

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

REPUBLIQUE DU MALI

UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI



Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
(LBMA)

Année universitaire 2020-2021

N°

**Analyse des marqueurs de microsatellites et des
paramètres cinétiques de *Saccharomyces
cerevisiae***

Présentée et soutenue publiquement le 20/04/2021 devant la faculté
de pharmacie pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)

Par

M. Youssouf DOUMBIA

JURY

Président du Jury : Professeur Ababacar I MAIGA

Membres : Professeur Fassé SAMAKE

Professeur Fatoumata TOUNKARA COULIBALY

Co-directeur : M. Ibrahim KEITA

Directeur de thèse : Professeur Ousmane KOITA

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2020-2021

ADMINISTRATION

Doyen : Boubacar TRAORE / Professeur

Vice-doyen : Sékou BAH / Maître de Conférences

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable : Ismaël CISSE, Contrôleur des finances.

PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Flabou	BOUGOUDOOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Mahamadou	CISSE	Biologie
4	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
5	Souleymane	DIALLO	Bactériologie-virologie
6	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
7	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
8	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
9	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
10	Alou A.	KEÏTA	Galénique
11	Mamadou	KONE	Physiologie
12	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
13	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
14	Abdourahamane S	MAÏGA	Parasitologie
15	Saidou	MAÏGA	Législation

16	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
17	Sékou Fantamady	TRAORE	Zoologie

DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MÉDICALES

1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie-parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique
6	Abdoulaye	DJIMDE	Biologie / Parasitologie
7	Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
8	Akory Ag	IKNANE	Santé publique/ Nutrition
9	Ousmane	KOÏTA	Biologie-Moléculaire
10	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
2	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/Bio statistique
3	Bourèma	KOURIBA	Immunologie chef de DER
4	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
5	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique

6	Ousmane	TOURE	Santé publique/ Santé environnement
---	---------	-------	-------------------------------------

3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie Clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biologie Clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biologie Clinique
6	Antoine	DARA	Biologie Moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
10	Kléligui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
11	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOITA	Biologie Clinique
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé Publique
16	Almoustapha Issiaka	MAIGA	Bactériologie-Virologie
17	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
18	Fanta	SANGHO	Santé publique/Santé communautaire
19	Oumar	SANGHO	Epidémiologie

4. ASSISTANTS / ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/ Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Falaye	KEITA	Santé publique/Santé environnement
6	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
7	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
8	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRES DE CONFÉRENCES / MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOM	SPÉCIALITÉS
	- Néant - -		

3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGÉS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière

Analyse des marqueurs de microsatellites et des paramètres cinétiques de S. cerevisiae

2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
6	Mahamane	HADARA	Pharmacognosie
7	Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
8	Moussa	SANOGO	Gestion
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS / ATTACHÉS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie
4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
5	Assitan	KALOGA	Législation
6	Ahmed	MAÏGA	Législation
7	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique
8	Aboubacar	SANGHO	Législation
9	Bourama	TRAORE	Législation
10	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutique
11	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
12	Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière

13	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière
----	---------------------	--------	------------------------

DER : SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Benoit Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFÉRENCES / MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOM	SPÉCIALITÉS
1	Sékou	BAH	Pharmacologie, Chef de DER

3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOM	SPÉCIALITÉS
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
2	Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
6	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

4. ASSISTANTS / ATTACHÉS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie

2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOOU	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

DER : SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROSEFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
2	Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONFERENCE / MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITES
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliqué

3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
2	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
3	Boureima	KELLY	Physiologie Médicale

4. ASSISTANTS / ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

5. CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba	COULIBALY	Droit commercial
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Moussa I	DIARRA	Biophysique
7	Babacar	DIOP	Chimie
8	Aboubacary	MAIGA	Chimie organique
9	Massambou	SACKO	SCMP/SIM
10	Modibo	SANGARE	Anglais
11	Satigui	SIDIBE	Pharmacie Vétérinaire
12	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
13	Fana	TANGARA	Mathématiques
14	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale

Analyse des marqueurs de microsatellites et des paramètres cinétiques de S. cerevisiae

15	Mamadou B	TRAORE	Physiologie
16	Boubacar	ZIBEIROU	Physique

Dédicace

Je dédions ce travail,

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui ;

Particulièrement à ma maman, elle qui m'a toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

Revoyez ici, ma reconnaissance avec ou sans votre nom, ce travail est la vôtre car vous avez contribué d'une manière à une autre,

Qu'ALLAH le tout puissant vous donne ce que vous désirez le mieux, qu'il vous donne longue vie et une santé de fer.

Remerciement

Je rends grâce à DIEU pour tous ses bienfaits à mon égard particulièrement pour la réalisation de cette étude.

Ma gratitude et profonde reconnaissance à l'endroit de tout le personnel au LBMA, pour leurs accueils, leurs suivis et surtout leurs disponibilités tout au long de mes travaux de recherche.

Je remercie Dr Clement Anseno BANOUCI ainsi qu'à l'ensemble du personnel de la Pharmacie de Référence.

Je remercie également les membranes de la 11^{ème} promotion du Numerus clausus de la Faculté de Pharmacie (FAPH) de Bamako Mali.

Je tiens à remercier sincèrement mes camarades de tous les temps, Dr Moussa N'DIAYE, Aziz Dit Noha TRAORE, Dr Nouhoum BA, Dr Gounédy MAGASSA, Dr Dramane DANTE pour leurs encouragements, leurs franchises.

Pour finir je remercie toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Hommages aux membres du Jury

A notre Maître et Président du Jury

Professeur Ababacar I MAIGA

- **Professeur titulaire de Toxicologie / Faculté de Pharmacie ;**
- **Chargé de cour de Phytopharmacie / Faculté de Pharmacie ;**
- **Directeur Adjoint de l'Institut National de Santé Publique (INSP).**

Chers Maître,

C'est un honneur que vous nous faites en présidant ce jury malgré vos multiples occupations,

Veillez accepter Cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance,

Que Dieu vous donne une longue et heureuse vie.

A notre Maître et membre du Jury

Professeur Fassé SAMAKE

- **Professeur de microbiologie / Faculté des Sciences et Techniques (FST) / Institut des Sciences Appliquée (ISA) / USTTB ;**
- **Chef de division du Service des Relations Extérieures et des Coopérations / Rectorat USTTB.**

Cher maître,

C'est un honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail,

Soyez rassuré de notre profonde reconnaissance.

Que Dieu vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maître et membre du Jury

Docteur Fatoumata TOUNKARA COULIBALY

- **Maître de conférences ;**
- **Responsable adjointe du laboratoire végétale Alimentaire et de Biotechnologie / Faculté des Sciences et Techniques (FST) /USTTB ;**
- **Professeur de Biochimie Métabolique / Biochimie Générale / Biochimie Alimentaire/ Technologie Alimentaire/ Faculté des Sciences et Technique (FST) / USTTB.**

Cher maître,

C'est un honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail,

Soyez rassuré de notre profonde reconnaissance.

Que Dieu vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maître et co-directeur thèse

M. Ibrahim KEITA

- **Assistant en Biologie moléculaire / Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) ;**
- **Attaché de recherche au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) / FST.**

Chers Maître,

Vous avez accepté de nous guider et aider dans la réalisation de ce travail, qui d'ailleurs est le vôtre.

Votre accessibilité du début à la fin du travail n'a pas créé défaut, votre rigueur scientifique et votre amour pour un travail bien fait, font de vous un homme de qualité.

Trouvez ici l'expression de nos reconnaissances les plus sincères.

Qu'ALLAH vous protège et vous donne une santé de fer. Amine !

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Ousmane KOITA

- **Pharmacien Biologiste (PharmD, PhD) ;**
- **Professeur Titulaire en Biologie moléculaire / Faculté de Pharmacie ;**
- **Chargé de cours de biologie cellulaire et moléculaire / Faculté de Pharmacie ;**
- **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée FST / USTTB.**

Chers Maître,

Aucun hommage ne pourrait exprimer nos reconnaissances,

Votre conviction pour la recherche, votre disponibilité et vos qualités d'enseignement font de nous l'un de vos plus grands admirateurs,

Qu'ALLAH, vous donne une longue vie.

