagonistes envers certaines levures indésirables sont maintenant bien connues, type toxines killers de nature protéique ou appelées également protéines killer (GUO *et al.*, 2013 ; ORO, 2013).

Ces dernières années, un intérêt grandissant des levures killer et leurs toxines a suscité la curiosité de recherches pour être une alternative efficace aux agents antifongiques chimiques classiques (ORO, 2013). Par leurs propriétés antimycotiques de ces protéines killer, elle vont avoir des retombées certaines dans la lutte contre les infections provoquées par des microorganismes pathogènes, en particulier, la levure pathogène type *Candida albicans* (İZGÜ *et al.*, 2007a ; LACHANCE et STARMER, 2011 ; LIM et TAY, 2011).

Dans les industries alimentaires et de fermentation, les levures killer et leurs toxines sont utilisées dans la lutte contre la contamination par les levures indésirables telles que *Dekkera bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bisporus* ainsi que *Saccharomyces cerevisiae* (GORETTI *et al.*, 2009 ; LIU et TSAO, 2009 ; COMITINI et CIANI, 2010 ; SANTOS *et al.*, 2011). Leur effet fongicide permet de préserver la qualité des produits et donc des pertes économiques conséquentes (STARTFORD, 2006 ; SANTOS *et al.*, 2009).

Pour la conservation des aliments manufacturés et des boissons, certains additifs chimiques sont ajoutés comme les dérivés d'acide benzoïques et d'acide sorbique et de dioxyde de soufre (SO₂) boissons (GORETTI *et al.*, 2009 ; TSERENNADMID *et al.*, 2011). Cependant, certaines souches de levures se montrent résistantes à de nombreux conservateurs chimiques (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2007). De plus, la tendance actuelle de consommateurs à utiliser des produits d'origine biologiques sans aucun additif chimique a incité la recherche dans ce sens (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2007 ; TSERENNADMID *et al.*, 2011 ; HATOUM, 2013).

Ainsi, les levures killer et leurs toxines constituent une des approches proposées parmi les plus prometteuses utilisée dans la lutte biologique contre les levures pathogènes ou indésirables (GORETTI *et al.*, 2009 ; LIU et TSAO, 2009 ; COMITINI et CIANI, 2010 ; SANTOS *et al.*, 2011).

Cependant, peu d'études sont publiées dans la littérature sur la recherche de levures killer à partir d'un biotope comme le sol. Ce dernier présente une importance générale dans les processus écosystémiques et peut constituer un réservoir de souches killer de levures dont la distribution est assurée par différents facteurs tels que la décomposition de la matière organiques végétale et les

insectes, vecteurs visiteurs des fruits et des fleurs (MAGLIANI, 1997 ; STARMER et LACHANCE, 2011).

Par ailleurs, un grand nombre de levures communément utilisées en biotechnologie est obtenu à partir de niches écologiques par leur faculté d'adaptation due à leurs propriétés physiologiques très caractéristiques (RESKI-BEKKI, 2014). L'ingénierie de ces levures trouve donc des champs d'applications dans plusieurs domaines pour produire métabolites variés comme les protéines killer. La recherche de souches productrices de protéines killer à partir d'un écosystème naturel comme le sol, est un enjeu important en biotechnologie. Pour cela, nous avons ciblé des sols dans la région de Constantine (Nord-Est Algérien). Dans le présent travail, nous avons cherché à isoler et à identifier des levures possédant un caractère de production de toxine killer par le test sur des levures indésirables. L'évaluation de l'activité de la toxine killer produite par la levure sélectionnée. La purification de la toxine killer produite est impérative pour sa caractérisation.

Nous avons ensuite procédé à des tests de sensibilité *in vitro* à la protéine killer purifiée : détermination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration inhibitrice fractionnaire.

Enfin, l'évaluation *in vitro* du potentiel de la toxine killer purifiée comme agent de biocontrôle des levures indésirables.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les levures

La levure est l'organisme modèle de référence, sur lequel le plus d'expérience ont été conduites, et donc le plus de données ont été fournies. En 1996, le génome *Saccharomyces cerevisiae* est entièrement séquencé. Par son métabolisme fermentaire des glucides, elle est utilisée plus de huit millénaires dans le brassage des bières dans Sumeria et Babylone, dans la culture du raisin en Géorgie et pour lever la pâte en Egypte (SMIDTAS, 2007). Le terme « levure » vient du latin « *levare* », faisant référence à la capacité de faire lever le pain en produisant du CO₂ en conditions anaérobiques et de fermenter le sucre (KUTZMAN *et al.*, 2011a). En 1860, les levures ont été observées, pour la première fois, au microscope par VAN LEEUWENHOEK Antoni. Vers 1860, Pasteur a identifié les levures comme agents des fermentations. En 1881, HANSEN Emile, a décrit l'isolement des premières souches pures de *Saccharomyces* à partir de moûts. Plus tard, d'autres espèces de levures ont été identifiées entre 1950 et 1970 (BASMAJI, 2005).

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires eucaryotes (Figure 1). Néanmoins, de nombreuses espèces sont capables de former un pseudomycélium comme l'espèce *Candida albicans*, voir un véritable mycélium comme l'espèce *Lindnera bimundalis* *Candida ontarioensis* (Figure 2) (NADEEM, 2013 ; KURTZMAN, 2011a).

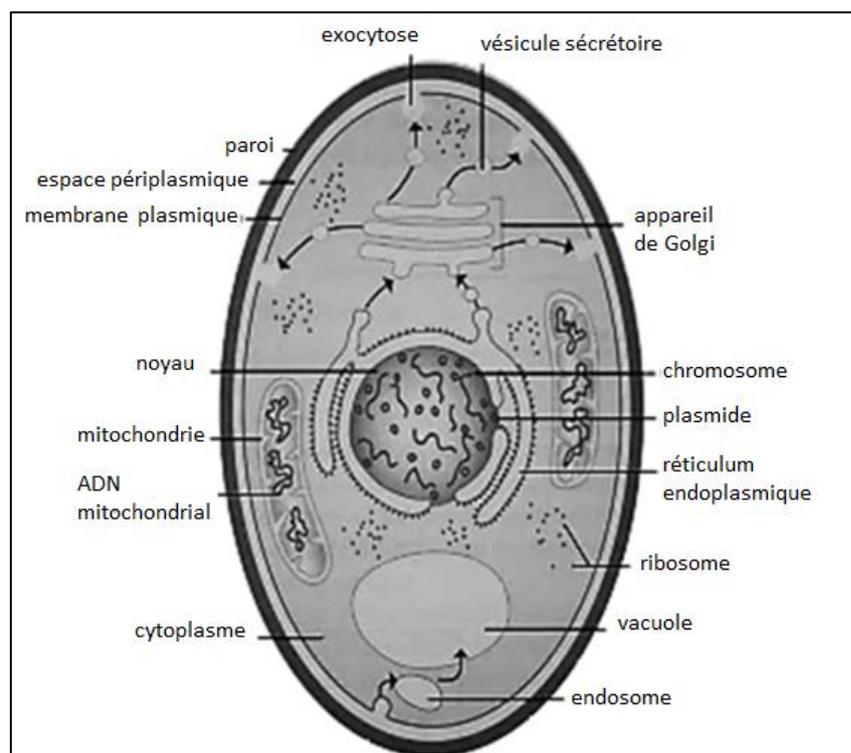


Figure 1. Présentation d'une cellule de levure (MANYRI, 2005).

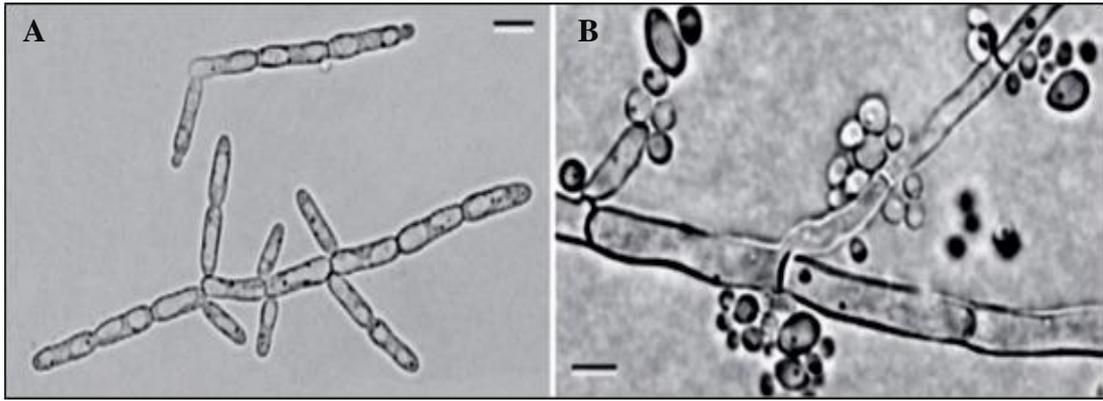


Figure 2. Filamentation des levures. (A) : Pseudomycélium. (B) : Vrai mycélium. Barre = 10 µm (KURTZMAN *et al.*, 2011a).

La morphologie des levures est d'une grande importance taxonomique. Elle est sphérique, ovoïde, globuleuse, cylindrique, ellipsoïde, allongée, apiculée, ogivale, triangulaire ou en forme de bouteille (WALKER, 2009 ; KURTZMAN *et al.*, 2011a). Certaines levures comme *S. cerevisiae* ont une reproduction sexuée qui correspond à une phase de leur cycle biologique avec une alternance de phase haploïde et diploïde (Figure 3).

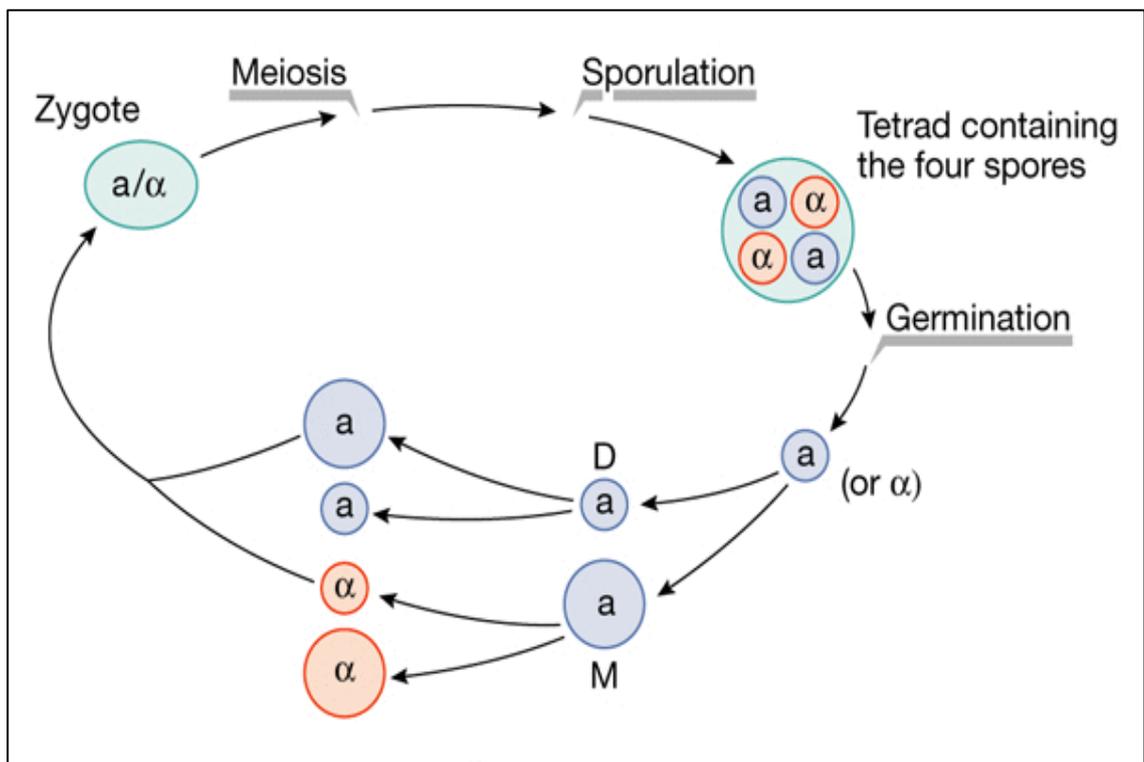


Figure 3. Reproduction sexuée des levures (COSMA, 2004).

Le bourgeonnement, le mode de reproduction végétative le plus fréquent, est représenté par une évagination qui apparaît à un point de la cellule mère (Figure 4). Un autre mode de reproduction

végétative peut être rencontré : la fission, caractéristique du genre *Schizosaccharomyces*, qui se manifeste par la formation d'une paroi transversale au grand axe de la levure (REZKI-BEKKI, 2014).

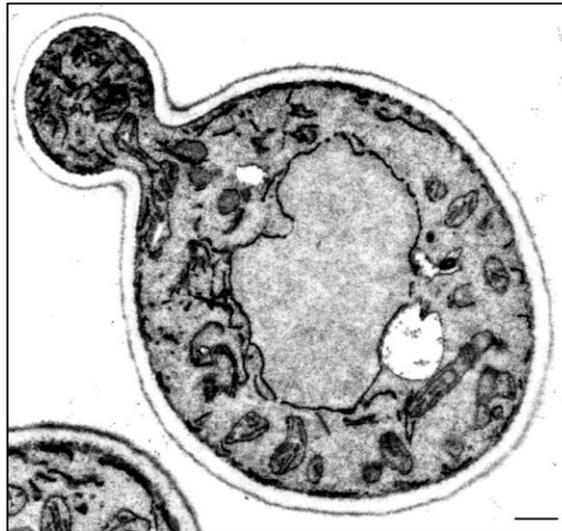


Figure 4. Bourgeonnement d'une cellule de levure (KLEI *et al.*, 2011). Barre = 500 nm.

Groupe complexe et hétérogène, les levures sont classées en deux grands groupes : les Ascomycètes et les Basidiomycètes, dont chacun comporte des états anamorphiques et téléomorphiques. Les Ascomycètes sont principalement classés en Saccharomycètes et Schizosaccharomycètes, tandis que les Basidiomycètes sont distribués dans les classes suivantes : Hymenomycètes, Urediniomycètes et Ustilaginomycètes (Tableau 1) (SCORZETTI *et al.*, 2002; KURTZMAN et FELL, 2006).

Les levures sont des microorganismes ubiquitaires qui peuvent coloniser plusieurs niches écologiques : l'air, le sol, l'eau, le tube digestif de certains animaux et les galeries d'insectes (LACHANCE *et al.*, 2001 ; LACHANCE *et al.*, 2006 ; WALKER, 2009 ; STARMER and LACHANCE, 2011). Certaines levures ont été isolées à partir d'environnements extrêmes comme l'Antarctique (SATYANARAYANA et KUNZE, 2009). D'autres vivent principalement sur les végétaux riches en sucres, en particulier les fruits (MAGLIANI *et al.*, 1997 ; Walker, 2009), dans des produits alimentaires (STRATFORD, 2006) ainsi que d'autres niches écologiques.

Tableau 1. Classification des levures Ascomycètes et Basidiomycètes (KURTZMAN et FELL, 2006 ; SUH *et al.*, 2006).

Ascomycètes			
Schizosaccharomycetes	<i>Dipodascopsis</i>	<u>Saccharomycodaceae</u>	<i>Komagataella</i>
Schizosaccharomycetales	<i>Lipomyces</i>	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Kuraishia</i>
<u>Schizosaccharomycetaceae</u>	<i>Myxozyma</i>	<i>Kloeckera</i>	<i>Lodderomyces</i>
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Zygozima</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Lindnera</i>
	<u>Metschnikowiaceae</u>	<u>Saccharomycopsidaceae</u>	<i>Macrorhabdus</i>
Saccharomycetes	<i>Clavispora</i>	<i>Saccharomycopsis</i>	<i>Meyerozyma</i>
Saccharomycetales	<i>Metschnikowia</i>	<u>Trichomonascaceae</u>	<i>Millerozyma</i>
<u>Ascoideaceae</u>	<u>Pichiaceae</u>	<i>Spencermartinsiella</i>	<i>Nakazawaea</i>
<i>Ascoidea</i>	<i>Brettanomyces</i>	<i>Trichomonascus</i>	<i>Ogataea</i>
Cephaloascaceae	<i>Dekkera</i>	<i>Wickerhamiella</i>	<i>Pachysolen</i>
<i>Cephaloascus</i>	<i>Peterozyma</i>	Saccharomycetales <i>incertae sedis</i>	<i>Phaffomyces</i>
<u>Dipodascaceae</u>	<i>Pichia</i>	<i>Aciculoconidium</i>	<i>Priceomyces</i>
<i>Dipodascus</i>	<i>Saturnispora</i>	<i>Ambrosiozyma</i>	<i>Scheffersomyces</i>
<i>Galactomyces</i>	<u>Saccharomycetaceae</u>	<i>Arxula</i>	<i>Schizoblastosporion</i>
<i>Geotrichum</i>	<i>Kazachstania</i>	<i>Ascobotryozyma</i>	<i>Schwanniomyces</i>
<u>Endomycetaceae</u>	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Babjeviella</i>	<i>Sporopachydermia</i>
<i>Endomyces</i>	<i>Lachancea</i>	<i>Barnettozyma</i>	<i>Starmerella</i>
<i>Helicogonium</i>	<i>Nakaseomyces</i>	<i>Blastobotrys</i>	<i>Starmera</i>
<i>Myriogonium</i>	<i>Naumovia</i>	<i>Botryozyma</i>	<i>Sympodiomyces</i>
<i>Phialoascus</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Candida</i>	<i>Trigonopsis</i>
<u>Eremotheciaceae</u>	<i>Tetrapisispora</i>	<i>Citeromyces</i>	<i>Wickerhamia</i>
<i>Coccidiascus</i>	<i>Torulaspora</i>	<i>Cyniclomyces</i>	<i>Wickerhamomyces</i>
<i>Eremothecium</i>	<i>Vanderwaltozyma</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Yamadazyma</i>
<u>Lipomycetaceae</u>	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Hyphopichia</i>	<i>Yarrowia</i>
<i>Babjevia</i>	<i>Zygotorulaspora</i>	<i>Kodamaea</i>	<i>Zygoascus</i>

Tableau 1. Classification des levures Ascomycètes et Basidiomycètes d'après Kurtzman et Fell (2006) et Suh *et al.* (2006) (la suite).

Basidiomycètes			
Hymenomycetes	<i>Bulleribasidium</i>	<i>Sterigmatomyces</i>	Ustilaginomycetes
Cystofilobasidiales	<i>Bulleromyces</i>	Microbotryales	<i>Malassezia</i>
<u>Cystofilobasidiaceae</u>	<i>Cryptococcus</i>	<u>Microbotryaceae</u>	<i>Pseudozyma</i>
<i>Cystofilobasidium</i>	<i>Cuniculitrema</i>	<i>Bensingtonia</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>Dioszegia</i>	<i>Curvibasidium</i>	<i>Sympodiomyces</i>
<i>Guehomyces</i>	<i>Fellomyces</i>	<i>Leucosporidiella</i>	<i>Tilletiopsis</i>
<i>Itersonilia</i>	<i>Filobasidiella</i>	<i>Leucosporidium</i>	
<i>Mrakia</i>	<i>Holtermannia</i>	<i>Mastigobasidium</i>	
<i>Phaffia</i>	<i>Kockovaella</i>	<i>Reniforma</i>	
<i>Tausonia</i>	<i>Sirobasidium</i>	<i>Rhodosporidium</i>	
<i>Udeniomyces</i>	<i>Sterigmatosporidium</i>	<i>Rhodotorula</i>	
<i>Xanthophyllomyces</i>	<i>Tremella</i>	<i>Sporobolomyces</i>	
Filobasidiales	<i>Trimorphomyces</i>	Naohideale	
<u>Filobasidiaceae</u>	<i>Tsuchiyaea</i>	<i>Bannoa</i>	
<i>Cryptococcus</i>		<i>Erythrobasidium</i>	
<i>Filobasidium</i>	Uredinomycetes	<i>Naohidea</i>	
Trichosporonales	Agaricostilbales	<i>Rhodotorula</i>	
<u>Trichosporonaceae</u>	<u>Agaricostilbaceae</u>	<i>Sakaguchia</i>	
<i>Cryptococcus</i>	<i>Agaricostilbum</i>	<i>Sporobolomyces</i>	
<i>Cryptotrichosporon</i>	<i>Bensingtonia</i>	Sporidiobolales	
<i>Trichosporon</i>	<i>Chionosphaera</i>	<u>Sporidiobolaceae</u>	
Tremellales	<i>Kondoa</i>	<i>Rhodosporidium</i>	
<u>Tremellaceae</u>	<i>Kurtzmanomyces</i>	<i>Rhodotorula</i>	
<i>Auriculibuller</i>	<i>Sampaio</i>	<i>Sporidiobolus</i>	
<i>Bullera</i>	<i>Sporobolomyces</i>		

Le rôle historique des levures dans le domaine de l'agroalimentaire ne s'est pas démenti et elles interviennent de nos jours dans la fabrication de nombreux produits alimentaires (brasserie, vinification, fromagerie, etc.). Elles participent aussi à la revalorisation des déchets agricoles et industriels et à la production de protéines, d'enzymes, de lipides, de vitamines et de biocarburants (Tableau 2).

Actuellement, les levures sont largement utilisées dans les secteurs de la recherche biomédicale et des biotechnologies en raison de leur double état de microorganismes et d'eucaryotes. En effet, contrairement aux bactéries, les levures ont la capacité de produire des protéines glycosylées. Des levures, modifiées génétiquement, produisent l'antigène de surface du virus de l'hépatite B utilisé dans le vaccin anti-hépatite. D'autres produisent la sérum- albumine humaine, des hormones, des facteurs de croissance et d'autres protéines thérapeutiques (WALKER, 2009 ; REZKI-BEKKI, 2014).

Tableau 2. Différents domaines d'utilisation industrielle des levures (Walker ; 2009 ; Rezki-Bekki, 2014).

Utilisation industrielle des levures	
Boissons alcoolisées	Vin, bière, cidre, saké, etc.
Protéines recombinantes	Hormones (p. ex. l'insuline), vaccins anti-viraux (p. ex. le vaccin contre l'hépatite B), facteurs de croissance (p. ex. facteur de nécrose tumorale), protéines sanguines (p. ex. sérum albumine bovine), interférons (p. ex. interférons leucocytaires) anticorps (p. ex. récepteurs aux IgE), enzymes (p. ex. lipase gastrique et chymosine).
Alcools industriels	Cosmétique, industrie chimique, industrie pharmaceutique, bioéthanol, glycérol.
Enzymes	Alpha-amylase, glucoamylase, protéase, invertase, pectinase, lipase, inulinase.
Biomasse	Levure de boulangerie, levure-aliment, extrait de levure, pigments alimentaires.
Vitamines	Vitamines B, vitamine D, etc.

2. Phénomène killer des levures

Les antibiotiques et les bactériocines ont été découverts dans la première moitié du XX^{ème} siècle, alors qu'il a fallu attendre les années 1960 pour mettre en évidence un principe équivalent chez certaines levures. En 1963, BEVAN et MAKOVER ont mis en évidence le phénomène killer à partir d'une souche de *S. cerevisiae* isolée de contaminants de brasserie (BEVAN et MAKOVER, 1963). Ce phénomène est basé sur la sécrétion par une souche dite « tueuse » ou « killer » d'une protéine ou une glycoprotéine de faible poids moléculaire, ayant une action létale sur des micro-organismes voisins qualifiés de « sensibles », sans contact direct de cellule à cellule (interaction indirecte). Les souches killer sont immunisées contre leur propre toxine, mais peuvent être sensibles aux toxines produites par d'autres souches killer (MUSHTAQ *et al.*, 2010). On qualifie de « neutre » une souche qui n'est pas sensible à une toxine et qui n'en produit pas. Il est à noter que les qualificatifs phénotypiques « killer », « sensible », « neutre » s'appliquent toujours en référence à une toxine particulière (POMMIER, 2003 ; MAQUEDA *et al.*, 2011).

L'action d'une souche killer sur une souche sensible est facile à mettre en évidence au laboratoire, par culture sur milieu gélosé à pH 4.2 – 4.7 à 20 - 25 °C. Dans la plupart des cas, le milieu glucose-extrait de levure-peptone agar avec un tampon citrate-phosphate (0.1 M, pH 4.5) est utilisé (GOLUBEV, 2006). La souche sensible est inoculée dans la masse de la gélose avant solidification ; la souche à tester est inoculée en stries ou en spots sur le milieu solidifié ; si elle est killer, une zone claire dans laquelle la souche sensible ne pousse pas entoure la culture de la souche à tester (Figure 5) (RIBEREAU-GAYON, 2004).

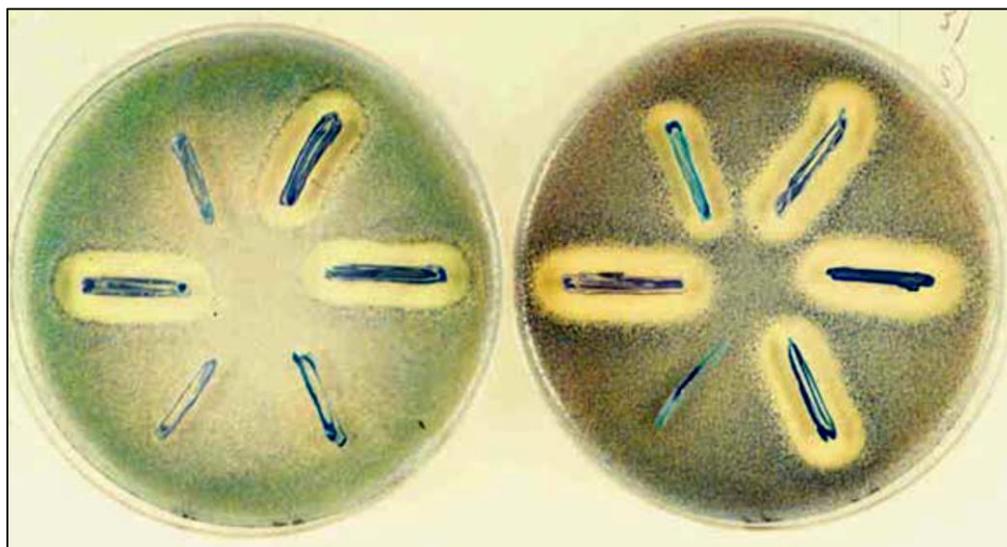


Figure 5. Mise en évidence sur milieu gélosé du phénotype killer contre deux isolats de *Candida albicans* (POLONELLI et CONTI, 2009).

Après la première découverte du phénomène killer chez *S. cerevisiae*, il est vite devenu évident que le caractère killer est largement distribué parmi les genres de levures. Au présent, l'activité killer a été observée dans plus de 100 espèces appartenant à plus de 20 genres de levures ascomycètes et basidiomycètes tels que *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Ustilago*, *Williopsis* et *Zygosaccharomyces* (Tableau 3) (SCHMITT et BREINIG, 2002 ; VADKERTIOVÀ et SLÀVIKOVÀ, 2006 ; WANG *et al.*, 2007 ; EL-BENNA *et al.*, 2011).

3. Ecologie du phénomène killer

Les souches killer des levures peuvent être isolées à partir de sources variées, mais elles sont beaucoup plus fréquentes dans les habitats où les populations de levures atteignent des densités relativement élevées, de sorte que la compétition est beaucoup plus forte.

Le phénomène killer présente un impact remarquable sur la compétition entre les levures apparentées vis-à-vis de leur niche écologique privilégiée. Ce c'est parce que la sensibilité aux toxines killer est spécifique et seules les cellules de levures contenant un récepteur pour ces toxines sont sensibles aux elles (GOLUBEV, 2006).

Les levures isolées à partir des habitats particuliers présentent une plus grande activité killer contre des levures provenant d'autres habitats que celles appartenant à leur propre habitat. Ainsi, l'activité killer des souches de *Pichia kluyveri* était de 12 % dans les fruits, tandis que son activité contre des levures de différentes localités était 64 % (STARMER *et al.*, 1987). De plus, seulement 9 % de levures provenant des fruits étaient sensibles à des souches killer de *P. kluyveri*, tandis que 42 % de souches provenant d'autres habitats étaient sensibles aux souches testées de *P. kluyveri* (STARMER *et al.*, 1992). D'une manière analogue, presque tous les isolats du sol sont sensibles aux toxines killer produites par des levures provenant de la phyllosphère. Cependant, de nombreux isolats des plantes sont résistants, indiquant ainsi une sélection au sein des communautés à la toxine présente (GOLUBEV et GOLUBEVA, 2004).

Clairement, la production de toxines killer par les levures représente une fonction importante pour les cellules killer, en défendant leur niche écologique contre les cellules microbiennes invasives qui possèdent les mêmes besoins nutritionnels. En d'autres termes, le phénomène killer joue un rôle important dans la maintenance de la composition de la communauté par l'exclusion des levures compétitives « étrangères » des habitats particuliers (GOLUBEV, 2006).

Tableau 3. Espèces de levures pour lesquelles l'activité killer a été rapportée (BUZZUNI *et al.*, 2004 ; GOLUBEV, 2006 ; BUZDAR *et al.*, 2011 ; COMITINI et CIANI, 2011 ; SANTOS *et al.*, 2011 ; BAJAJ *et al.*, 2012 ; LIU *et al.*, 2012 ; GUO *et al.*, 2013).

Espèce de levure	Référence	Espèce de levure	Référence
<i>Bullera alba</i>	<i>Candida versatilis</i>	<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>	<i>Rhodotorula lignophila</i>
<i>Bullera hanna</i>	<i>Cryptococcus aerius</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> (<i>Candida sphaerica</i>)	<i>Rhodotorula mucilaginos</i>
<i>Bullera sinensis</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (<i>Candida pseudotropicalis</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Bullera unica</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Kluyveromyces siamensis</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i> (<i>Candida holmii</i>)
<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus luteolus</i>	<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
<i>Candida berthetii</i>	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>Pichia guilliermondii</i>)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Candida diversa</i>	<i>Cryptococcus perniciosus</i>	<i>Millerozyma farinosa</i> (<i>Pichia farinosa</i>)	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>
<i>Candida freyschussi</i>	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	<i>Mrakia frigida</i>	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Curvibasidium pallidicorallinum</i>	<i>Pichia cactophila</i>	<i>Tetrapisispora phaffii</i>
<i>Candida. homilentoma</i>	<i>Cystofilobasidium bisporidii</i>	<i>Pichia kluyveri</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
<i>Candida maltosa</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Torulaspota microellipsoides</i> (<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>)
<i>Candida naeodendra</i>	<i>Fellomyces penicillatus</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Trichosporon asteroides</i>
<i>Candida oleophila</i>	<i>Filobasidium capsuligenum</i>	<i>Pseudozyma antarctica</i>	<i>Trichosporon jirovecii</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (<i>Kloeckera apiculata</i>)	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	<i>Ustilago maydis</i>
<i>Candida silvae</i>	<i>Hanseniaspora valbyensis</i> (<i>Kloeckera japonica</i>)	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (<i>Pichia anomala</i>)
<i>Candida sonorensis</i>	<i>Hanseniaspora. vineae</i> (<i>Kloeckera africana</i>)	<i>Rhodotorula graminis</i>	<i>Williopsis Saturnus</i>
<i>Candida stellata</i>	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	<i>Rhodotorula lactosa</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>

L'énergie ainsi que la machinerie cellulaire utilisées pour la production des toxines killer ne peuvent pas également être utilisées pour la reproduction cellulaire. Par conséquent, la synthèse des toxines killer peut réduire le taux de croissance et la compétitivité des organismes producteurs (PINTAR et STARMER, 2003). Probablement, le coût de la production des toxines, ainsi que l'hétérogénéité spatiale et temporelle des habitats, rend possible la coexistence de populations killer et sensibles, comme il est observé dans les communautés naturelles (GOLUBEV, 2006).

