

# ÉVALUATION QUANTITATIVE DE L'EFFET KILLER DES LEVURES ŒNOLOGIQUES. EFFET DE DIVERS ADJUVANTS

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE KILLER ACTIVITY OF SOME OENOLOGICAL YEASTS. EFFET OF SOME ADDITIVES

Sandrine ALFENORE, Marie-Line DÉLIA et P. STREHAIANO

Équipe "Fermentations & Bioréacteurs", Laboratoire de Génie Chimique, UMR CNRS 5503,  
I.N.P. - E.N.S.I.G.C., 18, Chemin de la Loge, 31078 Toulouse Cedex 04, France.

**Résumé :** En Œnologie, la possession par une souche de levure du facteur Killer est considérée comme une chance supplémentaire d'implantation. Cependant, les méthodes usuelles de caractérisation d'une souche vis-à-vis de ce facteur ne permettent pas d'établir une hiérarchie parmi ces souches. Dans ce travail, nous présentons une méthode quantitative basée sur la mesure de la fuite d'ATP induite chez les cellules sensibles par la toxine killer. Nous montrons qu'il est alors possible de classer différentes souches sensibles vis-à-vis de leur sensibilité à une souche killer comme différentes souches killer vis-à-vis de leurs effets sur une même souche sensible. Enfin, l'effet de divers adjuvants sur l'expression de cet effet est analysé.

**Summary :** The Killer factor was discovered in 1963. Since this time it has been widely studied and nowadays a lot is known about genetics of the factor, the biochemistry of the toxin and also about the way of action of the toxin on sensitive yeasts. The yeast strains are classified in three groups : killer strains, sensitive strains and neutral strains. The killer strain is able to kill sensitive strains while neutral strains are unable to kill any strain and remain unaffected by the toxin. Certainly this classification depends on the couple of strains (killer and sensitive) taken as references. It has been clearly established that the toxin acts on the sensitive cells by inducing important losses of ATP : due to holes created by the toxin in the cell membrane, ATP leaves the cell.

In the field of Enology, it's generally accepted that a killer yeast has more probabilities to have a good implantation in a non sterile medium (as the must is) than a neutral or a sensitive strain. Nevertheless, it is difficult to have a precise idea of the sensitivity of a strain as well as of its toxicity, as most of the methods are only able to give a qualitative information.

In this paper, a new method of evaluation of the killer effect is presented. Also some results dealing with its application to the classification of some enological yeast strains are given and discussed.

This method is based on the measurement of the ATP released by the sensitive strain under the action of the killer toxin. The criterion that we define is the initial rate of ATP release, that means the quantity of ATP lost in the two first hours by the sensitive cells in contact with the toxin. In a first step, it is shown that this method is reliable and also that it is in a good agreement with the method using the flow cytometry. ATP leak could be correlated with the amount of affected cells (dead and damaged cells). So, using this method, it becomes possible to classify easily yeast strains with respect to their sensitivity or toxicity. Several killer yeast strains were tested against a sensitive strain and different sensitive strains were submitted to the action of a killer toxin produced by a killer strain. It was shown that the losses of ATP were quite different according to the sensitivity of the strain. The initial rate of ATP release was found to be in a range of 0.00 to 0.12 micromole/L/h. The second part of the work deals with the study of the possible effect of some products used for winemaking on the efficiency of the killer effect. The products we have studied were bentonite, tannic acid and enological tannins. It is shown that these products may interact with the killer effect. So, bentonite, for example is able to inhibit completely the efficiency of the killer toxin, as soon as its concentration is about 10 grams/hL.

