

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS - MOSTAGANEM



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Filière : Sciences Agronomiques**  
**Spécialité : Sciences et Technologies Alimentaires**

## **THÈSE**

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DE DIPLOME DE  
DOCTORAT 3<sup>ème</sup> cycle LMD

Par

**M<sup>elle</sup> BERBER Nadia**

## **THÈME**

**Caractérisation biomoléculaire et biotechnologique des souches de  
« *Saccharomyces cerevisiae* » issues des cépages Algériens**

Soutenue publiquement le : 31/10/2017

### **Membres de jury**

<b>M. Selselet-Attou Ghalem</b>	<b>Prof</b>	<b>Président</b>	<b>Univ Mostaganem</b>
<b>M. Bekada Ahmed Mohammed Ali</b>	<b>Prof</b>	<b>Directeur de thèse</b>	<b>Centre Univ Tissemsilet</b>
<b>M. Ait-Saada Djamel</b>	<b>MCA</b>	<b>Co-Directeur de thèse</b>	<b>Univ Mostaganem</b>
<b>M. Heddadji M</b>	<b>Prof</b>	<b>Examineur</b>	<b>Univ d'Oran</b>
<b>M. Cheriguene Abderahim</b>	<b>Prof</b>	<b>Examineur</b>	<b>Univ Mostaganem</b>
<b>Mme. Belkacemi Louiza</b>	<b>MCA</b>	<b>Examineur</b>	<b>Univ Mostaganem</b>

Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition

*Année universitaire : 2017/2018*

## Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse de doctorat a été effectué, en grande partie, dans le laboratoire de Microbiologie Alimentaire à Ex INES de Chimie de l'université Mostaganem dirigé par le professeur **Mr Boudroua K**, à qui j'exprime ma reconnaissance de m'avoir accueillie et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour la réalisation de ce thèse. Merci pour votre enthousiasme et l'intérêt que vous avez porté pour ce projet.

Ma plus profonde gratitude à **Mme Marie Charlotte**, responsable du laboratoire de Microbiologie et Biotechnologie au sein de l'institut français de vigne et vin (IFV) de Vertou à Nantes (France), pour son aide précieuse et considérable. Sa gentillesse et sa disponibilité constante ont participé au bon déroulement de ce travail.

Il m'est très agréable d'adresser mes sincères remerciements à **Mr Bekada A.M.A** pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ces judicieux conseils, ses orientations, son soutien moral et scientifique ainsi que l'intérêt porté à mon sujet de recherche et qui m'ont permis de mener à terme ce projet.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres de jury :

Professeur **Selselet-Attou Ghalem**, qui a amplement accepté de diriger les débats en tant que président de ce jury de thèse.

Docteur **Belkacemi Louiza**, de m'avoir honoré et accepté d'examiner ce modeste travail.

Professeur **Hadadji Miloud**, Professeur **Cheriguene Abderrahim** et Docteur **Ait Saada Djamel** d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements les plus chaleureux et respectueux à Monsieur **Aissaoui Rachid**, Maître assistant à l'université de Mascara qui a fait preuve d'une grande patience et a été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail, qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Je remercie également l'équipe de recherche de l'IFV de Nantes, en particulier **Mr Coarer M** pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour sa collaboration scientifique et amicale.

Parmi les personnes qui ont contribué à ce travail, je remercie **Céline** avec qui j'ai apprécié nos longues discussions et qui m'a épaulée dans les moments difficiles, et **Emeline** pour ses conseils scientifiques.

Mes sentiments les plus profondes et remerciements infinis à tous mes enseignants pour leurs patiences et servitudes en particulier : **Dr Benmiloud Djamel, Dr Bouzouina Mohamed Dr Kaddam Ramdane, et Dr Benbouziane Bouassria.**

Un remerciement spécial à tout le personnel de laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition en particulier **Mme Benati Fatima.**

Et enfin, j'adresse mes remerciements, et pas les moindres, à ceux qui ont toujours été présents pour moi et qui m'ont beaucoup soutenus moralement.

## Dédicaces

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions. Je dédie ce travail à la mémoire de *Mon cher père*, le destin ne nous a pas laissé le temps pour jouir ce bonheur ensemble... que dieu tout puissant vous accorde sa clémence, sa miséricorde et vous accueille dans son saint paradis.

À la lumière de ma vie et l'espoir de mon existence, de celle qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté peut réaliser l'impossible *Ma mère*, que ce travail soit pour le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et toutes ces années de compréhension. Pour tout les peines et les sacrifices qu'elle m'avait consentis pour mon éducation. Que dieu tout puissant te donne santé et longue vie.

À mon cher frère Fethi et sa femme Meriem et mon neveu Mohamed

À mon cher petit frère Abderazek

À ma cher sœur Nawel et son mari Tayeb

À mes chers sœurs : Karima et Soumia

À tous mes oncles et toutes mes tantes

À mes cousins et mes adorables cousines : Imene, Hasnia, Louiza et Wafaa

*À toute la famille BERBER*

Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Je vous souhaite la réussite dans votre vie.

À mes très chers amies : Khaouchene Asmaa, Boudroua Yousra et Boukhanoufa Asmaa, pour tous les moments que nous avons partagés.

À mes amis : Belabbes Mohamed, Bouali Youcef Fayssal et Belhouari Salah.

À tous ceux qui ont participé de près et de loin à la réalisation de ce travail.

*Je vous dis Merci !*

*BERBER Nadia*

## Valorisation des travaux

Le travail mené dans cette thèse a fait l'objet de publications et communications nationales et internationales

### 1- Publication internationale

Nadia BERBER, Rachid AISSAOUI, Ahmed Mohamed Ali BEKADA, Morvan COARER. **Isolation and Molecular Identification (PCR-Delta and PCR-RFLP-ITS) of yeasts from the Black muscat grape cultivated in El Malah (Wilaya of Ain Temouchent, Algeria).** *Advances in Environmental Biology* 10(12) (2016) - 55-61.

### 2- Publication internationale acceptée

Nadia BERBER, Rachid AISSAOUI, Ahmed Mohamed Ali BEKADA, Morvan COARER. **Microbiological and Molecular Identification (PCR-RFLP-ITS) of the yeast from Cinsault grape cultivated in Abdelmalek Ramdane (Wilaya of Mostaganem, Algeria),** *Advances in Bioresearch*. 16 April 2017.

### 3-Publication internationale

Asmaa BOUKHENNOUFA, Nadia BERBER, Rachid AISSAOUI, Ahmed Mohamed Ali BEKADA. **Microbiological, Biochemical and Molecular Identification (PCR-RFLP-ITS) of the yeast from sultana grape cultivated in Ain Merane (Wilaya of Chlef, Algeria),** *Current Research on Biological Sciences (CRBS)*. *Science Vier*. 07 Novembre 2016.

### 4-Communication internationale

N. Berber, R. Aissaoui, A.M.A. Bekada et M. Coarer. **Isolement et Identification Moléculaire (PCR-Delta et PCR-ITS-RFLP) des levures du cépage Muscat noir cultivé dans la région El Malah (W. Ain Témouchent, Algérie).** 28<sup>ème</sup> Forum International des Sciences Biologiques et de Biotechnologie de l'ATSB, Tunisie, 21/24 Mars 2017

### 5-Communication nationale

Berber N, Aissaoui R et Bekada A.M.A. **Isolement et Identification Moléculaire (PCR-Delta et PCR-ITS-RFLP) des souches de *Saccharomyces cerevisiae* issues de cépages Algériens.** VI<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Mostaganem, 27/28 Avril 2016.

6-Communication nationale

Nadia BERBER, Rachid AISSAOUI, Ahmed Mohamed Ali BEKADA, Morvan COARER. **Identification Microbiologique et Moléculaire (PCR-Delta et PCR-ITS-RFLP) des levures de cépage Cinsault cultivé dans la région Abdelmalek Ramdane (Wilaya de Mostaganem).** VII<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Mostaganem les 26 et 27 Avril 2017.

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ADNr** : Acide DésoxyriboNucléique ribosomiaux

**AFLP** : Amplified Fragment Length Polymorphism

**ARNr** : Acide Ribonucléique ribosomique

**ARNt** : Acide Ribonucléique transporteur

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**BET** : Bromure d'éthidium

**Cn** : Cinsault

**Cr** : Carignan

**DAF** : DNA Amplified Fingerprinting

**DMSO** : Di-Méthyl-Sulf-Oxyde

**d ATP** : DésoxyAdénosine TriPhosphate

**d CTP** : DésoxyCytosine TriPhosphate

**d GTP** : DésoxyGuanosine TriPhosphate

**d NTP** : DésoxyNucléotides TriPhosphate

**DNS** : Acide 3,5 Dinitrosalcylique

**DO** : Densité Optique

**d TTP** : DésoxyThymidine TriPhosphate

**ECP** : Electrophorèse en champ pulsé

**EDTA** : Ethylène Diamine Tétracétique Acid (Acide éthylène-diamine-tétracétique)

**IFV** : Institut Français de la Vigne et Vin

**ITS** : Internal Transcribed Spacer (espace transcrit intergénique)

**I.T.A.F** : Institut Technique de l'Aarbroculture Fruitière et de la vigne

**Kb** : Kilo paires de base, soit 1000 paires de base

**Mn** : Muscat noir

## Liste des abréviations

---

**mM** : Millimole

**nm** : Nanomètre

**pb** : Paires de base (Unité de mesure de la taille d'un fragment d'ADN)

**PCR** : Polymerase Chain reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)

**RAPD** : Random Amplified Polymorphism

**rpm** : rotation par minute

**RE** : Réticulum Endoplasmique

**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism

**SDS** : Dédocyl Sulfate de Sodium

**S.C** : *Saccharomyces cerevisiae*

**Taq** : *Thermus Aquaticus*

**TAV** : Titre Alcoométrique Volumique

**TE** : Tris EDTA

**UFC** : Unité Formant Colonie

**UV** : Ultraviolet

**V** : Volt

**YG** : Yeast extract Glucose (extrait de levure-glucose)

**YM** : Yeast extract Malt (extrait de levure-malt)

**YPG** : Yeast extract peptone Glucose (extrait de levure –peptone-glucose)

<b>Figure 1 :</b> Structure de la grappe de raisin .....	06
<b>Figure 2 :</b> Représentation idéalisée d'une cellule de levure. ....	14
<b>Figure 3 :</b> Schéma de la reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure.....	17
<b>Figure 4 :</b> Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure. ....	17
<b>Figure 5 :</b> Schéma de la reproduction sexuée d'une levure.....	18
<b>Figure 6 :</b> Schéma des différents domaines d'utilisation des levures .....	25
<b>Figure 7 :</b> Le principe de la PCR. ....	33
<b>Figure 8 :</b> Principe général de la PCR-RFLP.....	36
<b>Figure 9 :</b> Micrographie de <i>S. cerevisiae</i> .....	38
<b>Figure 10:</b> Cycle biologique de la levure <i>S. cerevisiae</i> . ....	39
<b>Figure 11 :</b> Vignobles de la plaine d'El Maleh (Wilaya d'Ain Temouchent) .....	41
<b>Figure 12 :</b> Vignobles de la plaine d'Abdelmalek Ramdan (Wilaya de Mostaganem). .....	42
<b>Figure 13 :</b> Les photos des cépages étudiés (Muscat noir, Cinsault et Carignan). ....	43
<b>Figure 14 :</b> Schéma représentatif du protocole expérimental. ....	44
<b>Figure 15 :</b> Principe d'extraction de l'ADN génomique. ....	48
<b>Figure 16:</b> Protocole du traitement de l'ADN (amplifié par PCR-ITS) par des enzymes de restriction.....	54
<b>Figure 17 :</b> Protocole de l'amplification de la région cible par PCR-ITS-RFLP. ....	55
<b>Figure 18 :</b> Dispositif de mesure du CO <sub>2</sub> produit permettant la collecte du gaz. ....	58
<b>Figure 19:</b> Observation macroscopique de certains isolats de levures isolés. ....	64
<b>Figure 20:</b> Observation microscopique de certains isolats de levures isolés.....	65
<b>Figure 21 :</b> Photo d'ADN après extraction .....	67
<b>Figure 22 :</b> Visualisation de l'ADN extrait de certains isolats après migration sur gel d'agarose (Electrophorèse à blanc).....	67
<b>Figure 23 :</b> Profils PCR-Delta des 11 isolats de cépage Muscat noir (M : Marqueur de taille 100 pb de l'IFV).....	71
<b>Figure 24 :</b> Profils PCR-Delta des 12 isolats de cépage Carignan (M : Marqueur de taille 100 pb de l'IFV) .....	71
<b>Figure 25 :</b> Profils PCR-Delta des 11 isolats de cépage Cinsault (M : Marqueur de taille 100 pb de l'IFV).....	71

<b>Figure 26 :</b> Visualisation de la région (ITS1-ADNr5, 8S-ITSII) amplifiée chez les 11 isolats de Muscat noir .....	75
<b>Figure 27 :</b> Visualisation de la région (ITS1-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la Hinf I chez les 11 isolats de Muscat noir. ....	75
<b>Figure 28 :</b> Visualisation de la région (ITS1-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la HaeIII chez les 11 isolats de Muscat noir. ....	75
<b>Figure 29 :</b> Visualisation de la région (ITS1-ADNr5, 8S-ITSII) amplifiée chez les 11 isolats de Cinsault . ....	79
<b>Figure 30:</b> Visualisation de la région (ITS1-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la Hinf I chez les 11 isolats de Cinsault. ....	79
<b>Figure 31 :</b> Visualisation de la région (ITS1-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la HaeIII chez les 11 isolats de Cinsault .....	79
<b>Figure 32 :</b> Visualisation de la région (ITS1-ADNr5, 8S-ITSII) amplifiée chez les 12 isolats de Carignan. ....	83
<b>Figure 33 :</b> Visualisation de la région (ITS1-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la Hinf I chez les 12 isolats de Carignan. ....	83
<b>Figure 34 :</b> Visualisation de la région (ITS1-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la Hae III chez les 12 isolats de Carignan. ....	83
<b>Figure 35 :</b> Fréquences des espèces de levures isolées à partir des 3 cépages (Muscat noir, Cinsault et Carignan) .....	85
<b>Figure 36 :</b> Droite d'étalonnage pour la méthode de DNSA .....	90

<b>Tableau 1</b> : Les sources de carbone pouvant être utilisées par les levures.....	21
<b>Tableau 2</b> : Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes. ....	27
<b>Tableau 3</b> : Liste des amorces utilisées et leurs caractéristiques.....	35
<b>Tableau 4</b> : Classification de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	38
<b>Tableau 5</b> : Les principales applications de <i>S. cerevisiae</i> . ....	40
<b>Tableau 6</b> : Ensemble des caractères macroscopiques .....	46
<b>Tableau 7</b> : La composition du mélange réactionnel utilisé pour PCR-Delta. ....	52
<b>Tableau 8</b> : La composition du mélange réactionnel utilisé pour PCR-ITS-RFLP.....	53
<b>Tableau 9</b> : Dosage des sucres inverti par la méthode de DNS.....	62
<b>Tableau 10</b> : Les différents isolats de levures isolés. ....	63
<b>Tableau 11</b> : Fréquences des espèces de levures isolées à partir du cépage Muscat noir .....	73
<b>Tableau 12</b> : Taille en paires de bases des produits de PCR et des fragments de restriction obtenus avec deux endonucléases différentes (Hinf I et HaeIII).....	74
<b>Tableau 13</b> : Fréquences des espèces de levures isolées à partir du cépage Cinsault..	77
<b>Tableau 14</b> : Taille en paires de bases des produits de PCR et des fragments de restriction obtenus avec deux endonucléases différentes (Hinf I et HaeIII).....	78
<b>Tableau 15</b> : Fréquences des espèces de levures isolées à partir du cépage Carignan.	81
<b>Tableau 16</b> : Taille en paires de bases des produits de PCR et des fragments de restriction obtenus avec deux endonucléases différentes (Hinf I et HaeIII).....	82
<b>Tableau 17</b> : Quantités de CO <sub>2</sub> et d'éthanol résultant de la fermentation alcoolique des souches de <i>S.C.</i> ....	88
<b>Tableau 18</b> : Résultats de l'activité enzymatique de l'invertase des souches de <i>S.C.</i> .	91

## RESUME

Le raisin est un fruit exemplaire de la diversité microbienne, il est considéré comme l'habitat de multiples micro-organismes parmi les quels les levures. Dans ce cadre, cette étude consiste à isoler des souches indigènes de la levure « *Saccharomyces cerevisiae* » à partir de moût raisin (1<sup>er</sup> jour de fermentation) issus des différents cépages algériens (Muscat noir, Cinsault et Carignan), et à les identifier d'abord sur le plan microscopique puis moléculaire où on s'intéresse d'une part à l'étude de la région Delta par PCR-Delta, et d'autre part la variabilité de l'ADNr , plus exactement la région ITS1-5,8S-ITS2 par PCR-ITS-RFLP. Sur les 34 isolats de levures isolés, 06 genres et 12 espèces différentes ont été caractérisées selon leur profil moléculaire et différenciées par l'emploi de deux enzymes de restriction (HinfI et HaeIII). Parmi ces espèces, 03 souches de *Saccharomyces cerevisiae* Mn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> j) (AT), Cn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> j) (MOS) et Cr<sub>3</sub> (9<sup>ème</sup> J) (MOS) ont été identifiées, ayant des formes végétatives ovoïdes, se propagent par bourgeonnement monopolaire, caractérisées par un puissant pouvoir fermentaire (forte production de CO<sub>2</sub> et d'éthanol) et possédant l'enzyme « invertase ». Les 31 souches restantes sont des espèces non *Saccharomyces*, identifiées comme appartenant à différents genres tels que *Torulaspota*, *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora* et *Zygosaccharomyces*. Elles se multiplient par différents modes de reproduction (monopolaire, bipolaire et multipolaire) et sont caractérisées par des formes végétatives cylindriques, parfois sphériques, allongées ou courtes. Cependant, les levures non *Saccharomyces* sont très présentes, même majoritaires, dans les moûts de raisin du Muscat noir, du Cinsault et de Carignan par rapport aux levures *Saccharomyces*.