4. Matériels génétiques du système killer des levures

Les déterminants génétiques du phénotype killer sont à la fois cytoplasmiques et nucléaires. Ils peuvent être portés par des particules virales cytoplasmiques à ARN double brin (ARNdb), appelées « VLPs » (*Virus Like Particles*), ou par des plasmides cytoplasmiques formés d'ADN double brin (ADNdb) linéaire ou bien par un ADN chromosomique (Tableau 4) (SCHMITT et BREINIG, 2006 ; EL-BENNA *et al.*, 2011 ; STARMER et LACHANCE, 2011 ; HATOUM, 2013).

Tableau 4. Bases génétiques de l'expression du phénotype killer chez les levures (MARQUINA, 2002 ; SCHMITT et BREINIG, 2006 ; EL-BENNA *et al.*, 2011).

Base génétique	Espèce productrice de toxine killer	Gène codant pour la toxine killer
Virus à ARNdb	<i>Hanseniaporu uvarum</i>	M- ARNdb
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M1 ; M2 ; M28
	<i>Ustilago maydis</i>	M- ARNdb
	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	M- ARNdb
Plasmide linéaire à ADNdb	<i>Babjeviella inositovora</i> (<i>Pichia inositovora</i>)	pPin 1-1 ; pPin 1-3
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	pGkL 1 ; pGkL 2
	<i>Milleromyza acaciae</i> (<i>Pichia acaciae</i>)	pPac 1-1 ; pPac1-2
Chromosome	<i>Candida glabrata</i>	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	-
	<i>Milleromyza farinosa</i> (<i>Pichia farinosa</i>)	SMK 1
	<i>Pichia kluyveri</i>	-
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHR ; KHS
	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	-
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (<i>Pichia anomala</i>)	-
	<i>Williopsis mrakii</i>	HMK
<i>Williopsis saturnus</i>	-	

4.1. Génomes viraux cytoplasmiques à ARN double brins

Le système killer codé par les particules virales cytoplasmiques à ARNdb a été largement étudié chez *S. cerevisiae*, mais il a été aussi décrit pour *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailli* et *Ustilago maydis*. Ces particules virales sont classées dans le genre *Totivirus* qui appartient à la famille des *Totiviridae* (GOLUBEV, 2006 ; SCHMITT et BREINIG, 2006 ; MAQUEDA *et al.*, 2011). Contrairement à la plupart des virus des végétaux et des animaux, les virus des levures ne sont pas infectieux et ils sont transmis par division cellulaire végétative ou par fusion sexuelle des gamètes. Les génomes viraux à ARNdb sont entourés par une capsidie protéique ce qui leur permet de persister dans le cytoplasme des cellules infectées et ainsi leur donner le nom de virus des levures ou bien « *virus like particles* » (VLPs) (SCHMITT et BREINIG, 2006).

Les virus à ARNdb de type M sont responsables de la production des toxines killer et de l'immunité. Chez *S. cerevisiae*, il existe trois types de virus killer à ARNdb M : M1, M2 et M28 qui codent respectivement pour les toxines killer : K1, K2 et K28 (MARQUINA, 2002 ; SCHMITT et BREINIG, 2006). Les génomes viraux de type M sont dépendants d'un autre groupe de virus à ARNdb, nommé « *L-A helper* », qui code pour leur encapsidation et pour leur réplication (MAGLIANI, 1997 ; MAQUEDA *et al.*, 2011).

4.2. Plasmides linéaires à ADN double brins

Des plasmides linéaires cytoplasmiques à ADNdb ont été identifiés dans certaines espèces des genres *Babjeviella*, *Kluyveromyces* et *Millerozyma* (Tableau 4). L'exemple le plus connu est celui des plasmides linéaires nommés pGKL1 et pGKL2 qui sont présents dans le cytoplasme des cellules killer de *Kluyveromyces lactis* (MAGLIANI, 1997 ; EL-BENNA *et al.*, 2011). La toxine killer de *K. lactis* est codée par le plasmide pGKL1, tandis que le plasmide pGKL2 semble jouer un rôle dans la réplication du pGKL1 (SCHRÜNDER et MEINHARDT, 1995 ; MEINHARDT et SCHAFFRATH, 2001 ; STARMER et LACHANCE, 2011).

4.3. Gènes chromosomiques codant pour le phénotype killer

Chez des souches killer de certaines espèces appartenant aux genres *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Millerozyma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Wickerhamomyces* et *Williopsis*, les déterminants génétiques du système killer semblent être portés par des gènes chromosomiques (Tableau 4). Ceci est dû à l'absence, dans ces souches killer, de virus à ARNdb ou bien d'autres éléments génétiques cytoplasmiques comme les plasmides linéaires qui ne sont pas communs chez plusieurs espèces de levures (HODGSON *et al.*, 1995).

Chez la levure halotolérante, *Millerozyma farinosa* (*Pichia farinosa*), le gène (SMK1), localisé sur un chromosome, code pour une préprotoxine qui subit, par la suite, un processus de maturation similaire à celui de la toxine K1 de *S. cerevisiae*. De plus, la protéine killer produite par *Pichia kluyveri* et *Williopsis mrakii* sont probablement codées par des gènes nucléaires (STARMER et LACHANCE, 2011 ; ORO, 2013). Chez *W. mrakii*, au moins deux toxines killer différentes sont synthétisées dont la première est désignée comme HM-1 ou HMK et la seconde est nommée K-500 (MAGLIANI, 1997). En outre, les toxines killer KHR et KHS synthétisées par *S. cerevisiae* sont codées par deux gènes différents localisés sur les chromosomes IX et V (GOTO *et al.*, 1990 ; GOTO *et al.*, 1990b ; GOTO *et al.*, 1991 ; MARQUINA *et al.*, 2002).

5. Caractéristiques des toxines killer

Les toxines killer produites par les levures sont des protéines ou des glycoprotéines et peuvent être des monomères, des hétérodimères ou bien des hétérotrimères (Figure 6) (STARMER et LACHANCE, 2011). La plupart des levures killer sécrètent des toxines avec un poids moléculaire d'environ 10 à 30 kDa, bien que celles produites par *K. lactis*, *Millerozyma acaciae* (*Pichia acaciae*), *Wicherhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) et *Babjeviella inositovora* (*Pichia inositovora*) présentent des poids moléculaires beaucoup plus élevés, d'environ 100 kDa ou plus (Tableau 5) (MENEHIN *et al.*, 2010).

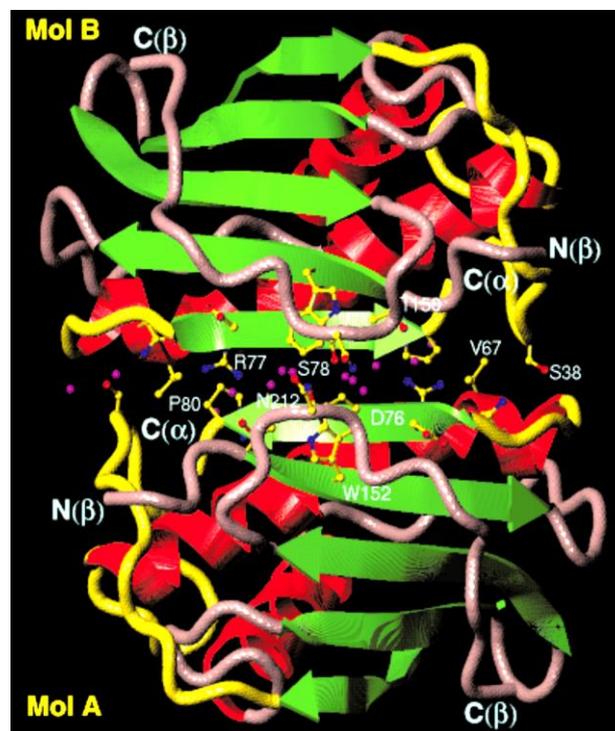


Figure 6. Structure dimère de la toxine killer SMKT produite par *Millerozyma farinosa* (*Pichia farinosa*) KK1 (KASHIWAGI, 1997).

Tableau 5. Comparaison entre les caractéristiques de différentes toxines killer.

Espèce ou souche killer	Toxine killer	Structure	Poids moléculaire (kDa)	Nature	Référence
<i>Babjeviella inositovora</i>	-	-	> 100	Glycoprotéine	MAGLIANI <i>et al.</i> (1997)
<i>Debaryomyces hansenii</i> CYC 1021	-	-	23.0	-	MARQUINA <i>et al.</i> (2001)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	-	Trimère	α (99) ; β (30) ; γ (27.5)	-	MAGLIANI <i>et al.</i> , (1997)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (<i>Kluyveromyces fragilis</i>) NCYC 587	K6	-	42.3	Protéine	İZGÜ <i>et al.</i> (1999)
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> DBVPG 6077	Kwkt	-	72.0	Protéine	COMITINI <i>et al.</i> (2004) ; COMITINI et CIANI (2010)
<i>Millerozyma acaciae</i>	-	Trimère	α (97) ; β (31) ; γ (28)	-	MAGLIANI <i>et al.</i> (1997)
<i>Millerozyma farinosa</i> KK1	SMKT	Dimère	α (6.6) ; β (7.9)	Glycoprotéine	SUZUKI et NIKKUNI (1994)
<i>Pichia kluyveri</i> 1002	-	Monomère	19.0	Glycoprotéine	MIDDLEBEEK <i>et al.</i> (1979)
<i>Pichia membranifaciens</i> CYC 1106	PMKT	-	18.0	Protéine	SANTOS <i>et al.</i> (2000)
<i>Pichia membranifaciens</i> CYC 1086	PMKT2	-	30.0	Protéine	SANTOS <i>et al.</i> (2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K1	Dimère	α (9.5) ; β (9.0)	Protéine	MARQUINA <i>et al.</i> (2002)
	K2	Dimère	α β (21.5)	Glycoprotéine	MARQUINA <i>et al.</i> (2002)
	KT28	Dimère	α (10) ; β (11)	Glycoprotéine	MARQUINA <i>et al.</i> (2002)
	KHR	-	20.0	Protéine	GOTO <i>et al.</i> (1990a)

Tableau 5. Comparaison entre les caractéristiques de différentes toxines killer (la suite).

<i>Schawnniomyces occidentalis</i> ATCC 44252	-	Dimère	7.4 ; 4.9	Protéine	CHEN <i>et al.</i> (2000)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> YF07b	-	-	67.0	Protéine	GUO <i>et al.</i> (2013)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> WC65	-	Monomère	83.3	-	MARQUINA <i>et al.</i> (2002)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> NCYC 434	K5	-	49.0	Glycoprotéine	İZGÜ et ALTINBAY (2004)
<i>Williopsis saturnus</i> DBVPG 4561	KT4561	-	~ 62	Protéine	BUZZNI <i>et al.</i> (2004)
<i>Williopsis saturnus</i> WC91-2	-	-	11.0	Protéine	WANG <i>et al.</i> (2012)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> 412	KT412	-	10.0	Protéine	RADLER <i>et al.</i> (1993)

Les voies de sécrétion des toxines killer sont complètement identifiées pour les toxines K1 et K28 de *S. cerevisiae* (GOLUBEV, 2006 ; EL-BENNA *et al.*, 2011). Malgré que les deux toxines se différencient dans leur composition en acides aminés et dans leur mode d'action, leur synthèse et maturation ainsi que leur sécrétion montrent une grande homologie. Les protéines killer K1 et K28 sont codées par des virus à ARNdb et sont composées de deux sous-unités, nommées α et β . Ces toxines, sont d'abord traduites en préprotoxine qui subit, par la suite, des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi conduisant enfin à sa sécrétion sous forme d'une protéine mature hétérodimérique (α/β) (Figure 7). Les deux sous-unités sont liées d'une manière covalente par un ou bien plus d'un pont disulfure (SCHMITT et BREINIG, 2006). En effet, la préprotoxine pénètre le réticulum endoplasmique à l'aide d'un peptide signal hautement hydrophobe au niveau de la région N-terminale. Ce dernier est éliminé dans le réticulum endoplasmique par une enzyme signal peptidase et la glycosylation de la sous-unité centrale γ aura lieu. Dans l'appareil de Golgi, l'endopeptidase Kex2p, qui est le produit du gène KEX2, clive la pro-région et élimine la séquence intramoléculaire γ N-glycosylée. Ensuite, une carboxypeptidase Kex1p, produite par le gène KEX1, élimine la région dipeptidique sur l'extrémité C-terminale de la sous-unité α . La toxine mature est transférée donc dans une vésicule de sécrétion et sécrétée à l'extérieur de la cellule (Figure 7) (SCHMITT et BREINIG, 2002 ; MOHAMUDHA PARVEEN et AYESHA BEGUM, 2010).

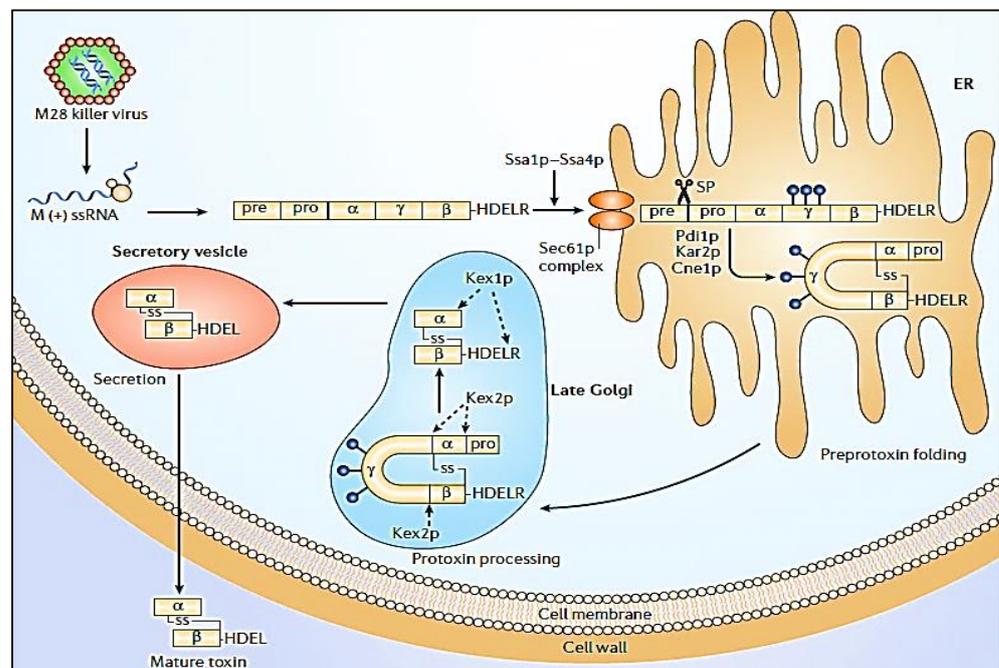


Figure 7. Voie de sécrétion de la toxine K28 chez *Saccharomyces cerevisiae* (SCHMITT et BREINIG, 2006).

6. Mode d'action des toxines killer

Bien que leur mécanisme d'action killer contre les cellules sensibles montre des différences significatives, les protéines killer des levures présentent un mode d'action en deux étapes (DE INGENIIS *et al.*, 2009 ; GUO *et al.*, 2013).

6.1. Fixation

La première étape de l'action toxique des protéines killer consiste en une fixation sur la paroi cellulaire des cellules sensibles cibles. Cette étape est rapide et dépendante du pH (MARQUINA, 2002 ; GUO *et al.*, 2013).

La paroi cellulaire des levures présente quatre classes des macromolécules qui sont les suivantes dans l'ordre de leur emplacement, de l'extérieur vers l'intérieur : les mannoprotéines sont retrouvées dans la couche externe. Ce sont des glycoprotéines fortement glycosylées qui comportent 95% de glucides. La couche interne, constituée de plusieurs sous-couches, est composée majoritairement de deux classes de β -glucanes, le β -(1,3) et le β -(1,6) glucanes avec une quantité mineure de chitine (Figure 8) (BASMAJI, 2005).

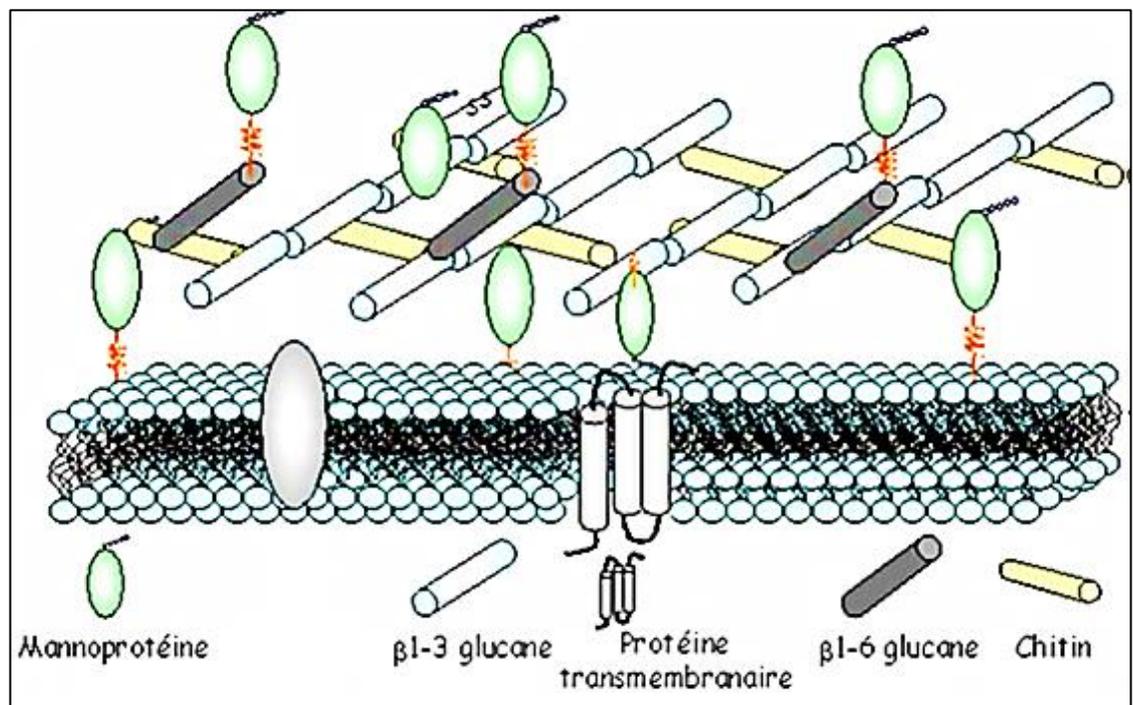


Figure 8. Structure de la paroi cellulaire des levures (BASMAJI, 2005).

Ces composés servent comme sites de fixation primaire pour les toxines killer des levures. Les β -(1,6) glucanes sont des récepteurs primaires pour les protéines killer de *D. hansenii*, *H. uvarum*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae* (K1, K2), *W. anomalus* et *W. saturnus*. Les mannoprotéines sont des récepteurs pour *S. cerevisiae* (K28), *S. occidentalis* et *Z. bailii*, tandis que les résidus de chitine constituent un site de liaison spécifique pour les toxines killer de *K. lactis* et *M. acaciae* (POMMIER, 2003 ; GOLUBEV, 2006 ; SANTOS *et al.*, 2009 ; EL-BENNA *et al.*, 2011).

6.2. Action toxique

L'action toxique des protéines killer commence avec la migration des protéines killer fixées à travers la paroi, vers la membrane plasmique. Cette seconde étape est un processus énergie-dépendant qui implique la translocation des toxines fixées vers la membrane cytoplasmique et l'interaction avec les récepteurs membranaires.

Les protéines killer exercent leur action toxique contre les cellules sensibles par différents mécanismes. Les toxines killer K1 et K2 produites par *S. cerevisiae* ont un mode d'action très similaire, bien qu'elles soient deux protéines différentes (MARQUINA, 2002). La toxine K1 liée au glucane récepteur est ensuite transférée sur un site récepteur membranaire (Kre 1p, une protéine O-glycosylée), selon un mécanisme nécessitant une fourniture d'énergie (SCHMITT et BREINIG, 2006 ; STARMER et LACHANCE, 2011). Ainsi, les cellules en phase de croissance sont plus sensibles à l'effet killer que les cellules en phase stationnaire. Les membranes plasmiques des cellules sensibles, exposées à la toxine, manifestent après une phase de latence de quarantaine de minutes, de graves altérations fonctionnelles se traduisant par l'interruption du transport couplé des acides aminés et des protons, l'acidification du contenu cellulaire et des fuites des ions potassium (K^+) et d'ATP (Figure 9). Ces dégâts, dus à la formation de pores dans la membrane plasmique, entraînent la mort de la cellule qui survient après deux ou trois heures de contact avec la toxine (RIBEREAU-GAYON, 2004 ; GOLUBEV, 2006 ; SCHMITT et BREINIG, 2006).

L'action de la toxine killer sécrétée par *P. kluyveri* est très similaire à celle de K1. Elle induit donc une perturbation dans le transport des protons et des acides aminés. Par la suite, la synthèse de certaines protéines et acides nucléiques est inhibée. Enfin, une fuite d'ATP intracellulaire et une perte de potassium accompagnée d'une diminution du pH intracellulaire se produisent, ce qui conduit à la mort de la cellule sensible (MARQUINA, 2002 ; EL-BANNA *et al.*, 2011).

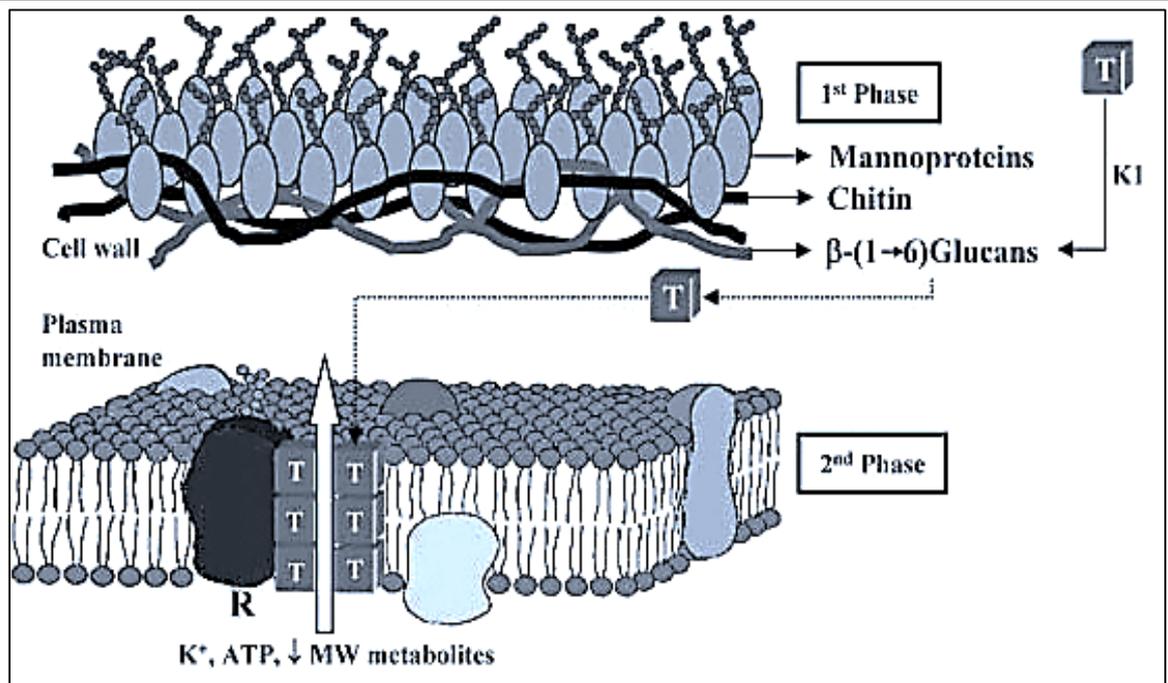


Figure 9. Mode d'action de la toxine killer K1 de *Saccharomyces cerevisiae* (MARQUINA, 2002).

Pareillement, la levure halotolérante *M. farinosa* synthétise une toxine killer qui semble également être impliquée dans l'augmentation de la perméabilité membranaire et provoque la perte des ions (SUZUKI *et al.*, 2001).

La toxine killer K28 de *S. cerevisiae* se diffère des toxines K1 et K2 du fait qu'elle agit sur le cycle cellulaire de différentes façons. La toxine K28 se fixe initialement aux résidus α -(1,3) mannose d'une mannoprotéine (185 kDa) de la paroi cellulaire et ensuite à un récepteur dans la membrane plasmique. La protéine killer pénètre dans la cellule par endocytose et suit, en sens inverse, la voie de sécrétion pour entrer dans le cytosol et finalement le noyau. Elle provoque donc l'inhibition du cycle cellulaire dans la phase G2 et s'implique d'une manière directe ou indirecte dans l'inhibition de la synthèse d'ADN (STARMER et LACHANCE, 2011).

La protéine killer produite par *K. lactis* provoque un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1, tandis que la toxine de *Lindnera mrakii* (*Williopsis saturnus* var. *mrakii*) inhibe la synthèse des β -(1,3) glucanes ce qui conduit à la perte du matériel cellulaire et éventuelle mort cellulaire (STARMER et LACHANCE, 2011 ; SANTOS *et al.*, 2013).

7. Paramètres déterminant l'intensité de l'interaction

L'intensité de l'interaction killer dépend de la sensibilité propre de la souche considérée, de la quantité de toxine fixée, de l'état physiologique des cellules et des conditions environnementales.

7.1. Sensibilité

Les premiers éléments déterminant à la fois la vitesse et l'amplitude de l'action létale dans les systèmes killer/sensible sont la nature de la protéine killer en jeu et celle de la souche sensible. Ainsi, une hiérarchisation des souches de levures peut être établie selon leur sensibilité à une même toxine. Pour ce faire, différentes techniques de quantification de l'interaction ont été développées. On distingue deux catégories : les techniques en milieu solide basées sur le principe des antibiogrammes (JANDEROVA *et al.*, 1999), et les techniques en milieu liquide, basées sur un suivi cinétique de la viabilité de cellules sensibles en contact avec la toxine (RAMON-PORTUGAL *et al.*, 1994).

7.2. Quantité de toxine

L'effet killer est dépendant de la concentration en toxine dans le milieu (KLASSEN et MEINHARDT, 2005 ; SANTOS et MARQUINA, 2011). Au-delà de la concentration absolue en protéine killer, c'est plus précisément le rapport entre la quantité de toxine et la quantité de cellules sensibles qui est fondamental. Plusieurs auteurs suggèrent ainsi que pour provoquer la mort d'une levure, il est nécessaire qu'un nombre minimum de molécules de toxine soient fixées sur ses parois. Ce nombre minimum est un taux d'occupation limite, qui est variable d'une souche sensible à une autre. PALFREE et BUSSEY (1979) annoncent par exemple un chiffre de 6000 molécules pour une souche sensible *S. cerevisiae* S6, BUSSEY *et al.* (1979) un chiffre de 28000 molécules pour une souche sensible *S. cerevisiae* S14a. Il est à noter que même en conditions de large excès de toxine, il existe un temps minimum avant d'observer l'effet killer. Ce temps, court, correspond aux étapes de migration de la toxine vers la membrane plasmique et de formation de spores autorisant la fuite de composés intracellulaires (l'étape de fixation sur la paroi étant quasi-instantanée). Il a été estimé à 20 minutes pour la toxine K1 sur des cellules sensibles *Saccharomyces cerevisiae* S6 (KURZWEILOVA et SIEGLER, 1995).

7.3. Etat physiologique

Probablement en raison du lien existant entre les besoins énergétiques des cellules sensibles et l'ampleur des dégâts causés par la toxine killer, on constate que des levures en phase exponentielle

de croissance sont plus sensibles que des levures en phase stationnaire (BUSSEY, 1972 ; MAGLIANI *et al.*, 1997).

7.4. Environnement

De nombreux facteurs environnementaux ont une influence parfois majeure sur l'expression du phénomène killer. On cite ici les principaux, d'après la revue bibliographique proposée par ALFENORE (1999) :

- *La température* : l'activité optimale des protéines killer se situe généralement entre 15°C et 25°C. Au-delà de 30°C, la plupart des toxines sont totalement désactivées ;
- *Le pH* : la gamme d'expression de l'activité killer est assez restreinte, puisque qu'elle se situe entre pH = 2,5 et pH = 7 pour la plupart des toxines ;
- *La présence de sels ou d'ions métalliques* : il a été montré que les cations métalliques Ca^{2+} et Mg^{2+} ou le NaCl sont susceptibles d'augmenter l'activité de la protéine K1. En revanche, le KCl présent en quantité trop importante est néfaste à l'expression de l'activité killer ;
- *La présence de composés organiques* : l'éthanol en concentration élevée atténue parfois l'effet killer, alors que les polyols assurent le maintien de l'activité toxique ;
- *La présence de composés spécifiques* : la bentonite, les débris de parois cellulaires et les polyphénols, possèdent une capacité d'adsorption des protéines killer et peuvent réduire considérablement la toxicité au sein des milieux de fermentation.

8. Applications

Les levures killer et leurs toxines trouvent des applications dans différents domaines. En biologie cellulaire, le système killer des levures fournit un excellent modèle pour l'étude des parois et des membranes plasmiques chez les champignons et les levures, des mécanismes de transcription protéique et de l'interaction virus-hôte dans les cellules eucaryotes (RIFFER *et al.*, 2002 ; POMMIER *et al.*, 2003). Par ailleurs, les systèmes killer peuvent avoir des applications biotechnologiques, à la fois dans les industries alimentaires et de fermentations ainsi que dans le domaine de la médecine. Dans la technologie de l'ADN recombinant, les plasmides killer de *K. lactis* présente un potentiel d'utilisation comme vecteurs de clonage pour la sécrétion efficace des protéines hétérologues (MARQUINA *et al.*, 2002).