**Mots-clés :** facteur killer, ATPmétrie, classement de souches, adjuvants

**Key words :** killer factor, ATP measurements, strain classification, additives

## INTRODUCTION

Dans les années qui ont suivi la "découverte" du mécanisme "killer" chez *Saccharomyces cerevisiae* (BEVAN et MAKOVER, 1963), nombre de travaux ont porté sur l'analyse de ce phénomène chez les levures responsables de la fermentation alcoolique lors de l'élaboration des vins. Les premières études ont été d'ordre "écologique" et ont essentiellement concerné la répartition des types alors définis (sensible, neutre, killer) au sein des populations levuriennes présentes dans les vignes et les caves (BARRE, 1978). Par la suite, les auteurs se sont intéressés à la réalité de l'expression de ce mécanisme dans les conditions de la vinification, c'est-à-dire aux facteurs susceptibles de l'amplifier ou au contraire de la minimiser (BARRE, 1981 ; POULARD, 1984). Parallèlement à ces recherches fondamentales, les industriels de la levure ont inclus la détermination du caractère killer, neutre ou sensible d'une souche dans leurs critères de sélection. Dans la logique actuelle d'emploi de levures sèches actives pour l'ensemencement des cuves de fermentation, l'implantation de la souche voulue doit pouvoir être garantie, et il est clair que la possession par une souche du facteur killer pouvait constituer un facteur supplémentaire de réussite. Quelques études "de terrain" sont disponibles qui renseignent sur les capacités d'implantation de souches "killer" par rapport à celles de "non-killer" ; le rôle important du niveau de la population indigène est souvent souligné (ROZIERES *et al.*, 1989). Les études plus fondamentales ont essentiellement concerné l'analyse des mécanismes d'action de la protéine killer (BUSSEY, 1972, 1981 ; BUSSEY et SHERMAN, 1973 ; BUSSEY *et al.*, 1979 ; KAGAN, 1983) ainsi que celle du déterminisme génétique de cette capacité (TIPPER et BOSTIAN, 1984 ; DOUGLAS *et al.*, 1988). Par contre, les travaux d'ordre cinétique sont moins nombreux. Une approche de modélisation du comportement de souches killer et sensible en cultures mixtes avec différents rapports initiaux de population est réalisée en 1992 par RAVAZ (RAVAZ, 1992). Plus récemment, cette analyse est reprise et complétée par RAMON PORTUGAL qui propose un test de mesure quantitative de l'activité killer (RAMON PORTUGAL *et al.*, 1994) ainsi qu'un modèle mathématique performant (RAMON PORTUGAL, 1995). Cependant, un des problèmes majeurs qui restait à résoudre pour aller plus loin dans l'étude de cette interaction était celui de l'absence de méthode de mesure quantitative précise de la sensibilité d'une souche à la toxine. Le test d'activité proposé par RAMON PORTUGAL (RAMON PORTUGAL *et al.*, 1994) bien que plus précis que le test classique de mesure de zones d'inhibition sur culture gélosée (WOODS et BEVAN, 1968 ; SUGISAKI *et al.*, 1983) reste encore lourd à mettre en œuvre et n'apporte pas

exactement toute la connaissance nécessaire sur la sensibilité de la souche concernée. Très récemment, nous avons donc développé une nouvelle technique d'évaluation de la sensibilité d'une souche à une toxine killer (ALFENORE, 1999). Cette mesure est basée sur la quantification du flux d'ATP libéré par la souche sensible soumise à l'action de la protéine killer. En effet, les études fondamentales sur le mécanisme d'action ont montré que la toxine agissait en se fixant sur la paroi de la cellule sensible et créait des pores dans la membrane plasmique, ce qui autorisait l'efflux d'ATP et de potassium (SKIPPER et BUSSEY, 1977 ; DE LA PEÑA *et al.*, 1980, 1981). Cet efflux entraîne la mort rapide de la cellule. La méthode que nous avons développée est donc basée sur la mesure de la vitesse initiale de la fuite d'ATP dans le milieu extracellulaire. Très précise, cette méthode a montré qu'elle était plus fine que le test de mesure d'activité de RAMON PORTUGAL (seuil de détection plus bas, gamme de réponse quantitative plus large).

Dans un premier temps, nous expliciterons cette méthode puis nous l'utiliserons d'une part, pour établir la sensibilité de diverses souches cibles à une souche killer de référence et d'autre part, pour comparer les pouvoirs toxiques de diverses souches killer par rapport à une souche sensible témoin. Enfin, l'influence de divers adjuvants pouvant être utilisés en vinification et susceptibles d'interférer sur le mécanisme killer sera étudiée. Les souches de levure utilisées sont toutes des souches sélectionnées pour l'élaboration des vins et disponibles dans le commerce.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### I - MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Au cours de cette étude, différents micro-organismes produits par la société Lallemand S.A. (Montréal, Canada) ont été utilisés ; le tableau I donne le phénotype des différentes levures du genre *Saccharomyces cerevisiae* utilisées et leurs nom et origine (code ou nom commercial). Les souches killer, autres que S.c.