**Mots clés:** Raisin, Levures, *Saccharomyces cerevisiae*, PCR-Delta, PCR-ITS-RFLP, Invertase.

## SUMMARY

The grape is an exemplary fruit of the microbial diversity, it is considered as the habitat of multiple microorganisms among which the yeasts. In this framework, this study consists of isolating native strains of the "*Saccharomyces cerevisiae*" yeast from grape must (first day of fermentation) from different Algerian grape varieties (Muscat noir, Cinsault and Carignan), and to identify them first on the microscopic and then on the molecular level, where we are interested on the one hand in the study of the Delta region by PCR-Delta, and on the other hand the variability of the rDNA, region ITS1-5,8S-ITS2 by PCR-RFLP-ITS. Of the 34 isolated yeast isolates, 06 genera and 12 different species were characterized according to their molecular profile and differentiated by the use of two restriction enzymes (HinfI and HaeIII). Among these species, 03 strains of *Saccharomyces cerevisiae* Mn<sub>11</sub> (9<sup>th</sup> J) (AT), Cn<sub>11</sub> (9<sup>th</sup> J) (MOS) and Cr<sub>3</sub> (9<sup>th</sup> J) (MOS) were identified, with ovoid vegetative forms, propagated by monopolar budding, characterized by a strong fermentative power (high production of CO<sub>2</sub> and ethanol) and possessing the enzyme « invertase ». The remaining 31 strains are non-*Saccharomyces* species, identified as belonging to different genera such as *Torulaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora* and *Zygosaccharomyces*. They multiply by different modes of reproduction (monopolar, bipolar and multipolar) and are characterized by cylindrical vegetative forms, sometimes spherical, elongated or short. However, non-*Saccharomyces* yeasts are very present, even in the majority, in the grape musts of Muscat noir, Cinsault and Carignan compared to *Saccharomyces* yeasts.

**Key words:** Grape, Yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, PCR-Delta, PCR-RFLP-ITS, Invertase.

## الملخص

العنب هو ثمرة مثالية للتنوع الميكروبي , و يعتبر موطن للعديد من الكائنات الحية الدقيقة من بينها الخمائر .في هذا السياق , تتمثل هذه الدراسة في عزل السلالات المحلية من خميرة *Saccharomyces Cerevisiae* من مختلف أنواع العنب الجزائرية (Carignan ,Cinsault , Muscat noir) وفي اليوم الأول من التخمير و لتحديدها اولا بواسطة الدراسة المجهرية و من تم على المستوى الجزئي , حيث نحن مهتمون من جهة بدراسة منطقة دلنا بواسطة PCR-دلنا و من جهة أخرى تبيان الحمض النووي الريبوسومي خاصة المنطقة ITS<sub>1</sub>-5.8 S-ITS<sub>2</sub> بواسطة PCR-ITS-RFL . من 34 نوع خميرة معزولة , تم وصف 6 أجناس و 12 نوعا مختلفا وفقا لملاحظها الجزئية المتأينة باستخدام إثنين من أنزيمات التقييد ( Hinf I, Hae III).

أ هذهنواع تم التعرف,على ثلاث سلالاتمن خميرة *Saccharomyces Cerevisiae* (9<sup>ème</sup> j) Mn<sub>11</sub> (AT), Cn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> j) (MOS) et Cr<sub>3</sub>(9<sup>ème</sup> J) التي تتكاثر من خلال مهدها أحادي القطب, وشكل غطاء نباتي لديها بيضاوي. فهي أيضا تتميز بجودة كبيرة في التخمير (إنتاج عالي من CO<sub>2</sub> و الإثانول) , مع وجود أنزيم الأنفرتيز ,بينما السلالات المتبقية (31 سلالة) هي أنواع غير ساكارومييسز. التي تعرف بانها تنتمي الى اجناس مختلفة مثل: *Candida, Pichia, Hanseniaspora, zygosaccharomyces, Torulaspora*, وهي في انماط مختلفة من التكاثر (أحادي القطب, ثنائي القطب , و متعدد الأقطاب) و تتميز بأشكال نباتية أسطوانية , احيانا كروية ,ممدودة أو قصيرة. و مع ذلك الخمائر الغير ساكارومييسز موجودة جدا, حتى في الغالبية في العنب (Carignan ,Cinsault , Muscat noir) مقارنة مع الخميرة ساكارومييسز.

كلمات البحث : العنب - الخميرة - خميرة الخبز (S.C), PCR-دلنا, PCR-ITS-RFLP, الأنفرتيز .

---

# SOMMAIRE

---

**Remerciements**

**Dédicaces**

**Valorisation des travaux**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Résumé**

**Summary**

**Résumé en Arabe**

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>4</b>
<b>I- Raisin et Vignoble .....</b>	<b>4</b>
1. Histoire.....	4
2. Définition .....	4
3. Physiologie et constituants chimiques .....	5
3.1. La physiologie.....	5
3.1.1. La rafle.....	5
3.1.2. La pellicule de raisin.....	6
3.1.3. La pulpe.....	6
3.1.4. Les pépins.....	6
3.2. Les constituants chimiques.....	6
3.2.1. Les sucres.....	6
3.2.2. Les acides organiques.....	7
3.2.3. Les polyphénols.....	7
3.2.4. Les substances odorantes.....	7
3.2.5. Les substances azotées.....	7
3.2.6. Les vitamines.....	8

4. La flore microbienne de raisin et son origine .....	8
5. Notion de cépage.....	9
5.1. La diversification entre les cépages .....	9
5.1.1. La couleur de la peau du raisin.....	9
5.1.2. L'observation des caractères morphologiques.....	9
5.2. Vignoble en Algérie.....	9
5.2.1. Cépages de cuve en Algérie.....	9
5.2.2. Cépages de table en Algérie .....	11
5.2.3. Cépages à raisin sec .....	12
<b>II- Etude fondamentale des levures.....</b>	<b>12</b>
1. Caractéristiques microbiologiques des levures.....	12
1.1.Habitat .....	13
1.2. Morphologie.....	13
1.3. Cytologie.....	13
1.3.1. La paroi cellulaire .....	14
1.3.2. La membrane plasmique (ou le plasmalemma).....	14
1.3.3. Le cytoplasme et ses organites.....	15
1.3.3.1. Le cytosol.....	15
1.3.3.2. Le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi et les vacuoles.....	15
1.3.3.3. Les mitochondries.....	15
1.3.4. Le noyau.....	16
1.4. Reproduction .....	16
1.4.1. Reproduction asexuée .....	16
1.4.1.1. Reproduction asexuée par bourgeonnement.....	16
1.4.1.2. Reproduction asexuée, par scission-Scissiparité.....	17
1.4.2. Reproduction sexuée.....	18
2. Différenciation des levures .....	18
2.1. Caractères botaniques .....	19
2.2. Caractères morphologiques.....	19
2.3. Caractères biochimiques .....	19

2.4. Caractères moléculaires .....	20
3. Classification des levures.....	20
3.1.Les ascomycètes.....	20
3.2.Les basidiomycètes.....	20
3.3. Les deutéromycètes.....	20
4. Physiologie et croissance des levures .....	21
4.1. Les besoins nutritifs .....	21
4.1.1. L'alimentation carbonée.....	21
4.1.2. L'alimentation azotée.....	22
4.1.3. Oligoéléments et facteurs de croissance.....	22
4.2. Les conditions physicochimiques de croissance.....	22
4.2.1. L'oxygène.....	22
4.2.2. La température.....	23
4.2.3. Le pH.....	23
4.2.4. La pression osmotique et l'activité de l'eau .....	23
4.3. Le métabolisme.....	23
4.3.1. Métabolisme oxydatif .....	24
4.3.2. Métabolisme fermentaire.....	24
5. Levure : Modèle génétique universel.....	24
6. Levures en biotechnologie .....	25
6.1. Boissons alcoolisées.....	26
6.2. Panification .....	26
6.3. Affinage des fromages .....	26
6.4. Production d'alcools industriels.....	26
6.5. Autres utilisations .....	27
6.6. Avantages des levures en industrie.....	27
<b>III- Techniques d'identification des levures.....</b>	<b>28</b>
1. Isolement des levures.....	28
2. Méthodes classiques d'identification des levures.....	28
2.1. Etude des caractères cultureux.....	28
2.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires .....	29

2.2.1. Aptitude à la filamentation : .....	29
2.2.2. Morphologies particulières .....	29
2.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques .....	30
2.3.1. Utilisation des substrats carbonés.....	30
2.3.1.1. Aptitude à la fermentation.....	30
2.3.1.2. Assimilation des substrats carbonés.....	30
2.3.2. Utilisation des sources d'azote :.....	30
3. Identification moléculaire .....	30
3.1. Le mécanisme moléculaire chez les eucaryotes .....	31
3.1.1. La réplication d'ADN in vivo .....	31
3.1.2. La réplication d'ADN in vitro « la PCR ».....	31
3.2. Méthode de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) .....	32
3.2.1. La dénaturation .....	32
3.2.2. L'hybridation .....	32
3.2.3. L'élongation.....	33
3.3. Visualisation de l'ADN par électrophorèse .....	33
3.4. Techniques moléculaires pour l'identification des levures .....	34
3.4.1. Identification de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
3.4.1.1. PCR-Delta.....	34
3.4.2. Identification des levures au niveau de l'espèce .....	35
3.4.2.1. PCR-ITS.....	35
3.4.3. Identification des levures au niveau de la souche.....	36
3.4.3.1. PCR-RFLP ( <i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i> ).....	36
3.4.4. Les différentes méthodes d'identification des levures .....	37
3.4.4.1. La DAF-PCR.....	37
3.4.4.2. L'Inverse PCR .....	37
3.4.4.3. La RAPD-PCR .....	37
3.4.4.4. Microsatellite.....	37
<b>III- Données sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>37</b>
1. Définition .....	37

2. Classification.....	38
3. Morphologie.....	38
4. Reproduction.....	39
5. Conditions de culture de la levure <i>S.cerevisiae</i> .....	39
5.1.Exigences culturales.....	39
5.1.1.Le pH.....	39
5.1.2. La température .....	39
5.1.3. La pression osmotique.....	40
6. Besoins nutritionnels.....	40
6.1. L'eau.....	40
6.2. Le carbone.....	40
6.3. L'azote.....	40
7. Principales applications de <i>S.cerevisiae</i> .....	40
<b>MATERILES ET METHODES .....</b>	<b>41</b>
1. Présentation des régions de la récolte de raisin .....	41
1.1. La région El Maleh (Wilaya d’Ain Temouchent).....	41
1.2. La région Abdelmalek Ramdane (Wilaya de Mostaganem).....	42
2. Sources de prélèvement des levures .....	42
2.1. Cépage Muscat noir (la région El Maleh de la wilaya d’Ain Temouchent).....	42
2.2. Cépage Cinsault (la région Abdelmalek Ramdan de la wilaya de Mostaganem) .	43
2.3. Cépage Carignan (la région Abdelmalek Ramdan de la wilaya de Mostaganem)	43
3. Isolement, purification et conservation des isolats .....	44
4. Techniques de prélèvement des levures.....	45
4.1. Préparation des extraits de raisin .....	45
4.2. Isolement des levures .....	45
4.3. Purification des levures.....	46
4.4. Conservation des levures.....	46
5. Etudes des caractéristiques culturales .....	46
5.1. Observation macroscopique.....	46
5.2. Observation microscopique .....	47
5.2.1. Observation microscopique sans coloration.....	47

5.2.2. Observation microscopique avec la coloration par le bleu de méthylène.....	47
6. Caractérisation moléculaire des isolats de levures .....	47
6.1. Extraction d'ADN.....	47
6.1.1. Réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN .....	49
6.1.2. Méthode d'extraction de l'ADN génomique des levures (selon l'IFV de Nantes) .....	50
6.2. Vérification qualitative et quantitative de l'ADN extrait .....	50
6.3. Amplification de l'ADN par la PCR.....	51
6.3.1. Dénaturation.....	51
6.3.2. Hybridation des amorces .....	51
6.3.3. Extension (polymérisation).....	51
6.4. PCR-Delta (Delta 12/Delta 21).....	52
6.5. PCR-RFLP (ITS1-ARNr 5,8S-ITS2).....	53
6.6. La digestion enzymatique .....	55
6.7. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	56
6.7.1. Programme du thermocycleur.....	56
7. Caractérisation biotechnologique des souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	57
7.1. Fermentation alcoolique : Capacité des souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à produire de l'éthanol et du CO <sub>2</sub> .....	57
7.1.1. Préparation des souches à caractériser.....	57
7.1.2. Addition de glucose et de l'inoculum.....	59
7.1.3. Démontage, mesure et observations.....	59
7.2. Etude de l'activité enzymatique de l'invertase chez les souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	60
7.2.1. Extraction de la fraction soluble des souches de <i>S.C</i> .....	61
7.2.2. Etablissement de la courbe étalon.....	61
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>63</b>
1. Isolement des levures à partir de différents cépages.....	63
2. Identification microbiologique des isolats de levures.....	64
2.1. Etude des caractéristiques culturelles .....	64
2.2. Etude des caractéristiques cellulaires .....	65
3. Identification moléculaire des isolats de levures .....	66

3.1. Extraction d'ADN des isolats .....	66
3.2. Vérification qualitative et quantitative de l'ADN extrait des isolats .....	67
3.3. Résultats de PCR-Delta des isolats de levures isolés à partir des cépages Muscat noir, Cinsault et Carignan .....	69
3.4. Résultats de PCR-ITS-RFLP des isolats de levures isolés à partir des cépages Muscat noir, Cinsault et Carignan.....	72
3.4.1. Les espèces de levures isolées à partir du raisin Muscat noir .....	73
3.4.2. Les espèces de levures isolées à partir du raisin Cinsault .....	77
3.4.3. Les espèces de levures isolées à partir du raisin Carignan.....	81
3.5. Taux de répartition de différentes espèces de levures isolées .....	85
4. Identification Biotechnologique des souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	87
4.1. Résultats du dosage de CO <sub>2</sub> et d'éthanol chez les souches de <i>S.C</i> .....	87
4.2. Résultats de l'activité enzymatique de l'invertase chez les souches de <i>S.C</i> .....	89
5. Discussion générale .....	93
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>95</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>101</b>

---

# INTRODUCTION GENERALE

---

La vigne est l'espèce végétale la plus cultivée dans le monde, où sa fructification résulte d'un cycle de reproduction long et complexe, dont sont issus les cépages de cuve et de table, chacun d'eux se distingue par la forme de la grappe et sa taille, le goût, et la couleur des grains. Le raisin produit à partir de ce genre est le fruit au premier rang parmi les productions fruitières dans le monde, du point de vue de sa production ainsi que son importance économique (**Blouin, 2007**).