8.1. Industries alimentaire et de fermentation

De nombreuses souches de levures commerciales utilisées dans la production du vin, de la bière et du pain, se sont révélées être sensibles aux toxines killer. Par conséquent, les souches killer sauvages peuvent provoquer des fermentations prolongées et affecter négativement la qualité des produits. Des souches œnologiques killer peuvent être utilisées comme des cultures starter afin de contrôler la croissance des souches de contamination durant les premiers stades de fermentation. En effet, avec le développement de la génétique moléculaire et de la biotechnologie, la construction de souches œnologiques modifiées pour un ou plusieurs caractères killer est possible. On peut y parvenir par cytoduction, c'est-à-dire par introduction dans une souche œnologique sensible des déterminants cytoplasmiques (mitochondries, plasmides) issus d'une souche killer, sans altérer le caryotype de la souche œnologique initiale (RIBEREAU-GAYON, 2004 ; GOLUBEV, 2006). D'autre part, SANTOS *et al.* (2009) ont reporté que la toxine killer PMKT2 de *P. membranifaciens* peut être utilisée dans la production du vin pour contrôler la croissance des levures de détérioration. La toxine PMKT2 est capable d'inhiber *Brettanomyces /Dekkera bruxellensis* tandis que *S. cerevisiae* s'est avérée être résistante.

Le système killer des levures est également prisé pour la conservation alimentaire. Ainsi, la toxine killer HMK produite par *L. mrakii* trouve des applications potentielles dans la protection d'ensilages de maïs ou encore de yaourts contre les contaminations par des levures (LOWES *et al.*, 2000). En outre, *L. mrakii* présente un potentiel d'utilisation comme agent de biopréservation pour le contrôle de la détérioration des fromages (LIU et TSAO, 2009). Les propriétés killer des souches de *Tetrapisispora phaffii* (*Kluyveromyces phaffii*) sont également étudiées, pour le développement d'agents de biopréservation contre les contaminations du raisin par des levures apiculées du genre *Hanseniaspora* ou *Kloeckera* (CIANI et FATICHENTI, 2001 ; COMITINI et CIANI, 2011).

Du à leur grande tolérance au pression osmotique, les levures killer du genre *Kluyveromyces* présentent ont été évaluées comme agent de préservation naturel dans les aliments fermentés salés (HERNANDEZ *et al.*, 2008 ; STARMER et LACHANCE, 2011). En outre, des attentions considérables ont été donnée aux espèces killer de *M. farinosa*, une levure halotolérante avec de nouvelles propriétés killer (SUZUKI *et al.*, 2001).

8.2. Taxonomie

Les levures forment un groupe de microorganismes eucaryotes très hétérogène. Bien que plusieurs critères discriminants permettent de caractériser et de différencier des levures ascomycètes et basidiomycètes, la distinction de levures différentes est souvent difficile. Les études moléculaires

ont montré que plusieurs caractéristiques classiques utilisées pour définir les taxons : la fermentation et l'assimilation des sucres, la présence des spores et la morphologie. A ce stade, la recherche pour des tests simples, qui peuvent être largement utilisés, est d'une grande importance. Un de ces tests peut consister à trouver les différences de sensibilité aux toxines produites par les levures killer, qui sont actives contre des levures taxonomiquement apparentées aux producteurs de toxines killer. Selon les différentes sensibilités aux toxines, il est possible de regrouper en catégories qui sont reproductibles, même si d'autres caractéristiques sont différentes (MARQUINA *et al.*, 2002 ; FARKAZ *et al.*, 2012).

8.3. Médecine

Le système killer trouve des applications dans le domaine médical, en particulier, dans le biotypage des levures pathogènes *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* (OCHIGAVA *et al.*, 2011 ; FARKAZ *et al.*, 2012). Le potentiel d'utilisation des toxines killer dans le domaine de la protection et le traitement des infections fongiques a été également suggéré (GUO *et al.*, 2013). Les protéines killer sont protéase-sensibles, antigéniques et très labiles aux températures et pH physiologiques. Leur utilisation comme nouveaux agents antimycotiques peut être seulement efficace dans le traitement des lésions superficielles. Par leur nature protéique, les protéines killer ne peuvent pas être administrées par voie orale ou intraveineuse (GOLUBEV, 2006). Cependant, il a été possible de développer une vaccination idiotypique fournissant une immuno-protection qui reflète une toxine microbicide (POLONELLI *et al.*, 1993 ; 1994 ; 1997, 2003). La méthode utilise des anticorps anti-idiotypiques qui semblent partager le site actif de la protéine killer produite par *W. anomalus*. Ils imitent, par conséquent, l'effet killer de la toxine sécrétée contre *C. albicans*, responsable des infections vaginales et difficile à éradiquer (MARQUINA *et al.*, 2002 ; GOLUBEV, 2006 ; STARMER et LACHANCE, 2011).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1. Échantillonnage

L'échantillonnage est effectué à partir de deux biotopes dans la région de Constantine (Nord-Est Algérien) : 1- échantillon sol agricole situé dans la localité de Hamma Bouziane (Nord-Est Constantine, 15 Km) 2- échantillon sol forestier localisé dans le campus Chaab-Erassas de l'Université Frères MENTOURI Constantine.

La région de Constantine se caractérise par un climat de type continental (<http://www.algerie-monde.com/villes/constantine>), une température moyenne annuelle de 15°C et une pluviométrie annuelle de 560 mm (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Constantine>).

La liste des échantillons et de leurs régions d'origine est représentée dans le tableau 6 et la figure 10.

Tableau 6. Provenance des échantillons de sol utilisés pour l'isolement des levures.

Échantillons	Localisation	Profondeurs
Sol agricole	Hamma Bouziane (Constantine).	10, 15, 20, 25, 30 et 35 cm
Sol forestier	Campus Chaab-Erassas, Université Frères Mentouri (Constantine).	

Les différents échantillons sont déposés sur des papiers d'aluminium stériles soigneusement enveloppés dans des sacs en papiers stériles. Ils sont ensuite gardés au frais (4°C) puis transférés au laboratoire pour une analyse immédiate.

2. Isolement des levures

1g de sol est introduit dans 9 ml d'eau distillée stérile (solution mère). La suspension est agitée pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur Vortex. Une série de dilutions décimales (10^{-1} jusqu'à 10^{-5}) est ensuite préparée à partir de la solution mère. Un échantillon de 0.1 ml de chaque dilution, est ensuite étalé sur milieu YMA (Annexe 1), rendu sélectif par un pH acide 3.7 (KURTZMAN *et al.*, 2011a; HASHEM *et al.*, 2014). La gentamicine (0.04 mg/ml), un antibiotique, est ajoutée pour inhiber la croissance des bactéries gram positif et négatif (Bouix et Leveau, 1991 ; Tarr, 2004).

Les boîtes de Pétri sont incubées à 25°C pendant 5 jours. Les colonies bien isolées, sont observées au microscope à l'objectif 40, pour vérifier la morphologie et l'homogénéité des cellules.

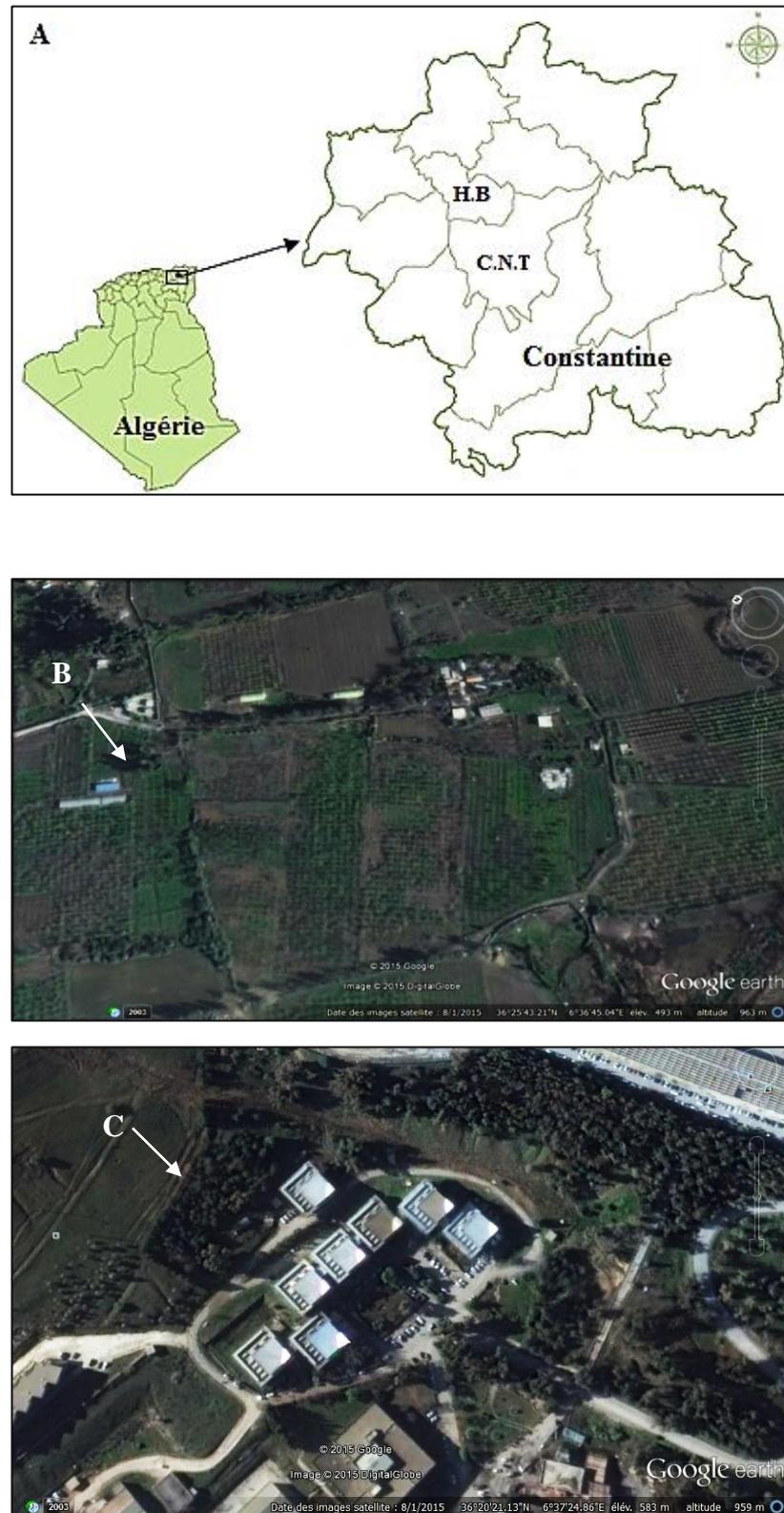


Figure 10. Localisation géographique des deux régions de récolte des échantillons de sol (A). (H.B : Hamma Bouziane ; C.N.T : Constantine). Images satellite du site d'échantillonnage du sol agricole (B) et du sol forestier (C) (Images obtenues de Google Earth, Avril 2015).

3. Purification et conservation des levures isolées

Après isolement, les isolats de levures sont purifiés par la technique d'épuisement sur le milieu YPGA (Annexe 1). L'incubation est réalisée à 25°C pendant 72h. L'aspect macroscopique et microscopique est, ensuite, examiné afin de vérifier la pureté de la souche. Les cultures pures sont conservées sur le même milieu en gélose inclinée puis stockée à 4°C.

4. Méthodes d'identification des souches de levures

4.1. Méthode conventionnelle

L'identification des levures isolées, selon les méthodes conventionnelles, repose sur la détermination de divers caractères culturels, morphologiques et physiologiques (KURTZMAN *et al.*, 2011a). La composition des milieux de cultures utilisés figure dans l'annexe 1.

4.1.1. Etude des caractères culturels

Les caractères culturels des souches isolées sont étudiés en milieu liquide et sur milieu solide.

- *Caractères culturels en milieu liquide*

L'aspect des cultures en milieu liquide est étudié dans des tubes à essai contenant le milieu YPG liquide (Annexe 1). Les cultures sont incubées à 25°C et observées après 3, 14 et 28 jours. L'aspect de la culture de chaque isolat est soigneusement noté: la présence de dépôt au fond du tube (sédimentation des cellules) ainsi que la présence de voile ou de pellicule en surface.

- *Caractères culturels sur milieu solide*

Cette étude est faite sur milieu YPG gélosé. L'ensemencement se fait en stries. Après incubation pendant 1 - 7 jours à 25°C, des observations sur la forme, la couleur, l'aspect et la pigmentation des colonies sont notées.

4.1.2. Etude des caractères morphologiques

- *Morphologie cellulaire normale et mode de reproduction végétative*

Cette étude a pour but l'examen microscopique de la forme, la taille, l'arrangement et le mode de reproduction végétative des cellules. L'examen est réalisé à l'état frais (grossissement x 40) de frottis préparés à partir de cultures fraîches en bouillon YPG.

- *Aptitude à la filamentation*

L'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur milieu PDA (Annexe 1) en boîte de Pétri. La levure à examiner est ensemencée en une strie longitudinale à la surface du milieu gélosé. Une lamelle stérile est ensuite placée sur le centre de la strie. L'observation microscopique (grossissement x 40) se fait sur une période allant de 3 à 7 jours. La bordure de la culture, sa filamentation ainsi que la nature de mycélium (pseudomycélium ou vrai mycélium) sont notées.

4.1.3. Etudes des caractères biochimiques et physiologiques

Les caractéristiques biochimiques et physiologiques étudiées, sont l'assimilation de sources de carbone et d'azote, la fermentation de sucres et la croissance à des températures différentes.

- *Assimilation de substrats carbonés*

L'étude de l'assimilation des sources carbonées est réalisée sur milieu minimum YNB (Annexe 1), additionné de 0.5 % de source de carbone. Ce milieu est stérilisé par filtration (diamètre, $\emptyset = 0.22 \mu\text{m}$), puis réparti dans des tubes contenant 4.5 ml d'eau distillée stérile (0.5 ml/tube). Les substrats carbonés sont: le D-glucose, le D-galactose, le saccharose, le D- maltose, le α, α tréhalose, le lactose et le raffinose. L'assimilation de la source carbonée se traduit par une croissance de la souche dans le milieu après incubation à 25°C pendant 01 à 03 semaines.

- *Assimilation de substrats azotés*

Les sources azotées testées sont le nitrate de potassium (KNO_3) et le nitrite de sodium (NaNO_2). Le milieu utilisé dans cette étude est YCB (Annexe 1) additionné d'une quantité du substrat azoté équivalente à 0.078% de KNO_3 (0.026% pour le NaNO_2), puis stérilisé par filtration. L'incubation se fait à 25°C pendant 01 à 03 semaines. L'assimilation de la source azotée se traduit par un trouble dans le milieu de culture. La confirmation des résultats positifs est réalisée par transfert d'un inoculum (0.1 ml) de la culture précédente dans un nouveau tube contenant le même milieu culture sans la source azotée (même période et même température d'incubation).

- *Fermentation de substrats carbonés*

Les sucres testés sont : le D-glucose, le D-galactose, le D- maltose, le saccharose, le α, α tréhalose et le lactose. La solution de base utilisée pour la fermentation de sucres est le milieu YP (Annexe 1), réparti dans des tubes de Durham (contenant une cloche de Durham). Des solutions stériles de sucres sont ajoutées au milieu à raison de 2%. Les tubes sont ensemencés avec 0.1 ml

d'une suspension de levures. Les cultures sont incubées à 25°C sous agitation et observées après 3, 7, 14 et 28 jours. La fermentation du sucre est mise en évidence avec la présence du gaz dans la cloche de Durham.

- *Test de croissance à des températures différentes*

Cette étude est réalisée dans un milieu YPG liquide. Les tubes sont ensemencés avec 0.1 ml d'une suspension de levure (absorbance $_{580} = 0.5$ ou 10^6 /ml). Les cultures sont incubées à différentes températures : 4°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C et 40°C. La croissance des levures est suivie chaque semaine pendant 28 jours.

L'ensemble des tests de la méthode conventionnelle sont praticables mais ne sont pas satisfaisants pour la délimitation et l'identification des espèces de levures. De plus, leur mise en œuvre est longue et difficile, les lectures s'étendant parfois sur plusieurs semaines. Ainsi, les méthodes d'identification moléculaire sont largement répandues (VANHEE *et al.*, 2009 ; MOREL, 2013).

4.2. Méthode d'identification moléculaire

Cette identification nécessite l'extraction de l'ADN d'une culture pure. Elle repose sur l'amplification de la région D1/D2 du gène de l'ARN ribosomique 26S (ARNr 26S) (Figure 11) et ensuite sur le séquençage de l'amplicon obtenu (KURTZMAN et ROBNETT, 1998 ; LOPEZ *et al.*, 2010). Cette région comporte des séquences fortement conservées et des séquences qui présentent un fort degré de variabilité génétique entre les espèces de souches levuriennes.

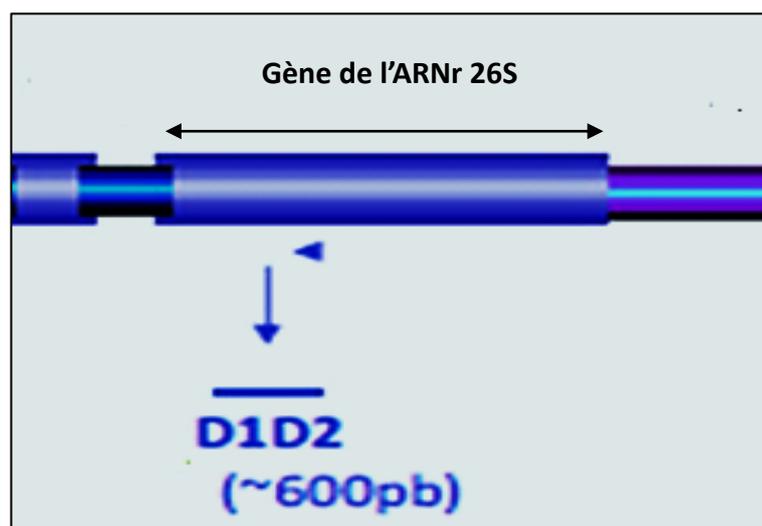


Figure 11. Schéma représentatif du gène de l'ARNr 26S et la localisation de la région hypervariable D1/D2 (MOREL, 2013).

4.2.1. Extraction d'ADN

La méthode de BOLANO *et al.* (2001) est utilisée pour l'extraction de l'ADN génomique total des isolats obtenus de cultures fraîches incubées pendant 48-96 h à 25°C sur milieu YPG agar. Les cellules sont collectées à la surface des boîtes de Pétri, puis mélangées à 500 µl de tampon de lyse [Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM/L, EDTA 50 mM/L, NaCl 250 mM/L, SDS 0.3% w/v], dans un microtube à vis. 150 µl de billes de verre (de diamètre entre 0.25 à 0.30 mm) sont ajoutées ainsi que 500 µl de solution phénol chloroforme (1 :1, v/v, pH 8.0). Le mélange est agité vigoureusement au Vortex pendant 3 min afin de casser les cellules. Une centrifugation (30 min, 12000 rpm) permet de séparer 4 phases : les billes de verre (en culot), la phase phénolique (contenant les protéines et les lipides), les débris cellulaires et la phase aqueuse (en surnageant contenant l'ADN et l'ARN). Cette dernière (environ 400 µl) est transférée dans un nouveau microtube, à laquelle est ajouté un volume égal d'éthanol glacé (96%). Le mélange est homogénéisé par inversion du tube, puis maintenu à -20°C pendant 30-60 min, ce qui permet la précipitation de l'ADN. Après une centrifugation (15 min, 12000 rpm, 4°C) et l'élimination du surnageant, le culot d'ADN est dissout dans 100 µl d'eau distillée stérile avec 4 µl de RNase afin d'éliminer les ARNs. Après une incubation de 30 min à 37°C, 11 µl d'acétate de sodium (0.3 M) sont ajoutés ainsi que 200 µl d'éthanol glacé (96%). Après une centrifugation (15 min, 12000 rpm, 4°C), le culot d'ADN est mélangé à 500 µl d'éthanol (70%). Le mélange est agité au Vortex pendant 30 secondes au minimum. Une dernière centrifugation (15 min, 13000, 4°C) permet de récupérer le culot d'ADN génomique qui est ensuite parfaitement séché avant d'être dissout dans 100 µl d'eau distillée stérile. La solution d'ADN est maintenue à -20°C.

2.4.2. Amplification de l'ADN extrait par PCR

Cette expérience consiste à multiplier, par la technique de PCR, la quantité d'ADN extraite de chaque isolat. La réaction de PCR se fait dans un volume final de 50 µl : 5 µl de tampon Taq polymérase (10X) ; 4 µl de MgCl₂ (25 mM) ; 10 µl de dNTPs (1.25 mM) ; 0.2 µl de Taq polymérase (5 U/µl) ; 2.5 µl de chaque amorce (Tableau 7) ; 5 µl d'ADN génomique. La réaction d'amplification est faite dans le thermocycleur (Biometra[®] GmbH, Goettingen, Germany) selon le programme décrit en annexe 2.

Tableau 7. Couples d'amorces utilisés dans la PCR.

Nom des amorces	Séquence des amorces
RLR3R	5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC-3'
V9	5'-TGCGTTGATTACGTCCCTGC-3'

2.4.3. Séquençage de l'ADN

Le séquençage des produits PCR est confié à la société MacroGen Inc. (Amsterdam, Pays-Bas). Ainsi, une région de 600 – 650 paires de bases (domaine D1/D2) est séquencée par l'utilisation des amorces NL1 et NL4 (Sigma) (Tableau 8) (LOPEZ *et al.*, 2010 ; TURCHETTI *et al.*, 2013). Les souches sont identifiées par une recherche BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de séquences D1/D2 déposées dans la base de données GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). L'alignement des séquences est effectué par le logiciel Vector NTI Suite 8 ContigExpress (Informax, Invitrogen, Camarillo, CA).

L'analyse phylogénétique permet la comparaison et le rapprochement des séquences en se basant à la fois sur des paramètres purement mathématiques et statistiques et sur des données biologiques d'évolution. Les comparaisons phylogénétiques des séquences de même taille sont réalisées à partir du logiciel « *Molecular Analysis Evolutionary Genetics Analysis* » (MEGA) version 4.1 selon la fonction des plus proches voisins (Tamura *et al.*, 2007). Les distances phylogénétiques sont consolidées par 1000 répétitions de *bootstrap* (Turchetti *et al.*, 2013).

Tableau 8. Couples d'amorces utilisées dans le séquençage de la région D1/D2 du gène codant pour l'ARNr 26S de la grande sous-unité ribosomique.

Nom des amorces	Séquence des amorces
NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'

5. Test de la mise en évidence de l'activité killer chez les souches isolées

Les essais préliminaires de la mise en évidence de l'activité killer chez les isolats de levures sont faits sur le milieu solide YPG agar additionné de 0.003 % de bleu de méthylène (YPG-BM agar) et tamponné à pH 4.5 avec un tampon citrate-phosphate (0.1 M) (19.2 g/L d'acide citrique, 28.4 g/L de Na₂HPO₄ dans 1 litre d'eau distillée) (BUZZINI *et al.*, 2004 ; COMITINI *et al.*, 2004 ; GUO *et al.*, 2013).

Un total de 43 souches de levures et d'organismes ressemblant à des levures appartenant aux 24 espèces d'intérêt alimentaire et médical de *Candida albicans* (nombre de souches 4), *C. glabrata* (5), *C. parapsilosis* (1), *C. tropicalis* (4), *C. zeylanoides* (1), *Clavispora lusitaniae* (2), *Cryptococcus laurentii* (3), *Debaryomyces hansenii* (1), *Dekkera anomala* (1), *D. bruxellensis* (1), *Filobasidiella bacillispora* (1), *F. neoformans* (4), *Hanseniaspora uvarum* (1), *Kazachstania exigua* (1), *Kluyveromyces lactis* (1), *K. marxianus* (1), *Meyerozyma guilliermondii* (1), *Pichia kudriavzevii* (1), *Saccharomyces cerevisiae* (3), *S. pastorianus* (1), *Yarrowia lipolytica* (1), *Zygosaccharomyces bisporus* (1), *Prototheca wickerhamii* (1) et *Prototheca zopfii* (2) sont utilisées pour le test de sensibilité (La liste détaillée est représentée dans l'annexe 3). Ces souches proviennent de la collection internationale des levures « *Industrial Yeast Collection DBVPG* » (www.dbvp.unipg.it) de l'Université de Pérouse (Italie).

Une suspension de cellules (en eau distillée stérile) de chaque souche sensible, est préparée à partir d'une culture en gélose inclinée de YPG agar, incubée pendant 48 h à 25°C. 100 µl de suspension sont ensuite mélangées avec le milieu YPG-BM agar (maintenu à 45°C dans un bain marie), afin d'obtenir une concentration finale de 10⁵ cellules/ ml, puis coulée dans des boites de Pétri stériles.

Les isolats de levures, testées pour leur activité killer, sont cultivés pendant 24 h à 25°C sur gélose inclinée du milieu YPG agar, puisensemencés en surface du milieu YPG-BM agar après solidification. Les cultures sont incubées pendant 5 jours à 25°C. L'apparition d'une zone claire d'inhibition, autour des colonies des souches potentiellement killer, entourée par de petites cellules colorées en bleu foncé révèle la présence d'une activité killer.

6. Production de la toxine killer brute

6.1. Souche killer d'intérêt

Le test préliminaire de la mise en évidence de révèle la présence du caractère killer chez la souche L5 isolée à partir d'un sol agricole dans la région de Hamma Bouziane (Constantine, Nord-Est Algérien). La souche L5 est identifiée comme étant *Pichia kluyveri* par séquençage du domaine D1/D2 du gène codant pour l'ARNr 26S de la grande sous-unité ribosomique.

6.2. Milieu de production

Le milieu utilisé pour la production de la toxine killer par la souche *P. kluyveri* (L5) est YPG liquide tamponné à pH 4.0 avec un tampon citrate-phosphate (0.1 M) (SANTOS et MARQUINA, 2004 ; da Silva *et al.*, 2008). Auparavant, le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 15 minutes à 121°C.

6.3. Pré-culture

Une pré-culture de la souche killer *P. kluyveri* (L5) à 10^5 cellules/ ml est préparée dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 250 ml de milieu de production et inoculée à partir d'une colonie isolée de la boîte de conservation. La culture se déroule pendant 24 h à 20°C avec une agitation de 100 rpm.

6.4. Culture principale

Un inoculum de 10 ml de pré-culture est transféré dans un erlenmeyer de 2L contenant 1L du milieu de production. La culture se déroule pendant 24 h à 20°C avec une agitation de 100 rpm. Après centrifugation (12 000 rpm, 15 min, 4°C), un volume d'éthanol glacé (concentration finale 80%) est ajouté au surnageant contenant la protéine killer (BUZZINI *et al.*, 2004). Le mélange est incubé à 4°C pendant une nuit, le précipité résultant est récupéré par centrifugation (12 000 rpm, 30 min, 4°C) puis re-solubilisé dans 36.5 ml du tampon citrate-phosphate 0.1 M (pH 4.0). La solution obtenue représente l'extrait brut de la toxine killer de *P. kluyveri*.

7. Test d'activité killer de la toxine brute

Un total de 121 souches de levures (provenues de la collection DBVPG) appartenant aux 24 espèces de détérioration des aliments (Statford, 2004) sont utilisées comme souches sensibles à

l'action toxique de la protéine killer. Il s'agit de *Candida parapsilosis* (nombre des souches 5), *Debaryomyces fabryi* (3), *Debaryomyces hansenii* (1), *Debaryomyces nepalensis* (1), *Dekkera anomala* (3), *Dekkera bruxellensis* (8), *Hanseniaspora uvarum* (5), *Kazachistania exigua* (5), *Kluyveromyces lactis* (6), *Kluyveromyces marxianus* (3), *Meyerozyma guilliermondii* (2), *Pichia kudriavzevii* (5), *Pichia membranifaciens* (5), *Rhodotorula mucilaginosa* (5), *Saccharomyces bayanus* (5), *Saccharomyces cerevisiae* (15), *Saccharomyces pastorianus* (3), *Schizosaccharomyces pombe* (5), *Torulaspora delbrueckii* (5), *Torulaspora microellipsoidea* (5), *Wickerhamomyces anomalus* (4), *Yarrowia lipolytica* (4), *Zygosaccharomyces bailii* (5) et *Zygosaccharomyces bisporus* (13). La liste détaillée est représentée dans l'annexe 3.

L'évaluation de l'activité killer de l'extrait brut de la protéine killer est faite par la méthode de diffusion par puits sur gélose pour la détermination des diamètres des zones d'inhibition telle que décrite par Woods et Bevan (1968) (BUZZINI *et al.*, 2004 ; COMITINI *et al.*, 2004). Des puits de 8 mm de diamètre sont creusés sur le milieu YPG-BM agar (pH 4.5), préalablement inoculé avec 10^5 cellules/ml de souche sensible puis, 100 μ l de l'extrait brut de la protéine killer sont introduits dans chaque puits. Après une pré-diffusion pendant une nuit à 4°C, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 5 jours à 25°C. Les essais sont répétés 2 fois. La superficie de la zone d'inhibition autour des puits est utilisée comme une évaluation semi-quantitative de l'activité killer de l'extrait brut. Une unité arbitraire (Ua) est définie par la quantité de protéine killer, nécessaire pour la production d'une zone d'inhibition avec une superficie de 10 mm² (BUZZINI *et al.*, 2004 ; LIU *et al.*, 2012).

8. Traitement protéasique de la toxine killer brute

100 μ l de la toxine killer brute (0.45 mg de protéine/ml) est mélangé avec 100 μ l de l'enzyme protéolytique pronase (100 UI/ml) (Sigma). Le mélange est ensuite incubé à 25°C pendant 24 h. Une inactivation par la chaleur (choc thermique) est réalisée en parallèle.

L'activation killer résiduelle est évaluée par la technique de diffusion par puits sur gélose comme décrit ci-dessus.

9. Cinétique de production de la toxine killer

La cinétique de production de la toxine killer par la souche *P. kluyveri* (L5) est réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu de production. 5 ml d'une pré-culture de la souche productrice L6, cultivée à 20°C pendant 24 h sous agitation (100 rpm) dans le milieu de production, sont inoculés dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml du même milieu de culture. Les erlensensemencés sont ensuite incubés à 20°C sous agitation (100 rpm) pendant 3 jours. Les prélèvements sont effectués toutes les 08 heures afin de déterminer la biomasse par mesure spectrophotométrique (DO = 580nm). Après centrifugation (12 000 rpm, 15 min, 4°C), le surnageant est récupéré pour l'évaluation de l'activité killer par la technique de diffusion en puits sur gélose. Les expérimentations sont effectuées en trois essais.