Liste des abréviations

μ max	Vitesse Maximale de croissance spécifique
ACETYL COA	Acetyl Coenzyme A
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénine TriPhosphate
BB	Bobo Dioulasso
BF	Banfora
DD	Dédougou
DO	Densité Optique
DO _{630nm}	Densité Optique à 630nm
DO _{660nm}	Densité Optique à 660nm
DR	Dori
FD	Fada-Ngourma
GA	Gaoua
He	Indice de Diversité de Nei
Ho	Taux d'Hétérozygote
ITS	Inter Transcript Spacer
KB	Kombissiri
KD	Koudougou
KY	Kaya
LBMA	Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
MSP 1 et 2	Mérozoïte Surface Protein 1 et 2
OG	Ouagadougou
OY	Ouahigouya
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RAPD	Random Amplified Polymorph DNA Analysis
PCR-RFLP	Restriction Fragments Length Polymorphisms
POU	Protéine d'Organisme Unicellulaire
SLS	Sample Loading Solution
SSR	Simple Sequence Repeats
STR	Short Tandem Repeats
TG	Temps de Génération
TK	Tenkodougou
UV	Ultra-Violet
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
ZN	Ziniaré

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques du locus et du marqueur utilisé	14
Tableau II : Mélange réactionnel de la PCR microsatellite	15
Tableau III : Condition d'amplification par PCR	15
Tableau IV : Distribution et caractéristiques des allèles des isolats de S. cerevisiae	21
Tableau V : Taux d'hétérozygote (Ho), nombre de génotypes et indice de diversité de Nei.....	22
Tableau VI : Vitesses maximales et temps de génération des isolats	24

Liste des figures

Figure 1 : Respiration et fermentation [19]	6
Figure 2 : Schéma de la croissance microbienne en culture discontinue [20]7	
Figure 3 : Structure de l'ADN ribosomale de la levure [12].	12
Figure 4 : Les différents lieux de collecte des échantillons.....	13
Figure 5 : Site de l'échantillonnage	18
Figure 6 : Profil de restriction enzymatique de l'isolat BB15.....	19
Figure 7 : Chromatogramme obtenu pour l'isolat BF20.....	20
Figure 8 : Fréquence allélique.....	22
Figure 9 : Courbe de croissance de l'isolat KB02	23

Résumé :

Les levures jouent un rôle primordial en agroalimentaire notamment pour les produits fermentés et *Saccharomyces cerevisiae* représente la levure la plus rencontrée. La présente étude avait pour but de déterminer les paramètres cinétiques des isolats de *S. cerevisiae* isolés d'un ferment traditionnel "Rabilé". La diversité génétique des isolats de *S. cerevisiae* a été évaluée par l'analyse des marqueurs de microsatellites et leurs paramètres cinétiques ont été estimés par le suivi de la croissance en milieu non renouvelé (batch). Les résultats obtenus mettent en évidence une grande diversité génétique des isolats de *S. cerevisiae* ($H_e=0,902$). Un total de 28 génotypes et de 18 allèles a été retrouvé pour les 38 isolats testés. Les paramètres cinétiques étaient significativement différents d'un isolat à un autre. La souche *S. cerevisiae* OG22 avait le taux de croissance le plus élevé ($0,566 \text{ h}^{-1}$) comparable à une souche commerciale ($0,593 \text{ h}^{-1}$) utilisée comme contrôle.

Mots clés : Microsatellites, paramètres cinétiques, *S. cerevisiae*.

Table des matières

1	Introduction	1
2	Objectif.....	4
2.1	Objectif principal	4
2.2	Objectifs spécifiques.....	4
3	Généralité	5
3.1	Définitions des concepts clés.....	5
3.1.1	Levures	5
3.1.2	Microsatellites	5
3.1.3	Gènes	5
3.1.4	Locus	5
3.1.5	Allèles.....	5
3.2	Levure et applications.....	5
3.2.1	Généralité	5
3.2.2	Le métabolisme chez les levures	6
3.2.3	Croissance chez la levure	7
3.2.4	Paramètres cinétiques	8
3.2.5	Domaines d'application.....	9
3.3	Microsatellites.....	11
3.3.1	Généralité	11
3.3.2	Intérêts	11
3.4	Autres méthodes d'étude de la diversité.....	11
3.4.1	PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphisms).....	12
3.4.2	PCR avec les Protéines de Surface Membranaire (MSP-1 et MSP-2), Marqueur de diversité génétique :.....	12
4	Méthodologie	13
4.1	Lieu d'échantillonnage	13
4.2	Lieu et période de l'étude	13
4.3	Population d'étude	13
4.4	Méthodes utilisées	14

4.4.1	PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphisms).....	14
4.4.2	Analyse des microsatellites	14
4.4.3	Analyses des paramètres cinétiques	15
4.5	Analyse des données.....	16
4.5.1	Diversité des isolats de <i>S. cerevisiae</i>	16
4.5.2	Paramètres cinétiques des isolats de <i>S. cerevisiae</i>	17
5	Résultats	18
5.1	Répartition de la population d'étude	18
5.2	Identification par la méthode de la PCR-RFLP.....	18
5.3	Diversité des isolats de <i>S. cerevisiae</i>	19
5.2.1	Distribution et caractéristiques des allèles.....	20
5.2.2	Fréquence allélique	22
5.2.3	Taux d'hétérozygote (Ho), nombre de génotype et indice de diversité de Nei	22
5.4	Paramètres cinétiques des isolats de <i>S. cerevisiae</i>	23
6	Commentaires et Discussion.....	25
7	Conclusion et perspectives.....	27
7.1	Conclusion	27
7.2	Perspectives	27
8	Références	28

1 Introduction

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes, hétérotrophes, se nourrissent de substances organiques, faisant partie du groupe des champignons [1]. On les distingue par leurs caractères unicellulaires et l'absence d'un vrai mycélium, la partie végétative d'un champignon formé d'une masse d'hyphes ramifiées et filiformes [2]. Elles sont ubiquitaires et sont fréquemment rencontrées dans les eaux, le sol, les feuilles des végétaux, des moûts de fruits, à la surface et à l'intérieur des êtres vivants [1]. Depuis des millénaires, les levures jouent un rôle prépondérant dans l'alimentation humaine : vinification, brasserie, fromagerie, panification [3].

De nos jours, les avancées du génie génétique ont permis d'introduire chez la levure, de nouvelles capacités pour étendre d'une part la gamme de substrat et d'autre part produire des substances nouvelles qu'elles ne pouvaient pas produire jusque-là [4]. Dès lors, nous assistons de plus en plus à la production de protéines recombinantes parmi lesquelles les protéines pharmaceutiques telles que l'insuline, le vaccin contre l'hépatite B, l'hormone de croissance humaine, les antigènes qui sont les plus rentables, d'un point de vue économique et surtout dans le domaine de la santé humaine [4, 5].

Sur le plan alimentaire, la production d'arômes, d'antioxydants et de vitamines à travers l'ingénierie génétique des levures constitue un atout majeur. Cependant selon Carrau et al, en 2015 l'un des soucis majeurs de l'utilisation des levures génétiquement modifiées est leur aptitude limitée à raffiner ou à améliorer les propriétés sensorielles des aliments fermentés dans les conditions de production réelles [3].

Récemment, de nouveaux types de levures ont attiré l'attention en raison de leur goût, de leur saveur, de leur durée de conservation et de leurs effets sur la

santé. Toutefois, les levures "domestiques et sauvages" constitueraient des ressources génétiques inestimables et un énorme potentiel reste à découvrir pour la production de substances à haute valeur ajoutée en utilisant les levures *Saccharomyces* et non *Saccharomyces*. Des recherches récentes ont conduit à la découverte de nouvelles propriétés métaboliques chez la levure naturelle [4, 6, 7].

Il a été démontré que la diversité phylogénétique choisie d'une souche était adaptée à sa diversité phénotypique, soulignant l'importance de sélectionner dans la vaste taxonomie de levure d'importantes caractéristiques bioindustrielles. Surtout en Afrique occidentale, où les études sur leur potentiel industriel ont porté essentiellement sur leur performance dans la fermentation alcoolique, or plusieurs potentiels peuvent être mise en évidence [7, 8]. Cette étude de la diversité génétique et l'identification des performances cinétiques naturelles est l'une des premières études sur les isolats de *S. cerevisiae* du Burkina Faso.

L'analyse de leur diversité repose principalement sur le typage moléculaire. En 1999, Esteve-Zarzoso et al ont proposé une méthode de différenciation des levures rapide et simple basée sur la restriction enzymatique de la région 5.8S-ITS [9]. Cette technique s'est avérée pratique dans plusieurs études de diversité notamment pour les levures du vin et de la bière [10]. Toutefois, pour avoir un niveau de discrimination élevé convenable à l'analyse génétique des populations, des techniques moléculaires beaucoup plus avancées comme l'analyse des microsatellites s'avèrent nécessaire. Cette dernière porte l'avantage de générer des données non équivoques exprimées sous formes de nombre de copies [11].

Durant cette étude, nous allons examiner et comparer les performances naturelles des isolats de *S. cerevisiae* génétiquement distincts, provenant de 13

régions du Burkina Faso à travers l'analyse des microsatellites et des paramètres cinétiques.

Hypothèse

La biodiversité génétique naturelle des isolats de *S. cerevisiae* leur confèrent des performances cinétiques spécifiques.

2 Objectif

2.1 Objectif principal

Examiner les performances cinétiques des isolats de *S. cerevisiae* génétiquement distincts de 13 régions du Burkina Faso.