Les levures sont naturellement présentes sur les sols, les surfaces végétales, en particulier les baies de raisin, ou dans les zones viticoles (**Ocón, et al., 2010 ; Bokulich et al., 2013**). Leur diffusion est assurée par le vent, les insectes et les humains à travers leurs diverses interventions sur l'environnement (**Ganter, 2006 ; Barata et al., 2012**). La microflore des raisins est composée d'une grande variété de micro-organismes répartie entre levures, bactéries et moisissures. Leur présence et leur nombre à la surface des raisins sont influencés par plusieurs facteurs tels que le cépage, les conditions climatiques lors de la maturation, le sol, les pratiques culturales, la localisation géographique du vignoble et l'âge de la vigne (**Filoftea, 2010**).

À la vigne, les populations de levures sont faibles et sont concurrencées par les moisissures. Très peu de levures fermentaires de type *Saccharomyces cerevisiae* sont retrouvées sur la cuticule des raisins, la plupart des espèces qui s'y trouvent sont oxydatives, c'est à dire qu'elles ne transforment pas, ou très peu, les sucres contenus dans le raisin en alcool. Cette microflore levurienne varie de manière importante d'une parcelle à l'autre en relation probable avec les pratiques culturales et la climatologie du millésime. Par ailleurs, dans le moût en fermentation, les levures issues du raisin ne sont pas systématiquement retrouvées, les espèces significativement présentes sont en nombre limité. Globalement, on rencontre essentiellement des levures à métabolisme strictement oxydatif, appartenant au genre *Rhodotorula*, et quelques espèces fermentaires tel que les espèces apiculées (*Kloeckera apiculata* et *Hanseniaspora uvarium*), on rencontre aussi *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida famata*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentans* (**Ribéreau et al., 1998**).

Jusqu'à une vingtaine d'années environ, les méthodes traditionnelles d'identification des levures étaient fondées sur les phénotypes des différents individus. Les levures étaient différenciées en se basant sur les caractéristiques morphologiques des cellules végétatives ou du stade sexuel, puis sur leurs propriétés physiologiques. Vu le polymorphisme des levures d'un stade à un autre, dépendant surtout des conditions environnantes, les tests phénotypiques seraient alors limités et imprécis pour leur identification. La mise en œuvre des techniques issues de la biologie moléculaire permet l'identification génétique fine des levures et leur classification selon le genre et de l'espèce sans ambiguïté (**Claude *et al.*, 2007**).

Les levures sont des acteurs essentiels intervenant dans divers domaines et l'intérêt qu'elles suscitent aujourd'hui est dû à leur grande diversité. Un grand nombre de levures communément utilisées en biotechnologie a été obtenu à partir d'habitats naturels où elles ont développé une faculté d'adaptation à un grand nombre de niches écologiques grâce à leurs propriétés physiologiques très caractéristiques. Par ailleurs, de nombreuses espèces de levures produisent un métabolite primaire très important à savoir l'éthanol, utilisé à la fois comme breuvage, carburant ou à d'autres fins industrielles. Une deuxième contribution majeure des levures dans les progrès de l'humanité a été leur utilité dans l'élucidation des processus biochimiques et génétiques fondamentaux chez les cellules. Ces micro-organismes ouvrent des voies de recherche pour l'avenir. Constamment améliorés, les systèmes de production permettent d'envisager la production de protéines très diverses, pour la pharmacie humaine ou vétérinaire, mais aussi pour d'autres applications dans les domaines de l'agro-alimentaire ou de la dépollution. À l'heure actuelle, seule *Saccharomyces cerevisiae* et ses espèces apparentées ont une importance industrielle majeure. Différents micro-organismes possèdent de bonnes performances de production d'éthanol en métabolisant des hexoses, parmi eux les souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyces marxianus*. La fermentation alcoolique du glucose par *Saccharomyces cerevisiae* est largement connue et maîtrisée et les performances atteintes sont les meilleures (**Ogier *et al.* 1999; Alfenore *et al.* 2002**).

De plus, le fait que cette levure soit un organisme modèle en biologie (métabolisme connu, nombreux outils) (Goffeau *et al.* 1996) en fait une bonne candidate pour la production industrielle intensive d'éthanol.

Les recherches entreprises dans cette étude ont pour objectif, l'isolement et l'identification des souches indigènes de la levure « *Saccharomyces cerevisiae* » à partir des raisin en fermentation issus de différents cépages des vignobles algériens, sur le plan microscopique puis moléculaire, où l'on s'intéresse tout particulièrement à l'étude de variabilité de l'ADNr, plus exactement la région ITS1-ARNr 5,8S-ITS2 par PCR-ITS-RFLP et la région Delta par PCR-Delta. Cette étude s'intéresse aussi à la caractérisation des souches de *Saccharomyces cerevisiae* isolées à l'échelle biotechnologique (production de CO<sub>2</sub>, éthanol, enzymes) pour d'éventuelles sélections et utilisations dans les différents domaines en technologie agro-alimentaire et en biotechnologie première et deuxième génération.

Le présent manuscrit est réparti en chapitres distincts. Le premier est une synthèse bibliographique portant essentiellement sur le raisin et les vignobles de l'Algérie, suivi par des généralités sur les levures, leurs caractéristiques biologiques, les utilisations industrielles et les différentes techniques permettant leur identification, suivie par l'étude de *Saccharomyces cerevisiae*. Le second chapitre est consacré aux matériels et aux protocoles expérimentaux mis en place pour la réalisation de cette étude, suivi de la présentation des résultats et discussion, et enfin nous terminons par une conclusion générale, et une proposition des perspectives possibles à la poursuite de ce travail.

---

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

### I- Raisin et Vignoble

#### 1. Histoire

La vigne Vit. C'est l'une des plantes les plus diversifiées qui soient, et certainement qui a fait le plus rêver les hommes depuis l'Antiquité (**Bettane et al., 2010**). En provenance d'Asie Mineure, le raisin était présent à l'état naturel puis diffusé ensuite vers l'Ouest. Lorsque la récolte était amplement suffisante, le raisin était broyé en jus, puis réservé dans les jarres de terre, c'est alors que 4000 ans avant notre ère débuta la maîtrise du processus de vinification et de la viticulture. Dans l'Antiquité, les Grecs et les Romains, répandirent la culture de la vigne dans tout l'Empire. Et à partir de là, la culture de la vigne fut domestique et de très nombreuses variétés de raisins virent le jour uniquement pour la viticulture et peu à peu, l'homme a commencé à maîtriser la culture de la vigne (**Retoumard, 2005**).

L'Algérie est le plus vaste pays du Maghreb, en a partagé le sort des phéniciens à l'empire ottoman, en passant par les romains, la conquête arabe, les temps des barbaresques, l'occupation espagnole. La conquête française (1830) ne trouve que 2000 hectares de vignes ; ils deviendront 30.000 en 1870, 125.000 en 1888, pour atteindre le maximum de 407.000 hectares en 1951-1954 en produisant jusqu'à 19 millions d'hectolitres. Au moment de l'indépendance de l'Algérie, la vigne couvrait encore 350.000 hectares soit 10% des terres cultivées, avec une production variant de 14 à 18 millions d'hectolitres. Par le temps, la plus grande partie de ce vignoble a été arrachée, le vignoble « pied noir » en très bon état général s'est désagrégé par pertes de compétences et volontés politiques. Aujourd'hui, ce vignoble reste le plus important du Maghreb, soutenu par diverses tentatives, relance souvent freinées par les incertitudes politiques (**Blouin, 2007**).

#### 2. Définition

La vigne est un arbrisseau rampant, de la famille botanique des vitacées essentiellement de l'espèce *Vitis* (**Hédalgo et al., 2005**). Schématiquement comme toutes les autres plantes comparables, un plant de vigne est formé d'une partie souterraine, les racines et radicelles, et d'une partie aérienne formant le tronc qui

supporte les sarments, les rameaux, les fleurs devenant fruit-raisin (**Carbonneau et al., 2007**).

Le raisin est le fruit de la vigne du genre *Vitis vinifera*. C'est le deuxième fruit le plus cultivé au monde (classement de l'année 2000). C'est une baie charnue qui a plusieurs formes possibles en fonction des variétés. Il est constitué d'un péricarpe et de graines appelées pépins qui sont au nombre maximum de 4 par baie pour la majorité. Il sert surtout à la fabrication du vin à partir de son jus fermenté, mais il se consomme également comme un fruit, soit frais, le raisin de table, soit sec, le raisin sec. On extrait aussi l'huile de pépins de raisin (**Cadet, 2005**).

### 3. Physiologie et constituants chimiques

#### 3.1. La physiologie

Le grain du raisin est une baie, c'est un fruit « **succulent** », il contient les graines. Sa structure faite de beaucoup de sucre et peu de pépins, contenus dans une pellicule protectrice assez facile à éclater (**Blouin, 2007**).

**3.1.1. La rafle :** C'est la charpente d'une inflorescence en grappe de raisin, elle est donc ramifiée. La ramification la plus longue forme l'axe principal appelé rachis. La ramification la plus courte dite pédicelle supporte le grain. Dans cette rafle, on trouve les constituants chimiques suivants :

- **Les tannins :** constituent 3% du poids de la rafle.
- **L'eau :** représente 78 à 80% du poids de la rafle.
- **Les matières minérales :** représentent de 2 à 3% du poids de la rafle. Elles sont surtout sous forme de sels de potassium (**Navarre, 1998**).

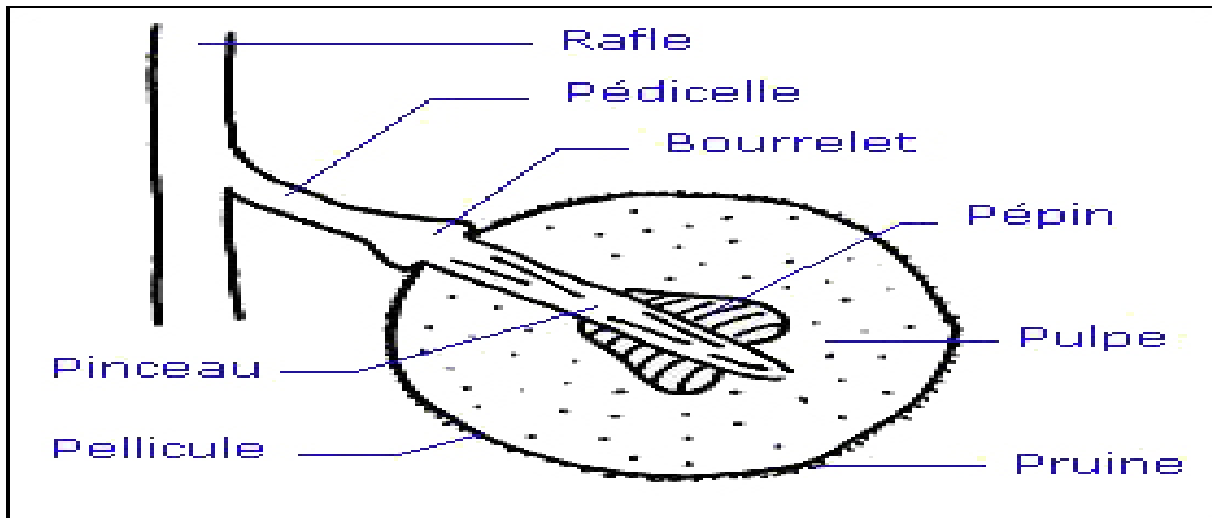


Figure N° 01: Structure de la grappe de raisin (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

**3.1.2. La pellicule du raisin :** Elle comporte de nombreux composés phénoliques et en particulier des pigments et des tannins. Elle est aussi la zone la plus riche en arômes. Enfin, elle est riche en matières pectiques (Guillaume, 2001).

**3.1.3. La pulpe :** C'est la partie principale de la baie (80 à 85% du poids de la grappe) contenue par la pellicule et abritant les pépins, constituée de cellules possédant d'énormes vacuoles gorgées de substances élaborées (Navaree, 1998). Elle est juteuse, sucrée, de couleur verte, jaune ou rouge avec des pépins et des matières minérales solubles, une fraction importante des tannins et faible des anthocyanes et des arômes (Arnaud *et al.*, 2007).

**3.1.4. Les pépins :** Leur nombre par baie peut varier de 1 à 4, la moyenne se situant le plus souvent vers 2. Certaines variétés sont apyrènes. Les téguments des pépins contiennent essentiellement des tannins (5 à 8% du poids des pépins) et des lipides (Arnaud *et al.*, 2007).

## 3.2. Les constituants chimiques

**3.2.1. Les sucres:** La pulpe renferme essentiellement 2 hexoses : le glucose et le lévulose (fructose) qui ont une importance quantitative et qualitative, leur teneur peut atteindre 200 à 300 g par litre, voire 350. Ils sont fermentescibles (à l'exception de

quelques oses, ex : le xylose, le galactose ...) : en anaérobiose avec les levures, ils sont transformés en alcool. Ils sont réducteurs, capables de s'oxyder pour donner l'acide gluconique.

### 3.2.2. Les acides organiques

\* **L'acide tartrique** : dit spécifique à la vigne avec une concentration de 3 à 8 g/L. C'est l'acide le plus fort du raisin (**Guillaume, 2001**).

\* **L'acide malique** : il existe dans tous les fruits. Il est synthétisé dans les tissus chlorophylliens (**Navaree, 2010**).

### 3.3.3. Les polyphénols

\* **Les matières colorantes** : sont localisées dans les vacuoles des cellules de l'hypoderme de la pellicule. On trouve : les anthocyanes et les flavones.

\* **Les polyphénols incolores** : on distingue : les phénols monomères, les polyphénols condensés et les tannins.

**3.3.4. Les substances odorantes** : Les arômes libres du raisin sont localisées dans les cellules hypoépidermiques, résulte de la juxtaposition de sensations olfactives et gustatives, provoquées par des substances volatiles :

\* **Les substances aromatiques** : le salicylate d'éthyle et la vanilline.

\* **Les esters** : le formiate d'éthyle, les acétates de méthyle et l'isoamyle.

\* **Les aldéhydes** : l'aldéhyde phénylpropionique, éthylique et cinnamique.

**3.3.5. Les substances azotées** : L'élément azote entre dans la matière vivante (16% seulement) cependant son rôle est fondamental. L'azote organique se présente sous trois formes :

\* **Forme monomère** : Dans le raisin, on trouve les 21 acides aminés. En fait, quatre dominant nettement en représentant eux-mêmes 85%. Ce sont : l'acide glutamique, l'arginine, la thréonine et la proline (**Navarre, 2010**).

\* **Forme polymère** : 60 à 90% de l'azote organique du raisin est sous cette forme.

\* **Forme complexe** : les protéines ne représentent que 3% de l'azote organique du raisin.

**3.3.6. Les vitamines** : Certaines vitamines sont hydrosolubles, on les trouve dans les pépins ; qui ont un rôle important en œnologie notamment la vitamine C et celles du groupe B (Guillaume, 2001).

#### 4. La flore microbienne de raisin et son origine

La surface externe du grain de raisin retient toujours des germes vivants apportés par les poussières de l'air ou les insectes hibernants (abeilles, drosophiles). À la vigne, les populations levuriennes cultivables sont faibles ( $10^2$  à  $10^3$  UFC/g) sur les raisins immatures puis croissent jusqu'à  $10^3$ - $10^5$  UFC/g au moment de la récolte (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004 ; Renouf *et al.*, 2005). L'évolution des populations de levures peut être liée à l'augmentation de la surface de la baie et à la disponibilité de nutriments : au cours de la maturation de la grappe, les baies grossissent, la teneur en nutriments à la surface augmente, la concentration en sucre augmente et l'acidité diminue (Cadez *et al.*, 2010 ; Combina *et al.*, 2005). La représentation des différentes levures varie au cours du développement de la baie de raisin selon plusieurs paramètres tels que le cépage, les conditions climatiques, le sol, les pratiques viticoles, l'âge de la vigne, l'état sanitaire de la grappe et le degré de maturité de raisin (Pretorius *et al.*, 1999 ; Nisiotou *et al.*, 2007 ; Valero *et al.*, 2007 ; Cadez *et al.*, 2010 ; Clavijo *et al.*, 2010 ; Cordero-Bueso *et al.*, 2011 ; Barata *et al.*, 2012 ).