10. Purification de l'extrait brut de la toxine killer par gel-filtration

Après la production de la toxine killer par *P. kluyveri* L5, l'extrait brut (36.5 ml) de la toxine est dialysé (12 – 14 kDa ; Medicell) contre le tampon citrate-phosphate 0.01 M (pH 4.0) pendant 3 jours à 4°C et le tampon est changé quotidiennement. Ce processus est effectué à 4°C, à laquelle la plupart des protéines killer maintiennent leur activité (BUZZINI *et al.*, 2004 ; SANTOS *et al.*, 2009). La fraction protéique obtenue est ensuite concentrée avec le polyéthylène glycol (PEG) à un volume final de 2.4 ml.

Le concentré (3.84 mg de protéine, 2.4 ml) est appliqué à une colonne Sephacryl S-200 (HR, 1.5 × 50 cm) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) qui est préalablement équilibrée par un tampon citrate-phosphate 0.01 M (pH 4.0) contenant 0.15 M de NaCl. L'élution (débit 0.24 ml/min) est faite à 4°C en utilisant le même tampon et l'activité protéique est détectée par mesure de l'absorbance à 260 nm. Des fractions de 0.6 ml sont collectées en sortie toutes les 2.5 min, regroupées puis dialysées à 4°C contre le tampon citrate-phosphate 0.01 M (pH 4.0). Les fractions de dialyses sont ensuite concentrées avec le PEG à un volume final de 2.0 ml. L'activité killer des fractions concentrées est vérifiée par la technique de diffusion en puits contre *D. bruxellensis* DBVPG 6706 (la souche la plus sensible).

11. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE)

Après la gel-filtration, les fractions concentrées obtenues (au nombre de 9) sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) selon la technique décrite par LAEMMLI (1970). L'électrophorèse est réalisée sur un gel à 10% d'acrylamide (Bio-rad) de 1.5 mm d'épaisseur. Après migration, les gels sont colorés à la fois par le bleu de Coomassie R-250 (Sigma) (GUO *et al.*, 2013) et par le nitrate d'argent (BUZZINI *et al.*, 2004).

La masse moléculaire de la protéine killer est estimée par comparaison au mélange de standards protéiques : la myosine (200 kDa), la b-galactosidase (116 kDa), la phosphorylase B (97 kDa), l'albumine bovine (66 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), l'anhydrase carbonique (29 kDa) (Sigma). Il existe une relation linéaire entre le logarithme de la masse moléculaire et la distance de migration des marqueurs (Rapport frontal, Rf).

La concentration en protéine est déterminée par la méthode de BRADFORD (1976) en utilisant le sérum albumine bovine comme standard (Figure 12).

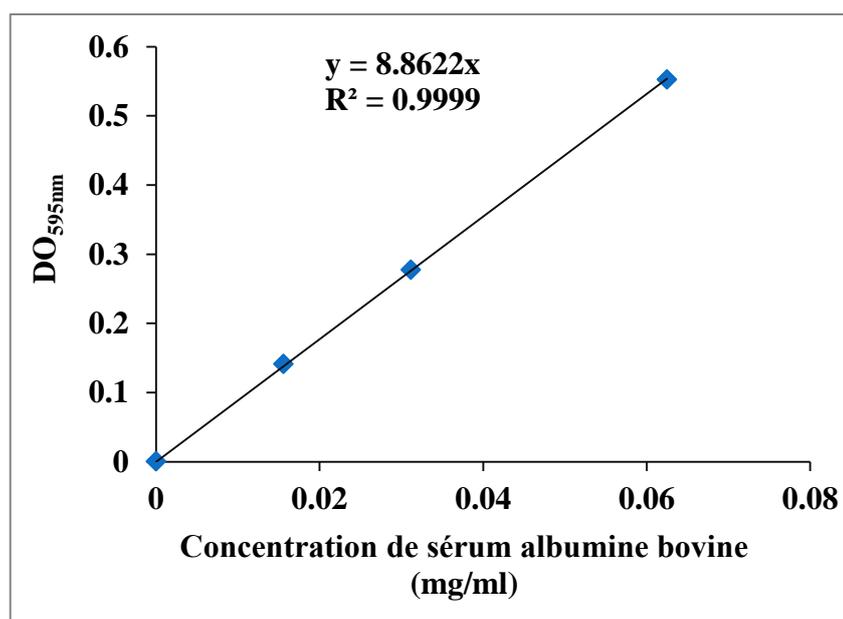


Figure 12. Courbe d'étalonnage de Sérum Albumine Bovine avec une solution mère de 2 mg/ml.

12. Effet du pH et de la température sur l'activité de la toxine killer purifiée

L'effet du pH sur l'activité killer est testé dans le milieu YPG-MB agar ajusté à des solutions de pH variables de 3.0 à 7.5. Le milieu est inoculé avec la souche sensible *D. bruxellensis* DBVPG 6706 (concentration finale 10^5 cellules/ml) et les cultures sont incubées à 25°C en présence d'aliquotes de 100 µl de la protéine killer purifiée. La superficie de la zone d'inhibition est évaluée après 5 jours d'incubation.

Afin d'étudier l'effet de la température sur l'activité killer, des boîtes de Pétri avec YPG-BM agar (pH 4.5) sontensemencées avec *D. bruxellensis* DBVPG 6706, puis incubées avec des aliquotes de 100 µL de la toxine killer purifiée aux températures suivantes : 10, 20, 25, 30 et 37°C. La superficie de la zone d'inhibition est déterminée après 5 jours d'incubation.

13. Détermination de la CMI de la toxine killer purifiée

La CMI ou concentration minimale inhibitrice de la toxine killer purifiée est déterminée par la méthode de microdilution en milieu liquide selon les standards définis par *The Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) (CLSI, 2002). Le milieu de culture préconisé pour cette technique est le bouillon RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institut*) sans bicarbonate mais avec L-glutamine (Sigma), tamponné avec 0.165 mol/L de tampon MOPS (Sigma). Le pH du milieu est ajusté à 4.5 avec 1M HCl comme préconisé par İZGÜ *et al.* (2007) et GORETTI *et al.* (2009).

Les souches sensibles testées sont *D. anomala* (DBVPG 3766, DBVPG 4075), *D. bruxellensis* (DBVPG 6704, DBVPG 6705, DBVPG 6706, DBVPG 6710), *S. cerevisiae* (DBVPG 6173, DBVPG 6500) et *Z. bisporus* (DBVPG 6382, DBVPG 6383). La concentration finale est fixée à 5×10^5 cellules/ml.

La protéine killer purifiée est dissoute dans des microtubes stériles, contenant du RPMI-1640, de manière à générer une gamme de dilution de base 2. La gamme de concentration est alors reproduite dans une microplaque à 96 puits. 50 µl de chaque dilution sont transférés dans les puits de la microplaque (puits A à H), qui contiennent chacun 50 µL de milieu RPMI-1640 inoculé avec la levure cible (puits 1 à 10). Les concentrations finales de la gamme ainsi générée sont comprises entre 0.0312 et 2 µg/ml pour la toxine killer (Figure 13). Il est à noter que le puits (H) correspond à la culture témoin (cellules cultivées en absence de protéine killer).

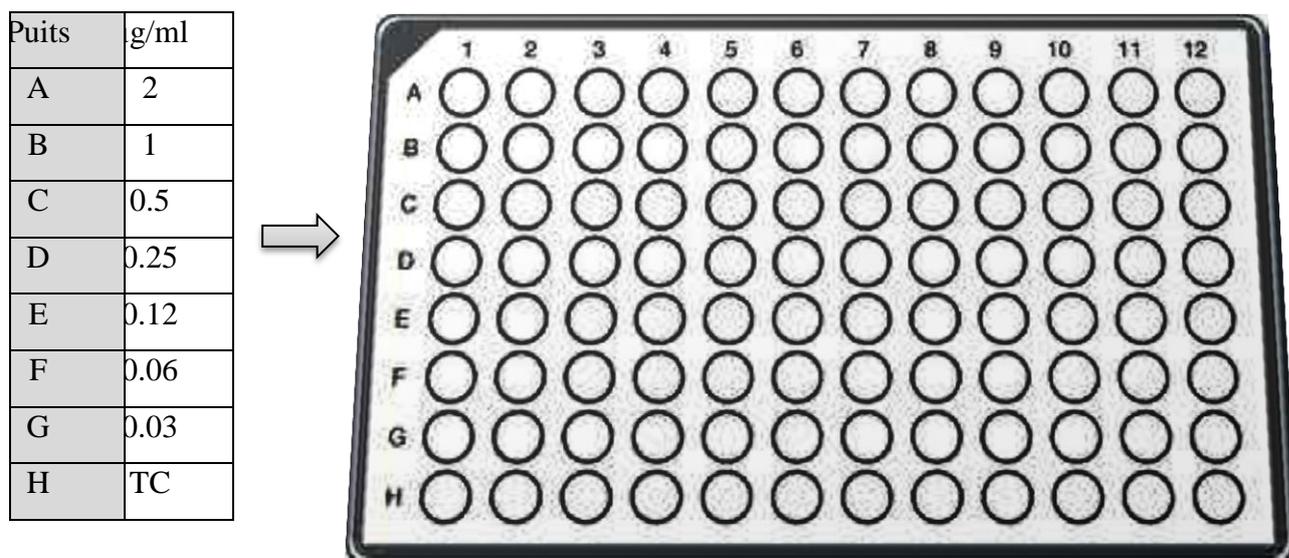


Figure 13. Détermination de la CMI de la protéine killer sur la microplaque. (TC : Témoin de culture).

Les expérimentations sont réalisées en deux essais. La croissance des souches sensibles est observée à l'œil nu après 72 h d'incubation à 25°C. La CMI est alors enregistrée comme la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

14. Détermination de la CMI du métabisulfite de potassium, du sorbate de potassium et de l'éthanol

Après la détermination de la CMI de la protéine killer purifiée, les souches qui donnent la plus faible valeur de CMI sont sélectionnées pour servir à la détermination de la CMI de métabisulfite de potassium, de sorbate de potassium et de l'éthanol selon la technique de microdilution en milieu liquide (CLSI, 2002). Pour cela, *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500 sont retenues.

Une série de dilutions de raison de 2 de premier terme sont préparées dans le milieu RPMI-1640. Les concentrations finales obtenues des composés actifs varient de 8 à 512 µg/ml pour le métabisulfite de potassium ou le sorbate de potassium et de 1.25 à 80 mg/ml pour l'éthanol. Les

expérimentations sont effectuées en deux essais. Les microplaques sont mises à l'étuve pendant 72 h à 25°C.

15. Détermination de la concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) et de l'indice CIF (Σ CIF) de la protéine killer purifiée associée avec le métabisulfite de potassium le sorbate de potassium ou l'éthanol

La méthode de l'échiquier en microdilution bidimensionnelle est utilisée pour déterminer la présence d'une interaction entre la protéine killer purifiée et le métabisulfite de potassium, le sorbate de potassium ou bien l'éthanol. Les levures *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500 sont utilisées comme étant souches sensibles. Ainsi, des combinaisons sont faites dans le milieu RPMI-1640 (pH 4.5) en utilisant des microplaques à 96 puits selon la technique décrites par PILLAI *et al.* (2005). Pour cela, une série de dilutions de raison 2 est préparée dans le milieu RPMI 1640 pour obtenir des concentrations finales qui varient de 0.0312 à 2 µg/ml pour la protéine killer, de 1.25 to 80 mg/ml for l'éthanol et de 8 à 512 µg/ml pour le métabisulfite de potassium ou le sorbate de potassium.

Les microplaques sont incubées pendant 72 h à 25°C. Les expérimentations sont réalisées en deux essais.

La valeur de la concentration fractionnaire inhibitrice (CIF) est calculée comme suit (PILLAI *et al.*, 2005) :

- CIF de protéine killer = CMI de protéine killer + éthanol (ou métabisulfite de potassium ou sorbate de potassium, utilisés dans la combinaison)/CMI de protéine killer utilisée seule.
- CIF de l'éthanol = CMI de l'éthanol + protéine killer (utilisée dans la combinaison)/CMI de l'éthanol utilisé seul.
- CIF de métabisulfite de potassium = CMI de métabisulfite de potassium + protéine killer (utilisée dans la combinaison)/CMI de métabisulfite de potassium utilisé seul.
- CIF de sorbate de potassium = CMI de sorbate de potassium + protéine killer (utilisée dans la combinaison)/CMI de sorbate de potassium utilisé seul.

L'indice CIF (Σ CIF) est déterminé par la formule suivante (PILLAI *et al.*, 2005) :

Σ CIF = CIF de protéine killer + CIF de l'éthanol (ou de métabisulfite de potassium ou bien de sorbate de potassium).

Selon la littérature (ODDS, 2003), lorsque Σ CIF ≤ 0.5 , il y a un effet synergétique entre les deux composés utilisés en association. Par contre, lorsque $0.5 < \Sigma$ CIF ≤ 4 , il y a une interaction additive, tandis que Σ CIF ≥ 4 indique la présence d'un effet antagoniste entre les deux composés.

16. Evaluation de l'activité killer de la toxine killer purifiée sur des contaminants de boissons

Deux boissons commerciales, une boisson gazeuse rafraichissante « *Campari MIXX* » (pH 2.9, 5% jus de raisin, 6.5 % alcool) de *Campari Spa* (Milan, Italie) et un jus de poire « *Santal* » (pH 3.5, sucre totaux 143g/L) de *Parmalat Spa* (Parma, Italie) achetées à partir de marchés locaux, sont utilisées pour évaluer l'activité killer et la stabilité de la protéine purifiée dans les boissons. La boisson gazeuse est stérilisée par filtration en utilisant des filtres de diamètre (\varnothing 0.22 μ m), tandis que le jus de poire est pasteurisé par vapeur pendant 10 min à 121°C.

Les souches sensibles d'altération, *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500, sont inoculées respectivement dans 2 ml de boisson gazeuse ou de jus de poire afin d'obtenir une concentration cellulaire initiale de 10^5 cellules/ml, par analogie étroite avec d'autres expérimentations similaires précédentes (CIANI et FATICHENTI, 2001 ; COMITINI *et al.*, 2004).

Compte tenu des résultats obtenus dans le test précédent de la détermination de la CMI, la protéine killer purifiée est ajoutée dans les deux boissons à la fois pour obtenir les concentrations finales suivantes : 0.125, 0.25 et 0.5 μ g/ml pour la boisson gazeuse et 0.5, 1 et 2 μ g/ml pour le jus de poire.

Il est à noter qu'une culture témoin (cellules cultivées en absence de la protéine killer purifiée) est préparée en parallèle. Les expérimentations sont réalisées dans des conditions statiques à 25°C pour la boisson gazeuse et à 20°C pour le jus de poire, prenant en considération les conditions optimales de croissance pour les deux souches cibles. La croissance de *D. bruxellensis* DBVPG 6706 dans la boisson gazeuse est contrôlée pendant 7 jours. Par contre, *S. cerevisiae* DBVPG 6500 est incubée pendant 30 h dans le jus de poire, en raison de son taux de croissance élevé.

- **Dénombrement des cellules viables sur milieu solide**

Il s'agit du dénombrement des cellules de *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500 qui restent vivantes après exposition à la protéine killer purifiée pendant un temps donné afin d'évaluer l'action killer de la toxine killer produite par *P. kluyveri* (L5).

Pour cela, des prélèvements (0.5 ml) sont effectués à partir des cultures des deux souches sensibles dans la boisson gazeuse et le jus de poire. Une série de dilutions décimales successives (de 10^{-1} à 10^{-6}) est ensuite réalisée dans l'eau distillée stérile à partir des échantillons prélevés. Un volume de 0.1 ml de chaque dilution est étalé de façon uniforme à la surface du milieu YPG agar en boîtes de Pétri. Les boîtesensemencées sont incubées pendant 5 jours à 25°C. Toutes les expérimentations sont réalisées en trois essais. Les résultats du dénombrement sont exprimés en UFC/ml (Unité Formant Colonie par ml).

17. Etude de la stabilité de la protéine killer purifiée dans des boissons

Pour vérifier la stabilité de la toxine killer dans les deux boissons étudiées, la toxine purifiée est ajoutée à des volumes de 500 µl de la boisson gazeuse et du jus de poire avec des concentrations finales de 0.5 et 1 µg/ml, respectivement. La boisson gazeuse est incubée à 25°C pendant 10 jours, tandis que le jus de poire est incubé à 20°C pendant 3 jours. L'activité résiduelle de la toxine killer est évaluée en boîte de Pétri par la méthode de diffusion par puits sur gélose. Les souches d'altération *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500 sont utilisées comme souches cibles.

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

1. Isolement des souches de levures

L'isolement des levures se fait à partir d'un sol agricole situé dans la région de Hamma Bouzine et d'un sol forestier localisé dans le campus Chaab Erssas de l'Université Frères MENTOURI. Les deux sites d'isolement sont situés dans la Wilaya de Constantine (Nord-Est Algérien). 15 souches de levures (L1 – L15) sont isolées et répertoriées. Leur répartition en fonction des sites d'échantillonnage est récapitulée dans le Tableau 9.

Tableau 9. Isolement des souches de levures.

Localité	Origine	Souches isolées
Région de Hamma Bouziane (Constantine)	Sol agricole Profondeur 10 cm.	L1
	Sol agricole Profondeur 15 cm.	L2 L3 L5 L6
	Sol agricole Profondeur 20 cm.	L4
Campus Chaab-Erssas de l'Université Frères MENTOURI (Constantine)	Sol forestier Profondeur 10 cm.	L15
	Sol forestier Profondeur 20 cm.	L7 L8
	Sol forestier Profondeur 25 cm.	L12 L13
	Sol forestier Profondeur 30 cm.	L9 L10
	Sol forestier Profondeur 35 cm.	L11 L14

La population de levures dans le sol dépend considérablement du biotope et donc des éléments nutritifs utiles à leur survie (CONNELL *et al.*, 2008). Ainsi, les échantillons du sol forestier renferment plus de souches de levures (60%) par rapport au sol agricole (40%). Ce résultat peut probablement être expliqué par la présence de différents éléments nutritifs apportés par la décomposition de la matière organique végétale dans le sol forestier (> 3.44%) par rapport au sol agricole (2.84%) cultivé (MUSHTAQ *et al.*, 2004). Dans le sol, l'estimation du nombre total des levures suggère qu'elles représentent un nombre très faible 10^4 à 10^6 cellules/g de sol, comparé à celui des bactéries et des moisissures de l'ordre de 4×10^6 à 7×10^7 /g de sol (BOTHAS, 2006 ; WALKER, 2009 ; STARMER et LACHANCE, 2011).

La compétition pour les nutriments peut probablement être le facteur le plus important dans l'écologie des levures. Parmi les facteurs physicochimiques qui affectent l'écologie des levures, les sources d'énergie, les éléments nutritifs, la température, le pH et l'eau semblent être les plus importants (MUSHTAQ *et al.*, 2004 ; BOTHAS, 2006).

Ainsi, la région de Constantine est caractérisée par un climat continental, une température moyenne annuelle de 15°C et une pluviométrie annuelle de 560 mm (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Constantine>). Par ailleurs, les échantillons de sol possèdent un pH neutre à légèrement basique (pH 7.4 pour le sol forestier et pH 7.5 pour le sol agricole) favorisant plutôt une reproduction rapide des populations bactériennes au dépens de celle des levures qui sont plutôt acidophiles (pH optimum entre 4.5 et 5.5) (DEAK, 2006). Cependant, des levures peuvent tolérer une large gamme de pH et se développent à des valeurs de pH comprises entre 3.0 et 10 (DEAK, 2006 ; CONNELL *et al.*, 2008).

D'autre part, les levures capsulées (comme le genre *Cryptococcus*) peuvent survivre mieux dans les habitats pauvres en aliments que les autres formes présentes dans le sol. De même, les formes sporulantes arrivent à résister dans le sol en raison de leur grande tolérance pendant les périodes de dessiccation et aux températures élevées (STARMER et LACHANCE, 2011).

2. Identification des souches isolées

2.1. Identification moléculaire

L'identification moléculaire, comme indiqué dans la partie matériel et méthodes, est réalisée au niveau des laboratoires de la collection des levures industrielles DBVPG (Perugia, Italie) en collaboration avec la société Macrogen (Amsterdam, Pays-Bas). Elle est basée sur l'amplification par PCR et sur le séquençage des amplicons de la région hypervariable D1/D2 du gène codant

pour l'ARNr 26S de la grande sous-unité ribosomique (KURTZMAN et ROBNETT, 1998 ; LOPEZ *et al.*, 2010). De nombreux travaux ont souligné la fiabilité et la rapidité de cette méthode dans l'identification des levures ascomycètes ou basidiomycètes (BAFFI *et al.*, 2011 ; BALEIRAS COUTO *et al.*, 2005 ; ZANOL *et al.*, 2010 ; TURCHETTI *et al.*, 2013 ; RESKI-BEKKI, 2014 ; SELVA-BEDOYA *et al.*, 2014).

Les séquences obtenues sont comparées aux séquences D1/D2 déposées dans la base de données GenBank. Les identités de séquences (100%) permettent de classer les 15 isolats de levures en 6 espèces : *Cryptococcus aerius* (ordre des Filobasidiales), *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kluyveri* et *Saccharomyces cerevisiae* (Ordre des Saccharomycétales). L'ensemble de ces résultats sont représentés dans le tableau 10 et le rapport de l'alignement des séquences est en annexe 4.

La présence de *C. aerius* dans le sol n'est pas étonnante car les espèces du genre *Cryptococcus* sont fréquemment isolées à partir des échantillons du sol, indiquant ainsi que la niche écologique de ces levures est bien le sol. En effet, le genre *Cryptococcus* est capable de produire des capsules exopolymérique, lui permettant de mieux survivre dans les habitats pauvres en éléments nutritifs ainsi qu'en périodes de dessiccation et aux températures élevées (BOTHA, 2006, STARMER et LACHANCE, 2011).

L'espèce *P. kluyveri* est bien connue depuis longtemps associées aux plantes et aux différents fruits, tels que les prunes, les pommes, les poires (SPENCER *et al.*, 1992 ; VADKERTIOVA *et al.*, 2012). Sa présence dans les échantillons du sol agricole, riche en pruniers, peut s'expliquer par le dépôt de fruits (pruniers) dans le sol qui exercent donc un effet sur sa distribution (PHAFF et STARMER, 1987). Elle peut être également transportée par les insectes (*Drosophila* sp.) lors de leur visite sur les fruits (MAGLIANI *et al.*, 1997).

La large gamme d'habitat de *H. uvarum* et *M. guilliermondii* (CADEZ et SMITH, 2011 ; KURTZMAN, 2011b) est en adéquation avec sa présence dans les échantillons du sol agricole.

En revanche, *H. opuntiae* a comme principal habitat la surface des fruits (CADEZ et SMITH, 2011 ; ASSIS *et al.*, 2014). Il est peu probable que la distribution de cette souche dans le sol est liée à la décomposition des résidus des plantes ainsi qu'au transport par les insectes (MAGLIANI *et al.*, 1997).

S. cerevisiae est une espèce à présence ubiquitaire dans la nature (WANG *et al.*, 2012). Elle peut se retrouver dans les sols associés aux arbres (BOTH, 2006) ce qui peut expliquer sa présence dans les échantillons du sol forestier (notre isolement).

Tableau 10. Résultats du séquençage des amplicons obtenus après PCR, de la région D1/D2 du gène de l'ARNr 26S et comparaison aux séquences de la base de données GenBank.

Ordre	Espèces	Code la souche	Identités
Saccharomycétales	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	L1	548/548 (100%)
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	L2	545/545 (100%)
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	L3	543/543 (100%)
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	L4	547/547 (100%)
	<i>Pichia kluyveri</i>	L5	542/543 (99%)
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	L6	547/547 (100%)
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	L7	546/546 (100%)
	<i>Meyerzoma guilliermondii</i>	L8	541/543 (99%)
	<i>Meyerzoma guilliermondii</i>	L9	543/544 (99%)
	<i>Meyerzoma guilliermondii</i>	L10	542/543 (99%)
	<i>Meyerzoma guilliermondii</i>	L11	543/544 (99%)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L12	556/556 (100%)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L13	556/556 (100%)
Filobasidiales	<i>Cryptococcus aerius</i>	L14	580/581 (99%)
	<i>Cryptococcus aerius</i>	L15	564/564 (100%)

L'analyse phylogénétique des séquences D1/D2 du gène de l'ARNr 26S des 15 souches isolées avec les espèces apparentées confirme l'appartenance des 15 isolats aux espèces : *C. aerius*, *H. uvarum*, *H. opuntiae*, *M. guilliermondii*, *P. kluyveri* et *S. cerevisiae* (Figure 14 et 15).

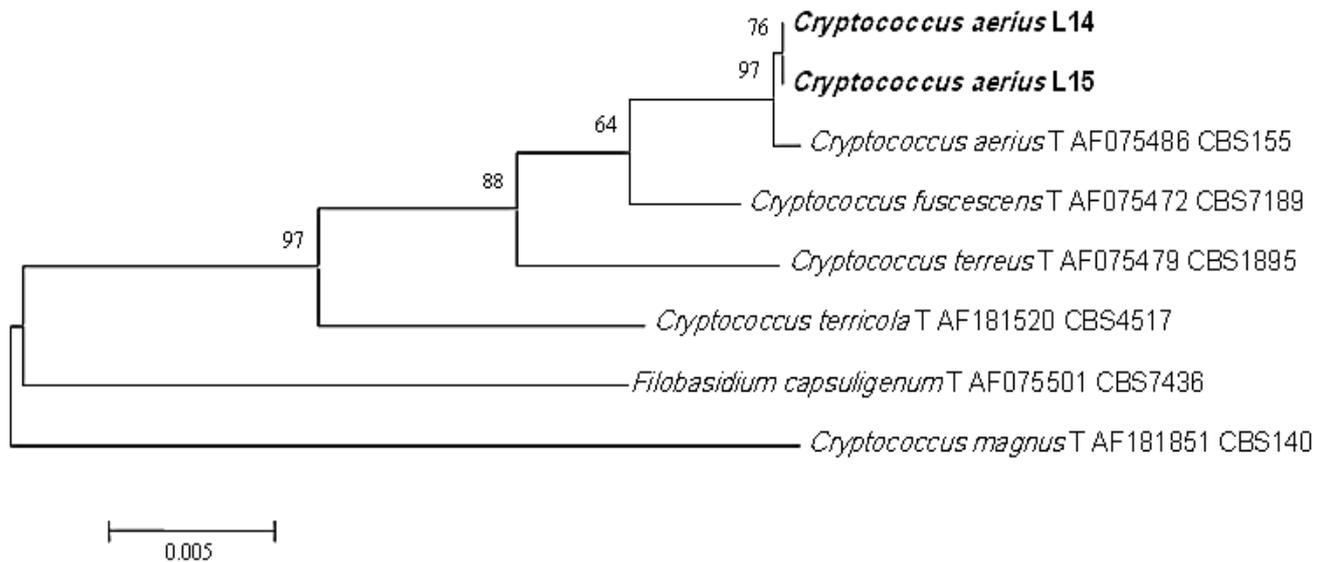


Figure 14. Arbre phylogénétique basée sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 26S, et montrant la relation des isolats L14 et L15 (Ordre des Filobasidiales) avec les espèces types du genre *Cryptococcus* et *Filobasidium*. Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux de Bootstrap (1000 répliques), la barre 0.005 indique le nombre de substitution par position de nucléotide.

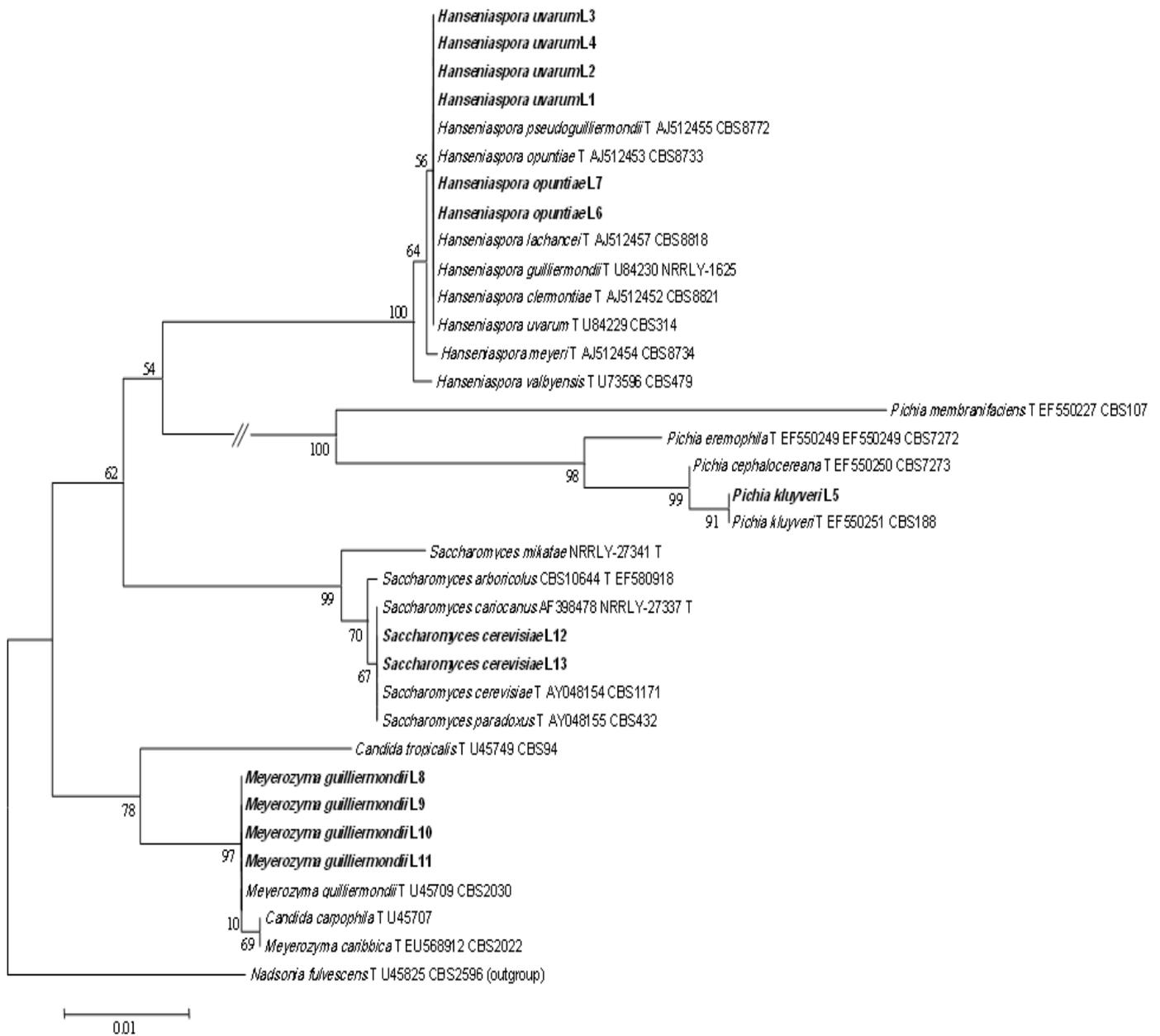


Figure 15. Arbre phylogénétique basée sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 26S, et montrant la relation des isolats L1-L13 (ordre des Saccharomycétales) avec les espèces types des genres *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Nadsonia* et *Saccharomyces*. Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux de Bootstrap (1000 répliques), la barre 0.01 indique le nombre de substitution par position de nucléotide.