#### TABLEAU I

Liste des souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées (phénotype, nom, numéro de collection).

Table I - List of the different strains of *Saccharomyces cerevisiae* used (phenotype, name, collection number).

	Nom des souches (n° collection Lallemand S.A.)
Killer	K1 (LYCC 016) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
Sensible	S6 (LYCC 6252) D254 (LYCC 116), BC (LYCC 048)
Neutre	3079RI (LYCC 098)

K1 (souches 1 à 9), sont volontairement codées. Le phénotype de chacune des souches citées a été établi par la technique usuelle d'inhibition en culture sur milieu gélosé (WOODS et BEVAN, 1968). Les souches killer et sensible de référence sont respectivement S.c. K1 (porteuse du facteur killer K2) et S.c. S6.

## II - MÉTHODE DE QUANTIFICATION DE L'ACTIVITÉ OU DE LA SENSIBILITÉ KILLER

### 1 - Production de toxine killer

La première étape consiste à produire la protéine killer par culture en milieu liquide de la souche à tester. Les cultures ont lieu sur milieu minimum (glucose : 50 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,4 g/L, extrait de levure : 1 g/L (pH initial = 4)) en conditions fermentaires d'anaérobiose non stricte, à 25°C, sous agitation à 250 tours par minute. Le milieu de culture estensemencé initialement à raison de  $3 \times 10^6$  cellules killer viables/mL. Pour comparer les pouvoirs toxiques de différentes souches killer, toutes les cultures sont menées dans les conditions fermentaires précédentes et arrêtées après 15 heures de culture. Le milieu est alors filtré pour éliminer toutes les cellules (ALFENORE, 1999). Il a été vérifié que, dans ces conditions, les niveaux de population atteints pour chacune des cultures des souches killer sont du même ordre de grandeur ( $90 \times 10^6$  à  $100 \times 10^6$  cellules/mL) et que la production de toxine est maximale à ce moment là. Ces milieux préfermentés contiennent alors la protéine killer en plus ou moins grande quantité en fonction de la souche utilisée pour la production.

### 2 - Mesure de l'activité killer par fuites d'ATP

Afin de quantifier l'effet toxique par la mesure des fuites d'ATP, un volume de milieu préfermenté killer est apporté sur un même volume de culture de cellules à tester supposées sensibles (culture test) tandis qu'un volume identique de solution toxique subit au préalable un traitement thermique (121°C, 10 minutes) destiné à dénaturer la toxine. Cette fraction dénaturée sera apportée dans le même rapport volumique sur la culture de la souche "sensible" ce qui constituera le témoin (culture de référence). Les concentrations en ATP extracellulaire sont alors mesurées par bioluminescence dans les cultures test et référence au temps initial et après deux heures de culture. En effet, des travaux déjà anciens (BUSSEY, 1972, SKIPPER et BUSSEY, 1977) analysant le mécanisme d'action de la toxine killer, avaient mis en évidence la fuite d'ATP et établi que l'essentiel des perturbations membranaires sur la cellule sensible se manifestait dans un délai très bref (inférieur à 2 heures).

Pour les études de hiérarchisation des souches killer en fonction de leur "pouvoir toxique", toutes les solutions toxiques correspondent à des milieux préfermentés obtenus après 15 heures de culture des différentes souches à tester. Les conditions opératoires du test par bioluminescence restent identiques : la souche sensible de référence utilisée est la souche S.c. S6 (culture en phase en croissance, concentration en cellules :  $75 \times 10^6$  cellules viables/mL).

### 3 - Mesure des concentrations en ATP par bioluminescence

La bioluminescence permet de mesurer des concentrations en ATP grâce à une réaction enzymatique entre l'ATP et le complexe enzyme-substrat (luciférase-luciférine). La quantité de lumière émise par la réaction est proportionnelle à la concentration en ATP. Cette énergie lumineuse est quantifiée par un luminomètre (LUCY, Prodemat SA) en terme de RLU (Relative Light Unit). Les réactifs utilisés pour ces expériences (luciférine et solution Tampon Biofax A) sont commercialisés par Prodemat SA.