Les espèces des levures présentes sur la surface de baie de raisin sont significativement limitées en nombre. On rencontre essentiellement des levures à métabolisme strictement oxydatif, appartenant au genre *Rhodotorula*, et quelques espèces fermentaires tel que les espèces apiculées (*Kloekerara apiculata* et sa forme sporogène *Hanseniaspora uvarium*), on rencontre aussi *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida intermedia*, *Pichia fermentans*, *Hansenula anomala* mais en moindre proportion (Ribéreau *et al.*, 1998), mais ces germes restent inactifs, car la pellicule du fruit les isole du jus sucré. Accidentellement ou après usure, la pellicule peu s'ouvrir et

le jus se contamine où la fermentation ne tarde pas à se déclarer d'elle-même, sans qu'il soit nécessaire d'ensemencer le milieu. Dans les pays viticoles, où la vigne est cultivée depuis longtemps, les levures multipliées à l'infini, d'année en année, finissent par s'adapter au climat et à la nature des vendanges, il se produit alors une véritable sélection naturelle.

### 5. Notion de cépage

Le cépage désigne le type et le qualitatif « variétal », alors une variété cultivée constituée d'un ensemble d'individus ayant les caractères morphologiques et technologiques assez proches pour les designers sous le même nom (**Reynier, 2007**).

#### 5.1. La diversification entre les cépages

Elle est basée sur :

##### 5.1.1. La couleur de la peau du raisin

- ❖ **Cépages rouges (noir)** : Carignon, grenache noir, cinsault, syrah, aramon, mourvèdre, merlot .... (**Reynier, 2007**).
- ❖ **Cépages blancs** : grenache blanc clairette, muscat blanc à petits grains.

##### 5.1.2. L'observation des caractères morphologiques

Comme la couleur des bourgeons ou des baies, la forme des feuilles ou des rameaux, la dimension des grappes, et le goût.

### 5.2. Vignoble en Algérie

#### 5.2.1. Cépages de cuve en Algérie

En 1961, l'Algérie alors département français produisait 16 millions d'hectolitres de vin pour 360 000 ha de vignobles. De nos jours, elle occupe une place plus que lointaine dans le palmarès des pays producteurs de vins. La réglementation a délimité les aires d'implantation des raisins de cuve au nombre sept appellations : Coteaux de Mascara, Médéa, Coteaux de Tlemcen, Monts de Tessalah (**I.T.A.F, 2000**).

Parmi les cépages de cuve cultivés en Algérie, on trouve :

**\*Carignon :** Il constitue le fond de l'encépagement du vignoble de cuve. Régulièrement productif et peu exigeant. Il convient peu dans les plaines sèches de l'ouest où la chaleur des étés ne lui permet pas de murir régulièrement, ses baies qui s'y développent mal et restent petites et sèches. Son aire d'adaptation est limitée aux zones de coteaux et de montagnes ayant une certaine fraîcheur nocturne.

**\*Cabernet sauvignon :** Il résiste au gel et à la pourriture, peut pousser dans divers types de climats et de sols. Ses grappes sont plutôt petites, 10 cm environ de longueur, cylindro-coniques, d'un poids moyen de 100 à 125 g. Les baies sont sphériques, petites, noires, à peau épaisse, dure, avec une chair très ferme, croquante, à saveur spéciale, rappelant à la fois la violette et les fruits sauvages comme les sorbes, avec un goût astringent (**Galet, 1991**).

**\*Cabernet franc :** Grappes petites, 10 cm environ, cylindro-coniques, baies petites, 10 mm, sphériques, de couleur noir bleuté, avec une pellicule plus fine que celle du cabernet-sauvignon, donc moins résistante à la pourriture grise, jus sucré, un peu astringent.

**\*Cinsault :** C'est un cépage qui donne de bons rendements si on le soigne correctement. Très sensible au type de sol où il est cultivé, il est producteur en coteaux maigres. C'est également un raisin de table à belles grappes, à grains ovoïdes, croquantes, à saveur simple et agréable qui convient parfaitement aux marchés locaux (**I.T.A.F, 2000**).

**\*Autres cépages :** cultivés en petites superficies mais donnent de la finesse. Citons le **mourvèdre**, le **pinot** et le **syrah**. Ces cépages ne sont pas originaires des pays viticoles méditerranéens.

### 5.2.2. Cépages de table en Algérie

L'époque de maturité joue un grand rôle économique et permet de classer les cépages en :

**\*Cépages précoces :** En Algérie, sont considérés comme cépages précoces les raisins arrivant à la maturité à la première semaine de juillet. De point de vue commercial, ils présentent un grand intérêt, puisque ce sont les premiers raisins qui apparaissent sur le marché.

- **Le Chasselas :** cépage blanc, de vigueur moyenne de fertilité élevée, donne des rendements appréciables. Les plus belles grappes sont obtenues dans les sols maigres de coteaux (**I.T.A.F, 2000**).

- **Le Cardinal :** cépage d'un beau de rose. Intéressant pour la dimension de ses baies et sa couleur parfois imparfaite. Un usage vigoureux, de fertilité élevée, donnant de gros rendements. Il doit être réservé aux zones littorales et dans les oasis.

**\* Cépages de saison :** Ils arrivent sur le marché dès la fin juillet jusqu'à la mi-septembre. Ils renferment une gamme assez variée de raisins noirs et blancs de belle présentation.

- **Alphonse Lavallée :** on l'appelle encore gros noir en raison de la dimension et de la couleur de ses baies. Cépage vigoureux, de fertilité élevée. Il faut l'établir en terrain frais et fertile.

- **Adari :** cépage de table blanc particulier à la région de Mostaganem et plus précisément à Mesra. Il est très recherché sur les marchés locaux. Il connaît un regain d'intérêt dans la région de Mostaganem et Mascara. Localement, il est également utilisé pour l'obtention du raisin sec.

**\* Les cépages tardifs :** Les raisins tardifs sont ceux qui arrivent à maturité après la mi-septembre en Algérie. L'encépagement autochtone renferme de très belles variétés qui méritent d'être développées.

• **Ahmar Bou-Amar** : cultivé dans toute la Kabylie ainsi dans la plupart des régions montagneuses : Tlemcen, Mascara. C'est un beau cépage à grandes grappes d'une belle couleur rose ou rouge vif, d'une saveur assez agréable, pas trop sucrée. Très vigoureux à fertilité élevée (**I.T.A.F, 2000**).

### 5.2.3. Cépages à raisin sec

\* **Sultanine blanche** : C'est un cépage blanc à petites baies apyrènes, le plus répandu dans le monde pour la préparation des raisins secs. Il est cultivé dans la région de Mascara, Mostaganem et Tlemcen. Les grappes sont volumineuses à petites baies qui s'égrènent facilement. Il préfère les terres riches et les zones bien arrosées (800mm/an). Pour le séchage traditionnel, il faut l'établir dans des zones où l'humidité est faible (**I.T.A.F, 2000**).

\* **King's Ruby** : C'est une variété très productive sur terrain profond et riche qui nécessite des zones à été chaud et sec. La grappe est très grande, à baies de couleur rouge, de grande moyenne taille.

## II- Etude fondamentale des levures

Les levures sont les premiers micro-organismes utilisées par l'homme depuis les millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain par fermentation. Elles sont également les premiers micro-organismes à être observés au microscope par A. Van Leewenhoek en 1680 qui les a dessinées. Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur (1866-1876) que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence (**Bouix et Leveau, 1991**). Á la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Buchner. Á l'heure actuelle, les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (**Pol, 1996**).

### 1. Caractéristiques microbiologiques des levures

Le terme levure provient du mot latin « levare » qui se traduit par le verbe « lever » comme levain (**Oteng-Gyang, 1984**), rappelle l'attitude de certaines d'entre elles à provoquer la « levée » des pâtes panifiables (**Bouchet et al., 2005**). Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons unicellulaires ; certaines font des bourgeons qui se détachent pas, il se forme alors une courte chaîne de cellules appelée hyphe (**Tortora et al., 2003**). Ces structures sont immobiles (**Guiraud, 2003**).

#### 1.1. Habitat

Les levures sont des espèces ubiquitaires, largement distribuées dans la nature. Elles se rencontrent sur les végétaux riches en sucre directement assimilables (les pommes, les raisins) (**Bouix et Leveau, 1991**). On trouve également des levures à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les eaux, dans l'atmosphère et dans le sol. Par ailleurs, le sol constitue un large réservoir assurant leur survie dans les conditions défavorables.

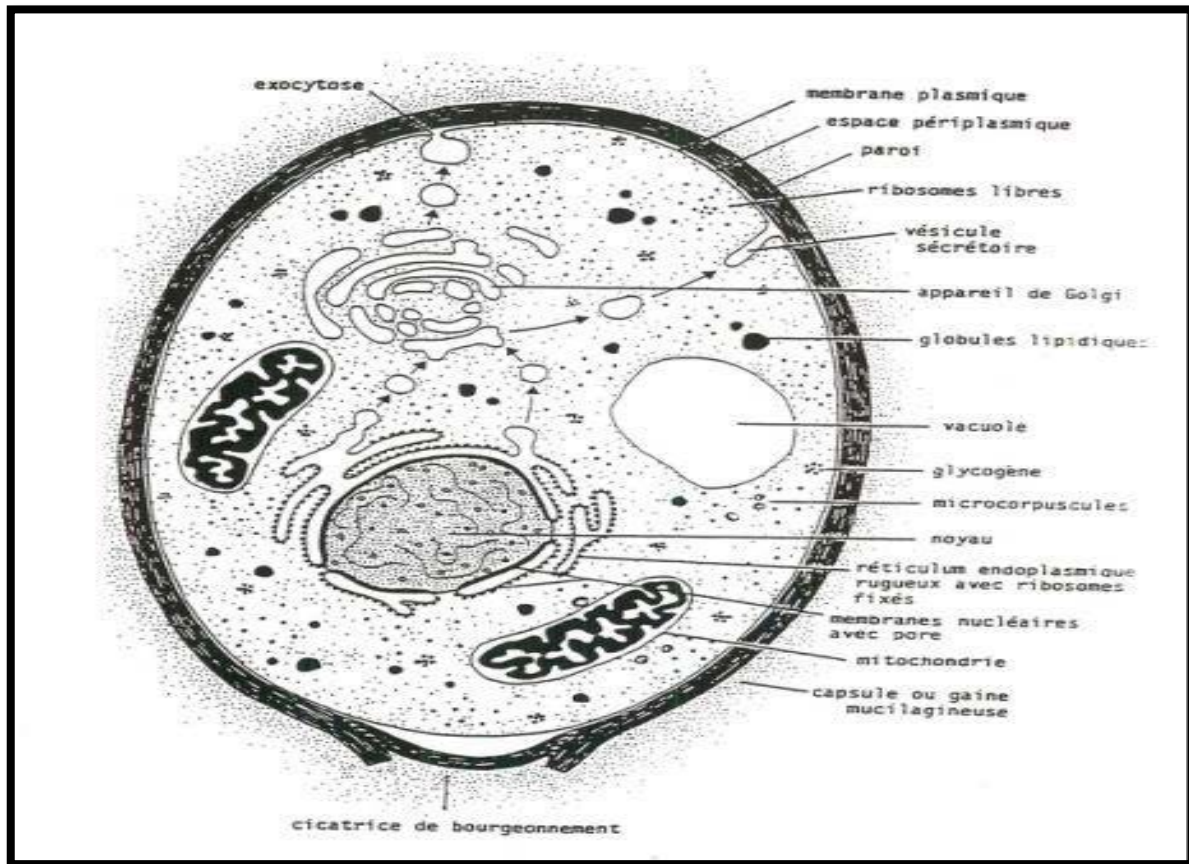
#### 1.2. Morphologie

Les cellules sont généralement ovoïdes. La forme levure est le plus simple des appareils végétatifs. Il se présente sous forme de cellule unique libres indépendantes ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique, à savoir : sphérique, ovoïde, cylindrique, apicule, en bouteille, pyramidale. Sous cette forme unicellulaire les dimensions sont de 2,5 à 10,5µm de large et de 4,5 à 21µm de long. Les dimensions et aspects dépendent fréquemment des conditions de culture et de l'âge des cellules (**Larpent, 1991**). Certaines peuvent formées des associations cellulaires ou se présenter sous forme filamenteuse à certains stades de leur vie (**Bouix et Leveau, 1991**).

#### 1.3. Cytologie

Les levures se différencient nettement des bactéries par leur structure cellulaire eucaryote (**Figure№ 02**) ; le cytoplasme des cellules de levure contient les organites

habituels des organismes végétaux supérieurs non photosynthétiques. La cellule est protégée par une paroi rigide (**Bouix et Leveau, 1991**).



**Figure N° 02** : Représentation idéalisée d'une cellule de levure (**Thuriaux, 2004**).

### 1.3.1. La paroi cellulaire

D'une épaisseur de 150 à 230 nm, la paroi englobe toute la cellule. Par sa rigidité elle confère à la levure une forme caractéristique (**Bourgeois et Larpent, 1996**) ; c'est un exosquelette qui représente 15 à 20% de la masse cellulaire (**Larpent, 1991**). Elle est également le siège de molécules déterminant certaines interactions cellulaires comme le facteur killer. Nombreuses enzymes, généralement des hydrolases, sont associées à la paroi ou logées dans l'espace périplasmique. Elle est formée de deux constituants principaux : les  $\beta$  glucanes et les monoprotéines en plus la chitine (**Ribéreau-Gayon et al., 1998**).

### 1.3.2. La membrane plasmique (ou le plasmalemma)

Sous la paroi, se trouve une membrane simple et fragile qui retient l'ensemble des composants intracellulaires. Elle résiste à pH acide mais elle est altérée par les pH alcalins. Elle est constituée d'une double couche lipidique (les phospholipides et stéroïdes ou « l'ergostérol »). Dans cette double couche sont localisées des protéines (intrinsèque et extrinsèque) de nature glycoprotéines (**Larpent, 1991**). C'est une barrière hydrophobe (grâce à ses phospholipides et stéroïdes) hautement sélective contrôlant les échanges entre la cellule vivante et son milieu extérieur (**Ribéreau - Gayon et al., 1998**).

### 1.3.3. Le cytoplasme et ses organites

#### 1.3.3.1. Le cytosol

Une solution tamponnée à pH 5 à 6 contenant des enzymes solubles, du glycogène et des ribosomes (**Ribéreau -Gayon et al., 1998**).

#### 1.3.3.2. Le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi et les vacuoles

Le RE est un système de double membrane quadrillant le cytoplasme, il est relié à la membrane cytoplasmique et à la membrane nucléaire dont il est en quelque sorte une extension. Quoique moins développé chez la levure que chez les cellules exocrines des eucaryotes supérieurs. L'appareil de Golgi ; sorte d'empilement de sacs membranaires et de vésicules associées ; c'est un prolongement du RE (**Ribéreau - Gayon et al., 1998**). Le nombre de vacuoles et leur taille en fonction de l'âge des cellules. Peu de temps avant la naissance d'un nouveau bourgeon, une grande vacuole se fragmente en de multiples (**Larpent, 1991**). Elle est un lieu de stockage de certaines hydrolases et de métabolites en attente d'utilisation (**Ribéreau -Gayon et al., 1998**).

#### 1.3.3.3. Les mitochondries

Lorsque les levures se développent en aérobiose, elles possèdent de 30 à 50 mitochondries bien développées dans lesquelles la membrane interne forme de

nombreux replis en crêtes. En anaérobiose, ces organismes dégènèrent, leur surface interne décroît, les crêtes disparaissent (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997**).

### 1.3.4. Le noyau

Sphérique de 1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre. L'enveloppe nucléaire, formée d'une double membrane reliée au RE, comporte de nombreux pores, permettant les échanges des petites protéines entre le noyau et le cytoplasme (**Ribéreau -Gayon et al., 1998**). Il existe dans le noyau des chromosomes linéaires (varie entre 3 à 16 chromosomes selon les espèces), et des petites molécules d'ADN circulaire (50 à 100 copies), les plasmides 2 $\mu\text{m}$  (6000 pb) (**Bourgeois et Leveau, 1991 ; Ribéreau -Gayon et al., 1998**).