2.2. Identification conventionnelle

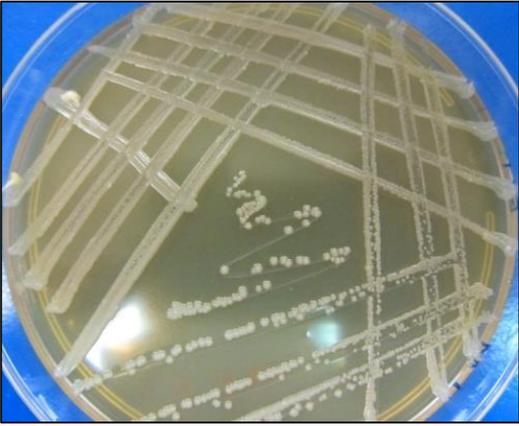
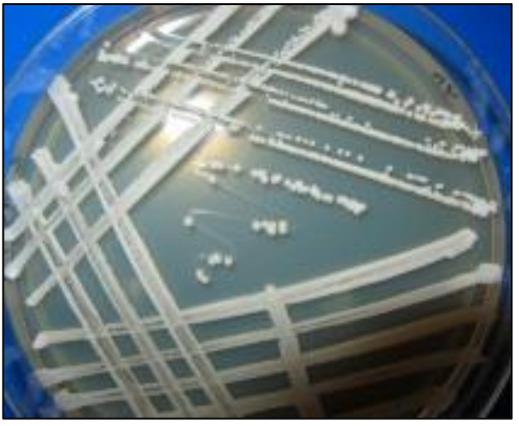
Bien que les données de séquences d'ADN soient la source principale d'information pour l'identification des isolats, l'identification conventionnelle est utile pour la confirmation de ces résultats. Ainsi, les caractéristiques culturelles, morphologiques et physiologiques des souches isolées sont déterminées selon les méthodes décrites par KURTZMAN *et al.* (2011a).

2.2.1. Caractères cultureux

Après culture de 3 jours à 25°C sur milieu YPGA, les souches possèdent en commun la forme ronde, le contour régulier, la surface lisse et bombée (Tableau 11). Cependant, des différences d'aspect sont notées chez *H. opuntiae* qui forme des colonies plates, tandis que *P. kluyveri* donne des colonies mates et plissées (Tableau 11).

La croissance des isolats de levures en milieu YPG liquide se manifeste de façon différente. Après 14 jours d'incubation à 25°C, on note la formation de l'anneau en surface chez l'ensemble des souches, excepté pour *P. kluyveri* et *S. cerevisiae*. En revanche, on observe la présence d'une pellicule qui nappe la paroi du tube uniquement chez la souche *P. kluyveri*. Elle correspond à des polysaccharides produits par cette souche (REZKI-BEKKI, 2011). Les dépôts, qui renseignent sur la masse cellulaire sont présents chez l'ensemble des souches isolées (Tableau 12).

Tableau 11. Caractères culturels des souches de levures isolées après une culture de 3 jours sur YPGA à 25°C.

Code des souches	Espèces	Caractères culturels sur milieu solide	Vue d'ensemble de la boîte
L1 ; L2 ; L3 ; L4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie ronde - Crème - Bombée à centre Elevé - Surface lisse et Brillante - Marge régulière 	
L5	<i>Pichia kluyveri</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie ronde - Blanchâtre - Bombée - Mate et plissée - Dentelée 	
L6 ; L7	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie ronde - Crème - Plate à centre élevé - Lisse et brillante - Marge régulière 	

L8 ; L9 ; L10 ; L11	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie ronde - Blanchâtre - Bombée à centre Elevé - Lisse et brillante - Marge régulière 	
L12 ; L13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie ronde - Blanche à crème - Bombée - Lisse - Marge régulière 	
L14 ; L15	<i>Cryptococcus aerius</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie ronde - Jaunâtre à crème - Bombée - Lisse et brillante - Marge régulière 	

Tableau 12. Caractères culturels sur milieu YPG liquide après 14 jours d'incubation à 25°C.

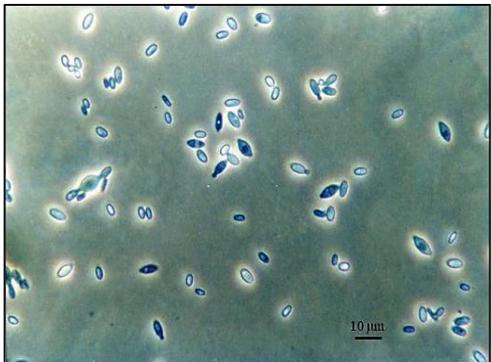
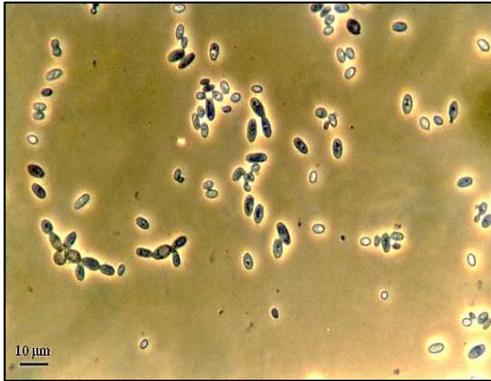
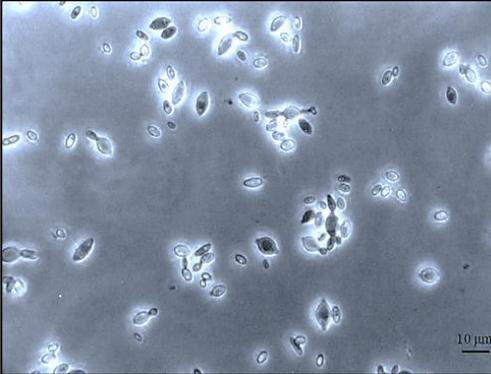
Code des souches	Espèces	Caractères culturels sur milieu liquide : YPG		
		Dépôt	Anneau	Pellicule
L1 ; L2 ; L3 ; L4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	+	-
L5	<i>Pichia kluyveri</i>	+	-	+
L6 ; L7	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	+	+	-
L8 ; L9 ; L10 ; L11	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	+	-
L12 ; L13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-
L14 ; L15	<i>Cryptococcus aerius</i>	+	+	-

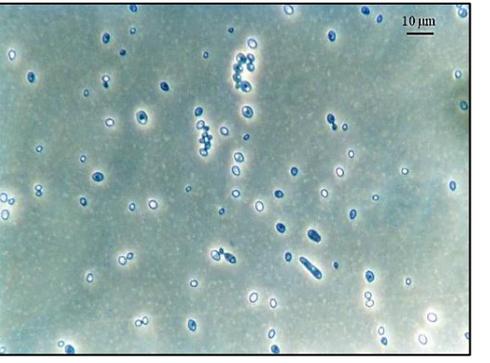
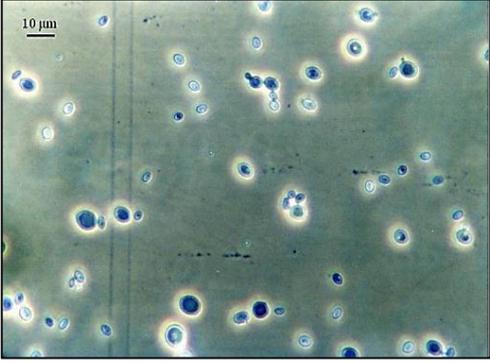
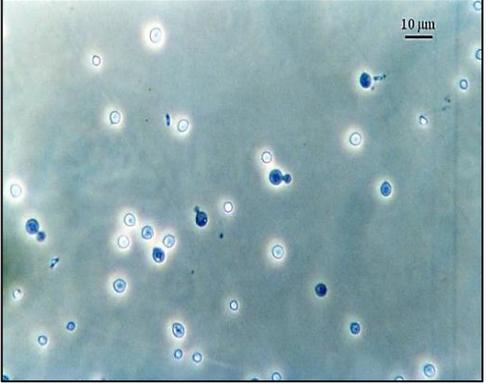
(+ : présence ; - : absence).

2.2.2. Caractères morphologiques

L'observation microscopique montre que la morphologie des cellules en milieu YPG liquide est variable et est résumée dans le tableau 13. Elle est apiculée chez *H. uvarum* et *H. opuntiae*, ovoïde allongée chez *P. kluyveri* et *M. guilliermondii*, globuleuse à ovoïde allongée chez *S. cerevisiae* et sphérique à ovoïde chez *C. aerius*. Le mode de reproduction végétative se fait par bourgeonnement pour la totalité des souches. Il est bipolaire chez *H. uvarum* et *H. opuntiae*, multilatéral chez *P. kluyveri* et *M. guilliermondii* et unipolaire chez *C. aerius* (Tableau 13). Le test de filamentation révèle la présence de pseudomycélium, chez toutes les souches excepté pour *C. aerius*.

Tableau 13. Caractères morphologiques des souches de levures cultivées pendant 3 jours à 25°C.

Code des souches	Espèces	Caractères morphologiques	Photographie microscopique (grossissement x 40)
L1 L2 L3 L4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules apiculées - Bourgeoisement Bipolaire -Présence de pseudomycélium 	
L5	<i>Pichia kluyveri</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules ovoïdes allongées - Bourgeoisement multilatéral -Présence de pseudomycélium 	
L6 L7	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules apiculées - Bourgeoisement Bipolaire -Présence de pseudomycélium 	

<p>L8 L9 L10 L11</p>	<p><i>Meyerozyma guilliermondii</i></p>	<p>- Forme ovoïde allongée</p> <p>- Bourgeoisement Multilatéral</p> <p>- Présence de pseudomycélium</p>	
<p>L12 L13</p>	<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	<p>- Forme globuleuse à ovoïde allongée</p> <p>- Bourgeoisement multilatéral</p> <p>- Présence de pseudomycélium</p>	
<p>L14 L15</p>	<p><i>Cryptococcus aerius</i></p>	<p>- Forme sphérique à ovoïde</p> <p>- Bourgeoisement monopolaire</p>	

2.2.3. Caractères biochimiques et physiologiques

Le test d'assimilation de sucres montre que les souches isolées sont capables d'assimiler les sucres testés à l'exception des souches de *H. uvarum* et *H. opuntiae* qui n'assimilent pas le D-galactose, le lactose et le raffinose. La souche *P. kluyveri* présente une assimilation légère du D-galactose. L'assimilation de sources azotées est positive pour la totalité des souches (Tableau 14).

Tableau 14. Résultats des tests d'assimilation des glucides et des sources azotées des souches de levures isolées.

Code des souches	Espèces	Caractères physiologiques								
		Assimilation des sucres							Assimilation de sources azotées	
		-Glu	-Gal	-Sac	-Mal	α, α Tré	Lac	Raf	Nitrate	Nitrite
1 2 3 4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	-	+	l	+	-	-	+	+
5	<i>Pichia kluyveri</i>	+	l	+	+	+	+	+	+	+
6 7	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+
8 9 10 11	<i>Cyerozyma illiermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12 13	<i>Saccharomyces revisiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14 15	<i>Cryptococcus erius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(D-Glu) : D-Glucose ; (D-Gal) : D-Galactose ; (D-Sac) : D-Saccharose ; (D-Mal) : D-Maltose ; (α, α Tré) : α, α Tréhalose ; (Lac) : Lactose ; (Raf) : Raffinose. (+) : assimilation positive ; (-) : pas d'assimilation ; (l) : assimilation légère.

L'ensemble des résultats de fermentation des sucres sont regroupés dans le tableau 15. La souche *P. kluyveri* ainsi que les autres souches isolées sont capables de fermenter le glucose excepté pour *C. aerius*. En revanche, la capacité à fermenter le galactose, le maltose, le saccharose, le tréhalose et le lactose se manifeste de façon différente (Tableau 15).

Tableau 15. Résultats du test de fermentation de différents sucres par les isolats de levures.

Code des souches	Espèces sucre	Fermentation de sucres					
		Glu	Gal	Mal	Sac	Tré	Lac
L1 L2 L3 L4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	-	-	v	-	-
L5	<i>Pichia kluyveri</i>	+	-	-	-	-	-
L6 L7	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	+	-	-	v	-	v
L8 L9 L10 L11	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	-	-	+	-	-
L12 L13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-
L14 L15	<i>Cryptococcus aerius</i>	-	-	-	-	-	-

(+ : fermentation positive ; - : pas de fermentation ; v : fermentation variable).

La température est l'un des facteurs les plus importants qui agit à la fois sur la croissance des levures et sur leurs productions en métabolites. Ainsi, le résultat de la croissance des souches de levures isolées à différentes températures (4, 20, 25, 30, 37 et 40°C) montre que seules les souches *P. kluyveri* et *H. uvarum* sont incapables de se développer à température 40°C. L'impact de ce paramètre sur la croissance des souches isolées est ensemble des résultats de cette étude est représenté dans le tableau 16.

Tableau 16. Effet de la température sur la croissance des levures isolées.

Souches	Espèces	Croissance à différentes températures					
		4° C	20° C	25° C	30° C	37° C	40° C
L1 ; L2 ; L3 ; L4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	+	+	+	+	-
L5	<i>Pichia kluyveri</i>	+	+	+	+	+	-
L6 ; L7	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	+	+	+	+	+	+
L8 ; L9 ; L10 ; L11	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+
L12 ; L13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+
L14 ; L15	<i>Cryptococcus aerius</i>	+	+	+	+	+	+

(+ : croissance positive ; - : pas de croissance).

En conclusion, on peut dire que l'ensemble des caractéristiques observées durant cette investigation ainsi que les descriptions signalées dans la littérature (KURTZMAN *et al.*, 2011) sont en accord avec l'identification initiale, basée sur le séquençage de la région D1/D2 du gène de l'ARN 26S, des souches de levures isolées.

3. Mise en évidence de l'activité killer

Le test préliminaire de la mise en évidence de l'activité killer chez les 15 souches isolées est réalisé contre 43 souches de levures appartenant aux 24 espèces indésirables (pathogènes et d'altération des aliments et des boissons). Après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu YPG-BM (pH 4.5) à 0.003% bleu de méthylène, un développement d'une zone d'inhibition claire autour des colonies de la souche *P. kluyveri* (L5) est observé dans les boîtesensemencées avec les souches

d'altération des aliments et de boissons : *D. bruxellensis* DBVPG 6706, *S. cerevisiae* DBVPG 6500 et *S. cerevisiae* DBVPG 6173 (Figure 16). En revanche, aucune sensibilité n'est détectée chez l'ensemble des levures pathogènes testées.

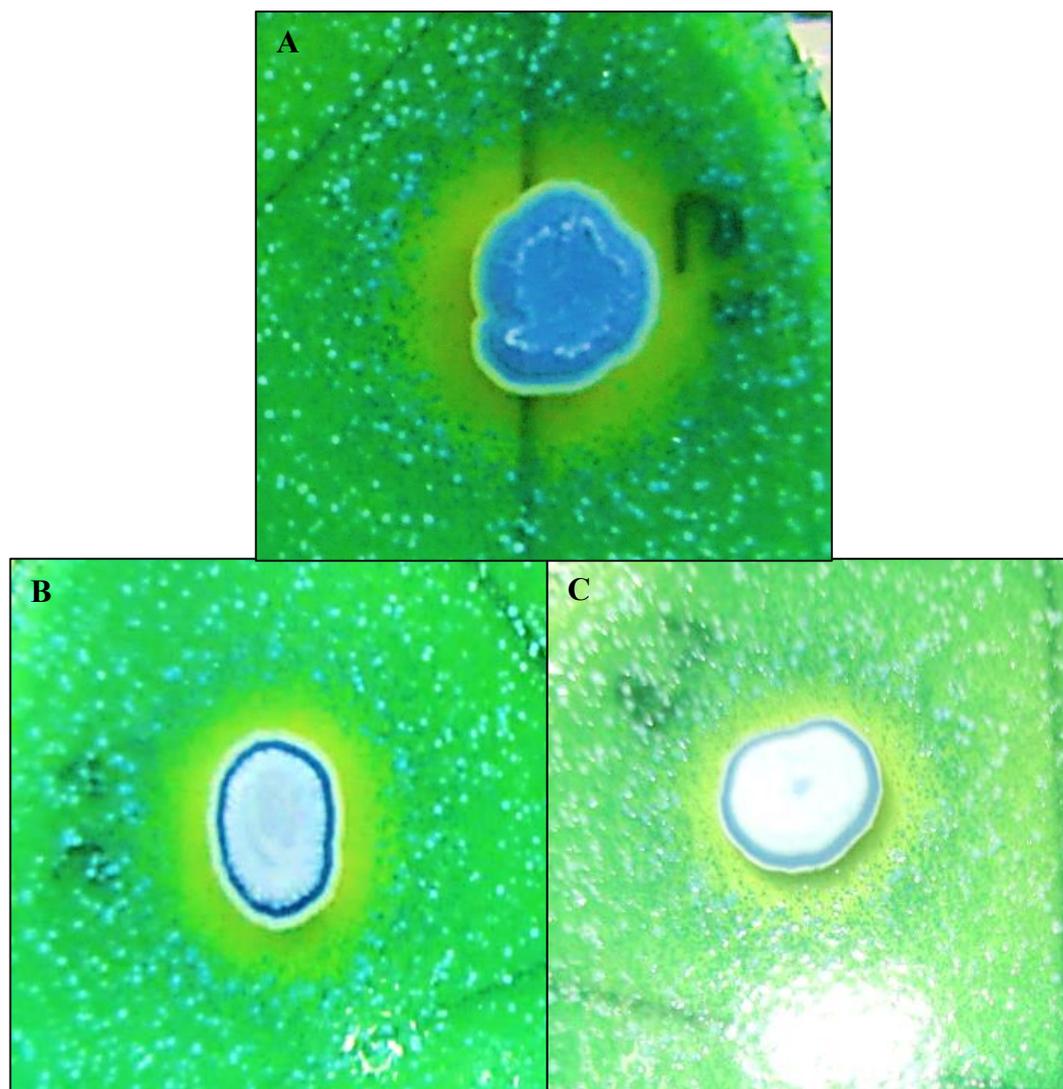


Figure 16. Mise en évidence de l'activité killer chez la *Pichia kluyveri* (L5) après une incubation de 5 jours sur milieu YPG-BM (pH 4.5) à 25°C. Développement de zones d'inhibition dans les boîtesensemencées avec *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6706 (A) ; *Saccharomyces cerevisiae* DBVPG 6500 (B) et *S. cerevisiae* DBVPG 6173 (C).

Par ailleurs, les souches de levures isolées appartenant aux espèces *H. uvarum*, *H. opuntiae*, *S. cerevisiae* et *C. aerius* n'exercent aucun effet killer contre la totalité des levures indésirables testées.

Ainsi, la souche killer isolée, *P. kluyveri* (L5), est sélectionnée pour la production de la toxine killer dans la suite de ce travail.

Dans le genre *Pichia*, qui est hétérogène d'un point de vue taxonomique, le phénomène killer est déjà signalé chez plusieurs espèces telles que *Babjeviella inositovora* (*Pichia inositovora*), *Pichia membranifaciens*, *Millerozyma acaciae* (*Pichia acaciae*), *Millerozyma farinosa* (*Pichia farinosa*), *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) et *Pichia kluyveri* (MIDDELBEEK *et al.*, 1979 ; SUZUKI et NIKKUNI, 1994 ; KLASSEN et MEINHARDT, 2003 ; COMITINI *et al.*, 2004 ; SANTOS et MARQUINA, 2004 ; WANG *et al.*, 2007 ; KLASSEN *et al.*, 2008 ; SANTOS *et al.*, 2009 ; BAJAJ *et al.*, 2012 ; GUO *et al.*, 2013).

En outre, chez l'espèce *P. kluyveri*, le phénotype killer est rapporté dans différentes études (MIDDELBEEK *et al.*, 1979 ; STARMER *et al.*, 1992 ; DABHOLE et JOISHY, 2005).

4. Spectre d'action de la toxine killer produite par *P. kluyveri* (L5)

L'effet de la toxine killer produite est évalué par la méthode de diffusion par puits sur gélose contre 121 souches de levures d'altération des aliments et des boissons. Les résultats du test révèlent que la toxine est active contre 15% des levures testées appartenant aux espèces : *D. anomala*, *D. bruxellensis*, *K. lactis*, *P. kudriavzevii*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *T. microellipsoides*, *W. anomalus* et *Z. bisporus*. L'effet killer le plus important est observé contre la souche *D. bruxellensis* DBVPG 6706, avec une superficie de zone d'inhibition estimée à 1205.8 mm² (Tableau 17).

A notre connaissance, il n'existe aucune étude publiée dans la littérature qui rapporte la capacité de l'espèce *P. kluyveri* à sécréter des toxines killer actives contre des levures de détérioration des aliments et de boissons. Aussi, il sera judicieux de caractériser la toxine produite par la souche killer *P. kluyveri* (L5) contre des levures d'altération.

Tableau 17. Effet de l'extrait brut de la protéine killer sur les souches de levures d'altération des aliments et de boissons (test par la technique de diffusion par puits sur gélose).

Espèces	Souches	Zone d'inhibition (mm ²)
<i>Dekkera anomala</i>	DBVPG 3766	126.4
	DBVPG 4075	263.8
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DBVPG 6704	263.8
	DBVPG 6705	263.8
	DBVPG 6706	1205.8
	DBVPG 6710	656.3
<i>Kluyveromyces lactis</i>	DBVPG 3423	263.8
	DBVPG 6075	263.8
	DBVPG 6969	126.4
<i>Pichia kudriavzevii</i>	DBVPG 3755	28.3
<i>Saccharomyces bayanus</i>	DBVPG 6260	126.4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DBVPG 6173	440.4
	DBVPG 6500	440.4
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	DBVPG 6047	440.4
<i>Torulaspora microellipsoides</i>	DBVPG 6397	263.8
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	DBVPG 3972	126.4
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	DBVPG 6382	126.4
	DBVPG 6383	656.3

En effet, l'espèce *D. bruxellensis* est désormais reconnue comme un contaminant des aliments et de boissons, entraînant des conséquences sérieuses dans le monde alimentaire et de brasserie (STRATFORD, 2006 ; COMITINI et CIANI, 2011). Dans le présent travail, *D. bruxellensis* DBVPG 6706 est signalée comme étant la souche la plus sensible vis-à-vis de l'action killer de la toxine de *P. kluyveri* (Figure 17). Ainsi, elle est retenue pour des investigations ultérieures. De plus, les autres souches sensibles appartenant aux espèces *D. anomala*, *D. bruxellensis*, *S. cerevisiae* et *Z. bisporus* (Figure 17) sont également sélectionnées pour des études ultérieures du présent travail, du à leur importance particulière dans le domaine alimentaire (STRATFORD, 2006).

Le traitement avec la pronase, une protéase, et à la fois avec le choc thermique (100°C pendant 30 min) de l'extrait brut de la toxine killer révèle une perte complète de l'activité killer. Ce résultat prouve que la toxine est une macromolécule protéase-sensible et donc de nature protéique. Cette propriété concorde très bien avec celle de l'ensemble des toxines killer de levures citées dans des travaux publiés (MAGLIANI *et al.*, 1997 ; MARQUINA *et al.*, 2002 ; BUZZINI *et al.*, 2004 ; SANTOS *et al.*, 2009 ; BUZDAR *et al.*, 2011 ; LIU *et al.*, 2012 ; GUO *et al.*, 2013).

L'activité de la protéine killer produite par *P. kluyveri* est largement étudiée depuis les années 1980s : elle agit de façon similaire à la protéine killer K1 synthétisée par *S. cerevisiae* en formant des canaux perméables aux ions dans les bicouches de lipides membranaires (STARMER et LACHANCE, 2011). Coordonnées avec la perte des ions potassium et d'ATP, les cellules traitées par la protéine killer de *P. kluyveri* deviennent plus perméables aux protons avec une diminution du pH intracellulaire ce qui conduit à la mort des cellules cibles (MIDDELBEEK *et al.*, 1980 ; MARQUINA *et al.*, 2002 ; RIBEREAU-GAYON *et al.*, 2004 ; EL-BENNA *et al.*, 2011).

Ainsi, MIDDELBEEK *et al.* (1979) rapportent que la protéine killer produite par la souche *P. kluyveri* 1002 est capable de tuer différentes souches de levures appartenant aux genres *Candida*, *Saccharomyces* et *Torulopsis*, tandis que STARMER *et al.* (1992) signalent que des souches de *P. kluyveri*, isolées de différentes localités dans les Etats-Unis (USA), sont actives contre des espèces appartenant aux genres *Candida*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Pichia* et *Saccharomyces*. Plus récemment, DABHOLE et JOISHY (2005) rapportent qu'une souche de *P. kluyveri*, isolée à partir des fleurs de plantes médicinales dans l'Inde, est capable d'inhiber la croissance des souches de *D. anomala*.

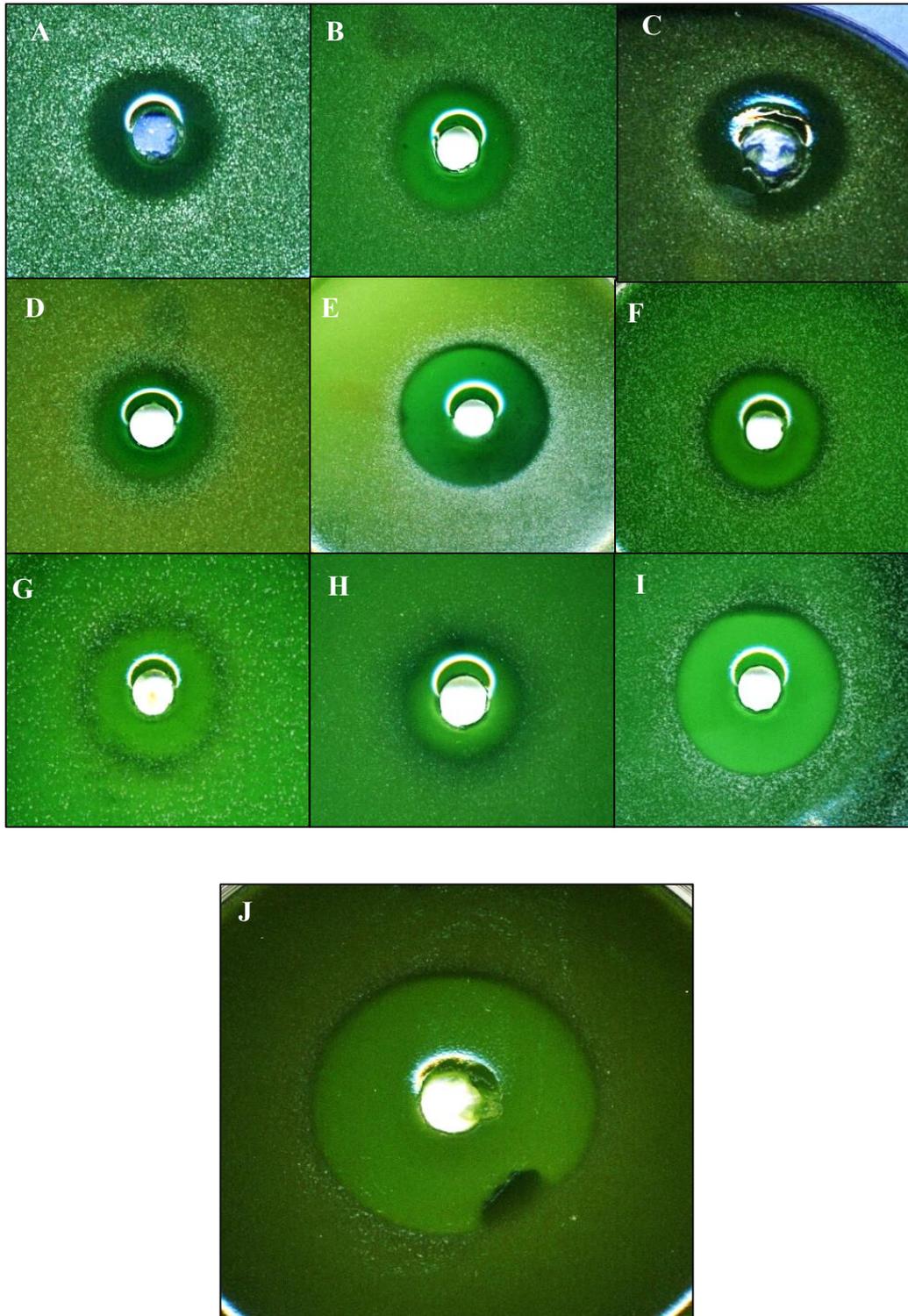


Figure 17. Effet de l'extrait brut de la protéine brute contre les dix souches sensibles retenues. (A) : *Dekkera anomala* DBVPG 3766 ; (B) : *Dekkera anomala* DBVPG 4075 ; (C) : *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6704 ; (D) : *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6705 ; (E) : *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6710 ; (F) : *Saccharomyces cerevisiae* DBVPG 6173 ; (G) : *Saccharomyces cerevisiae* DBVPG 6500 ; (H) : *Zygosaccharomyces bisporus* DBVPG 6382 ; (I) : *Zygosaccharomyces bisporus* DBVPG 6382. (J) : *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6706 (la souche la plus sensible).

Dans la présente investigation, la protéine killer de *P. kluyveri* (L5) présente une capacité de tuer un bon nombre de levures indésirables appartenant aux genres : *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Wickerhamomyces* et *Zygosaccharomyces*, avec une efficacité plus prononcée contre la levure *D. bruxellensis*.

En effet, la sensibilité aux toxines killer est spécifique et seules les cellules de levures contenant un récepteur pour ces toxines sont sensibles aux elles. D'autre part, les levures killer isolées à partir d'habitats particuliers présentent une plus grande activité killer contre des levures provenant d'autres habitats par rapport aux celles appartenant à leur propre habitat (GOLUBEV, 2006).

Par ailleurs, la divergence dans les spectres d'action peut suggérer une hypothèse selon laquelle les gènes responsables des différences d'expression de l'activité killer, peuvent coder pour différentes killer toxines, ce qui suppose donc que la protéine killer de *P. kluyveri* (L5) semble probablement être différente des autres protéines killer de *P. kluyveri* étudiées jusqu'à présent.