Des solutions étalons d'ATP (Sigma) sont préparées dans un milieu identique au milieu de culture dans la gamme de concentrations suivante :  $10^{-4}$  à  $10^{-8}$  mole/L et conservées sous forme congelée (-18°C). La concentration en ATP extracellulaire peut ensuite être corrélée linéairement à la mesure des RLU en tenant compte du bruit de fond (dosage sur eau ultrapure).

Cette corrélation liant log [ATP] et log RLUc est établie à chaque nouveau dosage.

NB :  $\text{RLUc} = \text{RLU corrigé} = \text{RLU mesuré} - \text{RLU (bruit de fond)}$

Sur l'ensemble des dosages réalisés avec différents lots de luciférine, les variations des coefficients de la droite de régression sont estimés à  $\pm 3$  p. cent sur la pente et à  $\pm 2,1$  p. cent sur l'ordonnée à l'origine (variation déterminée sur 10 expériences).

Pour les mesures des concentrations en ATP extracellulaire, 50  $\mu\text{L}$  d'échantillon de culture sont mélangés avec 2,5 mL de solution tampon (Biofax A dilué 5 fois) et homogénéisés au vortex pendant 30 secondes. 10  $\mu\text{L}$  de luciférine sont alors ajoutés à 200  $\mu\text{L}$  du mélange précédent et après homogénéisation, les RLU sont mesurés (3 intégrations de 10 secondes chacune par échantillon).

### 4 - Mesures par cytométrie de flux

L'analyse d'une population microbienne par cytométrie de flux est basé sur l'utilisation de deux fluorochromes, la fluorescéine diacétate (FDA) et l'iode

de propidium (IP) qui, par leur spécificité d'action, permettent de distinguer différents états physiologiques des cellules.

La fluorescéine diacétate est un colorant qui pénètre dans la cellule ; sous l'action des activités estérases du cytosol, il est réduit entraînant une fluorescence verte, renseignant ainsi sur l'activité enzymatique. L'iodure de propidium rend compte de l'intégrité membranaire d'une cellule. Si cette intégrité est altérée, le colorant pénètre dans la membrane cellulaire entraînant une fluorescence rouge.

De ce fait, 3 états distincts des cellules peuvent être identifiés en fonction du type de fluorescence observé :

- les cellules viables : fluorescence verte ;
- les cellules mortes : fluorescence rouge ;
- les cellules " endommagées " : double fluorescence verte et rouge.

A 1 mL de suspension cellulaire, 0,5 mL de solution de FDA sont ajoutés. Le mélange est incubé pendant 20 minutes à température ambiante. Passé ce temps, 0,5 mL de solution d'IP sont ajoutés. L'échantillon est ensuite incubé pendant 10 minutes à 0°C. La suspension peut alors être analysée par le cytomètre de flux.

Le cytomètre de flux utilisé (I.N.S.E.R.M. U395) est un analyseur-trieur de la marque Beckman-Coulter (modèle Elite). Un laser à argon ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) permet l'excitation des molécules. Les faisceaux d'émission de fluorescence sont collectés à 525 nm pour la fluorescéine diacétate (FDA) et à 630 nm pour l'iodure de propidium (IP).

### 5 - Adjuvants de vinification

Les tanins et la bentonite sont des produits commerciaux (Laffort Œnologie, Bordeaux, France). Les tanins utilisés dans cette étude sont extraits de tanins pyrocatechiques et ont une teneur en acide tannique supérieure à 70 p. cent. La comparaison avec une solution d'acide tannique pur (100 p. cent) a permis de voir l'influence de cet acide organique sur l'activité toxique. La gamme de concentrations d'ajouts testée correspond aux proportions usuelles ajoutées lors de la vinification (de 0 à 20 g/hL). Les solutions sont préparées dans de l'eau ultrapure (système millipore, 0,2  $\mu\text{m}$ ).