2.2 Objectifs spécifiques

Etudier la diversité génétique des isolats de *S. cerevisiae* par l'analyse des microsatellites ;

Déterminer leurs paramètres cinétiques en micro-culture par le suivi de la croissance dans un système non renouvelé (batch).

3 Généralité

3.1 Définitions des concepts clés

3.1.1 Levures

Les levures sont des mycètes chez lesquels la reproduction végétative se fait principalement par bourgeonnement ou par fission et la reproduction sexuée est caractérisée par la fusion des cellules a et α [12].

3.1.2 Microsatellites

Les microsatellites Simple Sequence Repeat ou Short Tandem Repeat (SSR ou STR pour ses sigles en anglais pour les répétitions simples et les répétitions courtes en tandem) sont des séquences d'ADN dans lesquelles un fragment (dont la taille varie de deux à six paires de bases) est répété de manière consécutive [13, 14].

3.1.3 Gènes

Le gène est l'unité de l'information génétique d'un organisme, il est constitué d'une séquence d'acide nucléique codant pour la synthèse d'un polypeptide spécifique ou d'un ARN [15].

3.1.4 Locus

Le locus est l'emplacement précis d'un gène sur un chromosome [16].

3.1.5 Allèles

Les allèles sont les différentes formes que peut prendre un même gène, à un locus donné [16].

3.2 Levure et applications

3.2.1 Généralité

Le mot levure vient du mot latin « levare » qui signifie lever [1, 14]. Elle se définit comme ce microorganisme fungi se nourrissant du glucose pour donner de la mousse à la surface lors de la fermentation alcoolique [17, 18]. Les levures sont les microorganismes chez lesquels la reproduction végétative se fait principalement par bourgeonnement ou par fission et la reproduction sexuée est caractérisée par la fusion des cellules a et α . Les cellules végétatives sont très polymorphes et leur taille varie selon les espèces. Certaines espèces peuvent

former des associations cellulaires (pseudo-mycélium) ou se présenter sous forme de filaments (mycélium) à un certain stade de leur vie [12].

Les levures appartiennent au groupe des champignons supérieurs et se répartissent essentiellement en trois classes :

- les ascomycètes : groupe de champignons chez lequel la reproduction sexuée conduit à la formation d'un asque ;
- les basidiomycètes : groupe de champignons chez lequel la reproduction sexuée conduit à la formation d'une baside ;
- les deutéromycètes : groupe de champignons dépourvu de reproduction sexuée.

3.2.2 Le métabolisme chez les levures

Le métabolisme se réfère à l'assimilation biochimique (dans des voies anaboliques) et à la dissimilation (dans des voies cataboliques) des aliments par une cellule. La principale source d'énergie pour les levures est le glucose. La voie générale de la conversion du glucose en pyruvate est la glycolyse par laquelle la production d'énergie sous forme d'ATP est couplée à la génération de NADH pour la voie de biosynthèse [5]. On distingue deux principaux modes d'utilisation du pyruvate pour la production d'énergie : la respiration et la fermentation (figure 1).

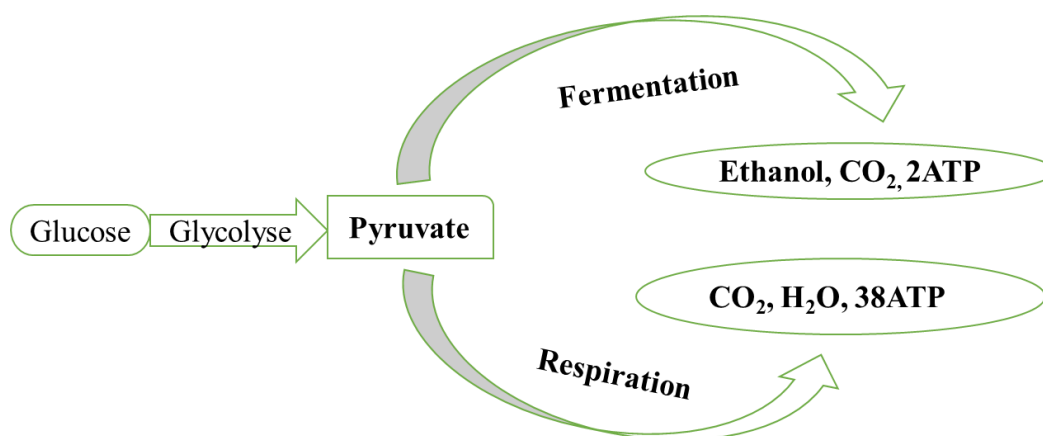
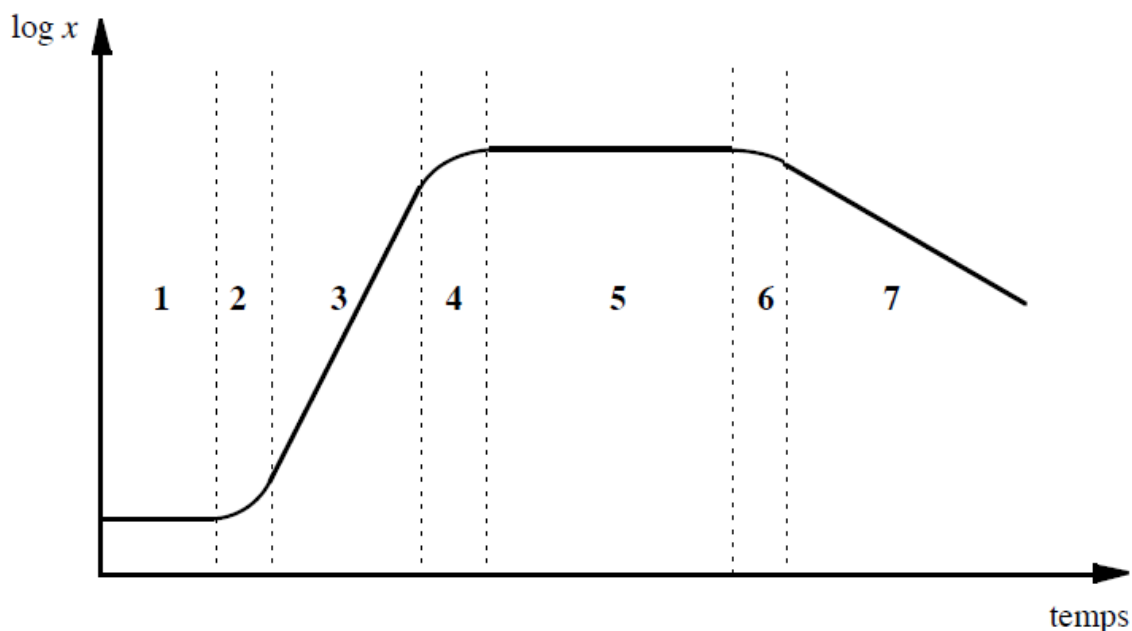


Figure 1 : Respiration et fermentation [19]

3.2.3 Croissance chez la levure

La croissance est l'augmentation globale de la biomasse de la population microbienne. Pour induire une croissance microbienne dans une culture il faut fournir aux cellules initiales les nutriments nécessaires et des conditions environnementales favorables. La croissance peut alors être suivie soit par la mesure de la densité optique à 600 nm soit par pesée de la masse sèche des cellules après évaporation complète de l'eau cellulaire qui représente environ 80% de la masse humide à des intervalles de temps réguliers. Le schéma de la croissance d'une population microbienne en culture discontinue est représenté sur la figure 2.

Figure 2 : Schéma de la croissance microbienne en culture discontinue [20]



- **Lag phase ou temps de latence (TL) (1)**

Le temps de latence est le moment où le taux de croissance cellulaire est nul. Pendant cette période la synthèse de nouveaux composants cellulaires se fait par adaptation à un nouveau milieu ou de nouvelles conditions de vie et par absorption des substances nutritives. La durée de ce temps varie selon le microorganisme et la nature du milieu. Chez certains microorganismes ce temps peut être très court ou absent [20].

- **Phase d'accélération (2)**

La phase d'accélération est le temps pendant lequel la vitesse de croissance augmente [20].

- **Phase de croissance exponentielle (3)**

La phase de croissance exponentielle est le moment où la vitesse de division cellulaire est constante et maximale. Pendant cette période la majorité des microorganismes sont en bon état physiologique et se multiplie de façon exponentielle. C'est pendant cette période, que le temps de génération est minime [20].

- **Phase de ralentissement (4)**

La phase de ralentissement où décélération de la division cellulaire, en cas de carence en nutritive, les levures arrêtent de croître et se préparent à l'entrée en phase stationnaire [20].

- **Phase stationnaire (5)**

La phase stationnaire est le moment où le nombre de microorganisme viable demeure constant. La raison pour laquelle les cellules entrent en phase stationnaire est l'arrêt de la multiplication cellulaire qui peut être due à la limitation en éléments nutritifs, à la disponibilité limitée en oxygène et à l'accumulation de déchets toxiques [20].