5. Cinétique de production de la protéine killer brute par *P. kluyveri*

Le profil cinétique montre que la souche killer *P. kluyveri* commence à produire sa protéine killer après 4 h d'incubation à 20°C (Figure 18).

Les résultats du test de diffusion en puits sur gélose, ensemencée avec *D. bruxellensis* DBVPG 6706 (la souche la plus sensible), révèle une augmentation de la production de la toxine durant la phase exponentielle (de 8 à 24 h), jusqu'à atteindre une valeur maximale après 16-24 h de culture avec une superficie de zone d'inhibition estimée à 656.26 mm² (Figure 18).

Ce profil traduit un mécanisme de production de la protéine killer de type associé à la croissance de la souche. Ces résultats sont en accord avec différents travaux précédents (MIDDELBEEK *et al.*, 1979 ; HODGSON *et al.*, 1995 ; ; NISSEN *et al.*, 2003 ; COMITINI *et al.*, 2004) qui signalent la sécrétion des toxines killer durant la phase exponentielle de croissance des levures. De plus, SUGISAKI *et al.* (1984) rapportent que la production de toxine killer est strictement couplée à la croissance et le niveau maximal a lieu dans la phase exponentielle.

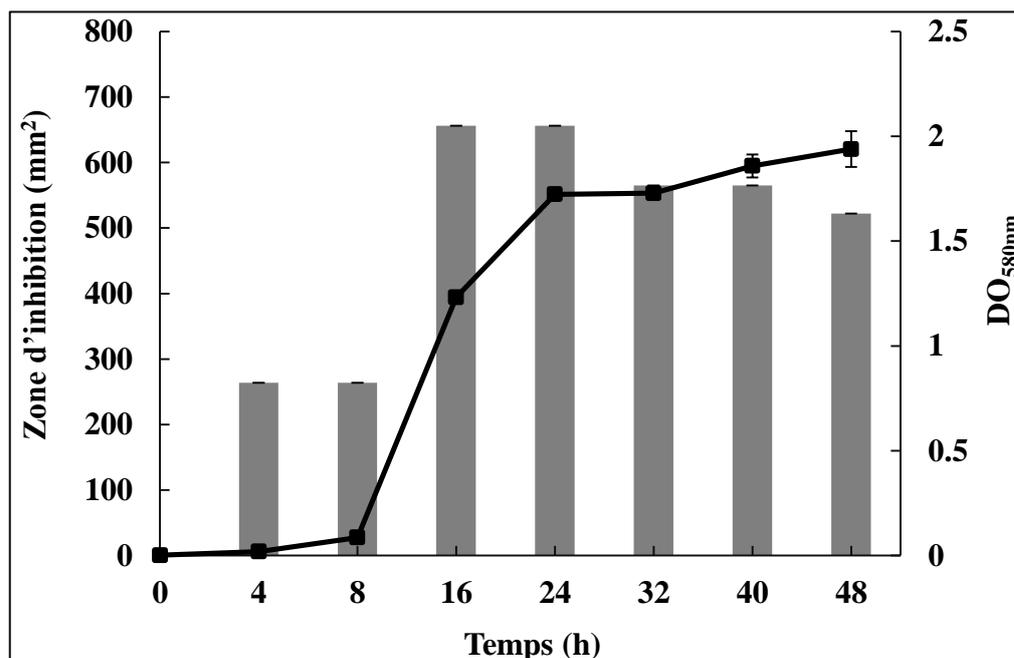


Figure 18. Production de la protéine killer brute par *Pichia kluyveri* (L5). Les histogrammes gris indiquent la zone d'inhibition de *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6706 (la souche cible) par la méthode de diffusion en puits. La courbe représente la DO₅₈₀. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD, n = 3.

6. Purification de la protéine killer brute

La protéine killer extracellulaire produite par la souche *P. kluyveri* (L5) est purifiée à partir du surnageant de la culture cellulaire par précipitation, concentration et chromatographie de filtration sur gel. Après, la procédure de la précipitation à l'éthanol glacé (80%), l'activité spécifique de la protéine killer est 1.2 fois supérieure à celle du surnageant de la culture, ce qui permet d'obtenir donc une purification préliminaire partielle. La protéine killer pure est obtenue, après chromatographie de filtration sur Sephacryl S-200 (HR), dans un pic élue de 35 à 85 min. Ce pic présente, après dialyse et concentration avec PEG, une forte activité killer contre *D. bruxellensis* DBVPG 6706 (Figure 19), tandis que les autres fractions présentent une activité killer nulle ou faible.



Figure 19. Effet killer de la protéine purifiée contre la souche d'altération des aliments et des boissons, *D. bruxellensis* DBVPG 6706. 100 μ l de la protéine killer purifiée sont introduits dans le puits puis incubés pendant 5 jours à 25°C.

La purification de la toxine killer en plusieurs étapes (Tableau 18) a abouti à la protéine killer purifiée à homogénéité, avec une augmentation de 7 fois de l'activité spécifique et un rendement d'environ 1.9 % de l'activité killer totale estimée dans le surnageant de la culture. Ce rendement faible peut être amélioré par une optimisation du milieu de production de la toxine killer de notre souche *P. kluyveri* (L5).

Tableau 18. Purification de la toxine killer produite par la souche *Pichia kluyveri* (L5). Les étapes de la purification sont décrites en détail dans la partie « Matériel et Méthodes ».

Etapes de purification	Volume (ml)	Protéines totales (mg)	Protéines (mg/ml)	Activité killer totale (Ua)	Rendement (%)	Activité spécifique (Ua/mg)	Taux de Purification
Surnageant de culture	1000	73.4	0.07	126 385	100	1 721.8	1
Précipitation à l'éthanol (80%)	36.5	16.4	0.45	33 265.5	26.32	2 028.4	1.2
Gel filtration sur Sephacryl S-200 HR	2.0	0.2	0.10	2 411.5	1.91	12 057.6	7.0

Une unité arbitraire (Ua) est définie comme la concentration de la toxine qui cause une superficie de zone d'inhibition estimée à 10 mm² autour du puits.

*La souche cible utilisée est *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6706, testée par la méthode de diffusion par puits sur gélose.*

L'analyse électrophorétique en SDS-PAGE de la protéine killer purifiée révèle la présence d'une seule bande (Figures 20a et 20b) dans le pic élué de 35 à 85 min. La masse moléculaire relative de cette bande protéique est estimée à 54 kDa (Figure 20c).

Un certain nombre d'articles publiés dans les dernières années révèlent que les protéines killer synthétisées par différentes souches de *P. kluyveri* présentent un poids moléculaire différent. Ainsi, la littérature publiée depuis la fin des années 1970s rapporte que la masse moléculaire des protéines killer secrétées par *P. kluyveri* est d'environ 19 kDa (MIDDELBEEK *et al.*, 1979 ; MAGLIANI *et al.*, 1997 ; MARQUINA *et al.*, 2002 ; EL-BENNA *et al.*, 2011). Dans la présente étude, la protéine killer purifiée produite par la souche *P. kluyveri* (L5) présente une masse moléculaire apparente de 54 kDa, qui est beaucoup plus élevée que celle signalée dans les investigations précédentes.

Cette divergence dans la masse moléculaire et les spectres d'action de la toxine killer, comme décrit précédemment, semble confirmer que la protéine killer est différente des autres protéines killer secrétés par des souches de *P. kluyveri*.

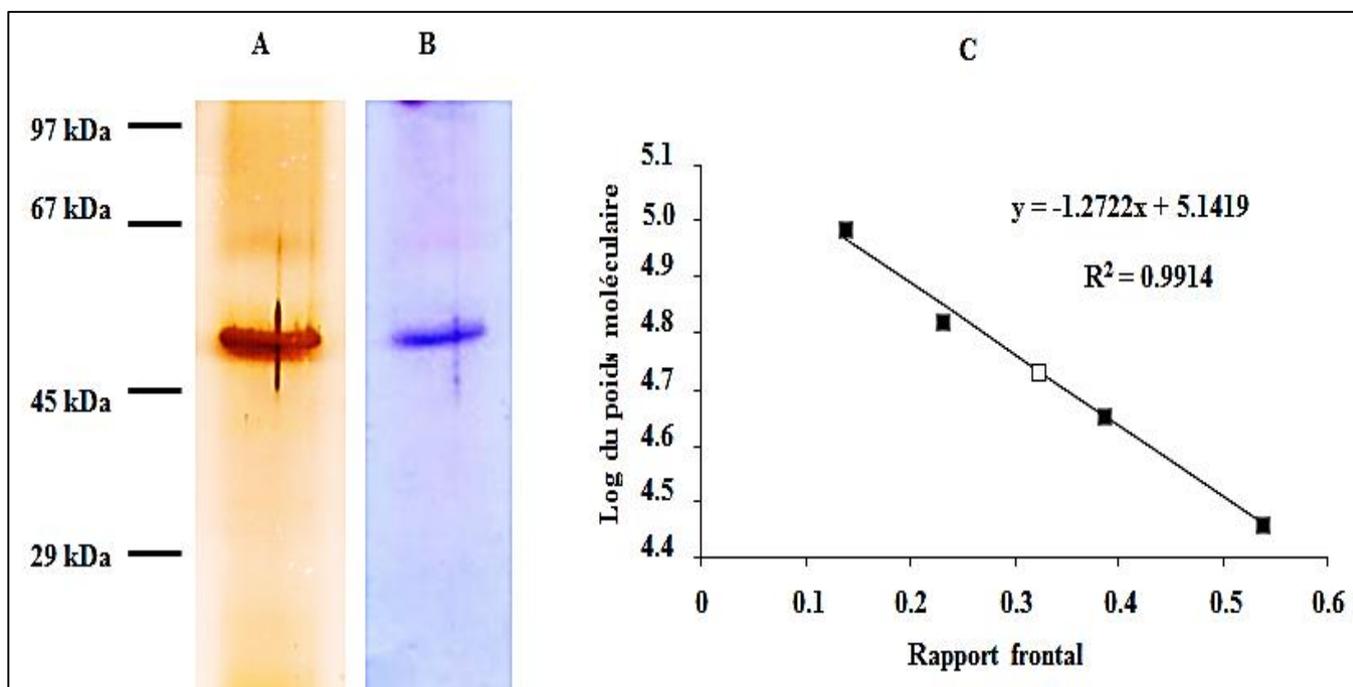


Figure 20. Profil électrophorétique en SDS-PAGE : révélation d'une seule bande de la protéine killer purifiée, par le nitrate d'argent (A) et par le bleu de Coomassie (B), obtenue après filtration sur Sephacryl S-200. (C) : Détermination de la masse moléculaire de la protéine killer purifié.

En outre, la masse moléculaire relative de la protéine killer sécrétée par *P. membranifaciens* CYC 1106 est 18 kDa (SANTOS et MARQUINA, 2004), tandis que celle produite par *P. membranifaciens* CYC 1086 possède une masse moléculaire d'environ 30 kDa (SANTOS *et al.*, 2004). La souche *W. anomalus* (*P. anomala*) YF07b sécrètent deux toxines killer ayant des poids moléculaire de 47 kDa et 67 kDa (GUO *et al.*, 2013). Cependant, *W. anomalus* DBVPG 3003 sécrète une protéine killer (Pikt) d'un poids moléculaire plus faible, 8 kDa (DE INGENIIS *et al.*, 2009). BAJAJ *et al.* (2012) rapportent que la souche *P. kudriavzevii* RY55 synthétise une protéine killer ayant une masse moléculaire d'environ 39.8 kDa. Ceci signifie que la protéine killer de *P. kluyveri* (L5) est complètement différente de celles produites par les autres levures du genre *Pichia*.

7. Effets du pH et de la température sur l'activité killer de la protéine purifiée

L'étude de l'influence du pH et de la température sur l'activité de la protéine killer purifiée est faite par la technique de diffusion par puits sur gélose en boîtes de pétriensemencées avec la souche sensible *D. bruxellensis* DBVPG 6706.

Les résultats de cette étude révèlent que la protéine killer purifiée est active à une gamme de pH optimale de 4.0 - 4.5 (Figure 21a). L'augmentation du pH à la valeur 5.0 conduit à une diminution spectaculaire de l'activité killer, tandis que l'inactivation complète de la protéine killer est observée à pH 5.5 ou à des valeurs supérieures (Figure 21a).

La détermination de la température optimale de l'activité killer de la toxine est exclusivement possible dans la gamme de température 20°C à 30°C, car la souche *D. bruxellensis* DBVPG 6706 ne se développe pas au-dessous de 20°C et au-dessus de 30°C. Ainsi, dans cet intervalle la toxine purifiée présente une activité killer maximale à une température de 25°C (Figure 21b). Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans les travaux d'autres études (MIDDELBECK *et al.*, 1979 ; BUZZINI *et al.*, 2004 ; COMITINI *et al.*, 2004 ; BAJAJ *et al.*, 2012).

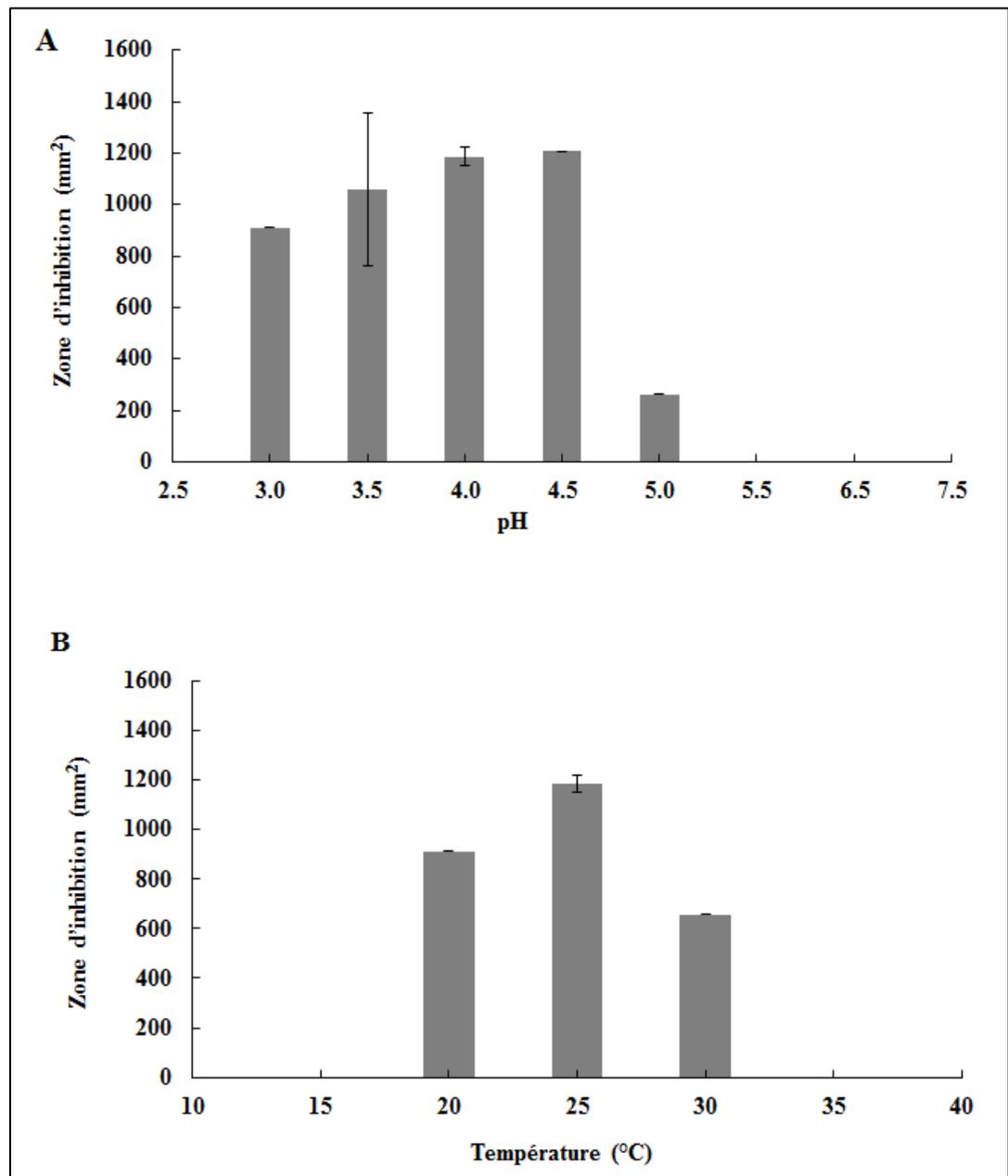


Figure 21. Effet du pH (A) et de la température (B) sur l'activité killer de la protéine purifiée, testée contre *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6706 (souche sensible). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type, n = 3.

Par ailleurs, les protéines killer des levures sont proposées depuis les années 2000s pour combattre la contamination par les levures d'altération (COMITINI *et al.*, 2004 ; GORETTI *et al.*, 2009 ; SANTOS *et al.*, 2009 ; LIU et TSAO, 2009 ; SANTOS *et al.*, 2011). Leur activité et stabilité sont pH- et température-dépendantes ce qui affecte potentiellement leur application dans l'industrie alimentaire et des boissons (SANTOS *et al.*, 2011).

Certaines boissons telles que les jus de fruits et les boissons gazeuses rafraichissantes sont caractérisées par une valeur de pH acide (près de 2.9 – 3.7), favorable au maintien de l'activité de la plupart des protéines killer (MARQUINA *et al.*, 2002 ; SEOW et THONG, 2005).

La protéine killer de notre souche *P. kluyveri* (L5) est active seulement à des valeurs de pH acides (3.0 – 5.0), avec un optimum de pH entre 4.0 à 4.5, tandis que la gamme de température de son activité est (20 – 30°C).

Ces résultats peuvent suggérer l'utilisation potentielle de la protéine killer, sécrétée par la souche *P. kluyveri* (L5), sous des conditions de pH et de température actuellement utilisées dans les industries de fermentation et des boissons.

8. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), des concentrations inhibitrices fractionnaires (CIF) et l'indice FIC (Σ CIF) de la protéine killer purifiée seule et en association avec le métabisulfite de potassium le sorbate de potassium ou l'éthanol

Les résultats de la détermination de la CMI par la méthode de microdilution en milieu liquide, montrent que la protéine killer purifiée est plus active contre la souche *D. bruxellensis* DBVPG 6706 avec une valeur CMI de 0.5 µg/ml (Tableau 19). La toxine killer présente également une efficacité significative *in vitro* avec une CMI estimée à 1 µg/ml sur *D. bruxellensis* (DBVPG 6704, DBVPG 6705), *S. cerevisiae* DBVPG 6500 et *Z. bisporus* DBVPG 6383. Elle est moins efficace sur les souches *D. anomala* (DBVPG 3766, DBVPG 4075), *D. bruxellensis* DBVPG 6710 et *S. cerevisiae* DBVPG 6173 avec une CMI de 2 µg/ml. La souche *Z. bisporus* DBVPG 6382 se montre insensible à l'action de la protéine killer avec une concentration 2 µg/ml (Tableau 19).

La sensibilité à la protéine killer s'est avérée à la fois espèce- et souche-dépendante. Ainsi, les deux souches *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500 sont retenues pour le reste de ce travail.

Tableau 19. Détermination de la CMI de la toxine killer contre les souches sensibles *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Zygosaccharomyces bisporus*.

Levures cibles		CMI (µg/ml)
Espèce	Souche	
<i>ekkerana anomala</i>	BVPG 3766	2
	BVPG 4075	2
<i>ekkerana bruxellensis</i>	BVPG 6704	1
	BVPG 6705	1
	BVPG 6706	0.5
	BVPG 6710	2
<i>accharomyces cerevisiae</i>	BVPG 6173	2
	BVPG 6500	1
<i>zygosaccharomyces bisporus</i>	BVPG 6382	>2
	BVPG 6383	1

En vue de comparer l'action de la protéine killer purifiée par rapport à celle de certains composants actifs, les CMIs de métabisulfite de potassium, de sorbate de potassium et de l'éthanol sont déterminées contre les souches *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500. Les résultats obtenus montrent que la souche *D. bruxellensis* DBVPG 6706 ne présente aucune sensibilité à l'éthanol 80 mg/ml (Tableau 20). Par contre, une concentration de 128 µg/ml du métabisulfite de potassium montre un effet inhibiteur contre la même souche. De même, la souche *S. cerevisiae* DBVPG 6500 est sensible à 64 µg/ml de sorbate de potassium (Tableau 20).

Tableau 20. Détermination de la CMI de métabisulfite de potassium, de l'éthanol et de sorbate de potassium.

Levures cibles		CMI (µg/ml)	
Espèce	Souche	Métabisulfite de potassium	Ethanol
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DBVPG 6706	128	>80
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DBVPG 6500	CMI (µg/ml)	
		Sorbate de potassium	
		64	

Ces résultats révèlent que la toxine killer purifiée semble être fortement active contre les souches sensibles de *D. bruxellensis* (des valeurs de CMI de 64 000- à 256 000-fois inférieures que celles signalées pour le métabisulfite de potassium) et *S. cerevisiae* DBVPG 6500 (des valeurs de CMI de 32 000- à 64 000-fois inférieure que celles du sorbate de potassium). De manière similaire, GORETTI *et al.* (2009) rapportent que la toxine killer, KT 4561, synthétisée par *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 présente des valeurs de CMI de 100 à 100 000-fois plus faibles que celles données par le métabisulfite de potassium et le sorbate de potassium contre des souches de levures d'altération.

En combinaison avec le métabisulfite de potassium, le sorbate de potassium et l'éthanol, la protéine killer semble être deux fois plus supérieure que celle observée lorsqu'elle est utilisée seule contre *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500 (Tableau 21).

L'indice FIC pour les combinaisons de la toxine killer avec le métabisulfite de potassium, le sorbate de potassium et l'éthanol respectivement révèle l'absence d'un effet synergique entre ces composés, mais seulement un effet additif est signalé (Tableau 21). De même, GORETTI *et al.* (2009) signalent la présence d'une interaction additive dans une combinaison de la toxine killer KT4561 avec l'éthanol contre la souche *D. bruxellensis* 6706.

Tableau 21. CMI, CIF et l'indice CIF (Σ CIF) de la protéine killer en présence de métabisulfite de potassium, de sorbate de potassium et l'éthanol, vis-à-vis des levures test: *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6706 et *Saccharomyces cerevisiae* DBVPG 6500.

Souches sensibles	CMI	CIF de toxine killer	CIF de métabisulfite de potassium	Σ CIF
<i>Dekkera bruxellensis</i> DBVPG 6706	Combinaison de toxine killer + métabisulfite de Potassium ($\mu\text{g/ml}$ - $\mu\text{g/ml}$)	0.5	0.5	1
	0.25-40			
	CMI	CIF de toxine killer	CIF de l'éthanol	Σ CIF
	Combinaison de toxine killer + éthanol ($\mu\text{g/ml}$ - mg/ml)	0.5	0.5	1
	0.25-64			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBVPG 6500	CMI	CIF de toxine killer	CIF de sorbate de potassium	Σ CIF
	Combinaison de toxine killer + sorbate de potassium ($\mu\text{g/ml}$ - $\mu\text{g/ml}$)	0.5	0.5	1
	0.5-32			

9. Evaluation de l'activité de la toxine killer purifiée sur des contaminants de boissons

L'efficacité de la protéine killer purifiée est simulée sous des conditions technologiques au laboratoire. Ainsi, les souches sensibles *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500 sont inoculées respectivement dans une boisson gazeuse rafraichissante et un jus de poire, avec la toxine killer à différentes concentrations.

Après 7 jours d'exposition dans la boisson gazeuse, une relation dose-effet est observée : la protéine killer présente seulement un effet fongistatique contre *D. bruxellensis* DBVPG 6706 avec une concentration de 0.125 µg/ml. A partir de 0.25 µg/ml, l'activité fongicide est bien visible (Figure 22a).

Un effet dose est détecté dans le jus de poires : une concentration de 1 µg/ml de la protéine killer donne un effet inhibiteur contre *S. cerevisiae* DBVPG 6500, tandis qu'une concentration de 2 µg/ml s'est avérée fongicide puisqu'elle provoque une réduction considérable des cellules viables de levures (Figure 22b).

La protéine killer semble avoir donc une forte activité anti-*Dekkera* dans la boisson gazeuse rafraichissante, même à faible concentration : une concentration de 0.25 µg/ml de la protéine killer présente une action fongicide. Son activité anti-*Saccharomyces* dans le jus de fruits est nettement plus faible : il va falloir une concentration de 2 µg/ml pour avoir un effet fongicide.

Par ailleurs, la stabilité de la protéine killer est contrôlée dans les mêmes boissons. Le test de diffusion par puits sur gélose révèle que la toxine maintient son action killer au moins 3 jours contre *S. cerevisiae* DBVPG 6500 (Figure 23b) inoculée dans le jus de poires, et pour 10 jours contre *D. bruxellensis* DBVPG 6706 inoculée dans la boisson gazeuse rafraichissante (Figure 23a).

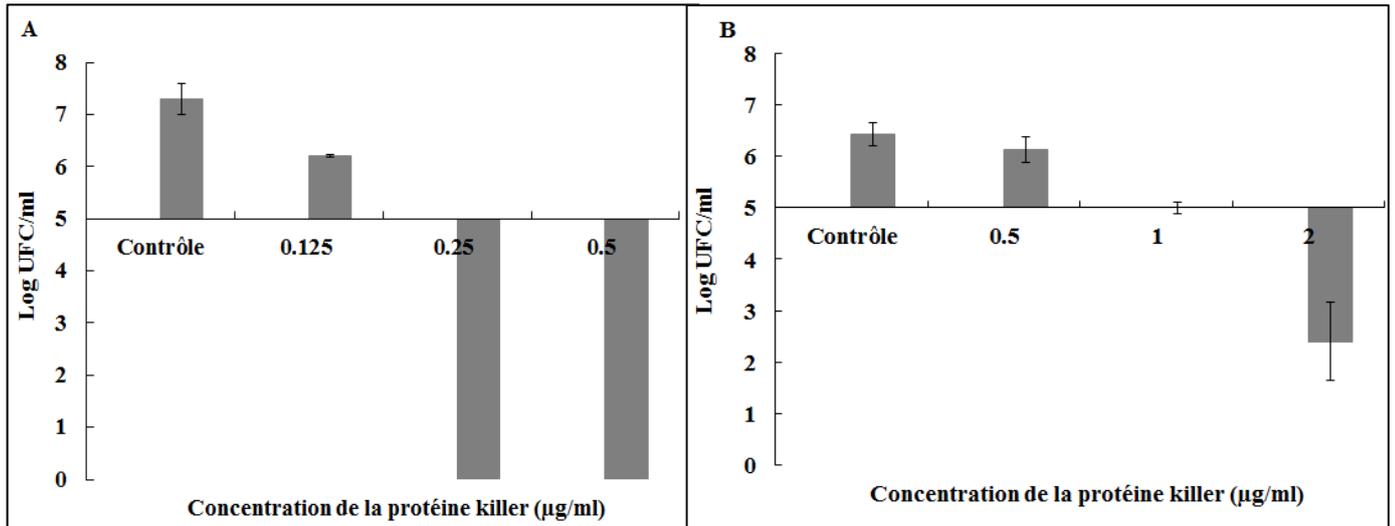


Figure 22. Effet dose de la toxine killer sur la croissance de *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6706 (A) après 7 jours d'incubation dans la boisson gazeuse rafraichissante et *Saccharomyces cerevisiae* DBVPG 6500 (B) après 3 jours d'incubation dans le jus de poire. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type, n = 3.

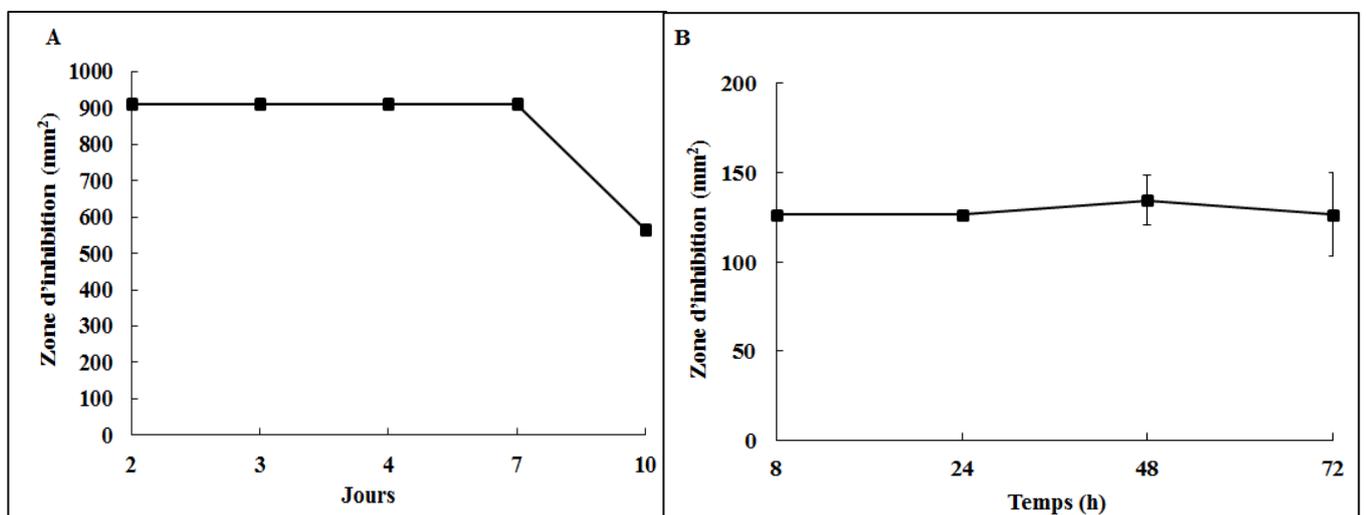


Figure 23. Stabilité de la toxine killer dans la boisson gazeuse rafraichissante (A) et dans le jus de poires (B). Les souches sensibles utilisées dans le test de diffusion par puits sur gélose : *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6706 pour la boisson rafraichissante et *Saccharomyces cerevisiae* DBVPG 6500 pour le jus de poires. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type, n = 3.

L'effet dose pour la protéine killer contre les souches d'altération *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500, observée dans cette étude, est similaire à celle précédemment détectée pour les protéines killer de *W. saturnus* (BUZZINI *et al.*, 2004) et *K. phaffii* (CIANI et FATICHENTI, 2001). HODGSON *et al.* (1995) rapportent que le mode d'action effet-dose pourrait être compatible avec l'hypothèse qu'un nombre critique de molécules des protéines killer, qui interagissent avec les cellules cibles, est nécessaire pour obtenir un effet létal ou inhibiteur.

Par conséquent, bien que les résultats observés dans cette étude doivent être évidemment liés aux seules levures testées, on peut spéculer que l'activité dose-effet exprimée par la protéine killer, suggère apparemment sa capacité à former une liaison énergie-dépendante avec un récepteur localisé à la surface de la paroi cellulaire, en étroite analogie avec la littérature actuelle (HODGSON *et al.*, 1995 ; GOLUBEV, 2006).