## RÉSULTATS

Nous justifierons dans un premier temps la validité de la méthode de quantification de l'activité killer par mesure des fuites d'ATP. Puis, cette technique sera utilisée pour étudier d'une part la sensibilité de diverses

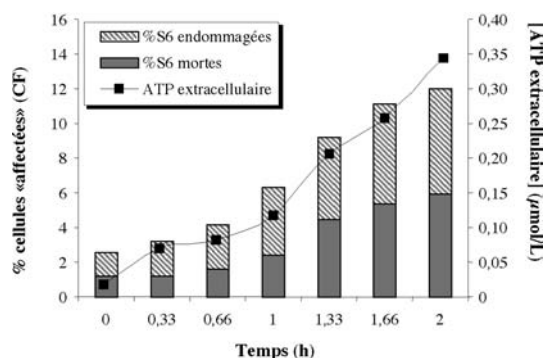
souches à une toxine killer donnée, et d'autre part afin de comparer l'efficacité de diverses souches killer (porteuses du même facteur) sur une même souche sensible.

1 - Mesure de l'activité toxique par les fuites d'ATP: Validation de la méthode.

Lors de notre étude, la validation de cette mesure par fuite d'ATP a été faite par corrélation avec l'état de la population sensible mesuré par cytométrie de flux (cellules vivantes, mortes et endommagées).

La figure 1 illustre la relation obtenue entre le nombre de cellules affectées par la protéine killer et le suivi cinétique de la fuite d'ATP au cours d'une culture de cellules sensibles en présence de toxine killer. Nous avons alors proposé la mesure de la vitesse initiale de libération d'ATP (mesure sur 2 heures) comme critère de quantification de l'effet toxique et de comparaison de la sensibilité des souches (ALFENORE *et al.*, 1999).

C'est ce critère de comparaison ( $V_i$ ) que nous utiliserons ici. Sur un volume d'une culture en phase de croissance de la souche "sensible" à tester (concentration en cellules :  $75 \times 10^6$  cellules viables/mL), un volume identique de milieu toxique préfermenté par la souche killer S.c. K1 est apporté. Un témoin est réalisé avec la même culture de cellules "sensibles" complétée par la même quantité de milieu "toxique" dénaturé. Un volume identique de milieu nutritif est apporté dans les deux cultures test et référence afin d'assurer la nutrition des cellules. La variable utilisée (et portée sur les figures 2 et 3) correspond donc à la



**Fig. 1 - Évolution du pourcentage de cellules "affectées" déterminé par cytométrie de flux (CF) et de l'ATP libéré sous l'action de la protéine killer et mesuré par bioluminescence (couple S.c. S6 / S.c. K1).**

**Fig. 1 - Comparison between the percentage of affected cells (determined by Flow Cytometry) and the released ATP during the action of a killer toxin (couple S.c. S6 / S.c. K1).**

différence des vitesses de fuites d'ATP observées entre les cultures test et référence.

2 - Sensibilité des souches à une toxine killer donnée

La première étape du travail a consisté à tester la sensibilité de diverses souches réputées sensibles à l'action de la toxine killer produite par la souche de référence S.c. K1. Une souche connue comme neutre vis-à-vis de cette toxine est également utilisée.

La figure 2 présente les valeurs mesurées de fuite d'ATP (micromoles d'ATP excrétées en deux heures)

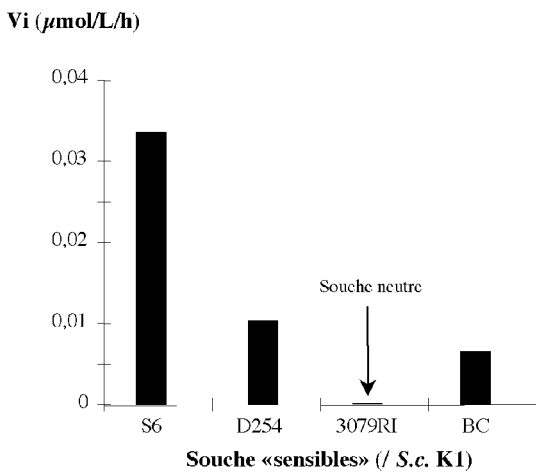


Fig. 2 - Comparaison de la sensibilité de 4 levures cibles (S.c. S6, 3079RI, D254 et BC) par rapport à une souche killer de référence (S.c. K1).