- **Phase de déclin (6 et 7)**

La phase de déclin est la période où le nombre de microorganisme viables diminue. Le taux de croissance est nul [20].

3.2.4 Paramètres cinétiques

La croissance d'une levure particulière peut être modélisée en déterminant les paramètres cinétiques [20].

- **Temps de latence**

Le temps de latence est le moment où le taux de croissance cellulaire est nul [20].

- **Vitesse spécifique de croissance maximale**

Le taux de croissance (μ) est défini comme étant le nombre de divisions cellulaires par unité de temps. En phase exponentielle de croissance, il est maximal. Il est déterminé par l'établissement de la courbe $\ln(DO'/DO)$ en fonction du temps [20].

- **Temps de génération**

Le temps de génération ou temps de demi vie (T_g ou $t_{1/2}$) représente le nombre d'unité de temps s'écoulant entre deux divisions successives du nombre de cellules ou de la masse. Il est déterminé en phase exponentielle de croissance et s'exprime en heure. $\mu = 0,69 / t_{1/2}$, (**r : rendement et $t_{1/2}$: temps de demi vie**) [20].

- **Rendement de bioconversion**

Le rendement de croissance est la quantité de biomasse cellulaire produite par gramme (rendement pondéral) ou par mole ($Y_{x/s}$ = rendement molaire) de substrat carboné métabolisé.

3.2.5 Domaines d'application

- **Agro-alimentaire**

Dans les industries agro-alimentaires, la levure est utilisée dans la production de boissons alcoolisées. Elle est également utilisée pour l'amélioration de la qualité des aliments et la production d'alicaments. Elle est riche en phosphore, en protéines à haute énergie, en vitamines B, en chrome, en 16 acides aminés, en 14 minéraux ou plus et 17 vitamines (à l'exclusion des vitamines A, C et E) [20, 21].

- **Environnement**

L'utilisation de la levure dans la production d'énergie renouvelable par le recyclage des déchets est d'une grande importance. Les levures ont un rôle capital dans les fonctions d'élimination naturelles et de bio restaurations (l'élimination

des métaux lourds et épuration des eaux usées). En 2018, une étude sur l'utilisation des levures dans le traitement des eaux usées d'ions de métaux lourds, des eaux usées domestiques, des eaux usées organiques à haute concentration ont donné des bons résultats et montré un avantage dans l'élimination des polluants [22].

- **Cosmétique**

Dans ce secteur, les levures sont utilisées dans le domaine du bien-être surtout dans la lutte contre le vieillissement et dans la fabrication des produits cosmétiques plus naturels. Elle est également utilisée pour ses fonctions photoprotectrices de la mélanine. La levure est utilisée dans la production de la céramide-NS humaine [24, 25].

- **Industrie chimique**

Le développement de la fermentation microbienne est en pleine évolution pour la production du bioéthanol. Ce dernier est l'une des sources d'énergies renouvelables pour remplacer l'essence. La levure est la plus grande productrice d'éthanol des microorganismes. Elle intervient pleinement dans les industries utilisant l'éthanol comme carburant [25].

- **Santé**

La biotechnologie a permis au secteur de la santé de mieux avancer avec la fabrication des organes artificiels, la thérapie cellulaire, le développement des biomédicaments et des vaccins. Le potentiel de la technologie à base de levure en médecine est encourageant. Nous assistons aujourd'hui à la production de l'insuline humaine, les antigènes de surface de l'hépatite B. Les levures sont également utilisées comme agents prébiotiques et/ou probiotiques pour prévenir ou traiter divers troubles intestinaux, nutritionnels et toxicologiques. Certaines levures possèdent des propriétés antioxydantes et antiradicalaires [22, 26–28].

3.3 Microsatellites

3.3.1 Généralité

Les microsatellites, Simple Sequence Repeat ou Short Tandem Repeat (SSR ou STR pour ses sigles en anglais pour les répétitions simples et les répétitions courtes en tandem) sont des séquences d'ADN dans lesquelles un fragment (dont la taille varie de deux à six paires de bases) est répété de manière consécutive. Un microsatellite est généralement composé d'un motif répétitif, dans lequel la séquence répétée est contenue, et de deux régions flanquantes, situées de part et d'autre du motif répétitif. La variation du nombre de répétitions, et non la séquence répétée, donne des allèles différents. Les microsatellites se trouvent généralement dans des zones non codantes de l'ADN. Ils sont neutres, codominants et ont un taux de mutation élevé, ce qui les rend très polymorphes [29, 30].

3.3.2 Intérêts

Les microsatellites sont utilisés comme marqueurs moléculaires dans une grande variété d'applications dans le domaine de la génétique, telles que les études de parenté et de population [31].

L'analyse des microsatellites au niveau d'un locus particulier pour une population donnée permet de :

- ❖ Connaître le nombre de répétition du motif répété pour chaque individu
- ❖ Déterminer les différents allèles au sein de la population
- ❖ Déterminer la fréquence allélique
- ❖ Distinguer les homozygotes des hétérozygotes
- ❖ Déterminer le nombre de génotypes au sein de la population
- ❖ Évaluer la diversité génétique de la population

3.4 Autres méthodes d'étude de la diversité

Il existe plusieurs méthodes moléculaires pour l'étude de diversité d'une population parmi lesquelles on peut citer la PCR-RAPD, la PCR-RFLP, le polymorphisme de longueur des chromosomes et de l'ADN mitochondrial. Des

méthodes moléculaires basées sur des gènes particuliers existent également comme le gène MSP-1 de *Plasmodium falciparum*.

3.4.1 PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphisms)

La PCR-RFLP est le sigle anglais du Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restrictions. Elle consiste à l'amplification spécifique d'une région de l'ADN suivie de la digestion des produits de la PCR par des endonucléases de restriction. Chez les levures, la région cible est le gène 5.8S ITS de l'ADN ribosomique (ADNr) avec les amorces ITS 1 (Inter Transcript Spacer) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [9, 33]. La figure 3 représente la structure de l'ADN ribosomale de la levure.

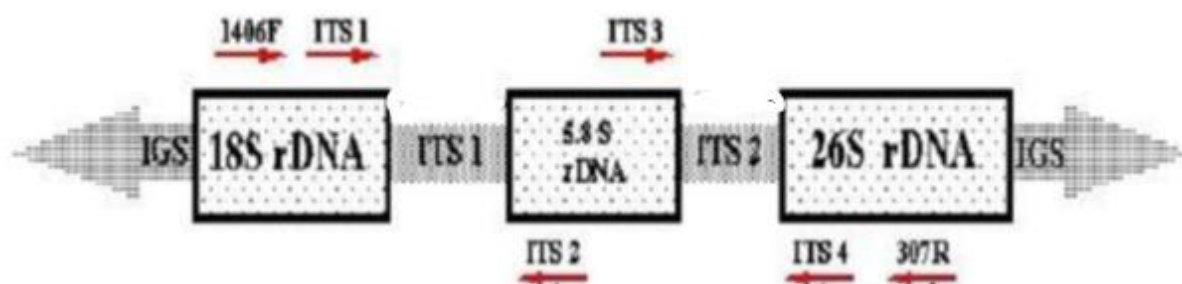


Figure 3 : Structure de l'ADN ribosomale de la levure [12].

3.4.2 PCR avec les Protéines de Surface Membranaire (MSP-1 et MSP-2), Marqueur de diversité génétique :

La PCR est utilisée pour étudier la diversité génétique, surtout par les marqueurs conçus à partir des gènes polymorphiques de la surface membranaire. Ces marqueurs tels que MSP1 et MSP2 sont pour distinguer les cas de recrudescence des cas de réinfection palustre [33]–[35].

4 Méthodologie

4.1 Lieu d'échantillonnage

Les échantillons de la présente étude ont été collectés dans 13 régions du Burkina Faso. La figure 4 représente la carte du Burkina Faso avec ses différentes régions.



Figure 4 : Les différents lieux de collecte des échantillons

4.2 Lieu et période de l'étude

L'étude a été réalisée de Septembre 2018 à Février 2020 au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) sis à la FST à Badalabougou, Bamako Mali.

4.3 Population d'étude

La population d'étude était constituée de 39 isolats de *Saccharomyces cerevisiae* provenant de ferments de bière (*Rabilé*) de 13 régions du Burkina Faso, choisis de façon aléatoire de manière à avoir 3 isolats par région. Ces isolats ont été identifiés par la méthode PCR-RFLP et confirmés par séquençage au LBMA.

4.4 Méthodes utilisées

4.4.1 PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphisms)

À partir d'une culture jeune (16 à 24 h), l'ADN des isolats de levure a été extrait selon la méthode d'extraction au CTAB (Cetyl Trimethylammonium Bromide). La portion du gène de l'ARN ribosomal fongique d'intérêt *ITS-5,8S rDNA*, a alors été amplifiée en se servant des amorces ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et TS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Les produits de la PCR ont été digérés séparément par 3 enzymes de restriction *CfoI* ou *HhaI*, *HaeIII*, *HinfI* selon les instructions du fabricant (New England Biolabs[®] Inc.).