## 1.4. Reproduction

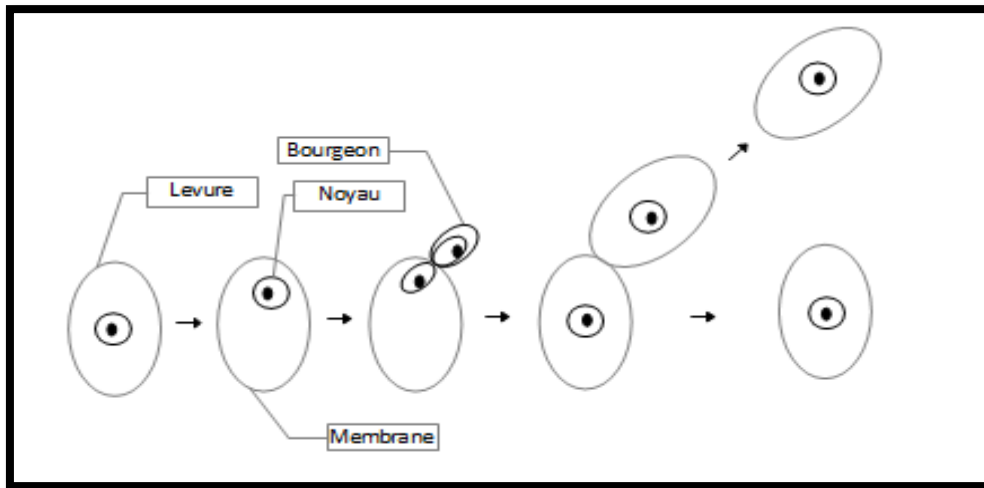
On appelle levures Sporogènes celles qui se reproduisent soit de façon sexuée, soit de façon asexuée, suivant les conditions de milieu, et levures Asporogènes, celles se reproduisent uniquement de façon asexuée (**Pierre, 2004**).

### 1.4.1. Reproduction asexuée

Suivant l'espèce de la levure, cette multiplication végétative se réalise par bourgeonnement ou par scission.

#### 1.4.1.1. Reproduction asexuée par bourgeonnement

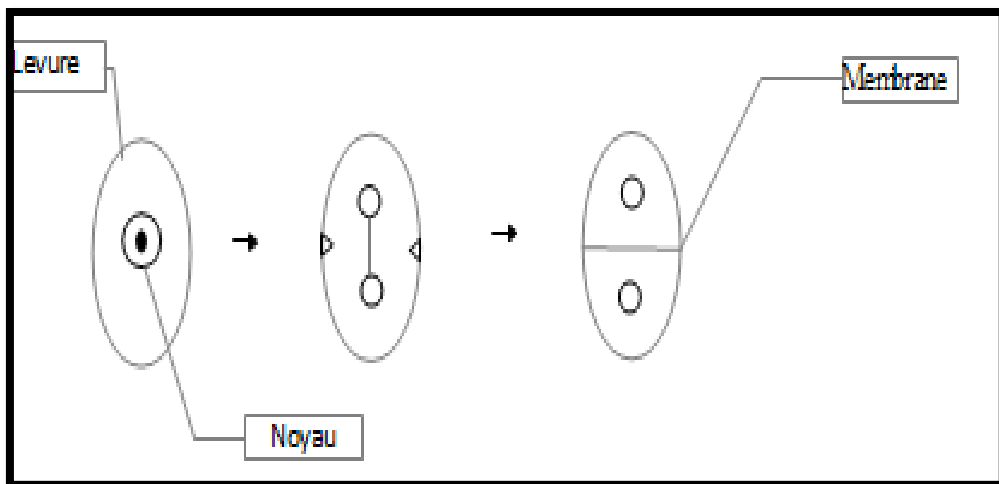
Le noyau de la cellule se déplace vers la paroi, s'étire et se divise en donnant naissance à un petit bourgeon à la surface de la cellule. Celui-ci croît rapidement pour donner naissance à une cellule fille qui peut ou non se détacher de la cellule mère et bourgeonner à son tour. C'est le mode de reproduction de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figure N° 03 :** Schéma de la reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure (Thuriaux, 2004).

#### 1.4.1.2. Reproduction asexuée, par scission-Scissiparité

Le noyau s'étire et se casse en deux. Pendant ce temps, une séparation s'amorce au niveau de la paroi, ce qui conduit à la formation de deux cellules. Les levures du genre *Schizosaccharomyces* se reproduisent ainsi.



**Figure N° 04 :** Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure (Thuriaux, 2004).

### 1.4.2. Reproduction sexuée

Lorsque les conditions de milieu deviennent défavorables (température extrêmes, absence d'éléments nutritifs ...), la levure cesse de se multiplier. Elle produit alors des ascospores. Le noyau subit deux divisions successives, chacun des noyaux fils s'entoure de cytoplasme et la levure mère devient un asque. Elle renferme 2 à 4 ascospores qui sont à l'état de vie ralentie et qui ne reprendront leur vie active que lorsque les conditions de milieu seront favorables. Les ascospores représentent le mode de survie durant la mauvaise saison.

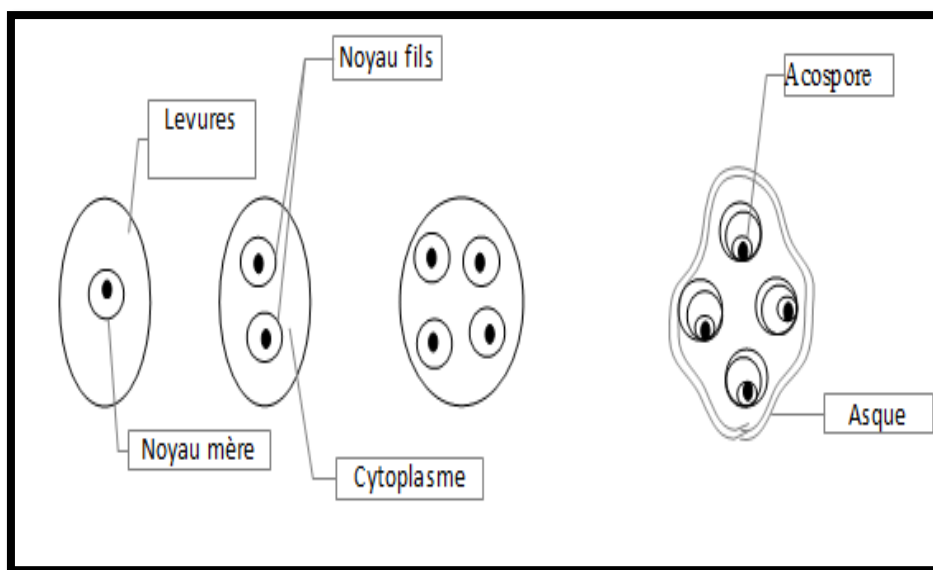


Figure N° 05 : Schéma de la reproduction sexuée d'une levure (Thuriaux, 2004)

## 2. Différenciation des levures

Les levures sont rattachées aux champignons Ascomycètes, Basidiomycètes et aux champignons imparfaits : les Deutéromycètes. Elles sont réparties en 81 genres auxquels sont rattachées 590 espèces. Longtemps, seuls des caractères botaniques, morphologiques et biochimiques ont permis les différencier et les classer. Cependant, l'isolement et la culture de micro-organismes font appel à des techniques de laboratoire pouvant entraîner des modifications de comportement des espèces, notamment l'aptitude à sporuler. Aujourd'hui, les méthodes d'investigation de la

structure moléculaire sont des moyens précis d'identification des êtres vivants (**Ribereau-Gayon *et al.*, 1998**).

### 2.1. Caractères botaniques

Ils permettent de distinguer :

-Les levures sporogènes, qui rassemblent de nombreux genres : *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* ...

-Les levures asporogènes, qui rassemblent les genres *Rhodotorula*, *Kloeckra*, *Candida*, *Brettanomyces* ... (**Ribereau-Gayon *et al.*, 1998**).

### 2.2. Caractères morphologiques

Ils permettent de différencier les levures d'après :

-La cellule par sa forme et ses dimensions ; certaines sont apiculées c'est-à-dire en forme de citron (*Kloeckera apiculata*), d'autres ovoïdes (*Saccharomyces cerevisiae*), d'autres rondes ou bien allongées.

-Le groupe de cellules ; les unes forment des voiles (muqueux, en anneau) ; d'autres donnent des dépôts (**Ribereau-Gayon *et al.*, 1998**).

### 2.3. Caractères biochimiques

Ils permettent de diagnostiquer les espèces de levures par des tests physiologiques menés en laboratoire, en déterminant notamment :

-Les sucres qu'elles peuvent fermenter : glucose, fructose pour les unes, galactose pour les autres.

-Leur rendement en éthanol ; ainsi pour produire 1% volumique, il faut 21 à 22 g de sucre à l'espèce *Kloeckera apiculata* et seulement 16 à 18g à *Saccharomyces cerevisiae*.

-Leur pouvoir alcoogène, c'est-à-dire le TAV maximum pouvant être obtenu avec la levure considérée. L'activité fermentaire de *Kloeckera apiculata* cesse que le moût

atteint 5% d'éthanol ; en revanche *Saccharomyces cerevisiae* peut faire fermenter un milieu jusqu'à qu'il contienne 17% d'éthanol et plus.

### 2.4. Caractères moléculaires

La comparaison et l'estimation de similitudes de génomes rendue possible par l'hybridation et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur l'ADN permettent d'identifier et de classer les êtres vivants, même si leurs résultats prennent parfois en défauts les classifications préexistantes (**Maftah et Julien, 1999**).

### 3. Classification des levures

La classification des levures est naturellement une partie intégrante de celle des champignons. Elle est basée au moins au départ sur des caractères morphologiques mais fait intervenir de nombreux caractères biochimiques (**Guiraud, 2003**). La classification de référence est actuellement celle de Kreger-Van (1984) qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente de Lodder (1971). En particulier, de nouveaux critères taxonomiques comme la composition en bases de l'ADN, la structure de la paroi, le type de coenzyme Q sont pris en compte pour permettre des études plus rigoureuses. La classification actuelle répertorie 60 genres et 500 espèces (**Bouix et Leveau, 1991**).

**3.1. Les ascomycètes :** se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose.

**3.2. Les basidiomycètes :** réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.

**3.3. Les deutéromycètes :** regroupent l'ensemble des levures ne présentent pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative.

## **4. Physiologie et croissance des levures**

### **4.1. Les besoins nutritifs**

Pour se maintenir, croître et se reproduire, la levure doit trouver dans un milieu externe les éléments nécessaires à la synthèse cellulaire et des conditions physicochimiques favorables.

#### **4.1.1. L'alimentation carbonée**

En somme un taux de sucre élevé gêne la croissance levurienne et diminue la population maximale ; en conséquence, la fermentation est ralentie (**Ribéreau-Gayon et al., 1998**). Les sucres carbonés sont d'une grande importance pour la biosynthèse des constituants cellulaires variés (les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques), leur oxydation fournit l'énergie à la cellule (**Larpent, 1991**). Certaines levures peuvent utiliser une large gamme de substrats carbonés, mais d'autres assimilent seulement un petit nombre de composés (**Bourgeois et Leveau, 1991**). Les sources les plus efficaces sont des oses (glucose, fructose et mannose) qui sont utilisables par plus de 400 espèces identifiées (**Pol, 1996**).

**Tableau N° 01** : Les sources de carbone pouvant être utilisées par les levures (modifié de : **Walker et White, 2005**).

<b>Sources de carbone</b>	<b>Exemples</b>
<b>Hexoses</b>	D-glucose, D-galactose, D-fructose, D-mannose
<b>Disaccharides</b>	maltose, saccharose, lactose, tréhalose, mélibiose, cellobiose, mélézitose
<b>Trisaccharides</b>	raffinose, maltotriose
<b>Polysaccharides</b>	inuline, cellulose, hemicellulose, chitine
<b>Oligosaccharides</b>	maltotetraose, maltodextrines
<b>Pentoses</b>	L-arabinose, D-xylose, D-xylulose, L-rhamnose
<b>Alcools</b>	méthanol, éthanol, glycérol
<b>Acides organiques</b>	acétate, citrate, lactate, malate, pyruvate, succinate

### 4.1.2. L'alimentation azotée

La synthèse des composés azotés structuraux et fonctionnels de la cellule, dépend de l'assimilation des formes oxydées ou réduites car les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre. Par ailleurs, l'assimilation des ions d'ammoniums est largement répandue chez ces dernières. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés comme source d'azote (les acides aminés, l'urée, la biotine et les bases puriques et pyrimidiques (**Bouix et Leveau, 1991**). Tandis que le moût de raisin est relativement riche en constituants azotés (0,1 à 1g/L d'azote soluble), même s'ils ne représentent qu'environ le quart de l'azote total de la baie ; ils comprennent le cation d'ammonium (3 à 10% de l'azote total), des acides aminés (25 à 30%), des polypeptides (25 à 40%), et des protéines (5 à 10%).

### 4.1.3. Oligoéléments et facteurs de croissance

Les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (**Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992**). Ils agissent en complément des protéines comme activateurs ou stabilisateurs d'enzymes et peuvent stimuler la croissance. Parmi les métaux alcalins indispensables :  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  (**Pommier, 2003**). Les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique) aussi agissent à faible concentration, sur la multiplication et l'activité cellulaire (comme facteurs de croissance).

## 4.2. Les conditions physicochimiques de croissance

### 4.2.1. L'oxygène

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes. Certaines levures sont aérobies strictes comme les *Rhodotorula*. Les autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire (comme les *Saccharomyces*) soit respiratoire (comme les *Candida*, les *Kluyveromyces* ...) (**Bouix et Leveau, 1991**).

### 4.2.2. La température

La température courante de culture des levures ne situe entre 25 et 30°C, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures. En effet, on trouve des levures psychrophiles, mésophiles et thermophiles (50°C pour *Candida slooffii*, *Saccharomyces telluris*) (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

### 4.2.3. Le pH

Les levures ont tendance à coloniser des environnements acides (leurs enveloppes cellulaires sont imperméables aux ions  $H_3O^+$  et  $OH^-$  et par leurs métaboliques acidifiant encore plus le milieu. Elles donc tolèrent des gammes de pH de 2,4 à 8,6 (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

### 4.2.4. La pression osmotique et l'activité d'eau

La plupart des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Généralement, les levures résistent mieux que les bactéries à la pression osmotique, en accumulant des polyols comme osmoprotecteurs (betaine, glycérol). Par conséquent, certaines espèces sont osmophiles mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérants (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

## 4.3. Le métabolisme

Les levures présentent une diversité métabolique dans la façon de production et de consommation de l'énergie à partir de substrats dégradés. Toutes les levures sont capables de dégrader le glucose, le fructose et le mannose en présence d'oxygène, par un métabolisme oxydatif conduisant à la formation de  $CO_2$  et  $H_2O$  (**Pol, 1996**). La voie de dégradation des glucides étant la glycolyse qui convertit les sucres en pyruvate. En se référant au catabolisme du pyruvate formé à partir du glucose, on peut distinguer deux types de métabolisme (**Larpent, 1991**).

### 4.3.1. Métabolisme oxydatif

Les levures utilisant les sucres simples en présence d'oxygène, par conséquent, leurs métabolismes est exclusivement respiratoire et le pyruvate est oxydé par le cycle de Krebs. Au cours du métabolisme oxydatif, une partie du glucose métabolisé génère des intermédiaires pour l'élaboration de nouvelles cellules, en consommant l'énergie fournit par la chaîne respiratoire. En plus des sucres simples, certaines levures utilisent d'autres glucides (mono, di ou tri saccharides et des polysaccharides comme l'amidon), mais aussi des alcools, des acides et des alcanes (**Marlène, 2006**).