Fig. 2 - Classification of the sensitivity of 4 yeasts (S.c. S6, 3079RI, D254 et BC) versus a killer strain taken as reference (S.c. K1).

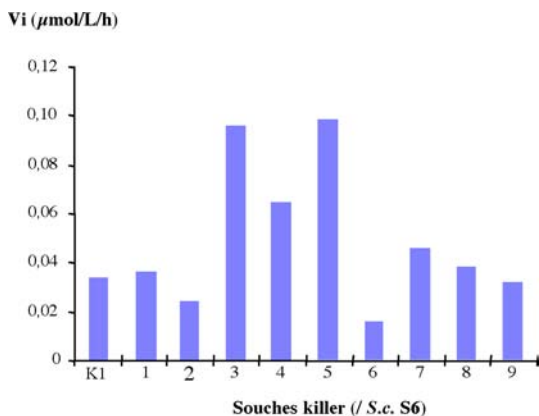


Fig. 3 - Comparaison de l'effet toxique de différentes souches killer par rapport à une souche sensible de référence (S.c. S6).

Fig. 3 - Classification of the toxic effect of some killer strains versus a reference sensitive yeast (S.c. S6).

pour les différentes cultures de cellules sensibles ou neutre.

La neutralité de la souche 3079RI est confirmée. La vitesse initiale de fuite d'ATP observée dans la culture en présence de toxine active est égale à celle obtenue sur la culture en présence de toxine dénaturée, ce qui confirme la validité du critère (pas de faux positifs).

Les souches S6, D254 et BC apparaissent sensibles, ce qui était attendu et conforme au phénotype déclaré, mais leurs sensibilités sont extrêmement différentes. Ainsi, D254 et, à un moindre degré, BC ne présentent qu'une sensibilité très modérée à la protéine killer issue de la levure S.c. K1. A l'opposé, la souche S6 est plus sensible.

3 - Efficacité de diverses souches killer sur une même souche sensible

Pour ce test, la souche sensible S6 a été choisie comme souche "cible" en raison de la très grande sensibilité dont elle a fait preuve dans l'essai précédent. 10 souches killer ont été testées. La figure 3 illustre les résultats obtenus.

On peut facilement observer que les différentes souches testées présentent des niveaux d'activité killer très variables : 2 de ces souches (3 et 5) ont une activité killer forte, induisant une fuite d'ATP de 0,10 micromoles/L/h, alors que 7 autres n'offrent qu'une activité réduite, dans une gamme de 0,02 à 0,04 micromoles/L/h. La souche 4, qui provoque une vitesse de fuite de 0,06 micromoles/L/h peut être qualifiée de modérément killer.

4 - Influence de divers adjuvants sur l'activité killer

BARRE soulignait, dès 1981, que certains facteurs du milieu comme le pH, la présence de tanins, etc. pouvaient moduler l'expression du mécanisme killer. En particulier, il montrait que dans les conditions de la vinification en rouge, l'efficacité d'une levure killer était grandement diminuée (BARRE, 1981). Cependant, les méthodes d'évaluation utilisées, basées sur les mesures de la croissance de la souche sensible ne permettaient pas de dissocier l'effet killer proprement dit des mécanismes de compétition toujours observés lors de cultures à plusieurs composantes (cultures mixtes). Dans ce travail, en utilisant la méthode quantitative définie ci-dessus, nous avons cherché à évaluer l'effet d'adjuvants de vinification sur la toxicité killer. Les adjuvants auxquels nous nous sommes intéressés sont : la bentonite, les tanins œnologiques et l'acide tannique. Ces adjuvants ont été choisis en raison de leur nature chimique qui permettait de penser à des

interactions avec une molécule protéique comme la toxine killer.

Pour chacun d'eux, différentes doses d'adjuvants ont été testées : 0, 5, 10, 20 g/hL. La toxine utilisée est elle produite par la levure K1, la souche sensible test est la levure S6. Les résultats sont présentés de façon synthétique en utilisant le rapport entre la réduction de vitesse initiale observée lors de l'essai (à une dose donnée) et la vitesse initiale mesurée sur le témoin (dose : 0 g/hL).