4.4.2 Analyse des microsatellites

L'analyse des microsatellites a porté sur les 39 isolats afin d'évaluer la diversité de la levure *S. cerevisiae* provenant des ferments de bière. L'analyse s'est déroulée en deux étapes principales.

A. Première étape : Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les ADN des différents isolats de *S. cerevisiae* ont été amplifiés en utilisant une paire d'amorces ScAAT1 [36]. Cette paire d'amorces cible un locus très polymorphe, les caractéristiques du locus ScAAT1 sont indiquées dans le tableau I.

La souche de levure commerciale *S. cerevisiae* (GOLD MAXIPAN YEAST) a été utilisée comme souche contrôle.

Tableau I : Caractéristiques du locus et du marqueur utilisé

Locus microsatellite	Séquence répété	Direction 5'- 3'	Séquence d'amorce	Taille (bp)	Référence
ScAAT1	ATT	F 2*Cy5	AAAAGCGTAAGCAATGGTGTAGAT	129bp	[6]
		R	AGCATGACCTTTACAATTTGATAT		

La composition du mélange réactionnel et les conditions d'amplification sont consignées respectivement dans les tableaux II et III.

Tableau II : Mélange réactionnel de la PCR microsatellite

Réactifs	Volume (µL)	Concentrations initiales	Concentrations finales
H2O	10	-	-
Buffer	5	10X	1X
MgCl ₂	1,5	25 mM	1,5mM
dNTPs	1	10mM	0,8mM
Amorce sens	1	10µM	0,4µM
Amorce anti sens	1	10µM	0,4µM
Taq polymérase	0,5	-	-
ADN	5	-	-
Total	25	-	-

Tableau III : Condition d'amplification par PCR

Étapes	Température (°C)	Durée	Nombres de cycles
Dénaturation initiale	95	5min	1
Dénaturation	94	30 S	40
Hybridation	57	30 S	
Elongation	72	30 S	
Elongation finale	72	5 min	1

B. Deuxième étape : Electrophorèse capillaire sur gel d'acrylamide par séquençage

Une dilution (1/60) des produits de la PCR dans de l'eau ultra pure a été réalisée. Parallèlement le marqueur de taille (DNA standard size 400 bp) a été mélangé à une solution SLS (Sample Loading Solution). Un volume de 20µL du mélange a été dispensé par puits dans des microplaques, 1µL des produits de la PCR a été ensuite ajouté. Par la suite une goutte d'huile minérale a été ajoutée pour couvrir l'ensemble. La plaque ainsi préparée a été introduite dans le séquenceur (CEQ™ 8000 Genetic Analyzer Sequencer). Le module de mise en marche "Default Frag-Test" a été utilisé pour la séparation électrophorétique. Les données brutes apparaissent sous forme de chromatogrammes.

4.4.3 Analyses des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques Paramètres Cinétique et Temps de Génération (μ_{max} ; T_g), de chaque isolat de *S. cerevisiae* ont été déterminés à travers le suivi

de la croissance dans un système non renouvelé (batch). Cette analyse a été réalisée en 3 étapes successives.

A. Culture de réserve et préculture

Une colonie pure a été inoculée dans 6 ml de milieu YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), l'ensemble est incubé sous agitation 24 h à 30 °C. Cette dernière a servi de culture de réserve. Un volume de 6 µl de la culture de réserve a servi pour inoculer à nouveau des tubes contenant 6 ml de milieu YEPD puis incubé à 30 °C pendant 24 h. La préculture ainsi réalisée avait une densité cellulaire approximative de $0,7 \cdot 10^7$ à 10^7 cellules/ml (DO ~ 0,5 – 0,7).

B. Préparation des cellules pour la micro-culture

Des cellules de la préculture ont été collectées par centrifugation à 3000 g pendant 2 min (**Eppendorf centrifuge 5417c**). Le culot a été lavé avec 5 ml d'eau physiologique stérile en le centrifugeant à 3000 g pendant 2 min. Le culot a été ensuite délayé dans de l'eau physiologique de manière à obtenir une concentration finale de $0,8 \cdot 10^7$ cellules/ml.

C. Micro-culture

Chaque puits de la microplaque contenant 95 µl de milieu YEPD a été inoculé avec 5 µl de la suspension cellulaire ($0,8 \cdot 10^7$ cellules/ml) excepté les puits contrôles. La culture a été effectuée à 30 °C sous agitation légère pendant 24 h (**Edmund Bühler GmbH**). La $DO_{630\text{nm}}$ de la biomasse cellulaire a été enregistrée à 20 min d'intervalle. L'essai a été réalisé en triplicata. Une courbe de croissance (DO en fonction du temps) a été réalisée et les paramètres cinétiques de chaque isolat ont été calculés.

4.5 Analyse des données

4.5.1 Diversité des isolats de *S. cerevisiae*

Les données brutes de l'analyse des microsatellites sous forme de chromatogrammes ont été convertis en nombre de répétition en appliquant la formule suivante :

$$\text{Copy number} = \frac{[\text{Amplicon size} - (\text{Offset1} + \text{Offset2})]}{\text{Repeat size}}$$

Copy number : nombre de copie,

Amplicon size : taille de l'amplicon,

Offset1 : l'extrémité 3'-5' où l'amorces se fixe,

Offset2 : l'extrémité 5'-3' où l'amorces se fixe,

Repeat size : le nombre de base azoté qui constitue le locus, (exemple : repeat size de AAT est égale à 3).

Le logiciel GenAlex version 6.502 a été utilisé pour déterminer les différents paramètres de diversité des isolats de *S. cerevisiae* des 13 régions du Burkina Faso.

4.5.2 Paramètres cinétiques des isolats de *S. cerevisiae*

L'analyse de la variance (ANOVA) a été appliquée aux données des paramètres cinétiques pour montrer d'une part la fiabilité des résultats obtenus et d'autre part, les différences cinétiques significatives entre les isolats de *S. cerevisiae* génétiquement distincts ont été révélées par le test de Fisher. Le logiciel XLSTAT version 2019 a été utilisé pour ces analyses.

5 Résultats

5.1 Répartition de la population d'étude

Nous avons procédé à un choix aléatoire de trois isolats de *S. cerevisiae* pour évaluer la diversité et les paramètres cinétiques de *S. cerevisiae* provenant du ferment traditionnel de la bière de sorgho « dolo » au Burkina Faso.

La répartition des 39 isolats de *S. cerevisiae* en fonction de leur origine est illustré sur la figure 5.