### 4.3.2. Métabolisme fermentaire

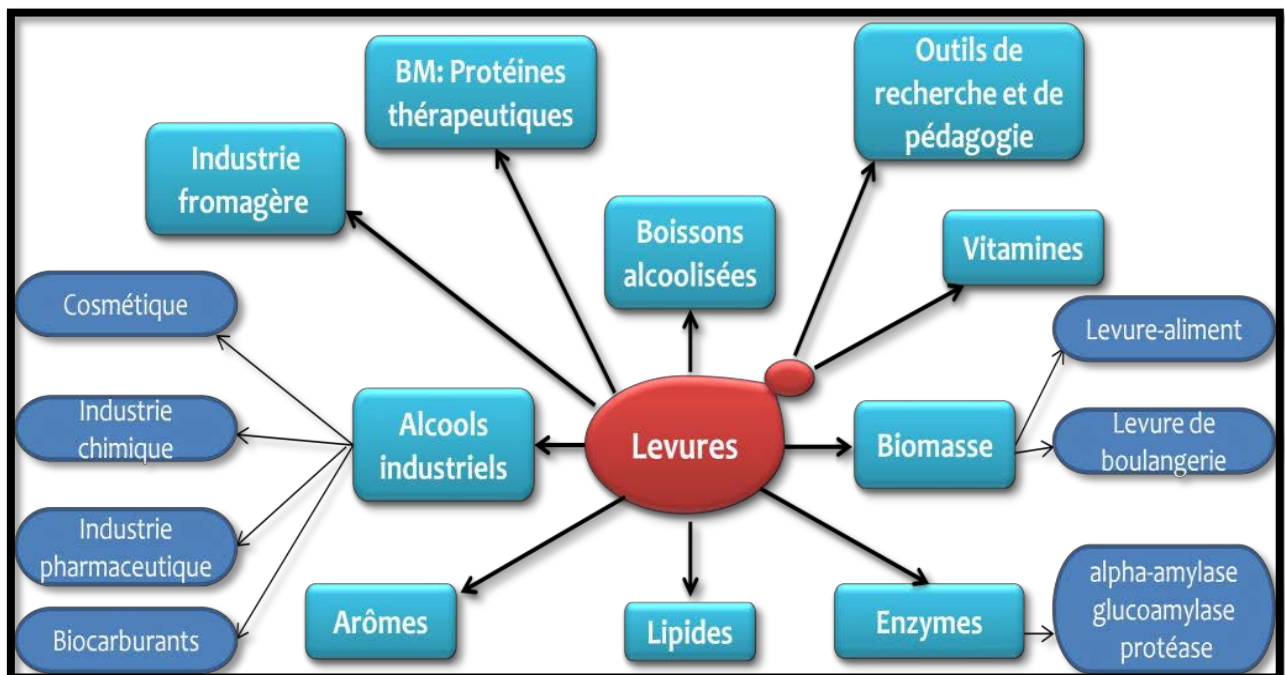
En plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO<sub>2</sub>. En plus de ces composés majoritaires, des alcools, des aldéhydes, des esters, des acides sont formés en petites quantités. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif (**Guiraud et Rose, 2004**).

## 5. Levure : Modèle génétique universel

Les levures et en particulier *S.cerevisiae*, sont probablement les organismes eucaryotiques dont la biologie cellulaire est la mieux étudiée (c'est-à-dire que l'on anticipe qu'une partie au moins des systèmes cellulaires fonctionnent de façon similaire chez la levure et chez l'homme et par extension chez tous les eucaryotes). Ceci tient à leur importance industrielle, mais aussi à la simplicité de leur organisation unicellulaire et à leur croissance rapide dans les conditions contrôlées du laboratoire, qui en font un modèle expérimental particulièrement commode (**Larpen, 1991**). Ceci est vrai dans une certaine mesure et de nombreux processus biologiques mis en évidence ou étudiés chez la levure se sont révélés en partie conservés chez les mammifères bien qu'avec des niveaux de complexité plus élevés que le trafic intracellulaire, la transmission des signaux extracellulaires, la voie sécrétoire ... (**Thuriaux, 2004**).

## 6. Levures en biotechnologie

Par métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie) et dans la production des métabolites mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles et industriels. Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêt médical (ex : production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B). La facilité d'approvisionnement, de conservation et de mise en culture de ces microorganismes ainsi que la variété des espèces et des souches disponibles sont des atouts majeurs pour les enseignants et font intervenir les levures dans le domaine de la pédagogie. C'est un organisme modèle, peu encombrant, peu exigeant et peu coûteux. **La figure N° 06** résume les principales utilisations de la levure qui représente le microorganisme le plus exploité par l'homme.



**Figure N° 06:** Schéma des différents domaines d'utilisation des levures (Bourat, 1992).

### 6.1. Boissons alcoolisées

Le rôle, le plus ancien des levures est la fabrication de boissons alcoolisées. Cette fabrication repose sur la fermentation alcoolique, qui consiste à transformer les sucres simples en alcool. Ainsi, elles interviennent au cours de la vinification et de l'élaboration de la bière. L'espèce la plus utilisée par l'homme est *Saccharomyces cerevisiae*, appelée aussi levure de bière pour son innocuité (**Bouix et Leveau, 1999**).

### 6.2. Panification

Une autre utilisation, connue depuis l'antiquité, est la fabrication du pain : Le dégagement de gaz carbonique, qui accompagne la fermentation, permet de faire lever la pâte en lui conférant une texture légère. On utilise également *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie) (**COFALEC, 2006**).

### 6.3. Affinage des fromages

Les levures sont aussi capables d'utiliser les acides organiques comme source d'énergie et de carbone (**Larpent, 1991**). Elles participent à l'affinage des fromages ; en consommant l'acide lactique produit par les bactéries lactiques à partir des composants du lait. Elles contribuent aussi à réduire l'acidité du caillé (**Bouix et Leveau, 1999**). De nombreuses espèces se rencontrent en fromagerie, les plus fréquentes appartenant aux genres : *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* et *Rhodotorula* (**Larpent, 1991**).

### 6.4. Production d'alcools industriels

Depuis quelques temps, une nouvelle utilisation des levures est apparue. Les levures, essentiellement des souches du genre *Saccharomyces*, grâce à leur haute capacité fermentaire, peuvent assurer la bioconversion de nombreux substrats saccharosés (jus de betteraves, sirop, mélasse de sucrerie) en bioéthanol (**Bouix et Leveau, 1991**).

### 6.5. Autres utilisations

Aujourd’hui, les levures constituent une des importantes sources d’enzymes produites commercialement en raison de leurs capacités polyvalentes et de la frugalité de leurs exigences permettant d’obtenir une biomasse importante à bas prix (Pol, 1996). En effet, l’invertase ou saccharase sécrétée par diverses levures est utilisée industriellement pour produire du glucose et du fructose à partir de mélasses de betterave ou de cannes à sucre (tableau N° 02) (COFALEC, 2006).

**Tableau N° 02 :** Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes (COFALEC, 2006).

Type d’enzymes	Levures utilisées	Utilisations
<b>Amylases</b>	<i>Lipomyces starkey</i> <i>Schwanniomyces castellii</i>	Saccharification de l’amidon  Boulangerie  Textile, Papeterie
<b>Invertases</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Confiserie
<b>Lipases</b>	<i>Candida lipolytica</i>	Fromagerie, Laiterie

### 6.6. Avantage des levures en industrie

Par rapport aux bactéries, les levures présentent des éléments favorables quant à leur utilisation en biotechnologie. Elles offrent donc une meilleure résistance que les bactéries à ces conditions de stress, en particulier la possibilité à des pH acides. En plus, l’état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles à ces eucaryotes permettent de les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des micro-organismes procaryotes. Comme l’écrit James D. Watson, ce sont les « *Escherichia coli* » des eucaryotes (Pol, 1996). Elles produisent des protéines glycolyses qui vont servir à des fins industriels et

pharmaceutiques : insuline par *Saccharomyces cerevisiae* (Mercier, 1997) et le vaccin de l'hépatite B (Blin, 2002). Leur utilisation dans l'alimentation a fait de sorte que les levures soient globalement plus connues pour leur efficacité en fermentation industrielle que d'autres micro-organismes. Elles ne sont pas attaquées par des virus (phages), elles sont facilement récupérables grâce à leur grosseur. La stabilité génétique des levures permet aussi une très bonne fidélité du procédé et la connaissance de leur physiologie cellulaire facilite leur utilisation (Labrecque, 2003).

### III- Techniques d'identification des levures

#### 1. Isolement des levures

Avant d'identifier un champignon-levure, il faut d'abord l'isoler de son substrat dans son milieu naturel et l'obtenir en culture pure (Cahagnier, 1998). Les levures sont parmi les micro-organismes les plus faciles à isoler et à cultiver comme le montrent la diversité de leurs applications agro-alimentaires (Pol, 1996). L'isolement des levures, en vue de leur identification ou de leur numération, demande l'emploi de milieux sélectifs dotés de propriétés antibactériennes et si possible antimoisissures (Guiraud *et al.*, 1998). Les milieux de culture favorables aux levures sont des milieux à base d'extrait de levures ou de malt, en combinaison avec le glucose (YM, YPG ou YG) et aussi le milieu de Sabouraud (Guiraud et Rose., 2004).

#### 2. Méthodes classiques d'identification des levures

Les levures sont identifiées par une description standard. Celle-ci fait appel à des caractères cultureux, morphologiques et physiologiques ainsi que la description du cycle de reproduction sexuée.

##### 2.1. Etude des caractères cultureux

La culture en tube de milieu liquide permet de déterminer la zone de culture (surface ou profondeur), son aspect général et en particulier celui de la culture en

surface. La culture en tube gélosé incliné ou en boîte de pétri permet de définir l'aspect et la forme de la culture, sa croissance et sa couleur. L'examen des colonies peut être effectué à l'œil ou à l'aide d'une loupe binoculaire ou d'une loupe compte-fils (Regnault, 1990).

### 2.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires

Cette observation a pour but la détermination du mode de reproduction végétative, l'examen de la forme des cellules isolées, ainsi que la mise en évidence d'une éventuelle organisation particulière des cellules (mycélium ou pseudo mycélium), et la formation éventuelle de « spores » asexuées (chlamydospores, ballistospores, arthrospores). L'étude microscopique permet de définir la forme, l'arrangement et le mode de division des cellules, ainsi de mesurer leur taille en utilisant un oculaire micrométrique étalonné. Les cellules de levures peuvent varier de manière importante entre souches d'une même espèce (Regnault, 1990).

**2.2.1. Aptitude à la filamentation :** Certaines espèces peuvent former des filaments de type mycélium (mycélium ou pseudo-mycélium).

**-Le pseudo-mycélium** constitué par élongation de cellules formées par bourgeonnements successifs et restant attachées les unes aux autres.

**-Le mycélium** formé par scissiparité et croît par élongation continue de l'extrémité du filament, puis formation d'un septum très réfringent, sans rétrécissement du diamètre du filament entre les cellules.

### 2.2.2. Morphologies particulières

**-Chlamydospores :** sont des cellules rondes à paroi épaisse et réfringente, caractéristiques de quelques espèces (*Candida albicans*) (Larpen, 1991).

**-Arthrospores :** sont des cellules isolées produites par la désarticulation de mycélium vrai.

**-Blastospores :** c'est une spore produite par bourgeonnement sur mycélium ou pseudo-mycélium.

**-Ascospores :** ce caractère permet de classer la souche étudiée dans une espèce « parfaite » plutôt que dans sa forme parfaite. La forme des asques et des ascospores ainsi le nombre de ces derniers, apportent des éléments caractéristiques de levures (**Larpen, 1991**).

### **2.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques**

L'identification est basée essentiellement sur l'aptitude à l'assimilation et la fermentation des substrats carbonés et azotés.

**2.3.1. Utilisation des substrats carbonés :** Les levures utilisent les substrats carbonés par la voie oxydative ou fermentaire. Toutes les espèces possèdent la voie oxydative et toutes utilisent le glucose.

**2.3.1.1. Aptitude à la fermentation :** La fermentation de certains carbohydrates est recherchée par inoculation de la souche, dans un milieu liquide contenant du carbohydrate à tester et un indicateur coloré (**Regnault, 1990**).

**2.3.1.2. Assimilation des substrats carbonés :** elle est recherchée par culture dans un milieu comprenant le composé à tester comme seule source de carbone. L'incubation est réalisée en aérobiose et l'assimilation est mise en évidence par la croissance de la souche.

**2.3.2. Utilisation des sources d'azote :** Les levures assimilent généralement l'ammonium, souvent les peptones, les acides aminés et parfois l'urée, les nitrates et les nitrites (**Larpen, 1991**).

Certains substrats azotés (essentiellement nitrate, nitrite, éthylamine et acide aminé) qui ne sont utilisés que par certaines espèces sont employés pour leur identification.

### **3. Identification moléculaire**

L'apparition de la biologie moléculaire a permis de comprendre que les méthodes d'identification des micro-organismes fondées sur les phénotypes des différents individus n'étaient pas toujours fiables, car les résultats pouvaient varier dans le temps. Plusieurs techniques ont donc été développées pour discriminer et/ou

identifier les microorganismes par l'analyse de l'ADN ou d'une partie de celui-ci (Turner, 2000).

### 3.1. Le mécanisme moléculaire chez les eucaryotes

#### 3.1.1. La réplication d'ADN *in vivo*

La réplication d'ADN se produit dans chaque cellule lors de la présentation pour la mitose ou la méiose plus précisément, la réplication s'effectue dans la phase S de l'interphase du cycle cellulaire ou le bagage génétique est dupliqué dans la cellule mère avant la division cellulaire pour assurer la transmission de celui-ci à chaque cellule fille (Luc, 2005). Ce mécanisme renferme trois phases, l'initiation, l'élongation et la terminaison en présence de plusieurs complexes enzymatiques indispensables tel que la gyrase, l'hélicase qui favorisent le déroulement de double brin d'ADN, et l'ADN polymérase qui est responsable de l'élongation d'ADN (Etienne *et al.*, 2006).

#### 3.1.2. La réplication d'ADN *in vitro* « la PCR »

La PCR est une technique dont le but est de copier "*in vitro*" de façon exponentielle un fragment de l'ADN cible. Son principal objectif est alors de faire un grand nombre de copies d'un fragment cible ou d'un gène cible pour avoir assez de l'ADN matrice pour des études ultérieures de RFLP, d'AFLP, d'hybridation, de séquençage.... (Thiao, 2005). Cette technique consiste à hybrider un ADN dénaturé à deux amorces nucléotidiques, qui permettent la copie du brin qu'elles encadrent, à l'aide d'une ADN polymérase thermorésistante. Chaque couple d'amorces est composé d'un oligomère de 12 à 25 nucléotides, complémentaire de l'extrémité 3' du monobrin de l'ADN à amplifier et d'un 20 autre oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 3' du brin antiparallèle. La polymérisation est réalisée en présence de désoxynucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) et de l'ADN polymérase (Taq) isolé de *Thermus aquaticus*. Les réactions de PCR sont réalisées avec un thermocycleur, en utilisant des programmes différents en fonction du couple d'amorces choisi et la répétition de trois étapes (dénaturation, hybridation et polymérisation) aboutissant à une amplification exponentielle de la séquence cible (Bouluis *et al.*, 2001).

### 3.2. Méthode de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN (ADN matriciel), la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon (**Roland, 2008**). Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur (appareil qui comporte une enceinte où l'on dépose les tubes échantillons et dans laquelle la température peut varier, très rapidement et précisément, de 0 à 100°C ). L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend de la durée de quelques dizaines de secondes.

#### 3.2.1. La dénaturation : 94°C

Elle consiste en une séparation des deux brins de l'ADN matrice en deux fragments simples brins. Elle est réalisée grâce à une élévation de la température, en général à 94°C pendant un temps variable. Cette élévation de température rompt les liaisons hydrogène entre les bases libérant ainsi les deux brins (**Thiao, 2005**).

#### 3.2.2. L'hybridation : 40-70°C

Cette étape consiste en la fixation des amorces sur l'ADN matrice simple brin. Elle se réalise suite à une baisse de la température jusqu'à environ de 55°C. La température d'hybridation varie en fonction du pourcentage de GC des amorces utilisées. Les amorces contenues dans le mélange réactionnel se fixent sur l'ADN matrice simple brin au niveau des zones qui leur sont complémentaires. Plus les amorces sont parfaitement complémentaires de leur site de fixation, plus elles sont stables et solidement fixées. C'est sur cette portion de l'ADN en double brin que la polymérase va pouvoir se fixer et débiter la synthèse du brin complémentaire au brin matrice (**Thiao, 2005**).

### 3.2.3. L'élongation : (extension ou polymérisation) 72°C

Le résultat de cette étape est la synthèse complète du brin de l'ADN complémentaire du brin matrice par la polymérase. Elle est réalisée à 72°C qui est la température idéale de fonctionnement de la polymérase. De plus, cette élévation de température rompt les hybridations non spécifiques d'amorce. La polymérase attachée à l'extrémité 3' de l'amorce ajoute des dNTPs sur cette extrémité réalisant ainsi la synthèse du nouveau brin. Après chaque cycle, le nombre de copies de départ est doublé (Thiao, 2005).