Ce rapport est appelé  $\gamma$  ; il s'écrit :

$$\gamma = V_i(\text{témoin}) - V_i(\text{essai}) / V_i(\text{témoin})$$

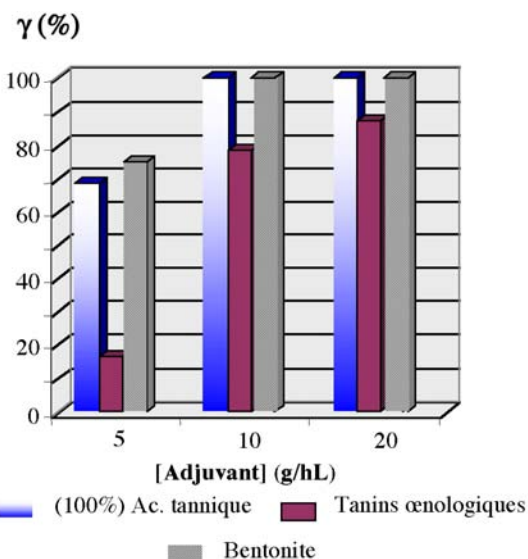
La figure suivante reprend les résultats obtenus pour les différents adjuvants apportés aux doses précisées plus haut (figure 4).

Les composés les plus inhibiteurs sont la bentonite et l'acide tannique pur. En effet, dès un ajout de 5 g/hL, la vitesse initiale est réduite de 75 p. cent pour la bentonite (connue pour ses propriétés d'adsorption des protéines) et de 70 p. cent pour l'acide tannique. Avec un ajout de 10 g/hL, l'inhibition de l'activité killer est totale. Les tanins se révèlent moins inhibiteurs ; en effet, avec 20 g/hL, l'inhibition de l'activité killer est de 90 p. cent.

## CONCLUSIONS

La méthode d'évaluation de la sensibilité d'une souche levurienne à une toxine killer que nous avons proposée permet une évaluation quantitative fine de cette sensibilité alors que les méthodes disponibles jusque là n'autorisaient qu'une classification grossière. Son utilisation a permis de classer différentes souches d'intérêt œnologique tant du point de vue de la sensibilité de souches à une toxine donnée que de celui de l'efficacité de diverses souches killer sur une même souche cible. Toutefois, il est nécessaire d'avoir des conditions opératoires très strictes, notamment en ce qui concerne la culture de cellules sensibles utilisée lors du test : en effet, l'état physiologique et la concentration cellulaire de la population cible modifient la relation "killer/sensible" et induisent des valeurs absolues de  $V_i$  différentes.

La grande disparité dans les sensibilités comme dans les efficacités killer que nous avons pu mettre en évidence constitue un élément nouveau pour expliquer les aléas observés en œnologie dans la manifestation du mécanisme killer. En effet, si l'implantation de souches killer est généralement reconnue comme plus facile et certaine que celles de souches dites sensibles, on n'observe cependant pas toujours les dépla-



**Fig. 4 - Pourcentage de réduction de l'effet killer (g) en présence d'acide tannique et de divers adjuvants œnologiques (tanins œnologiques, bentonite).**

**Fig. 4 - Percentage of reduction of the killer effect ( $\gamma$ ) in view of some additives (tannic acid, enological tannins and bentonite).**

cements de population attendus. D'ailleurs, si les études de laboratoire ont mis en évidence qu'à partir de 10 p. cent de levures killer on pouvait obtenir une disparition de la souche sensible, les données pratiques montrent que la garantie d'implantation n'est souvent atteinte qu'avec des rapports voisins de l'égalité.

Par ailleurs, le fait de disposer d'une méthode rapide fiable et quantitative ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude du mécanisme killer ou plus précisément pour l'étude de son importance réelle dans les conditions de fermentation vinicole. Il est maintenant possible de quantifier l'effet de ces facteurs et nous disposons déjà de quelques résultats intéressants sur l'effet d'adjuvants comme la bentonite. Cette étude est à poursuivre pour disposer d'une approche globale sur l'activité killer et sa réalité dans les conditions de la vinification.