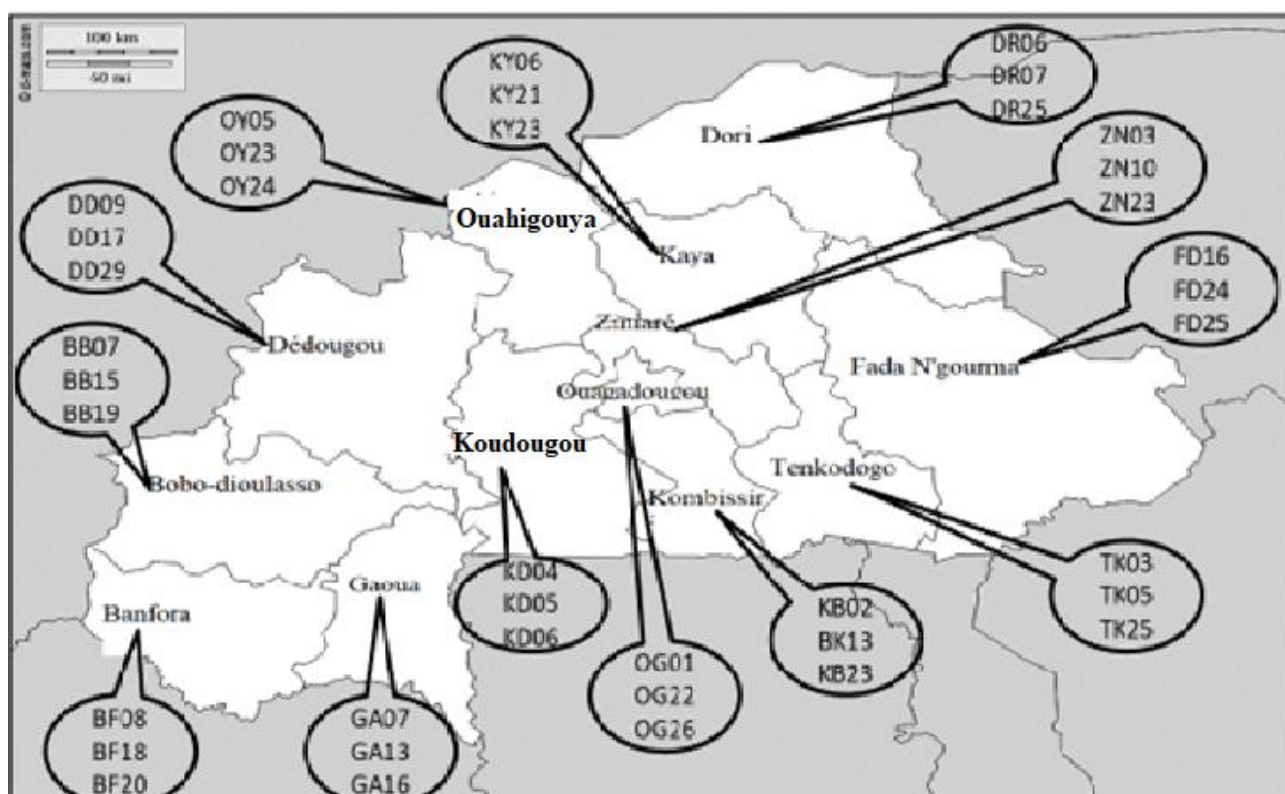


Figure 5 : Site de l'échantillonnage

5.2 Identification par la méthode de la PCR-RFLP

L'identification des 39 isolats de *S. cerevisiae* a été confirmée par la méthode de la PCR-RFLP. La figure 6 représente le profil de l'ADN non digéré et les profils de restriction des différents enzymes de restriction pour l'isolat BB15 à l'instar des autres isolats de *S. cerevisiae*. **M** (figure 6) est le marqueur de poids moléculaires.



Figure 6 : Profil de restriction enzymatique de l'isolat BB15

5.3 Diversité des isolats de *S. cerevisiae*

L'étude de la diversité a porté sur les 39 isolats de *S. cerevisiae* à travers l'analyse des marqueurs de microsatellites. Parmi ces isolats de *S. cerevisiae*, 38 isolats ont pu être analysée avec succès au niveau de leur locus ScaAT1.

La figure 7 montre le chromatogramme obtenu pour l'un des isolats de *S. cerevisiae* (BF20) sur laquelle l'intensité du signal du "dye" est mentionnée en ordonnée, la taille des fragments du marqueur de poids (rouge) et de l'allèle (bleu) est mentionnée en abscisse. Ce chromatogramme pour l'isolat BF20 à l'instar des

chromatogrammes obtenus pour les autres isolats mentionne la taille des allèles et nous a permis de déterminer les paramètres de diversité.

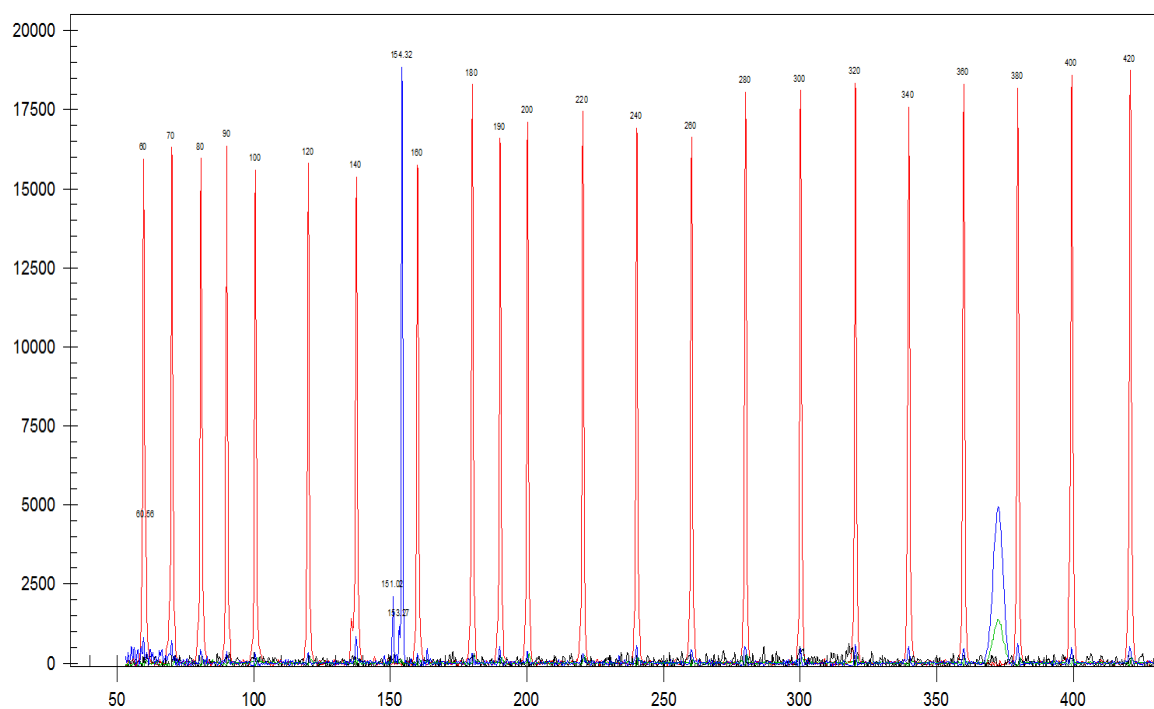


Figure 7 : Chromatogramme obtenu pour l'isolat BF20

5.2.1 Distribution et caractéristiques des allèles

Le nombre de répétition pour chaque typer allèle et leur distribution dans la population des 38 isolats de *S. cerevisiae* sont consignés dans le tableau IV.

Tableau IV : Distribution et caractéristiques des allèles des isolats de *S. cerevisiae*

Isolats	Allèle1	Allèle2	Allèle3
BB07	7	7	-
BB15	11	11	-
BB19	13	10	-
BF08	10	7	-
BF18	13	12	10
BF20	10	10	-
DD09	13	10	-
DD17	10	10	-
DD29	18	16	-
DR06	19	18	-
DR07	19	18	-
DR25	18	18	-
FD16	30	30	-
FD24	18	14	-
GA07	22	14	-
GA13	18	14	-
GA16	20	14	10
KB02	22	22	-
KB13	22	10	-
KB23	19	19	-
KD04	35	18	-
KD05	18	14	-
KD06	18	14	-
KY06	21	17	-
KY21	21	17	-
KY24	21	18	-
OG01	19	18	-
OG22	23	23	-
OG26	21	18	-
OY05	29	17	-
OY23	25	20	-
OY24	22	22	-
TK03	20	20	-
TK05	20	18	-
TK25	20	20	-
ZN03	19	16	-
ZN10	18	14	-
ZN24	18	14	-

5.2.2 Fréquence allélique

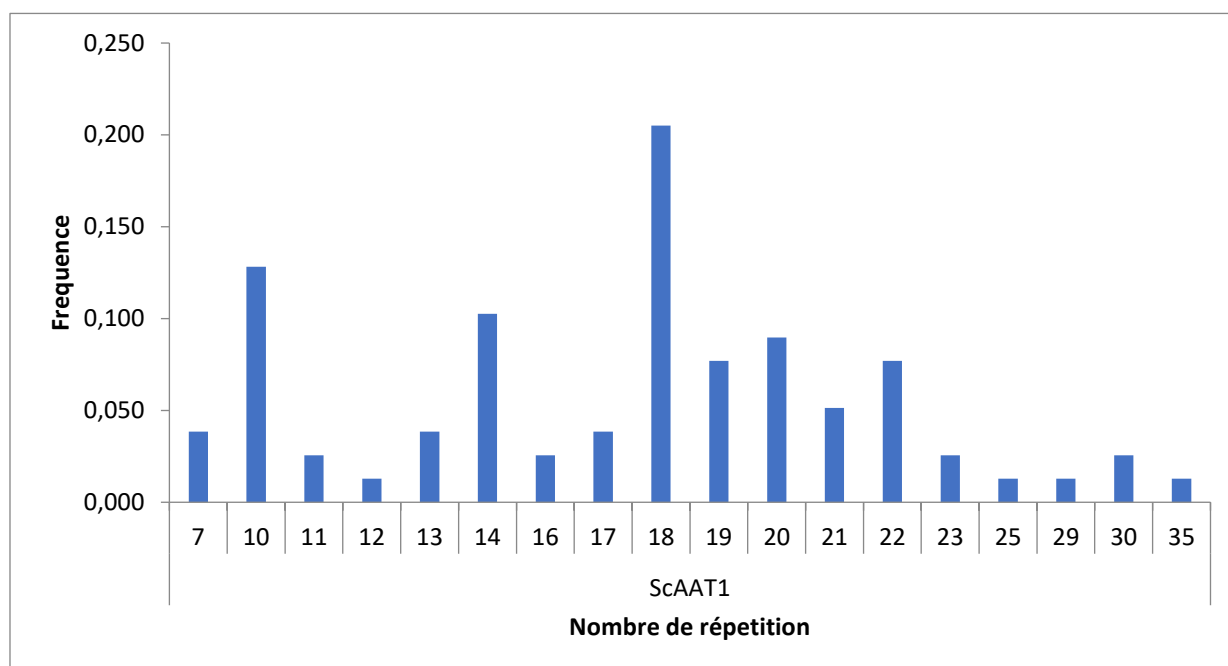


Figure 8 : Fréquence allélique

La figure 8 indique la fréquence allélique pour l'ensemble des 18 allèles obtenus lors de l'analyse du locus ScAAT1 au sein de la population des 38 isolats de *S. cerevisiae*.