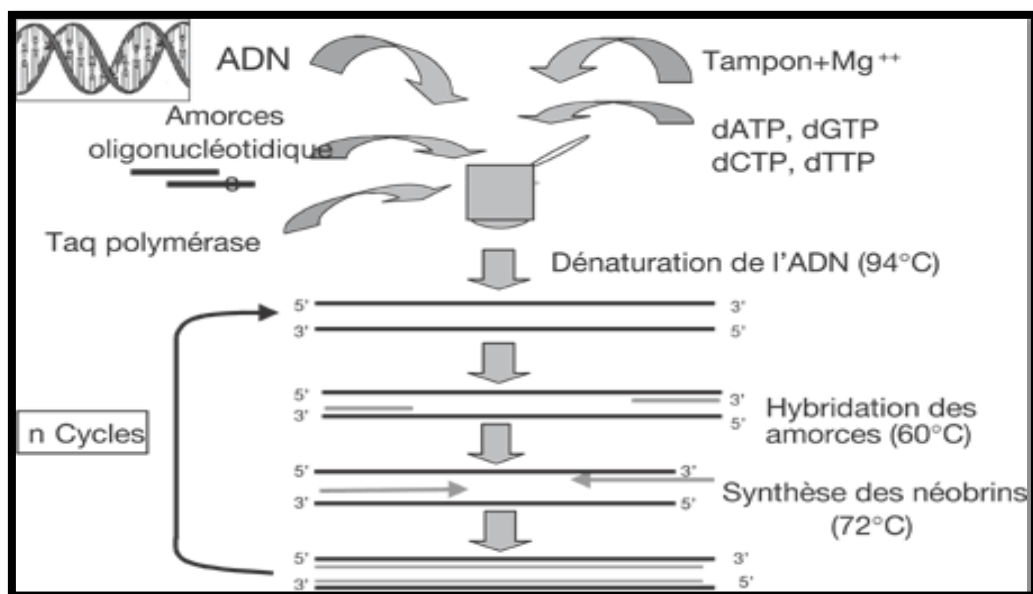


Figure N° 07: Le principe de la PCR (Claude *et al.*, 2007).

### 3.3. Visualisation de l'ADN par électrophorèse

Une fois les différentes étapes décrites plus haut réalisées, il faut visualiser le résultat de l'amplification ou du traitement réalisés sur les amplicons. Pour ce faire, différents types d'électrophorèses peuvent être réalisés, de la plus classique sur gel d'agarose à des processus complexes tels que des gels contenant des gradients d'agents dénaturants et alliant donc dans la même étape le traitement de l'ADN et sa visualisation. L'électrophorèse permet de séparer des particules en fonction de leur charge électrique et de leur taille. Les molécules d'ADN, chargées négativement, sont

attirées vers l'anode ou travers d'un réseau solide non mobile (généralement un gel en agarose ou polyacrylamide). Ce réseau permet de retenir les molécules en fonction de leur taille, les plus petites gagnant plus rapidement l'anode que les grandes. Plus le réseau est dense, mieux les molécules de petites tailles seront séparées (**Ausubel et al., 1989**).

### 3.4. Techniques moléculaires pour l'identification des levures

L'électrophorèse et la PCR sont les deux outils centraux de la génétique moléculaire (**Read, 2009**) car la PCR fournit alors, une estimation qualitative (nature des espèces) et quantitative (nombre d'espèces) de la diversité microbienne (**Renouf, 2006**) et afin d'être le discriminant possible, il est nécessaire de choisir des régions cibles d'ADN comportant des séquences conservées chez tous les levures d'intérêts pouvant être utilisées pour l'hybridation des amorces mis également des séquences variables spécifiques d'un genre, d'une espèce voir d'une souche (**Filofteia, 2010**).

#### 3.4.1. Identification de *Saccharomyces cerevisiae*

##### 3.4.1.1. PCR Delta

Il s'agit d'une technique basée sur l'amplification par PCR des régions du génome situées entre les éléments delta, portions d'ADN dispersées en nombre variable selon la souche de levure. Seul *Saccharomyces cerevisiae* possède ces éléments delta, aussi cette technique n'est appliquée qu'à cette espèce. Les séquences delta sont des éléments de 0,3 Kb (334 pb) qui flanquent les rétrotransposons Ty1 dans *S.cerevisiae*. Entre 35 et 55 copies de séquences delta ont été identifiées dans le génome de la levure, sous forme de rétrotransposons Ty1 ou d'éléments isolés. Cependant, ces séquences delta sont concentrées dans des régions génomiques unissant les gènes ARNt. Le nombre et la position de ces éléments connaissent une certaine variabilité intraspécifique que (**Ness et al., 1993**) ont utilisé pour mettre au point des amorces spécifiques :  $\delta 1$  et  $\delta 2$  utiles pour la différenciation des souches de *S.cerevisiae*. (**Legras et Karst, 2003**) ont optimisé cette technique en concevant deux nouvelles amorces :  $\delta 12$  et  $\delta 21$  situées près de  $\delta 1$  et  $\delta 2$ . L'utilisation de  $\delta 12$  et  $\delta 21$  ou  $\delta 1$  et  $\delta 2$

met en lumière un plus grand polymorphisme se traduisant par des bandes sur le gel d'électrophorèse (Castellucci, 2011).

### 3.4.2. Identification des levures au niveau de l'espèce

#### 3.4.2.1. PCR-ITS

Cette technique permet d'amplifier la région ITS d'ADN ribosomique, cette région largement décrite par différents travaux (White *et al.*, 1990 ; Bruns *et al.*, 1991) a été choisie comme région cible pour une identification des espèces fongiques. Plus précisément, la séquence ITS1-5,8S-ITS2 présente une région conservée chez la majorité des espèces fongiques et des régions variables qui permettent son utilisation pour des études de population. Les amorces **ITS1**(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et **ITS4** (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ont été utilisées pour cette étude.

**Tableau N° 03:** Liste des amorces utilisées et leurs caractéristiques.

Nom	Séquences	% G + C	T <sub>m</sub> (°C)	Loc	Référence
<b>ITS1</b>	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	63,0	55,7	18S	<b>White <i>et al.</i>,1990</b>
<b>ITS2</b>	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	45,0	55,7	5,8S	<b>White <i>et al.</i>,1990</b>
<b>ITS3</b>	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	55,0	55,7	5,8S	<b>White <i>et al.</i>,1990</b>
<b>ITS4</b>	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	50,0	49,6	28S	<b>White <i>et al.</i>,1990</b>

### 3.4.3. Identification des levures au niveau de la souche

#### 3.4.3.1. PCR-RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*)

La technique RFLP a été développée par Botstein et ses collaborateurs (**Botstein et al., 1980**). Elle repose sur l'amplification des régions spécifiques des unités de répétition de l'ADN (telles que les séquences internes transcrits, ITS1 et ITS2, et le gène imbriqué codant pour l'ARNr 5,8S ou le gène de l'ARNr 26S). Ces régions comportant des séquences fortement conservées et des séquences qui présentent un fort degré de variabilité génétique entre des souches d'espèces différentes. Dans la majorité des cas, les produits amplifiés par PCR issus des souches de la même espèce et du même genre ont des tailles moléculaires identifiées, et les espèces du même genre présentent des tailles similaires (**Polomska et al., 2007**). La différence de séquence est mise en évidence par l'analyse de restriction en utilisant plusieurs endonucléase de restriction qui coupent d'une manière définie et reproductible l'ADN double-brin à des endroits spécifiques (séquences nucléotides appelés sites de restrictions généralement 4 à 6 paires de bases) quel que soit son origine telles que Cfo I, Hae III, Hinf I, Dde I et Mbol I. Les profils de la restriction diffèrent suivant les espèces (**Castellucci, 2011**).

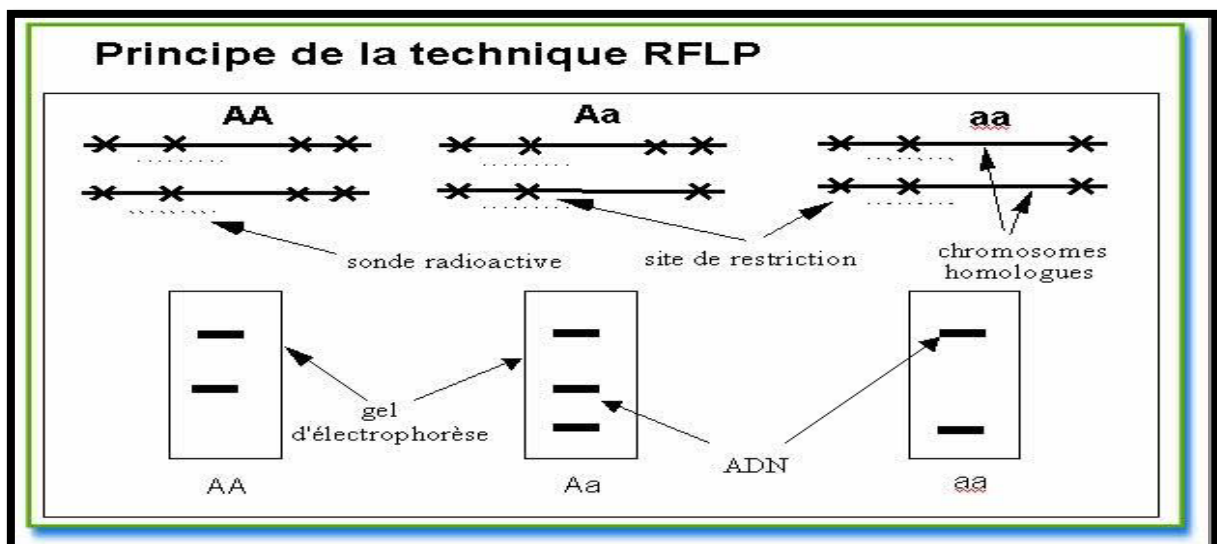


Figure N° 08: Principe général de la PCR-RFLP (Verscheure et al., 2002).

### 3.4.4. Les différentes méthodes d'identification des levures

Une liste non exhaustive des différentes techniques PCR est :

**3.4.4.1. La DAF-PCR** (DNA amplification fingerprinting) : cette technique utilise une unique et courte amorce (environ 5 paires de base) de séquence arbitraire, elle permet d'obtenir des spectres d'ADN de complexité variable constituant l'empreinte digitale génétique d'un spécimen donné.

**3.4.4.2. L'Inverse PCR** : elle permet l'amplification d'une séquence inconnue d'ADN lorsqu'elle encadre une région de séquence connue.

**3.4.4.3. La RAPD-PCR** (Random Amplified Polymorphie DNA-PCR) : elle utilise une paire d'amorces identiques d'environ 10 paires de bases choisies au hasard.

### 3.4.4.4. Microsatellite

## III- Données sur *Saccharomyces cerevisiae*

### 1. Définition

*Saccharomyces cerevisiae* vient du mot saccharose qui signifie «sucre», mycès « champignon », tandis que *cerevisiae* fait référence à «cervoise», c'est un terme scientifique, nom qu'on donnait autrefois à la bière, c'est un terme utilisé pour désigner le petit champignon microscopique qui compose les différentes sortes de levures qu'on utilise pour la fermentation. Elle est littéralement connue comme levure du sucre (**Larpent et Gourgoud, 1985**). La levure est utilisée depuis des siècles pour la transformation du sucre en alcool, pour l'élaboration de pain, de vin, de bière ... Elle a été découverte, isolée et identifiée au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle. Ce champignon (mycète d'où -mycès), capable de métaboliser des sucres (saccharo-) responsable de la fermentation fut appelé *Saccharomyces cerevisiae* par Meyen en 1837 (**Thuriaux, 2004**).

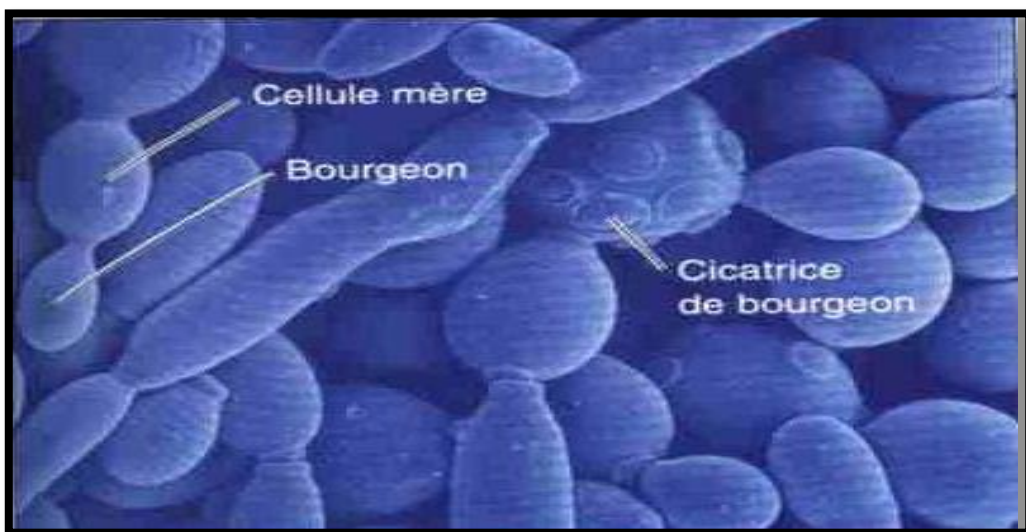
**2. Classification** La place de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans la classification des êtres vivants est brièvement rappelée au (**Tableau N° 04**).

**Tableau N° 04** : Classification de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (**Larpent, 1992**).

<b>Règne</b>	<i>Protistes-Eucaryotes</i>
<b>Classe</b>	<i>Ascomycètes</i>
<b>Sous-classe</b>	<i>Hemiascomycetes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Endomycetales</i>
<b>Famille</b>	<i>Saccharomycetaceae</i>
<b>Sous-famille</b>	<i>Saccharomycetoideae</i>
<b>Genre</b>	<i>Saccharomyces</i>
<b>Espèce</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

### 3. Morphologie

*S. cerevisiae* est une cellule sphérique, ovoïde, ou allongée de taille très variable (3-10  $\mu\text{m}$ , 4-14  $\mu\text{m}$ ). Certaines cellules sont cylindriques et de grandes tailles jusqu'à 20 $\mu\text{m}$  de longueur ou plus (**Goffeau et al., 1996**).



**Figure N° 09** : Micrographie de *S. cerevisiae* (**Tortora et Anagnostakos, 1987**).

## 4. Reproduction

C'est une espèce de levure de bourgeonnement, les principales étapes de bourgeonnement de la levure de *S. cerevisiae* sont représentés dans la (Figure N° 10). La souche *S. cerevisiae* capable de bourgeonner une trentaine de fois avant de mourir, et la paroi conserve toutes les cicatrices laissées par les cellules filles (Bourgeois *et al.*, 1998).

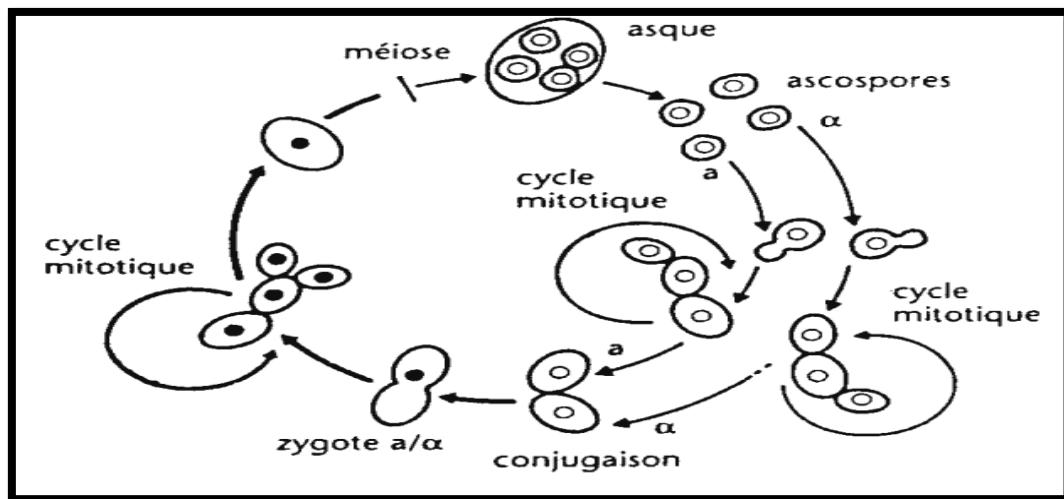


Figure N°10 : Cycle biologique de la levure *S. cerevisiae* (Bourgeois et Larpent, 1996).

## 5. Conditions de culture de la levure *S.cerevisiae*

La croissance d'un micro-organisme peut être considérée comme une série d'interaction entre les cellules et l'environnement (Bouix et Leveau, 1999).

### 5.1. Exigences culturelles

**5.1.1. Le pH:** *S. cerevisiae* présente l'avantage de croître sur un milieu acide, pour lequel la plupart des bactéries ne se développent pas. Elle préfère un pH compris entre 4- 4,5 (Larpent et Gourgoud, 1985).