Remerciements : Les auteurs tiennent à remercier Monsieur G. CASSAR, du service de cytométrie de l'Université P. Sabatier de Toulouse III, pour son aimable participation aux expériences de cytométrie réalisées à l'INSERM U395, C.H.U. Toulouse-Purpan.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALFENORE S., 1999. Interactions de type killer chez *Saccharomyces cerevisiae* : études physiologiques et cinétiques. Quantification et modélisation. Thèse Doctorat, I.N.P. Toulouse.
- ALFENORE S., DELIA M.L. et STREHAIANO P., 1999. Le mécanisme "killer" : étude quantitative de la rela-

- tion "killer/sensible". In : *6<sup>e</sup> Symp. Int. Œnol., Bordeaux (France)*. Actualités Œnologiques 99, Lonvaud-Funel (Coord.), Lavoisier (Ed), p. 259-263.
- BARRE P., 1978. Killer factor activity under vinification conditions. In : *6th Int. Symp. Spec. Yeasts*, Montpellier France.
- BARRE P., 1981. Intervention du mécanisme killer dans la concurrence entre souches de levure en Œnologie. In : *Colloque Soc. Fr. Microbiol.*, Reims, p. 109-124.
- BEVAN E.A. et MAKOVER M., 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. In : *Genetics today, 11th Int. Congr. Genet.*, Geers S.G. Editor, Pergamon Press, Oxford, 1, p. 202-203.
- BUSSEY H., 1972. Effects of yeast killer factor on sensitive cells. *Nature New Biology*, **235**, 73-75.
- BUSSEY H., 1981. Physiology of killer factor in yeast. *Microbiol. Physiol.*, **22**, 93-112.
- BUSSEY H. et SHERMAN D., 1973. Yeast killer factor : ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 868-875.
- BUSSEY H., SAVILLE D., HUNTCHINS K. et PALFREE R.G.E., 1979. Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **140**, 888-892.
- DE LA PEÑA P., BARROS F., GASCON S., LAZO P.S. et RAMOS S., 1980. Primary effects of yeast killer toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 544-550.
- DE LA PEÑA P., BARROS F., GASCON S., LAZO P.S. et RAMOS S., 1981. Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **256**, 10420-10425.
- DOUGLAS C.M., STURLEY S.L. et BOSTIAN K.A., 1988. Role of protein processing intracellular trafficking and endocytosis in production of and immunity to killer yeast killer toxin. *Eur. J. Epidemiol.*, **4**, 400-408.
- KAGAN B.L., 1983. Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. *Nature*, **302**, 709-711.
- POULARD A., 1984. Influence de quelques facteurs intervenant sur la variabilité de la microflore levurienne des moûts et des vins. *Vignes et Vins*, **326**, 18-21.
- RAMON-PORTUGAL F., 1995. Interaction de type killer entre levures : analyse cinétique, co-culture et modélisation. *Thèse Doctorat*, I.N.P. Toulouse.
- RAMON-PORTUGAL F., DELIA M.L., SCHNEIDER G. et STREHAIANO P., 1994. Yeast killer activity : a quantitative study. *Biotechnol. Techniques*, **8**, 797-804.
- RAVAZ N., 1992. Croissance de populations levuriennes mixtes. Effet "killer" : analyse et modélisation. *Thèse doctorat*, I.N.P. Toulouse.
- ROZIERES C., RAGINEL F., SANCHEZ C. et STREHAIANO P., 1989. Implantation de levures sélectionnées. Étude en site industriel de vinification. *Rev. Fr. Œnol.*, **119**, 37-41.
- SKIPPER N. et BUSSEY H., 1977. Mode of action of yeast toxins : energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. *J. Bacteriol.*, **129**, 668-677.
- SUGISAKI Y., GUNGE N., SAKAGUCHI K., YAMASAKI M. et TAMURA G., 1983. Kluyveromyces lactis killer toxin inhibits adenylate cyclase of sensitive yeast cells. *Nature*, **304**, 464-466.
- TIPPER D.J. et BOSTIAN K.A., 1984. Double stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. *Microbiol. Rev.*, **48**, 125-156.
- WOODS D.R. and BEVAN E.A., 1968. Studies on the nature of killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **51**, 115-126.

---

Reçu le 12 juillet 2000  
accepté pour publication le 6 septembre 2000

---