Les résultats de cette étude suggèrent que la protéine killer peut être un composé de qualité alimentaire souple utile pour le contrôle de certaines levures de détérioration des aliments et de boissons, en particulier, celles appartenant aux genres *Dekkera* et *Saccharomyces*. D'autre part, bien que de nombreuses souches de *S. cerevisiae* sont utilisées dans l'industrie de fermentation, cette espèce est très bien connue comme agent d'altération dans certains jus de fruits (STRATFORD, 2006 ; MARAZ et KOVACS, 2014). Ainsi, dans le cas présent, la protéine killer sécrétée par la souche *P. kluyveri* peut être rentablement utilisée pour réduire certains phénomènes délicats tels que le gonflement des emballages de jus de fruits provoqué par la formation de dioxyde de carbone (CO₂) par les levures indésirables (MARAZ et KOVACS, 2014).

Dans cette optique, la protéine killer produite par la souche *P. kluyveri* (L5) peut représenter une alternative potentielle à l'utilisation de l'acide sorbique et les dérivés du dioxyde de soufre (SO₂) pour la protection des produits alimentaires. Ceci est également soutenu par une persistance de l'activité killer dans un intervalle de pH : 3.0 – 5.0 (sous des conditions technologiques simulées en laboratoire). La possibilité de l'utilisation de la protéine killer dans les aliments et les boissons peut se produire par la suite, mais ceci après des investigations plus approfondies menées pour répondre aux nombreuses questions restantes. Tout d'abord, bien que la protéine killer maintient son activité pendant quelques jours dans la boisson gazeuse et à la fois dans le jus de poires, sa stabilité devra être vérifiée dans les aliments (tels que en présence de protéases microbiennes comme les yaourts et les fromages). Ensuite, la nature non toxique de la protéine killer devra être clairement démontrée à des concentrations efficaces pour l'activité killer.

CONCLUSION

Les systèmes killer de levures font actuellement de ces microorganismes des candidates à très fort potentiel pour différentes applications.

Dans ce contexte, la présente thèse a pour comme objectifs : l'isolement et la sélection à partir d'un biotope de souches de levures productrices de protéines killer, la production et la purification à homogénéité de la toxine killer à partir de la souche la plus performante enfin sa caractérisation et la vérification de son potentiel d'application dans le biocontrôle de souches indésirables les plus sensibles.

Quinze souches de levures (L1- L15) sont isolées à partir des échantillons de sol agricole et forestier dans la région de Constantine (Nord-Est Algérie). L'identification selon la méthode moléculaire (séquençage de la région D1/D2 du gène de l'ARN 26S de la grande sous-unité ribosomique) permet de classer les 15 isolats de levures en 6 espèces différentes : *Cryptococcus aerius*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kluyveri* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats sont en accord avec ceux des espèces identifiées signalés dans la littérature. A travers ce répertoire, on peut conclure que le sol constitue un bon biotope pour les souches de levures.

La mise en évidence de l'activité killer contre 34 souches de levures indésirables (Souches pathogènes ou infectant des produits manufacturés des IAA) montre que seule la souche L5 appartenant à l'espèce *P. kluyveri* est capable de produire une activité killer, souche sélectionnée pour la production de la protéine killer.

Le test de diffusion par puits sur gélose réalisé contre 121 souches de levures indésirables, montre que la protéine killer brute est active contre 15% de souches de détérioration des aliments et de boissons appartenant aux espèces : *Dekkera anomala*, *D. bruxellensis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *Torulaspora microellipsoides*, *Wickerhamomyces anomalus* et *Zygosaccharomyces bisporus* avec un effet très prononcé pour la souche *D. bruxellensis* DBVPG 6706 avec une superficie de zone d'inhibition estimée à 1205.8 mm².

Soumise à un traitement par une protéase, la pronase et à un choc thermique de 100°C pendant 30 min, l'extrait brut de la toxine perd complètement son activité killer, ce qui confirme donc sa nature protéique.

La purification de la protéine killer de *P. kluyveri* L5 en 3 étapes (précipitation à l'éthanol glacé 80%, la dialyse et la chromatographie de filtration sur gel de Sephacryl S-200 (HR), donne une augmentation de 7 fois de l'activité spécifique avec un rendement d'environ 1.9% de l'activité totale. Le profil électrophorétique en SDS-PAGE de la protéine killer purifiée révèle une masse

moléculaire de 54 kDa. Cette masse moléculaire faible et la présence d'un seul pic en profil chromatographique sont des indicateurs d'une structure monomérique.

Les tests de diffusion par puits sur gélose à différents pH et à différentes températures contre la souche *D. bruxellensis* DBVPG 6706, révèle que le pH optimum de la protéine killer purifiée est compris entre 4.0-4.5 tandis que la température optimale est de 25°C.

La sensibilité *in vitro* des souches indésirables à l'action de la protéine killer purifiée est à la fois espèce- et souche-dépendante. Ainsi, la détermination des valeurs CMI de la protéine killer révèlent une activité élevée contre *D. bruxellensis* (MICs de 64 000 à 256 000 fois plus faibles que celles obtenues avec le métabisulfate de potassium) et *S. cerevisiae* (MICs de 32 000 à 64 000 fois plus faibles que celles obtenues avec le sorbate de potassium).

L'indice CIF pour les combinaisons de la protéine killer purifiée avec les composants actifs : métabisulfate de potassium, le sorbate de potassium ou l'éthanol, révèlent l'absence d'une interaction synergétique entre ces composés actifs mais seulement un effet additif.

L'étude de l'efficacité de la protéine killer purifiée dans le biocontrôle des souches sensibles *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500 dans des boissons montre que la toxine killer semble avoir une forte activité anti-*Dekkera* dans la boisson gazeuse rafraichissante « *Campari MIXX* » (Milan, Italie) même à concentration faible (action fongicide avec une concentration de 0.25 µg/ml). D'autre part, son action anti-*Saccharomyces* dans un jus de poire « *Santal* » (Parma, Italie), est plus faible (action fongicide avec 2 µg/ml). De plus, la toxine purifiée maintient son activité killer au moins 3 jours dans le jus de poire contre *S. cerevisiae* DBVPG 6500 et 10 jours contre *D. bruxellensis* DBVPG 6706 dans la boisson gazeuse. Ces résultats entrevoit la possibilité d'utiliser la protéine killer produite par la souche *P. kluyveri* (L5) comme un composé naturel de qualité alimentaire pour le contrôle des levures indésirables ce qui justifie l'objectif assigné à cette recherche.

Ce travail de thèse ouvre des perspectives :

- Optimiser la production de la protéine killer par la souche *P. kluyveri* (L5).
- Identifier par la protéomique, la toxine killer.
- Identifier le gène responsable de la synthèse de cette toxine, stimuler son expression et le cloner sur *E. coli* à croissance rapide.
- Tester la protéine killer purifiée différentes matrices alimentaires.
- Démontrer la nature non toxicité de la protéine killer surtout à doses élevées.

RESUMES

Résumé

L'objet principal de cette thèse est la recherche de l'activité killer chez des levures isolées à partir des échantillons de sol agricole et forestier dans la région de Constantine pour des applications biotechnologiques. L'isolement des levures permet de répertorier 15 souches. L'identification par la taxonomie moléculaire sur la base des séquences de la région D1/D2 du gène codant pour l'ARN ribosomique 26S des isolats aboutissent à six espèces différentes : *Cryptococcus aerius*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Meyerozyma guilliermondii* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches isolées sont en accord avec ceux cités dans la littérature. Le test préliminaire de la mise en évidence de l'activité killer chez les souches isolées, révèle que seule la souche L5 possède une activité killer. Cette souche appartient à l'espèce *P. kluyveri*. L'extrait de la protéine killer produite par la souche *P. kluyveri* (L5) révèle que la toxine est active contre des souches d'altération d'aliments et boissons appartenant aux genres : *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces* et *Zygosaccharomyces* avec un effet très prononcé pour la souche *D. bruxellensis* DBVPG 6706. Les traitements thermiques (30 à min à 100°C) et enzymatique par une protéase, la pronase, font perdre complètement l'activité killer initiale de la toxine, ce qui prouve sa nature protéique. La protéine active se présente sous une seule bande de SDS-PAGE avec un poids moléculaire de 54 kDa. La toxine killer purifiée possède un pH optimum entre 4.0-4.5 et une température optimale à 25°C. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) montre que la protéine killer a une activité élevée *in vitro* contre *D. bruxellensis* (MICs de 64 000 à 256 000 fois plus faibles que celles obtenues avec le métabisulfite de potassium) et contre *S. cerevisiae* (MICs de 32 000 à 64 000 fois plus faibles que celles obtenues avec le sorbate de potassium). Aucune interaction synergétique *in vitro* (calculée par l'indice CIF- Σ CIF) est observée quand la protéine killer est utilisée en combinaison avec les agents antifongiques : le métabisulfite de potassium, le sorbate de potassium ou l'éthanol. La protéine killer purifiée présente une relation dose-effet contre les souches sensibles *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500 inoculées dans une boisson gazeuse rafraichissante « *Campari MIXX* » (Milan, Italie) et un jus de poire « *Santal* » (Parma, Italie), respectivement. De plus, la toxine killer maintient son activité au moins 3 jours dans le jus de poire contre *S. cerevisiae* DBVPG 6500 et pendant 10 jours dans la boisson gazeuse contre *D. bruxellensis* DBVPG 6706. Les résultats de la présente étude suggèrent que la protéine killer produite par la souche *P. kluyveri* (L5) peut être proposée comme un nouvel agent naturel de biocontrôle de levures indésirables contenues dans les boissons.

Mots clés : levures, isolement, *Pichia kluyveri*, toxine killer, biocontrôle, levures indésirables.

Abstract

The general purpose of this thesis is to search for killer activity in yeast strains isolated from agricultural and forest soil in the region of Constantine for biotechnological applications. The isolation of yeasts allows to list 15 strains. The molecular taxonomy based on the sequences of D1/D2 domain of the 26S ribosomal ARN gene groups these isolates into 6 different species: *Cryptococcus aerius*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Meyerozyma guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae*. Morphological, physiological and biochemical characteristics of the strains are in agreement with those cited in literature. Preliminary testing for killer activity reveals that only the strain L5 is able to produce killer activity. The killer strain is belonging to the species *P. kluyveri*. The crude killer protein produced by the strain *P. kluyveri* reveals that the toxin is active against food and beverage spoilage yeast strains belonging to the genera: *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces* and *Zygosaccharomyces*. The highest killer activity is obtained against the strain *Dekkera bruxellensis* DBVPG 6706. Both the heat shock (30 min at 100°C) and the enzymatic treatment with pronase demonstrate the complete loss of the initial killer activity of the toxin, and hence its proteinaceous nature is apparently confirmed. The active protein migrates as a single band in SDS-PAGE and has a molecular mass of 54 kDa. The purified killer toxin has an optimal pH between 4.0-4.5, while the optimal of temperature is 25°C. The determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) shows that the purified killer protein has a high *in vitro* activity against *D. bruxellensis* (MICs from 64 000- to 256 000-fold lower than that exhibited by potassium metabisulphite) and *Saccharomyces cerevisiae* (MICs from 32 000- to 64 000-fold lower than potassium sorbate). No *in vitro* synergistic interactions (calculated by FIC index $-\Sigma$ FIC) are observed when killer protein is used in combination with the active compounds: potassium metabisulphite, potassium sorbate, or ethanol. The killer protein exhibited a dose-response effect against *D. bruxellensis* and *S. cerevisiae* in a soft drink « *Campari MIXX* » (Milan, Italy) and pear juice « *Santal* » (Parma, Italy), respectively. The results of the present study suggest that the killer protein could be proposed as a novel food-grade compound useful for the control of food and beverage spoilage yeasts. Additionally, the purified killer protein maintains its killing action at least for 3 days against *S. cerevisiae* DBVPG 6500 inoculated in pear juice and for 10 days against *D. bruxellensis* DBVPG 6706 in soft drink. The results of the present study suggest that the killer protein produced by the strain *P. kluyveri* (L5) could be proposed as a novel natural agent for the biocontrol of beverage spoilage yeasts.

Keywords: Yeast, isolation, *Pichia kluyveri*, killer toxin, biocontrol, undesirable yeasts.

المخلص

إن الهدف العام من هذه الدراسة هو البحث عن نشاط قاتل لخمائر معزولة من عينات تربة زراعية وغابية في منطقة قسنطينة (شمال شرق لجزائر) وهذا من اجل تطبيقات بيوتكنولوجية. سمحت الدراسة بعزل 15 سلالة. إن الاعتماد على بيولوجيا الجزيئات في تصنيفها بدراسة المجال D/1D2 للحامض الريبي 26S، بين أن هذه السلالات تنتمي لستة أنواع مختلفة: *Cryptococcus aerius*، *Hanseniaspora opuntia*، *Hanseniaspora uvarum*، *Meyerozyma guilliermondii* و *Pichia kluyveri* و *Saccharomyces cerevisiae*. الخصائص المورفولوجية، الفيزيولوجية والبيوكيميائية للسلالات المعزولة تتماشى مع تلك التي ورد ذكرها في المراجع. اختبار إظهار النشاط القاتل عند السلالات المعزولة أوضح أن فقط السلالة L5 تملك نشاط قاتل. السلالة القاتلة المعزولة تنتمي إلى النوع *P. kluyveri*. مستخلص البروتين القاتل المنتج من طرف السلالة (*P. kluyveri* (L5) بين أن هذه المادة السمية فعلة ضد سلالات إتلاف المواد الغذائية والمشروبات المنتمية إلى الاجناس *Saccharomyces*، *Pichia*، *Kluyveromyces*، *Dekkera*، *Zygosaccharomyces Wickerhamomyces*، *Torulaspora*، *DBVPG* ضد السلالة *DBVPG* 6706 *Dekkera bruxellensis*. المعالجات الحرارية (100 درجة مئوية مدة 30 دقيقة) و الإنزيمية باستعمال إنزيم Pronase، سببت فقدان الكلي للنشاط القاتل الأولي للمادة السمية، مما يثبت طبيعتها البروتينية. البروتين الناشط أعطى شريطا أحاديا عند استعمال SDS-PAGE ووزن جزيئي مقدر ب 54 kDa. السم القاتل المنقى يملك pH مثالي بين 4.0 – 4.5 و درجة حرارة مثالية مقدرة ب 25 درجة مئوية. تحديد التركيزات المثبطة الدنيا (ت.م.د) أوضحت أن البروتين القاتل المنقى يملك فعالية عالية *in vitro* ضد *D. bruxellensis* (ت.م.د من 64000 إلى 256000 مرة اقل من تلك المتحصلة مع استعمال ميتابيسولفات البوتاسيوم) و ضد *S. cerevisiae* (ت.م.د من 32000 إلى 64000 مرة اقل من تلك المتحصلة مع سوروبات البوتاسيوم). عند استخدام البروتين القاتل في مزيج مع المركبات الناشطة ميتابيسلفيت البوتاسيوم، سوروبات البوتاسيوم و الايثانول، لوحظ انعدام وجود لأي تفاعل متأزر *in vitro* (على النحو الذي حدده مؤشر التركيز المثبط الكسري "ت.م.ك"). البروتين الناشط المنقى أعطى العلاقة جرعة - مفعول ضد السلالتين الحساستين. *S. cerevisiae* DBVPG 6500 و *D. bruxellensis* DBVPG 6706 الملقحتان في المشروب الغازي المنعش "Campari MIXX" (ميلان، ايطاليا) و عصير الأجاص "Santal" (بارما، ايطاليا)، على التوالي. إضافة إلى ذلك، المادة السمية القاتلة تحتفظ بنشاطها على الأقل مدة 3 أيام في عصير الأجاص ضد السلالة *S. cerevisiae* DBVPG 6500 ومدة 10 أيام في المشروب الغازي ضد السلالة *D. bruxellensis* DBVPG 6706. تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن البروتين القاتل الذي تنتجه السلالة القاتلة (*P. kluyveri* (L5) يمكن اقتراحه كعامل طبيعي جديد في مكافحة الحيوية ضد خمائر إتلاف المواد الغذائية والمشروبات.

كلمات مفتاحية : خمائر، عزل، *Pichia kluyveri*، سم قاتل، مكافحة حيوية، خمائر غير مرغوب فيها.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Références bibliographiques

- Alfenore S. (1999). Interaction de type « killer » chez *Saccharomyces cerevisiae*. Etudes physiologiques et cinétiques. Quantification et modélisation. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Assis M.O., Santos A.P.C., Carlos Augusto Rosa C.A., Mamede M.E.O. (2014). Impact of a non-*Saccharomyces* yeast isolated in the Equatorial region in the acceptance of wine aroma. *Food Nutr Sci*, 5 : 759-769.
- Bajaj B.K., Raina S., Singh S. (2012). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *J Basic Microbiol*, 52:1–11.
- Baffi M.A., Dos Santos Bezerra C., Arevalo-Villena M., Biones-Perez I.A., Gomes E., Da Silva R. (2011). Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. *Ann Microbiol*, 61: 75-78.
- Baleiras-Couto M.M., Reizinho R.G., Duarte F.L. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *Int J Food Microbiol*, 102: 49-56.
- Basmaji M.F. (2005). Caractérisation de la protéine Knr4 et recherche de ses partenaires fonctionnels pour la compréhension de son rôle dans la synthèse pariétale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.
- Bevan E.A., Makover M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. In : Geers S.G. (Eds), *Proc XIth Int Congr Genet*. Pergamon Press, Oxford, pp. 202-203.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-311 dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254.
- Bolano A., Stinchi S., Preziosi R., Bistoni F., Allegrucci M., Baldelli F., Martini A., Cardinali G. (2001). Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res*, 1: 221–224.
- Botha A. (2006). Yeasts in soil. In: Rosa C., Peter G. (Eds), *Ecophysiology and biodiversity of yeasts*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 221-223.
- Bouix M., Leveau J.Y. (1991). Les levures. Dans: Bourgeois C.M., Leveau J.Y. (Eds). *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Techniques et Documentation - Lavoisier, Paris*, pp. 210-223.
- Bussey H., Saville D., Huntchins K., Palfree R.G.E. (1979). Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 140 : 888-892.
- Bussey H. (1972). Effects of yeast killer factor on sensitive cells. *Nature New Biol.*, 235, 73-75.

- Buzdar M.A., Chi Z., Wang Q., Hua M.X., Chi Z.M. (2011). Production, purification, and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91:1571-1579.
- Buzzini P., Corazzi L., Turchetti B., Buratta M., Martini A. (2004). Characterization of the *in vitro* antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiol Lett*, 238:359–365.
- Cadez N., Smith M.T. (2011). *Hanseniaspora Zikes* (1912). In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, London, pp. 428-430.
- Chen W.B., Han Y.F., Jong S.C., Chang S.C. (2000). Isolation, Purification, and Characterization of a Killer Protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl Environ Microbiol*, 66: 5348-5352,
- Ciani M., Faticenti F. (2001). Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *Appl Environ Microbiol*, 67:3058–3063.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard 2nd Edn. NCCLS document M27-A2, Pennsylvania, USA.
- Comitini F., Ciani M. (2011). *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiol Lett*, 316:77-82.
- Comitini F., De Ingeniis J., Pepe L., Mannazzu I., Ciani M. (2004). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol Lett*, 238: 235–240.
- Connell L., Redman R., Craig S., Scorzetti G., Iszard M., Rodriguez R. (2008). Diversity of soil yeasts isolated from south Victoria land, Antarctica. *Microb Ecol*, 56 :448-459.
- Cosma MP. (2004). Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* *HO*: Ash1 is the commander. *EMBO reports*, 5: 953-957.
- Dabhole MP., Joishy KN. (2005). Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri* on sensitive yeasts and fungal pathogens. *Indian J Biotechnol*, 4:290-292.
- da Silva S., Calado S., Lucas C., Aguiar C. (2008). Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* Killer toxin, CnKT. *Microbiol Res*, 163: 243–251.
- De Ingeniis J., Raffaelli N., Ciani M., Mannazzu M. (2009). *Pichia anomala* DBVPG 3003 secretes a ubiquitin-like protein that has antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol*, 75:1129–1134.
- Deak T. (2006). Environmental Factors Influencing Yeasts. In: Rosa C., Peter G. (Eds), *Ecophysiology and biodiversity of yeasts*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 161.

- El-Benna A.A., Malak A., El-Sahn, Shehata M.G. (2011). Yeasts Producing Killer Toxins: An Overview. *Alex J Fd Sci Technol*, 8: 41-53.
- Farkas Z., Márki-Zay J., Judit Kucséra, Vágvölgyi Cs., W. I. Golubev W.I., Ilona Pfeiff. (2012). Characterization of two different toxins of *Wickerhamomyces anomalus* (*pichia anomala*) vkm y-159. *Acta Biol Hung*, 63 : 277-287.
- Golubev W.I. (2006). Antagonistic interactions among yeasts. In: Rosa C.A., Péter G. (Eds) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer, Berlin, pp 197–219.
- Golubev W.I., Golubeva E.W. (2004). Yeast fungi in steppe and forest phytocenoses of the Prioksko-terrasny biosphere reserve. *Mykol i Phytopathol*, 38:20–27.
- Goretti M., Turchetti B., Buratta M., Branda E., Corazzi L., Vaughan-Martini A., Buzzini P. (2009). *In vitro* antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. *Int J Food Microbiol*, 131:178–182.
- Goto K., Iwase Y., Kichise K., Kitano K., Totuka A., Obata T., S. Hara. (1990a). Isolation and properties of a chromosome-dependent KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem*, 54:505–509.
- Goto K., Iwatuki Y., Kitano K., Obata T., Hara S. (1990b). Cloning and nucleotide sequence of the KHR killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem*, 54:979–984.
- Goto K., Fukuda H., Kichise K., Kitano K., Hara S. (1991). Cloning and nucleotide sequence of the KHS killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem*, 55:1953–1958.
- Guo F.J., Ma Y., Xu H.M., Wang X.H., Chi Z.M. (2013). A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103:737–746.
- Hashem M., Hashem A., Alrumman S.A., Alamri S.A., Moustafa M.F.M. (2014). Indigenous yeasts of the rotten date fruits and their potentiality in bioethanol and single-cell protein production. *Int J Agric Bio*, 16:752-758.
- Hatoum R. (2013). Levures lactières à activité antimicrobienne : une nouvelle génération de cultures protectrices et de probiotiques. Thèse de doctorat, Université de Laval, Canada.
- Hernández A., Martín A., Córdoba M. G., Benito M. J., Aranda E., Pérez-Nevado F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Int J Food Microbiol*, 121, 178–188.
- Hodgson V.J., Button D., Walker G.M. (1995). Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology*, 141:2003–2012.
- İzgü F., Altınbay D., Türeli A.E. (2007). *In vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to Panomycocin, a novel exo-b-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Microbiol Immunol*, 51:797–803.

- İzgülü F., Altınbay D. (2004). Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an α -1,3 - glucanase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68 : 685-693.
- Janderová B., Janousková O., Flegelová H., Vondřejš V. (1999). The groove assay for quantitative estimating the killer toxin activity or susceptibility of *S. cerevisiae* strains to killer toxins. *Biotechnol. Tech.*, 13, 883-887.
- Kashiwagi T., Kunishima N., Suzuki C., Tsuchiya F., Nikkuni S., Arata Y., Morikawa K. (1997).
The novel acidophilic structure of the killer toxin from halotolerant yeast demonstrates remarkable folding similarity with a fungal killer toxin. *Structure*, 5: 81-94.
- Klassen R., Meinhardt F. (2005). Induction of DNA damage and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast killer toxin. *Cell Microbiol*, 7 : 393–401.
- Klassen R., Meinhardt F. (2003). Structural and functional analysis of the killer element pPin1–3 from *Pichia inositovora*. *Mol Genet Genomics*, 270 : 190–199.
- Klassen R., Paluszynski J. P., Wemhoff S., Pfeiffer A., Fricke J., Meinhardt F. (2008). The primary target of the killer toxin from *Pichia acaciae* is tRNA(Gln). *Mol Microbiol*, 69 : 681–697.
- Klei I.V., Veenhuis M., Brul S., Klis F.M., De Groot P.W.J., Wally H. Müller W.H., van Driel K.G.A., Boekhout T. (2011). Cytology, Cell Walls and Septa: A Summary of Yeast Cell Biology from a Phylogenetic Perspective. In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, London, pp. 115.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., Robert V. (2011a). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of Yeasts. In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, London, pp. 87–110.
- Kurtzman C.P. (2011a). Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Ascomycetous Yeasts and Yeast-like Taxa. In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, London, pp. 304.
- Kurtzman C.P. (2011b). *Meyerozyma* Kurtzman and M. Suzuki (2010). In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, London, pp. 623.
- Kurtzman C.P., Fell J.W. (2006). Yeast systematics and phylogeny - Implications of molecular identification methods for studies in ecology. In : C. Rosa., G. Péter (Eds), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 11-30.
- Kurtzman C.P., Robnett C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 331-371.

- Kurzweilová H., Sigler K. (1995). Significance of the lag phase in K1 killer toxin action on sensitive cells. *Folia Microbiol*, 40 : 213-213.
- Lachance M.A., Starmer W.T., Rosa C.A., Bowles J.M., Barker J.S., Janzen D.H. (2001). Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Res*, 1 : 1-8.
- Lachance M.A., Bowles J.M., Wiens F., Dobson J., Ewing C.P. (2006). *Metschnikowia orientalis* sp. nov., an Australasian yeast from nitidulid beetles. *Int J Syst Evol microbiol*, 56 : 2489-2493.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- Lim S.L., Tay S.T. (2011). Diversity and killer activity of yeasts in Malaysian fermented food samples. *Tropical Biomedecine*, 28: 438-443.
- Liu S.Q., Tsao M. (2009). Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *Int J Food Microbiol*, 131: 280–282.
- Liu GL., Wang K., Hua M.X., Buzdar M.A., Chi Z.M. (2012). Purification and characterization of the cold-active killer toxin from the psychrotolerant yeast *Mrakia frigida* isolated from sea sediments in Antarctica. *Proc Biochem*, 47:822-827.
- Lowes K.F., Shearmen C.A., Payne J., MacKenzie D., Archer D.B., Merry R.J., Gasson M.J., (2000). Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocine HMK. *Appl Environ Microbiol*, 66 : 1066–1076.
- Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Polonelli L. (1997). Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev*, 10:369-400.
- Manyri L. (2005). Analyse automatique d'image de population microbienne. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Maqueda M., Zamora E., Álvarez M.L. Ramirez M. (2012). Characterization, ecological distribution, and population dynamics of *Saccharomyces sensu stricto* killer yeasts in the spontaneous grape must fermentations of southwestern Spain. *Appl Envir Microbiol*, 78: 735-743.
- Maráz A., Kovács M. (2014). Food spoilage by cold-adapted yeasts. In: Buzzini P., Margesin R. (Eds), Cold-Adapted Yeasts. Springer, Berlin, pp. 497–532.
- Marquina D., Santos A., Peinado J.M. (2002). Biology of killer yeasts. *Int Microbiol*, 5 :65-71.
- Marquina D., Barroso J., Santos A., Peinado J.M. (2001). Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbiol Res*, 156 : 387-389.
- Meinhardt F., Schaffrath R. (2001). Cytoplasmic linear ds-DNA killer elements of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis*, *Progress in Botany* , 62 : 51-70.

- Meneghin M.C., Vanda Renata Reis V.R., Ceccato-Antonini S.R. (2010). Inhibition of Bacteria Contaminating Alcoholic Fermentations by Killer Yeasts. *Braz Arch Biol Technol*, 53 : 1043-1050,
- Middelbeek E.J., Hermans J.M.H., Stumm C. (1979). Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 45:437–450.
- Middelbeek E.J., Stumm C., Vogels G.D. (1980). Effects of a *Pichia kluyveri* killer toxin on sensitive cells. *Antonie van Leeuwenhoek*, 46:205-220.
- Mohamudha Parveen R., Ayesha Begum J. (2010). Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* on sensitive yeast and fungal pathogens. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 3: 127-129.
- Morales-López R., Auclair E., Van Immerseel F., Ducatelle R., García F., Brufau J. (2010). Effects of different yeast cell wall supplements added to maize- or wheat-based diets for broiler chickens. *Brit Poul Sci*, 51 : 399–408.
- Morel G. (2013). La levure *Geotrichum candidum* : taxonomie, biodiversité et génome. Thèse de doctorat, Université Paris-Sud XI Orsay, France.
- Mushtaq M., Nahar S., Hashmi M.H. (2010). Screening of killer-sensitive-pattern (KSP) for biotyping of yeast strains isolated from slime fluxes of trees and flowers' nectar. *Pak. J. Bot.*, 42: 4313-4327, 2010.
- Nadeem S.G., Shafiq A., Hakim S.T., Anjum Y., Kazm S.U. (2013). Effect of Growth Media, pH and Temperature on Yeast to Hyphal Transition in *Candida albicans*. *OJMM*, 3: 185-192.
- Nissen P., Nielsen D., Arneborg N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell–cell contact-mediated mechanism. *Yeast*, 20: 331–341.
- Ochigava, I. Collier P.J., Walker G.M., Hakenbeck R. (2011). *Williopsis saturnus* yeast killer toxin does not kill *Streptococcus pneumoniae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99 : 559–566.
- Odds F.C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard put between them. *J Antimicrob Chemother*, 52:1.
- Oro L. (2011). Role of yeast bioactive compounds in food and fermented beverages. PhD thesis, Polytechnic University of Marche.
- Palfree R.G.E., Bussey H. (1979). Yeast killer toxin: purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 93 : 487-493.
- Papadimitriou M.N.B., Resende C., Kuchler K., Brul S. (2007). High Pdr12 levels in spoilage yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) correlate directly with sorbic acid levels in the culture medium but are not sufficient to provide cells with acquired resistance to the food preservative. *Int J Food Microbiol*, 113:173–179.