5.2.3 Taux d'hétérozygote (Ho), nombre de génotype et indice de diversité de Nei

Parmi les 38 isolats de *S. cerevisiae*, 12 isolats avaient un seul type d'allèles au niveau du locus ScAAT1, 24 avaient 2 types d'allèles et 2 isolats avaient 3 types d'allèles ce qui correspond à 28 génotypes, un taux d'hétérozygote de 68,4 % et un indice de diversité de Nei (He) de 0,902 (Tableau V).

Tableau V : Taux d'hétérozygote (Ho), nombre de génotypes et indice de diversité de Nei

Site	Isolats (#)	Un allèle (#)	Deux allèles (#)	Trois allèles (#)	Génotypes (#)	Ho (%)	He
Burkina Faso	38	12	24	2	28	63,15789474	0,902

: Nombre ; Ho : taux d'hétérozygote ; He : indice de diversité de Nei

5.4 Paramètres cinétiques des isolats de *S. cerevisiae*

Pour évaluer les paramètres cinétiques des isolats de *S. cerevisiae*, nous avons mis les isolats en micro-culture dans un système non renouvelé. La figure 9 représente la courbe de croissance de l'isolat KB02. Il s'agit de la courbe de la densité optique (DO_{630nm}) en fonction du temps sur laquelle les paramètres cinétiques sont représentés. μ_{max} représente la vitesse maximale et $Lag(t)$ est le temps de latence.

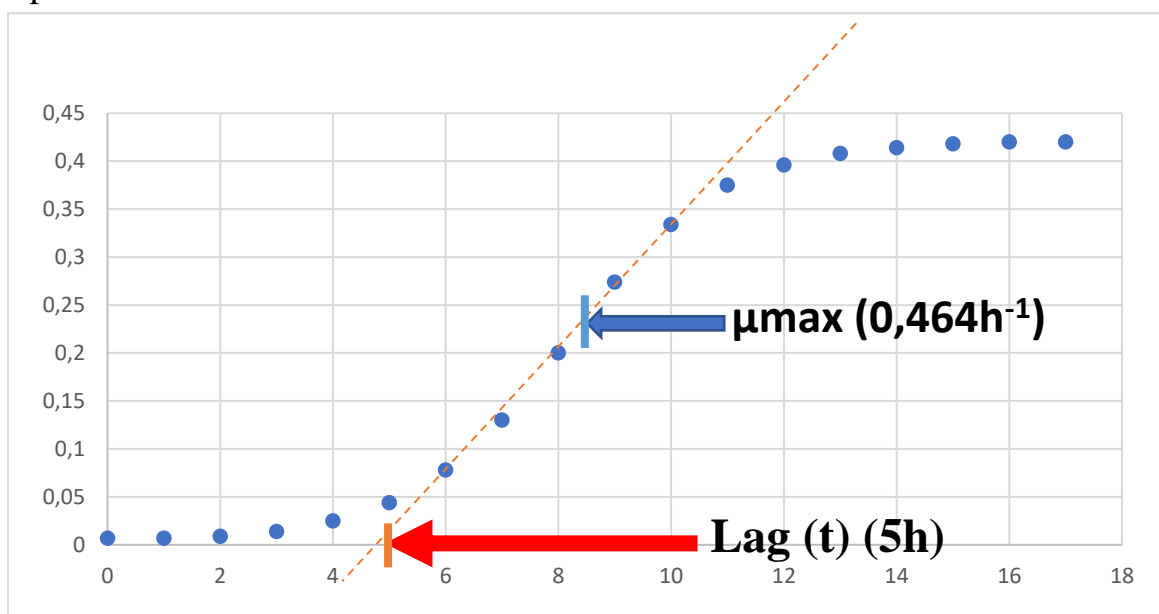


Figure 9 : Courbe de croissance de l'isolat KB02

Les résultats de l'analyse des paramètres cinétiques (Tableau VI) pour chaque isolat montrent que :

1] la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max}) et le temps de génération (t_g), des isolats de *S. cerevisiae* sont significativement variables d'une souche à l'autre.

2] huit isolats (OG22, OG26, TK03, BF18, KD05, TK05, ZN03 et DD29) ont une vitesse spécifique maximale de croissance significativement élevée de plus de $0,50 h^{-1}$.

3] l'isolat OG22 a montré un taux de croissance élevé similaire à celui de la souche industrielle utilisée comme contrôle.

Tableau VI : Vitesses maximales et temps de génération des isolats

Nom des isolats	μ_{max} (h^{-1})	Tg (h)
SC1	0,593 a	1,16973704
OG22	0,566 a	1,22550774
OG26	0,557 ab	1,24435494
TK03	0,555 abc	1,24816419
BF18	0,518 bcd	1,3370035
KD05	0,518 bcd	1,33747647
TK05	0,513 bcd	1,34993608
ZN03	0,512 cde	1,35309835
DD29	0,510 de	1,3592898
KY24	0,500 def	1,38601716
BB19	0,499 def	1,38823789
KD06	0,498 def	1,3909308
FD25	0,487 defg	1,42286191
GA16	0,485 defg	1,42907123
GA13	0,482 defg	1,43717019
FD16	0,479 defg	1,44606505
DR06	0,469 efgh	1,47855627
KB02	0,464 fgh	1,49320806
OY24	0,460 fghi	1,50640506
BF20	0,446 ghij	1,55263312
OY05	0,445 ghijk	1,55915239
BB15	0,433 hijkl	1,60030902
KD04	0,432 hijkl	1,60351754
KB23	0,431 hijklm	1,60698728
DR25	0,427 hijklm	1,62228237
OY23	0,420 ijklm	1,64930325
BF08	0,417 ijklm	1,66195775
DD09	0,412 jklmn	1,68416744
FD24	0,411 jklmn	1,68498626
DD17	0,405 jklmn	1,71232011
DR07	0,404 jklmn	1,71599401
KY06	0,401 klmn	1,72854658
ZN24	0,399 lmno	1,73590579
OG01	0,388 mno	1,78845923
KY21	0,368 no	1,88286992
GA07	0,356 o	1,94795461
ZN10	0,307 p	2,2570732
BB07	0,303 p	2,28811789
TK25	0,218 q	3,18639525
KB13	0,203 q	3,42249834
ANOVA	Fisher (LSD) p-value	<0,0001

6 Commentaires et Discussion

Notre étude basée sur l'analyse des microsattellites révèle une grande diversité de *S. cerevisiae* dans un ferment traditionnel populaire au Burkina Faso. Plusieurs études ont en effet signalé cette grande diversité des isolats de *S. cerevisiae* d'origine africaine. Nos résultats prouvent que le "Rabilé" est un ferment constitué de clones d'un très grand nombre de souches sauvages à l'opposé des ferments ordinaires qui sont constitués de clones d'une ou de quelques souches bien connues.

En effet, les isolats ont présenté une forte richesse allélique et génotypique pour une population d'un même pays comparativement à d'autres populations dont celle de Legras et al (2005) qui ont trouvé pour une population de 67 individus provenant de divers pays 24 allèles pour 31 génotypes.

Cette étude nous a permis, sur le plan technique, de mettre en place et de maîtrisé l'analyse des microsattellites, une méthode permettant de différencier des individus au niveau moléculaire et d'évaluer la diversité génétique des populations.

Nous avons émis l'hypothèse que la biodiversité des isolats de *S. cerevisiae* confèrent des performances cinétiques spécifiques. L'analyse de la variance a montré d'une part que les isolats de *S. cerevisiae* génétiquement distincts avaient des paramètres cinétiques différents et d'autre part certaines souches avaient des taux de croissance maximale significativement plus élevés par rapport aux autres isolats. Ces isolats à taux de croissance élevé (Tableau VI) constituent des ressources génétiques dont le potentiel biotechnologique reste à évaluer notamment pour leur aptitude dans la production de Protéines d'Organismes Unicellulaire (POU) et de CO₂. Il faut signaler que certains isolats avaient des taux de croissance comparables à une souche de levure commerciale que nous avons utilisé comme contrôle dans les mêmes conditions expérimentales. Ces

résultats tendent à soutenir que nos levures locales (sauvages ou domestiques) ont des compétences biotechnologiques inexplorées et exploitables.