- Phaff H.J., Starmer W.T. (1987). Yeasts associated with plants, insects and soil. In: Rose A.H., Harrison J.S. (Eds), *The Yeasts. Biology of yeasts*. Academic, London, pp. 123–180.
- Pillai S.K., Moellering R.C., Eliopoulos G.M. (2005). Antimicrobial combination. In: Lorian V (Eds), *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 365–424.
- Pintar J., Starmer W.T. (2003). The cost and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83:89–98.
- Polonelli L., Magliani W., Ciociola T., Giovati L., Conti S. (2011). From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99:35–41.
- Polonelli L., Conti S. (2009). Biotyping of *Candida albicans* and Other Fungi by Yeast Killer Toxins Sensitivity. In : Cihlar R.L., Calderone R.A. (Eds), *Candida albicans: Methods and Protocols*. Springer Science Business Media, pp. 97-115.
- Polonelli L., Magliani W., Conti S., Bracci L., Lozzi L., Neri P., Adriani D., de Bernardis F., Cassone A. (2003). Therapeutic activity of an engineered synthetic killer anti-idiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis. *Infect Immun*, 71 : 6205–6212.
- Polonelli L., Séguy N., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Cantelli C., Magliani W., Cailliez J.C. (1997). Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4 : 142–146.
- Polonelli L., de Bernardis F., Conti S., Boccanera M., Gerloni M., Morace G., Magliani W., Chezzi C., Cassone A. (1994). Idiotypic intravaginal vaccination to protect against *Candida 1 vaginitis* by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J Immunol*, 152 : 3175–3182.
- Polonelli L., Lorenzini R., de Bernardis F., Gerloni M., Conti S., Morace G., Magliani W., Chezzi C. (1993). Idiotypic vaccination, immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. *Scand J Immunol*, 37: 105–110.
- Pommier S. (2003). Dynamique de populations microbiennes en culture mixte : étude expérimentale en bioréacteur à membranes et modélisation du phénomène killer chez *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Radler F., Herzberger S., Schonig I., Schwarz P. (1993). Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J Gen Microbiol*, 139: 495–500.
- Ramon-Portugal F. (1995). Interaction de type killer entre levures : analyses cinétique, co-culture et modélisation. Thèse de doctorat Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

- Reski-Bekki M.A. (2014). Production de métabolites par les levures: caractérisation et identification des arômes et des alcools. Thèse de doctorat, Université d'Oran. Algérie.
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. (2004). *Traité d'oenologie*. Dunod, Paris, pp.26-57.
- Riffer F., Eisfeld K., Breinig F., Schmitt M. J. (2002). Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 148 : 1317–1328.
- Santos A., Marquina D. (2004). Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biopreservative agent to control grey mould disease of grapevine. *Microbiology*, 150:2527–2534.
- Santos A., San Mauro M., Bravo E., Marquina D. (2009). PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, 155:624–634.
- Santos A., Navascués E., Bravo E., Marquina D. (2011). *Ustilago maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Int J Food Microbiol*, 145:147–154.
- Santos A., Marquina D. (2011). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to proapoptotic concentrations of *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Fungal Genet Biol*, 48 : 979–989.
- Santos A., Marquina D., Leal J.A., Peinado J.M., 2000. (1-6)-b-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Appl Environ Microbiol*, 66 : 809–1813.
- Satyanarayana T., Kunze G. (2009). *Yeast biotechnology: Diversity and Applications*, Springer Science, New Delhi, pp. 744.
- Schmitt M.J., Breinig F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol*, 4: 212-221.
- Schmitt M.J., Breinig F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev*, 26: 257–276.
- Schründer J., Meinhardt F. (1995). Yeast linear killer plasmids as a tool in genetic engineering” *Progress in Botany*, 56 : 332-353.
- Scorzetti G., Fell J.W., Fonseca A., Stazzell-Tallman A. (2002). Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res*, 2: 495-517.
- Seow W.K., Thong K.M. (2005). Erosive effects of common beverages on extracted premolar teeth. *Aust Dent J*, 50 :173-178.

- Silva-Bedoya L.M., Ramírez-Castrillón M., Osorio-Cadauid E. (2014). Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. *Braz J Microbiol*, 45: 135-42.
- Smidtas S. (2007). Modélisation et analyse, globale et locale, de réseaux d'interactions biologiques hétérogènes (RIBH) appliquée à la levures. Thèse de doctorat, Université d'Evry.
- Spencer D.M., Spencer J.F.T., Defigueroa L., Heluane H. (1992). Yeasts associated with rotting citrus fruits in Tucuman, Argentina. *Mycol Res*, 96 : 891–892.
- Starmer W.T., Ganter P.F., Aberdeen V. (1992). Geographic distribution and genetics of killer phenotypes for the yeast *Pichia kluyveri* across the United States. *Appl Environ Microbiol*, 58: 990-997.
- Starmer W.T., Ganter P., Aberdeen V., Lachance M.A., Phaff H.J. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can J Microbiol*, 33:783–796.
- Starmer W.T., Lachance M.A. (2011). Yeast ecology. In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, London, pp. 65-83.
- Stratford M. (2006). Food and beverage spoilage yeasts. In: Querol A, Fleet GH (Eds), *Yeasts in Food and Beverage*. Springer, Berlin, pp. 335–379.
- Suh S.O., Kurtzman, C. P., Lachane, M. (2006). Phylogenetics of Saccharomycetales, the Ascomycete yeasts. *Mycologia*, 98: 1006-1017.
- Suzuki, C., Nikkuni, S. (1994). The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *J Biol Chem*, 269 : 3041–3046.
- Suzuki, C., Ando Y., Machida S. 2001. Interaction of SMKT, a killer toxin produced by *Pichia farinosa*, with the yeast cell membranes. *Yeast*, 18 : 1471–1478.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24: 1596–1599.
- Tarr S. (2004). Yeasts from Lesotho - Their classification and possible applications. PhD thesis, University of the Free State. South Africa.
- Turchetti B., Goretti M., Branda E., Diolaiuti G., D'Agata C., Smiraglia C., Onofria A., Buzzini P. (2013). Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers. *FEMS Microbiol Ecol*, 1-14.
- Tserennadmid R., Takó M., Galgóczy L., Papp T., Pesti M., Vágvölgyi C., Almássy K., Krisch J. (2011). Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int J Food Microbiol*, 144:480–486.
- Vadkertiovà R., Slàvikovà E. (2006). Killer activity of yeasts isolated from natural environments against some medically important *Candida* species. *Pol J Microbiol*, 56: 39-43.

-
- Vadkertiová R., Molnárová J., Vránová D., Sláviková E. (2012). Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. *Can J Microbiol*, 58 :1344-1352
- Vanhee L.M., Symoens F., Jacobsen M.D., Nelis H.J., Coenye T. (2009). Comparison of multiple typing methods for *Aspergillus fumigatus*. *Clin Microbio Infect*, 15 :643-650.
- Walker G.M. (2009). Yeasts. University of Abertay Dundee, Dundee, Scotland. *Elsevier Inc.* 1174-1187.
- Wang X., Chi Z., Yue L., Li J. (2007). Purification and characterization of killer toxin from a marine yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast in crab. *Curr Microbiol*, 55:396–401.
- Wang X.X., Chi Z., Peng Y., Wang X.H., Ru S.G., Chi Z.M. (2012). Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Microbiol Res*, 167: 558-563.
- Woods D.R., Bevan E.A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*, 51:115–126.
- Zanol G., Baleiras-Couto M.M., Duarte F. (2010). Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification. *Ciência Téc Vitiv*, 25: 75-85.

ANNEXES

Annexe 1

Composition des milieux de culture

- **Yeast Malt Agar (YMA):**

Extrait de levure	3 g
Extrait de malt	3 g
Peptone	5 g
Glucose	10 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

- **Yeast Peptone Glucose (YPG):**

Extrait de levure	10 g
Peptone	10 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

- **Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) :**

Glucose	20 g
Peptone	20 g
Extrait de levure	5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

- **Potato Dextrose Agar (PDA) :**

Amidon de pomme de terre	50 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

- **Milieu d'assimilation de substrats carbonés, Yeast Narbon Base (YNB) :**

YNB	6.7 g
Glucose	5 g
Eau distillée	1000 ml

- **Milieu d'assimilation de substrats azotés, Yeast Carbon Base (YCB) :**

YCB	11.7 g
KNO ₃	5 g (ou équivalent)*
Eau distillée	1000 ml

* NaNO₂, 0.26 g

- **Yeast Extract Peptone (YP) :**

Extrait de levure	4.5 g
Peptone	7.5 g
Eau distillée	1000 ml

Annexe 2

- **Protocole de la technique de PCR :**

La programmation de la PCR s'effectue ainsi :

- étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 5 min
- une série de 30 cycles d'amplification comprenant :
 - a) une phase de dénaturation à 94°C pendant 45 secondes
 - b) une phase d'hybridation à 52°C pendant 30 secondes
 - c) une phase d'élongation à 72° pendant 2 min
- une dernière phase d'élongation à 72°C pendant 7 min

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont séparés en fonction de leur taille par une électrophorèse en gel d'agarose à 1.4 % (w/v). La migration est faite dans le tampon TAE 1x (Tris 40 mM, acétate 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6), sous voltage 120 V pendant 1.5 h. La révélation de l'ADN dans le gel est assurée par l'incorporation de bromure d'éthidium (BET) dans le gel au moment de son coulage dans la plaque à électrophorèse. Des marqueurs (Mass Ruler™ DNA ladder, Mix, Fermentas Inc., Hanover) sont utilisés comme marqueurs de poids moléculaire. Les bandes électrophorétiques d'ADN sont visualisées sous la lumière UV grâce à la fluorescence du BET.

Annexe 3

Liste détaillée des souches de levures d'intérêt alimentaire et médical utilisées dans le test préliminaire de la mise en évidence de l'activité killer chez les souches isolées (Des informations supplémentaires sont disponibles sur le site : www.dbvpg.unipg.it)

Espèce	Souche	Origine	Localité
<i>Candida albicans</i>	DBVPG 6133	Peau d'homme avec mycose interdigitale	Uruguay
	DBVPG 6157	Homme	Inconnue
	DBVPG 7450	Erosion interdigitale	Uruguay
	DBVPG 3903	Flegme d'un patient atteint de la tuberculose	Perugia
<i>Candida glabrata</i>	DBVPG 7212	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 3828	Selles	Inconnue
	DBVPG 7241	Peau humaine	Allemagne
	DBVPG 4278	Cavité orale humaine	Pérouse, Italie
	DBVPG 7240	Crachat humain	Inconnue
<i>Candida parapsilosis</i>	DBVPG 6150	Epinette	Porto Rico
<i>Candida tropicalis</i>	DBVPG 3982	Patient bronchitique	Inconnue
	DBVPG 3920	Flegme d'un patient atteint de la tuberculose	Pérouse, Italie
	DBVPG 7431	Patient bronchitique	Inconnue
	DBVPG 3921	Flegme d'un patient atteint de la tuberculose	Pérouse, Italie
<i>Candida zeylanoides</i>	DBVPG 6163	Macroglossie	Inconnue
<i>Clavispora lusitaniae</i>	DBVPG 6142	Caecum de porc	Portugal
<i>Clavispora lusitaniae</i>	DBVPG 6148	Crachat	Norvège
<i>Cryptococcus laurentii</i>	DBVPG 3883	Flegme d'un patient atteint de la tuberculose	Inconnue
<i>Cryptococcus laurentii</i>	DBVPG 4272	Cavité orale humaine	Pérouse, Italie
<i>Cryptococcus laurentii</i>	DBVPG 6265	Vin de palme	Congo
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DBVPG 6050	Inconnue	Inconnue
<i>Dekkera anomala</i>	DBVPG 6708	La bière	Inconnue
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DBVPG 6706	Sédiments de la bière	Belgique
<i>Filobasidiella bacillispora</i>	DBVPG 6225	Liquide de la colonne vertébrale	Etats Unies
<i>Filobasidiella neoformans</i>	DBVPG 3428	Inconnue	Yougoslavie
<i>Filobasidiella neoformans</i>	DBVPG 6010	Jus de fruit fermenté	Inconnue
<i>Filobasidiella neoformans</i>	DBVPG 6981	Inconnue	Inconnue
<i>Filobasidiella neoformans</i>	DBVPG 6982	Inconnue	Inconnue
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	DBVPG 6718	Raisins	Ukraine
<i>Kazachstania exigua</i>	DBVPG 6252	Inconnue	Inconnue

(La suite)

<i>Kluyveromyces lactis</i>	DBVPG 6305	Fromage	Grande Bretagne
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DBVPG 6141	Grains de Kéfir	Les Pays-Bas
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	DBVPG 6140	Crachat	Inconnue
<i>Pichia kudriavzevii</i>	DBVPG 6782	Jus de fruit	Inconnue
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DBVPG 6173	Levure de boulanger	Les Pays-Bas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DBVPG 6497	Inconnue	Inconnue
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DBVPG 6500	Inconnue	Inconnue
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	DBVPG 6047	Arbre	Inconnue
<i>Yarrowia lipolytica</i>	DBVPG 6053	Maïs	Etats Unies
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	DBVPG 6901	Olives	Inconnue
<i>Prototheca wickerhamii</i>	DBVPG 9225	Inconnue	Inconnue
<i>Prototheca zopfii</i>	DBVPG 9227	Inconnue	Inconnue
<i>Prototheca zopfii</i>	DBVPG 9135	Inconnue	Inconnue

Liste détaillée des souches de levures d'altération des aliments et de boissons testées pour leur sensibilité à la toxine killer produite par la souche *Pichia kluyveri* (L5) (Des informations supplémentaires sont disponibles sur le site : www.dbvpg.unipg.it)

Espèce	Souche	Origine	Localité
<i>Candida parapsilosis</i>	DBVPG 3741	Grignons d'olives ensilés	Italie
	DBVPG 3742	Sol	Finlande
	DBVPG 4047	Mouts de raisins	Italie
	DBVPG 4331	Eau marine	Italie
	DBVPG 6150	Epinette	Porto Rico
<i>Debaryomyces fabryi</i>	DBVPG 6406	Lésion de la peau	France
	DBVPG 6806	Sol	Italie
	DBVPG 7034	Fluide de tannage	France
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DBVPG 6050	Inconnue	Inconnue
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	DBVPG 3143	Saucisses	Italie
<i>Dekkera anomala</i>	DBVPG 3766	La bière stout	Grande Bretagne
	DBVPG 4075	La bière stout	Grande Bretagne
	DBVPG 6708	La bière	Inconnue
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DBVPG 6703	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 6704	Le lambic	Belgique
	DBVPG 6705	Mouts de raisins	France
	DBVPG 6706	Sédiments dans le lambic	Belgique
	DBVPG 6707	Sédiments dans le lambic	Inconnue
	DBVPG 6710	Bière de thé	Mozambique
	DBVPG 7279	Fut de bière altérée	Inconnue
	DBVPG 7280	Fut de bière altérée	Inconnue

(La suite)

<i>Hanseniaspora uvarum</i>	DBVPG 3284	Sol	Pays-Bas
	DBVPG 3388	Fleurs	Italie
	DBVPG 3795	Mouts de raisins	Italie
	DBVPG 4312	Mouts de raisins fermentés	Italie
	DBVPG 6718	Raisins	Ukraine
<i>Kazachistania exigua</i>	DBVPG 4384	Eau marine	Italie
	DBVPG 6252	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 6369	Fraises	Japan
	DBVPG 6481	Babeurre	Pays-Bas
	DBVPG 7866	Sol	Costa Rica
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DBVPG 6164	Yaourt	Pays-Bas
	DBVPG 6165	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 6854	Forêt tropicale, <i>Drosophila</i> sp.	Brésil
<i>Kluyveromyces lactis</i>	DBVPG 3423	Lait	Italie
	DBVPG 6075	<i>Drosophila</i> sp.	Etats Unis
	DBVPG 6305	Fromage gassy	Grande Bretagne
	DBVPG 6835	Fromage gassy	Grande Bretagne
	DBVPG 6969	Exsudats d'arbres	Japon
	DBVPG 6866	Cactus	Brésil
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	DBVPG 3749	Fromage Mozzarella	Italie
	DBVPG 3751	Grignons d'olives ensilés	Italie
<i>Pichia kudriavzevii</i>	DBVPG 3755	Sol	Finlande
	DBVPG 3916	Tec rouge	Ethiopie
	DBVPG 7252	Matériel végétal	Petites Carpates
	DBVPG 7257	Fruit	Ile Maurice
	DBVPG 6782	Jus de fruit	Inconnue
<i>Pichia membranifaciens</i>	DBVPG 3115	Sol	Pays-Bas
	DBVPG 3309	Mouts de raisins	Italie
	DBVPG 3619	Artichaut	Italie
	DBVPG 3967	Vin	Italie
	DBVPG 6720	Inconnue	Inconnue
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DBVPG 3858	Papillon	Inconnue
	DBVPG 4377	Eau marine	Italie
	DBVPG 4466	Peau de citron	Italie
	DBVPG 5235	Sol près du glacier	Antarctique
	DBVPG 7019	Inconnue	Inconnue
<i>Saccharomyces bayanus</i>	DBVPG 6115	Jus de poire	Suisse
	DBVPG 6171	La bière trouble	Inconnue
	DBVPG 6259	Pulpe de poire	Inconnue
	DBVPG 6260	Jus de raisins	Inconnue
	DBVPG 6299	<i>Mesophylax adopersus</i>	Espagne
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DBVPG 1006	Graines de Colza	Italie
	DBVPG 1015	Mouts de raisins	Italie
	DBVPG 1055	Jus du palmier dattier	Tunisie

(La suite)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DBVPG 1832	Jus de fruits	Inconnue
	DBVPG 1862	Jus de fruits	Inconnue
	DBVPG 1864	Jus de fruits	Inconnue
	DBVPG 1871	Jus de fruits	Inconnue
	DBVPG 3964	Vin	Italie
	DBVPG 5760	Vin fermenteur	Italie
	DBVPG 5766	Baril en acier de vin	Italie
	DBVPG 5780	Vin fermenteur	Italie
	DBVPG 6173	Levure de boulanger	Pays-Bas
	DBVPG 6285	Bière	Danemark
	DBVPG 6497	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 6500	Inconnue	Inconnue
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	DBVPG 6560	Brasserie	Inconnue
	DBVPG 6047	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 6258	Bière	Inconnue
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	DBVPG 6275	Raisins	Espagne
	DBVPG 6277	Arak mash	Inconnue
	DBVPG 6280	Mélasses de cannes à sucres	Jamaïque
	DBVPG 6448	Pomme	Pologne
	DBVPG 6688	Mouts de raisins	Italie
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	DBVPG 2501	Mouts de raisins	Italie
	DBVPG 2530	Sol	Pays-Bas
	DBVPG 3463	Raisins	Espagne
	DBVPG 6167	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 6169	Ecorce de <i>Combretum apiculatum</i>	Afrique du Sud
<i>Torulaspora microellipsoides</i>	DBVPG 6188	Jus de poire	Allemagne
	DBVPG 6394	Baies de <i>Ribes nigrum</i>	Danemark
	DBVPG 6396	Bière de thé	Finlande
	DBVPG 6397	Exsudats de <i>Myoporum</i> sp.	Inconnue
	DBVPG 6398	Limonade	Suisse
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	DBVPG 3863	Miel	Ethiopie
	DBVPG 3972	Cavernes	Italie
	DBVPG 4099	Dattes	Iraq
	DBVPG 6781	Inconnue	Inconnue
<i>Yarrowia lipolytica</i>	DBVPG 3219	Fromage	Pays-Bas
	DBVPG 3374	Fleurs	Italie
	DBVPG 6022	Olives	Italie
	DBVPG 6053	Usine de transformation de maïs	Etats-Unis
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	DBVPG 3458	Sol	Espagne
	DBVPG 6117	Jus de pommes	Pays-Bas
	DBVPG 6287	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 6377	Lies de mouts de poires	Inconnue
	DBVPG 6435	<i>Myoporum</i> sp.	Japon

(La suite)

<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	DBVPG 3016	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 3018	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 3052	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 3111	Mouts de raisins	Italie
	DBVPG 3112	Mouts de raisins	Italie
	DBVPG 3303	Raisins	Italie
	DBVPG 3552	Mouts de raisins	Espagne
	DBVPG 6382	Inconnue	Inconnue
	DBVPG 6383	Champignons de la bière de thé	Indonésie
	DBVPG 6384	Champignons de la bière de thé	Indonésie
	DBVPG 6485	Concombre fermenté	Etats-Unis
	DBVPG 6901	Olives	Inconnue
	DBVPG 6925	Vinaigrette	Etats-Unis

Annexe 4**Identification moléculaire : les séquences**

- **S1- *Hanseniaspora uvarum* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

TACGGCGAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCCG
AGTTGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACA
GGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGAC
TTTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCA
TCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAG
ATGAAAAGAAGTCTTGAAGAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA
GGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTGGGC
CTCTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAATTCTGGCAGCAGGATAAATCATTAAG
AATGTAGCTACTTCGGTAGTGTATAGCTTTTTTGAATACTGTTAGCCGGGATTGAG
GACTGCGCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCCGTCTTGA

- **S2- *Hanseniaspora uvarum* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

GCGAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGAGTT
 GTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGAC
 GTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTTTTT
 CGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAA
 AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAA
 AAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCA
 TTTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTGGGCCTCTC
 AAAAATTTCACTGGGCCAACATCAATTCTGGCAGCAGGATAAATCATTAAAGAATGT
 AGCTACTTCGGTAGTGTTATAGCTTTTTTGAATACTGTTAGCCGGGATTGAGGACTG
 CGCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCCGTCTTGAAACACGGA
 CC

- **S3- *Hanseniaspora uvarum* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

GAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGAGTTGT
 AATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGT
 CATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTTTTTTCG
 AAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAG
 CTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAA
 GAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATT
 TGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTGGGCCTCTCAA
 AAATTTCACTGGGCCAACATCAATTCTGGCAGCAGGATAAATCATTAAAGAATGTAG
 CTAATTCGGTAGTGTTATAGCTTTTTTGAATACTGTTAGCCGGGATTGAGGACTGCG
 CTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCCGTCTTGAA

- **S4- *Hanseniaspora uvarum* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

CGGCGAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGAG
 TTGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGG
 ACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTT
 TTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCATC
 TAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGAT
 GAAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGG
 GCATTTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTGGGCCT
 CTCAAAATTTCACTGGGCCAACATCAATTCTGGCAGCAGGATAAATCATTAAAGAA
 TGTAGCTACTTCGGTAGTGTTATAGCTTTTTTGAATACTGTTAGCCGGGATTGAGGA
 CTGCGCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCCGTCTTGA

- **S5- *Pichia kluyveri* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

CGGCGAGTGAagCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCTCACCTAGTGTGCGAGTTGT
 AAATTGCAGGTTGGAGTCTCGGGTTAGACGTGTGTGCAAGTCCCTTGGAACAGGGT
 GCCACTGAGGGTGAGAGCCCCGTATCGTGCATGTCGACACCTGTGAGGCCCTTCTG
 ACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAGG
 CTAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAA
 GCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATT
 GGGCTCGACATGGGATTTACGCATCGTTGCCTCTCGTGGGCGGCCGCTCTGGGTTTTT
 CCTGGGCCAGCATCGGTTTTTCGTTGCAGGATAAGGACAATTGGAATGTGGCTCCTC
 GGAGTGTTATAGCCTTTTGTAGATGCTGCGTATGGGGACCGAGGGCTGCGGCGGAC
 TCGTTTCGTCTCGGATGCTGGCACAACGGCGCAATACCGCCCGTCTT

- **S6- *Hanseniaspora opuntiae* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

CGGCGAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGAG
 TTGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGG
 ACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTT
 TTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCATC
 TAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGAT
 GAAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGG
 GCATTTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTGGGCCT
 CTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAATTCTGGCAGTAGGATAAATCATTAAAGAA
 TGTAGCTACCTCGGTAGTGTTATAGCTTATTGGAATACTGCTAGCTGGGATTGAGG
 ACTGCGCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCCGTCTTGAA

- **S7- *Hanseniaspora opuntiae* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

GGCGAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGAGT
 TGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGA
 CGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTTTT
 TCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTA
 AAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGA
 AAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGC
 ATTTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTGGGCCTCT
 CAAAATTTCACTGGGCCAACATCAATTCTGGCAGTAGGATAAATCATTAAAGAATG
 TAGCTACCTCGGTAGTGTTATAGCTTATTGGAATACTGCTAGCTGGGATTGAGGAC
 TGCGCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCCGTCTTGA

- **S8- *Meyerozyma guilliermondii* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

GCGAGTGAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTG
 TAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGAC
 GTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTT
 TCGAAGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTA
 AAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGA
 AAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGT
 TTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAG
 CTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTT
 ACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGC
 GATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCGCCCGTCTTG

- **S9- *Meyerozyma guilliermondii* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGT
 TGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGG
 ACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGC
 TTTCGAAGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATC
 TAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGAT
 GAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGG
 GTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGC
 AGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACT
 TACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACT
 GCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCGCCCGTCTTGAAACACG
 GACC

- **S10- *Meyerozyma guilliermondii* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

GCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTT
 GTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGA
 CGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCT
 TTCGAAGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCT
 AAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATG
 AAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGG
 TTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCA
 GCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTT
 TACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTG
 CGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCGCCCGTCTTGA

- **S11- *Meyerozyma guilliermondii* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGT
 TGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGG
 ACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGC
 TTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATC
 TAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGAT
 GAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGG
 GTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGC
 AGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACT
 TTAATTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACT
 GCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCGCCCGTCTTGA

- **S12- *Saccharomyces cerevisiae* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

CGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAG
 TTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAG
 GACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
 CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCAT
 CTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGA
 TGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG
 GGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCT
 CGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTA
 GCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGAC
 TGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCCTTGA

- **S13- *Saccharomyces cerevisiae* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

CGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAG
 TTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAG
 GACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
 CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCAT
 CTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGA
 TGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG
 GGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCT
 CGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTA
 GCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGAC
 TGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCCTTGA

- **S14- *Cryptococcus aerius* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

GCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCAGCCTCAGGTTGTCCGA
 GTTGTAATCTATAGAAACGTTTTCCGCGCTGGCCCATGTACAAGTCCCTTGGAATA
 GGGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCCTTGACACGGACCACCAGTGCTTTGTGA
 TACGTTTTCAACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATT
 CCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGA
 AAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTATGTGAAATTGTTGAAAGG
 GAAACGATTGAAGTCAGTCGTGTCTATTGGACTCAGCCGGTTCTGCCGGTGTACTT
 CCTTTAGATGGGGTCAACATCAGTTTTGATCGCTGGAAAAGGGCGGGAGGAATGTA
 GCACTCTCGGGTGAAC TTATAGCCTTCCGTCGTATACAGTGGTTGGGACTGAGGAA
 CGCAGCATGCCTTTATGGCCGGGGTTCGCCCACGTACATGCTTAGGATGTTGACAT
 AATGGCTTTAAACGACCCGTCTTG

- **S15- *Cryptococcus aerius* D1/D2 du gène de l'ARNr 26S**

ACGGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCAGCCTCAGGTTGTC
 CGAGTTGTAATCTATAGAAACGTTTTCCGCGCTGGCCCATGTACAAGTCCCTTGGA
 ATAGGGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCCTTGACACGGACCACCAGTGCTTTG
 TGATACGTTTTCAACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAA
 ATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAG
 GGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTATGTGAAATTGTTGAA
 AGGGAAACGATTGAAGTCAGTCGTGTCTATTGGACTCAGCCGGTTCTGCCGGTGTAA
 CTCCTTTAGATGGGGTCAACATCAGTTTTGATCGCTGGAAAAGGGCGGGAGGAAT
 GTAGCACTCTCGGGTGAAC TTATAGCCTTCCGTCGTATACAGTGGTTGGGACTGAG
 GAACGCAGCATGCCTTTATGGCCGGGGTTCGCCCACGTACATGCTTAGGATGTTGA
 CATAATGGCTTTAAACGACCCGTCTTG

Intitulé : Activité « killer » chez des levures isolées des sols du Nord-Est Algérien : Purification, caractérisation et effet sur les souches de levures indésirables.

Résumé :

L'objet principal de cette thèse est la recherche de l'activité killer chez des levures isolées à partir des échantillons de sol agricole et forestier dans la région de Constantine pour des applications biotechnologiques. L'isolement des levures permet de répertorier 15 souches. La taxonomie moléculaire sur la base des séquences de la région D1/D2 du gène codant pour l'ARN ribosomique 26S des isolats aboutissent à six espèces différentes : *Cryptococcus aerius*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Meyerozyma guilliermondii* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches isolées sont en accord avec ceux cités dans la littérature. Le test préliminaire de la mise en évidence de l'activité killer chez les souches isolées, révèle que seule la souche L5 possède une activité killer. Cette souche appartient à l'espèce *P. kluyveri*. L'extrait de la protéine killer produite par la souche *P. kluyveri* (L5) révèle que la toxine est active contre des souches d'altération d'aliments et boissons appartenant aux genres : *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces* et *Zygosaccharomyces* avec un effet très prononcé pour la souche *D. bruxellensis* DBVPG 6706. Les traitements thermiques (30 à min à 100°C) et enzymatique par une protéase, la pronase, font perdre complètement l'activité killer initiale de la toxine, ce qui prouve sa nature protéique.

Sa purification par chromatographie gel filtration sur Sephacryl-S 200, donne un seul pic correspondant à une masse moléculaire de 54 kDa par SDS-PAGE. La toxine killer purifiée possède un pH optimum entre 4.0-4.5 et une température optimale à 25°C. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMIs) montre que la protéine killer a une activité élevée *in vitro* contre *D. bruxellensis* (MICs de 64 000 à 256 000 fois plus faibles que celles obtenues avec le métabisulfite de potassium) et contre *S. cerevisiae* (MICs de 32 000 à 64 000 fois plus faibles que celles obtenues avec le sorbate de potassium). Aucune interaction synergétique *in vitro* (calculée par l'indice CIF- Σ CIF) est observée quand la protéine killer est utilisée en combinaison avec les agents antifongiques : le métabisulfite de potassium, le sorbate de potassium ou l'éthanol. La protéine killer purifiée présente une relation dose-effet contre les souches sensibles *D. bruxellensis* DBVPG 6706 et *S. cerevisiae* DBVPG 6500 inoculées dans une boisson gazeuse rafraichissante « *Campari MIXX* » (Milan, Italie) et un jus de poire « *Santal* » (Parma, Italie), respectivement. De plus, la toxine killer maintient son activité au moins 3 jours dans le jus de poire contre *S. cerevisiae* DBVPG 6500 et pendant 10 jours dans la boisson gazeuse contre *D. bruxellensis* DBVPG 6706. Les résultats de la présente étude suggèrent que la protéine killer produite par la souche *P. kluyveri* (L5) peut être proposée comme un nouvel agent naturel de biocontrôle de levures indésirables contenues dans les boissons.

Mots clés : levures, isolement, *Pichia kluyveri*, protéine killer, biocontrôle, levures indésirables.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications. Université des Frères MENTOURI, Constantine.

Membres de Jury :

Président : Mr. KACEM-CHAOUCH N. Prof. Univ. Frères MENTOURI, Constantine.

Encadreur : Mme. MERAIHI Z. Prof. Univ. Frères MENTOURI, Constantine.

Examineurs : Mme. BENDJEMANA K. M.C.A. Univ. LAGHROUR A. Khenchela.

Mr. HARZALLAH D. Prof. Univ. FERHAT A. Sétif.

Mr. SAKA S. Prof. Univ. BADJI M. Annaba.