L'analyse de la variance réalisée prouve que les résultats obtenus ne sont pas dus à des biais expérimentaux et que les différences observées entre les isolats génétiquement distincts sont statistiquement significatives. Ces résultats montrent notre capacité à suivre la croissance dans un système non renouvelé et à déterminer les paramètres cinétiques.

7 Conclusion et perspectives

7.1 Conclusion

L'utilisation de *S. cerevisiae* est principalement empirique en Afrique occidentale. La présente étude a porté sur l'évaluation de la diversité et la détermination des paramètres cinétiques de *S. cerevisiae* provenant d'un ferment traditionnel (*Rabilé*). Elle a permis de mettre en évidence une grande diversité génotypique et une forte richesse allélique de *S. cerevisiae*. Huit isolats ont présenté une vitesse spécifique maximale de croissance significativement élevée de plus de 0,50 h⁻¹. Ces isolats à taux de croissance élevée constituent des ressources génétiques dont le potentiel biotechnologique mérite d'être évalué notamment pour leur aptitude dans la production de Protéines d'Organismes Unicellulaire (POU) et de CO₂.

7.2 Perspectives

En perspectives nous envisageons de :

Evaluer l'aptitude de ces isolats pour la production d'éthanol, de CO₂ et de POU ;

Evaluer la viabilité de ces isolats sous forme lyophilisée et

Déterminer les valeurs nutritionnelles et éléments nutritifs de ces isolats.

8 Références

- [1] L. Zeineb et M. Roumaïssa, « Etude de la production de la biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu optimisé à base de l'extrait de dattes déclassées », Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master, 2016.
- [2] M. A. B. M. Z. Iman, « Etude du comportement rhéologique d'une levure microbienne *Saccharomyces cerevisiae* Saccaromyces cerevisiae en milieu liquide », UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES FACULTE FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE BIOLOGIE Mémoire de projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master, 2016.
- [3] F. Carrau, C. Gaggero, et P. S. Aguilar, « Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes », *Trends Biotechnol.*, vol. 33, n° 3, p. 148-154, 2015.
- [4] M. Türker, « Yeast biotechnology: Diversity and applications », *Yeast Biotechnol. Divers. Appl.*, n° December, p. 1-744, 2014.
- [5] M. Pathways et P. Pathways, « Yeast Metabolism », *Yeast Mol. Cell Biol. Second Ed.*, p. 25-58, 2012.
- [6] H. Nagano, E. Inoue, M. Inoue-Murayama, et T. Suzuki, « Microsatellite Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* in Cooked Bread », *Food Anal. Methods*, vol. 11, n° 6, p. 1757-1762, 2018.
- [7] J. Wu *et al.*, « Yeast diversity in relation to the production of fuels and chemicals », *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1. Springer US, p. 1-11, 2017.
- [8] Zuko Nofemele, « Improvement of ethanol production from sugarcane molasses through enhanced nutrient supplementation using *Saccharomyces cerevisiae* », *J. Brew. Distill.*, vol. 3, n° 2, p. 29-35, 2012.

- [9] B. Esteve-Zarzoso, C. Belloch, F. Uruburu, et A. Querol, « Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers », *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 49, n° 1, p. 329-337, 1999.
- [10] M. A. Pérez, F. J. Gallego, I. Martínez, et P. Hidalgo, « Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 33, n° 6, p. 461-466, 2001.
- [11] D. Schuller *et al.*, « Genetic diversity and population structure of *saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different grape varieties and winemaking regions », *PLoS One*, vol. 7, n° 2, 2012.
- [12] K. Ibrahim, « Caractérisation moléculaire et métabolisme énergétique des levures productrices de Protéines d ' Organismes Unicellulaires (POU) », ECOLE DOCTORALE REGIONALE DU RA-BIOTECH Diplôme d'Etudes Approfondies en Biotechnologies Option : Biotechnologie Microbienne et Cellulaire, 2014.
- [13] J. Polaina, « Brewer ' s Yeast : Genetics and Biotechnology », vol. 2, 2002.
- [14] D. L. F. Martins De Melo, F. C. Santos, A. M. B. Junior, P. O. Santos, M. A. G. Carnelossi, et R. De Cássia Trindade, « Identification of yeasts isolated from the pulp in nature and the production of homemade “umbu” wine », *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 50, n° 5, p. 887-892, 2007.
- [15] Hervé Le Guyader, « Une petite histoire du concept », Université Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6), UMR 7622, Biologie du développement, équipe Développement et Évolution Bâtiment B, 7e étage, 9, quai Saint-Bernard, case 241, 75252 Paris cedex 05 France., 2001.
- [16] D. Bonneau, « Hérité monogénique », Collège National des Enseignants

et Praticiens de Génétique Médicale, Département de Biochimie et Génétique, CHU d'Angers., 2011.

- [17] J. F. T. Spencer et D. M. Spencer, « Outside and Inside: The Morphology and Cytology of the Yeast Cell », *Yeasts Nat. Artif. Habitats*, n° Fleet 1991, p. 80-94, 1997.
- [18] A. A. Moawad, A. I. N. El Deen, N. B. Mahfouz, S. M. Helmy, et Y. F. Hashem, « Phenotypic and molecular identification of yeasts isolated from cultured Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Kafrelsheikh province, Egypt », *Slov. Vet. Res.*, vol. 56, n° January, p. 647-655, 2019.
- [19] G. Walker et G. Stewart, « *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages », *Beverages*, vol. 2, n° 4, p. 30, 2016.
- [20] J. Augustin, L. Rosso, et J. Jouve, « Sciences de la vie Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments », Université Paris XII Val de Marne, Pour l'obtention de l'
HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES Sciences de la vie, 2005.
- [21] D. Mattanovich, M. Sauer, et B. Gasser, « Yeast biotechnology: Teaching the old dog new tricks », *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, n° 1, p. 1-5, 2014.
- [22] F. M. Freimoser, M. P. Rueda-Mejia, B. Tilocca, et Q. Migheli, « Biocontrol yeasts: mechanisms and applications », *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, n° 10, p. 1-19, 2019.
- [23] and M. H. Yan Wang, Liping Qiu, « Application of yeast in the wastewater treatment », *E3S Web Conf.*, vol. 53, p. 10-13, 2018.
- [24] S. Murakami *et al.*, « Producing human ceramide-NS by metabolic engineering using yeast *Saccharomyces cerevisiae* », *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 1-11, 2015.

- [25] P. Pongcharoen, J. Chawneua, et W. Tawong, « High temperature alcoholic fermentation by new thermotolerant yeast strains *Pichia kudriavzevii* isolated from sugarcane field soil », *Agric. Nat. Resour.*, vol. 52, n° 6, p. 511-518, 2018.
- [26] M. A. Moyad, « Brewer's/baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and preventive medicine: Part II. », *Urol. Nurs. Off. J. Am. Urol. Assoc. Allied*, vol. 28, n° 1, p. 73-75, 2007.
- [27] M. Delic, M. Valli, A. B. Graf, M. Pfeffer, D. Mattanovich, et B. Gasser, « The secretory pathway: Exploring yeast diversity », *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 37, n° 6, p. 872-914, 2013.
- [28] S. Sahay, « Environment-isolates of black yeasts from Ekant park », *Biomed. Pharmacol. J.*, vol. 6, n° 2, p. 395-397, 2013.
- [29] B. Najimi, « Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes », *Bull. la Soc. Bot. Fr. Actual. Bot.*, vol. 133, n° 1, p. 35-44, 2003.
- [30] O. Paun, « Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) - an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic and epigenetic studies », *Methods Mol. Biol.*, vol. 862, n° March, p. 181-200, 2012.
- [31] M. Asif, J. I. Mirza, et Y. Zafar, « High resolution metaphor agarose gel electrophoresis for genotyping with microsatellite markers », *Pakistan J. Agric. Sci.*, vol. 45, n° 1, p. 75-79, 2008.
- [32] W. M. El-Sharoud, C. Belloch, D. Peris, et A. Querol, « Molecular identification of yeasts associated with traditional egyptian dairy products », *J. Food Sci.*, vol. 74, n° 7, 2009.
- [33] I. Soulama, « Diversité génétique des formes asexuées de *Plasmodium*

falciparum chez des enfants de moins de 5 ans vivant au Burkina Faso : Variations temporelles, géographiques et cliniques des formes alléliques », p. 140.

- [34] N. ROSALIE, « Etude du polymorphisme du Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) et du Merozoite Surface Protein 2 (MSP2) de », vol. 2, 2008.
- [35] H. Y. DARAR, « Etude épidémio-clinique et moléculaire du Paludisme à Plasmodium falciparum par la MSP-1 à Missira (Cercle de Kolokani) », FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE de Bamako Mali, Pour l'obtention du diplôme de Docteur en Médecine (Diplôme D'état), 2004.
- [36] J. L. T, O. Ruh, D. Merdinoglu, et F. Karst, « Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of Saccharomyces cerevisiae strains », vol. 102, p. 73-83, 2005.