**5.1.2. La température:** la température de croissance est variable suivant les espèces de levures. La température convenable pour la levure *S. cerevisiae* est entre 25°C et 35°C, ce sont des mésophiles (Larpent et Gourgoud, 1985).

**5.1.3. La pression osmotique:** la levure *S. cerevisiae* est une espèce osmophile qui développe sur des milieux à forte concentration en sucres et en sel mais avec un métabolisme lent au contraire de certaines espèces (**Larpen et Gourgoud, 1985**).

## **6. Besoins nutritionnels**

Le milieu de culture doit apporter tous les éléments nécessaires aux systèmes cellulaires et aux besoins énergétiques de la levure.

**6.1. L'eau:** représente 75% du poids total cellulaire. Elle doit être en grande quantité dans le milieu.

**6.2. Le carbone:** la souche *S. cerevisiae* utilise les glucides simples (hexoses) et des disaccharides mais elle est incapable d'utiliser les pentoses.

**6.3. L'azote:** toutes les levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ions d'ammonium, et l'urée pour constituer des protéines ; acide nucléique et des vitamines. (**Larpen, 1992**).

## **7. Principales applications de *S.cerevisiae***

Les levures représentent certainement le groupe le plus important de micro-organismes exploités par l'homme. Depuis la plus haute antiquité, elles ont joué un rôle de premier ordre dans l'alimentation humaine : vinification, panification, brasserie, fromagerie.

**Tableau № 05:** Les principales applications de *S. cerevisiae* (**Camonis, 1990**).

<b>Produits de <i>S.cerevisiae</i></b>	<b>Applications</b>
<b>Alcool et CO<sub>2</sub></b>	Fabrication du pain, du vin, de la bière
<b>Ethanol</b>	Solvant
<b>Glycérol</b>	Chimie des matières plastiques industrie pharmaceutique
<b>Protéines alimentaires (à partir des mélasses et divers déchets alimentaires)</b>	Alimentation de l'homme ou du bétail
<b>Invertase</b>	Confiserie

---

# MATERIEL ET METHODES

---

### 1. Présentation des régions de la récolte de raisin

Le prélèvement des raisins est réalisé dans les vignobles cultivés dans deux régions algériennes (la région El Maleh de la wilaya d'Ain Temouchent, et la région Abdelmalek Ramdan de la wilaya de Mostaganem), au mois de **Septembre 2014**. Les échantillons prélevés sont transportés directement au laboratoire de Microbiologie Alimentaire du département d'Agronomie de l'Université de Mostaganem. Des séries d'isolements et purifications sont réalisés par des repiquages successifs.

#### 1.1. La région El Maleh (Wilaya d'Ain Temouchent)

El Malah (anciennement Rio Salado) est une ville du nord ouest de l'Algérie (11 km d'Ain Temouchent, 58 km d'Oran, 60 km de Sidi Bel Abbès et 80 km de Tlemcen). Région autrefois viticole, elle garde toujours son aspect agricole (climat méditerranéen doux, pluviométrie supérieure à 450 mm par an, sol d'origine volcanique) et touristique (montagnes « Dhar El Menjel », « Aïcha touila », vallée de Oued El-Malah).



**Figure N° 11:** Vignobles de la plaine d'El Maleh (Wilaya d'Ain Temouchent).

### 1.2. La région Abdelmalek Ramdane (Wilaya de Mostaganem)

La commune Abdelmalek Ramdane est située au centre de la wilaya de Mostaganem, sur la côte méditerranéenne. Elle est caractérisée par un climat semi-aride sec et chaud. C'est une région viticole par excellence.



**Figure N° 12 :** Vignobles de la plaine d'Abdelmalek Ramdan (Wilaya de Mostaganem).

## 2. Sources de prélèvement des levures

Les grappes de raisin de chaque cépage (**Cépages Muscat noir, Cinsault et Carignan**) sont prélevées à partir de 10 parcelles différentes dans les vignobles des régions d'El Maleh et de Abdelmalek Ramdane.

Les cépages de raisin soumis à l'étude sont :

### 2.1. Cépage Muscat noir (la région El Maleh de la wilaya d'Ain Temouchent)

Le Muscat noir est un cépage de raisin de table, caractérisé par des belles grappes noires, de chair juteuse, la coloration des grains reste parfois claire. Ce cépage résiste assez bien à la sécheresse et se plaît dans les zones ensoleillées (**I.T.A.F, 2000**).

### 2.2. Cépage Cinsault (la région Abdelmalek Ramdan de la wilaya de Mostaganem)

Le Cinsault est un vieux raisin noir au jus blanc, ses grappes sont grandes, composées de grandes baies à la chair très juteuse. C'est un cépage tardif qui a besoin de soleil et résiste bien à la sécheresse, assez productif mais fragile face aux maladies. Il préfère les sols pauvres pour une production de qualité (I.T.A.F, 2000).

### 2.3. Cépage Carignan (la région Abdelmalek Ramdan de la wilaya de Mostaganem)

Le Carignan est un cépage qui constitue le fond de l'encépagement du vignoble de cuve. Régulièrement productif et peu exigeant, il convient peu dans les plaines sèches de l'ouest où la chaleur des étés ne lui permet pas de murir régulièrement, ses baies qui s'y développent mal et restent petites et sèches (I.T.A.F, 2000).

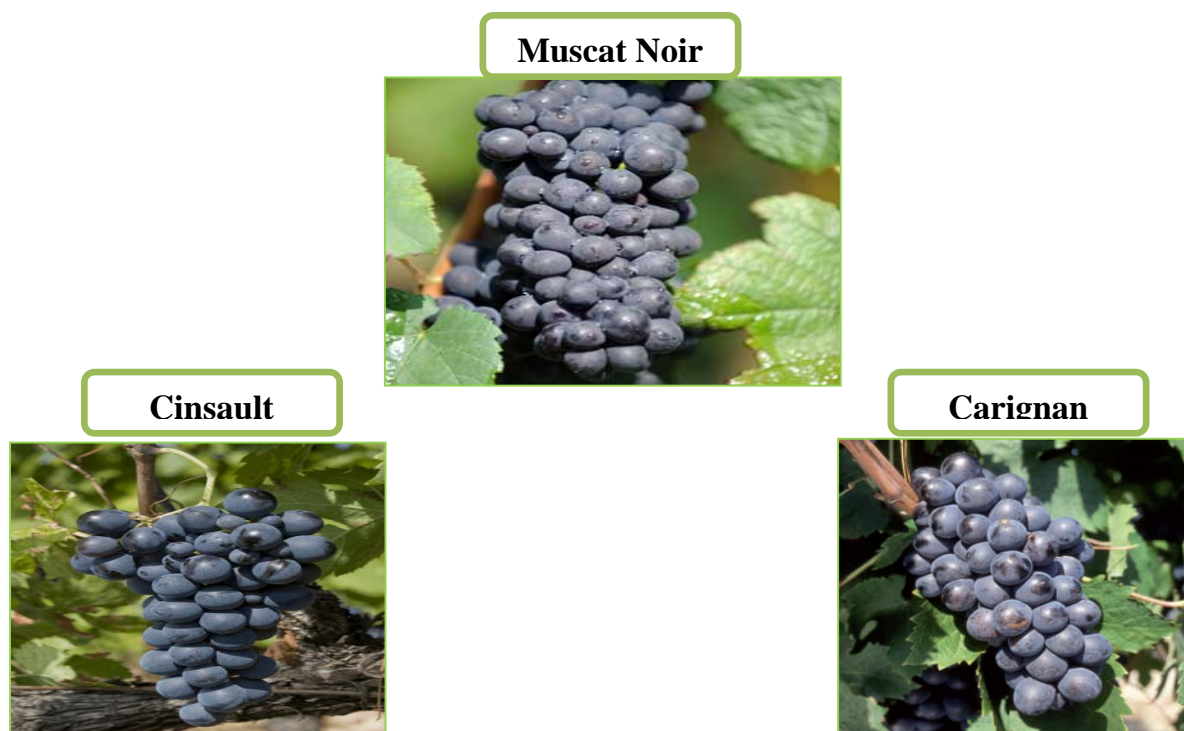


Figure N° 13 : Les photos des cépages étudiés (Muscat noir, Cinsault et Carignan).

3. Isolement, purification et conservation des isolats

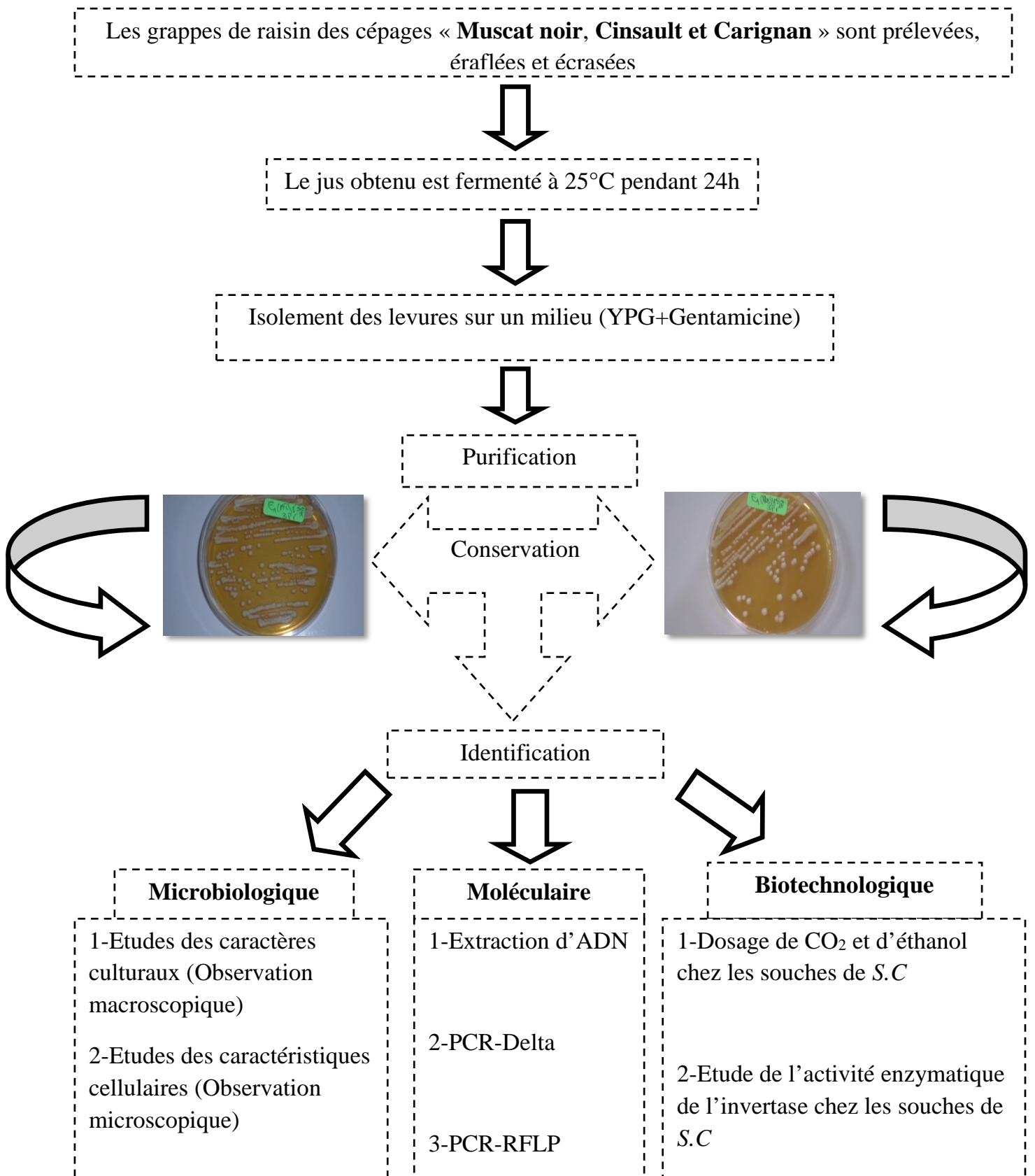


Figure № 14 : Schéma représentatif du protocole expérimental.

### 4. Techniques de prélèvement des grappes de raisin

Une quantité d'environ 500 g de grappes de raisins sains ont été prélevés à l'aide de ciseaux stériles, puis recueillis dans des sachets stériles. Les baies de raisin des différents cépages « Muscat noir, Cinsault et Carignan » sont déposées en boîte de Pétri pour une durée allant de 10 à 12 h, indépendamment sur un lit de milieu de culture gélosé YPG (2% Glucose, 2% Agar, 1% peptone, 1% extrait de levure) rendu sélectif par l'ajout d'un antibiotique (Gentamicine à 0,5 mg/ml) car en plus des levures, le raisin contient des bactéries et des moisissures (**Vergeade *et al.*, 1976 ; Bouix et Leveau, 1993**). Les baies sont ensuite retirées et les levures censées être présentes sur le raisin s'y installent sur le milieu de culture.

#### 4.1. Préparation des extraits de raisin

Les grappes de raisin de chaque cépage sont éraflées et écrasées afin d'obtenir un moût qu'on laisse fermenter pendant une journée à 25°C afin d'augmenter la quantité et la viabilité des levures recherchées (**Renouf *et al.*, 2005**).

#### 4.2. Isolement des levures

Cette étape consiste à isoler les levures présentes dans le jus ou le moût de raisin sur un milieu spécifique (YPG+ Gentamicine). A l'aide d'une pipette pasteur flambée, on ensemence par la méthode de stries les boîtes contenant des milieux de cultures avec le jus obtenu ou le moût recueilli à partir de cépage de la 1<sup>ère</sup> journée de fermentation.

#### Technique

- Tracer sur le fond extérieur de la boîte de pétri deux diamètres perpendiculaires, la boîte est ainsi séparée en quatre secteurs équivalents.
- Prélever à l'anse le jus de raisin ou le mout de premier jour de la fermentation en respectant les règles de la stérilité.
- Etaler l'inoculum en une zone périphérique sur une surface de 1 cm<sup>2</sup>.
- Flamber l'anse, laisser refroidir, puis disséminer l'inoculum précédemment déposé en l'étalant en stries très serrées sur une moitié de la boîte.

- Faire pivoter la boîte d'un quart de tour, flamber à nouveau l'anse, laisser refroidir, puis tracer à nouveau des stries dans la moitié de la boîte ressemblant les autres quadrants.
- Répéter l'opération afin de disséminer la semence du troisième quadrant dans le quatrième.
- Avant d'être mises à l'incubation (25°C/1-9 j) en position renversée, les boîtes stériles doivent être soigneusement codées et arrangées.

### 4.3. Purification des levures

Nous avons effectué une série d'ensemencement par la méthode des stries sur des boîtes de culture gélosé (YPG+Gentamicine) dans le but d'avoir des cultures pures. L'opération est renouvelée en prenant chaque fois au hasard une colonie isolée. Ceci conduit à obtenir une culture dont la pureté est estimée par observation microscopique.

### 4.4. Conservation des levures

Pour une conservation plus longue, les souches levuriennes sont conservées à -18°C dans leur propre milieu de culture avec une solution stérile de glycérol à 25%.

## 5. Etudes des caractéristiques culturelles

### 5.1. Observation macroscopique

Effectuée directement sur boîte de pétri, cette dernière est liée à de nombreux caractères mentionnés dans le **tableau N° 06** ci-dessous.

**Tableau N° 06** : Ensemble des caractères macroscopiques (**Callon, 1997**).

<b>La forme</b>	Ronde
<b>Le contour</b>	Régulier ou irrégulier
<b>La taille</b>	Moyenne, petite, grosse
<b>La surface</b>	Lisse ou rugueuse
<b>La couleur</b>	Blanche ou opaque
<b>Autres caractères</b>	La consistance ou l'odeur

### 5.2. Observation microscopique

#### 5.2.1. Observation microscopique sans coloration

Ce test sert à déterminer la forme microscopique de la levure et le type de bourgeonnement.

#### 5.2.2. Observation microscopique après coloration par le bleu de méthylène

Afin de mieux observer la forme des levures et les types de bourgeonnement après une coloration un peu plus spécifique.

##### ➤ Méthode de la coloration avec le bleu de méthylène

A l'aide de la spatule une colonie est prélevée, puis déposée sur une lame stérile contenant une goutte de solution de bleu de méthylène. La préparation est ensuite recouverte par une lamelle, puis rapidement observée au microscope à l'objectif x40.

### 6. Caractérisation moléculaire des isolats de levures

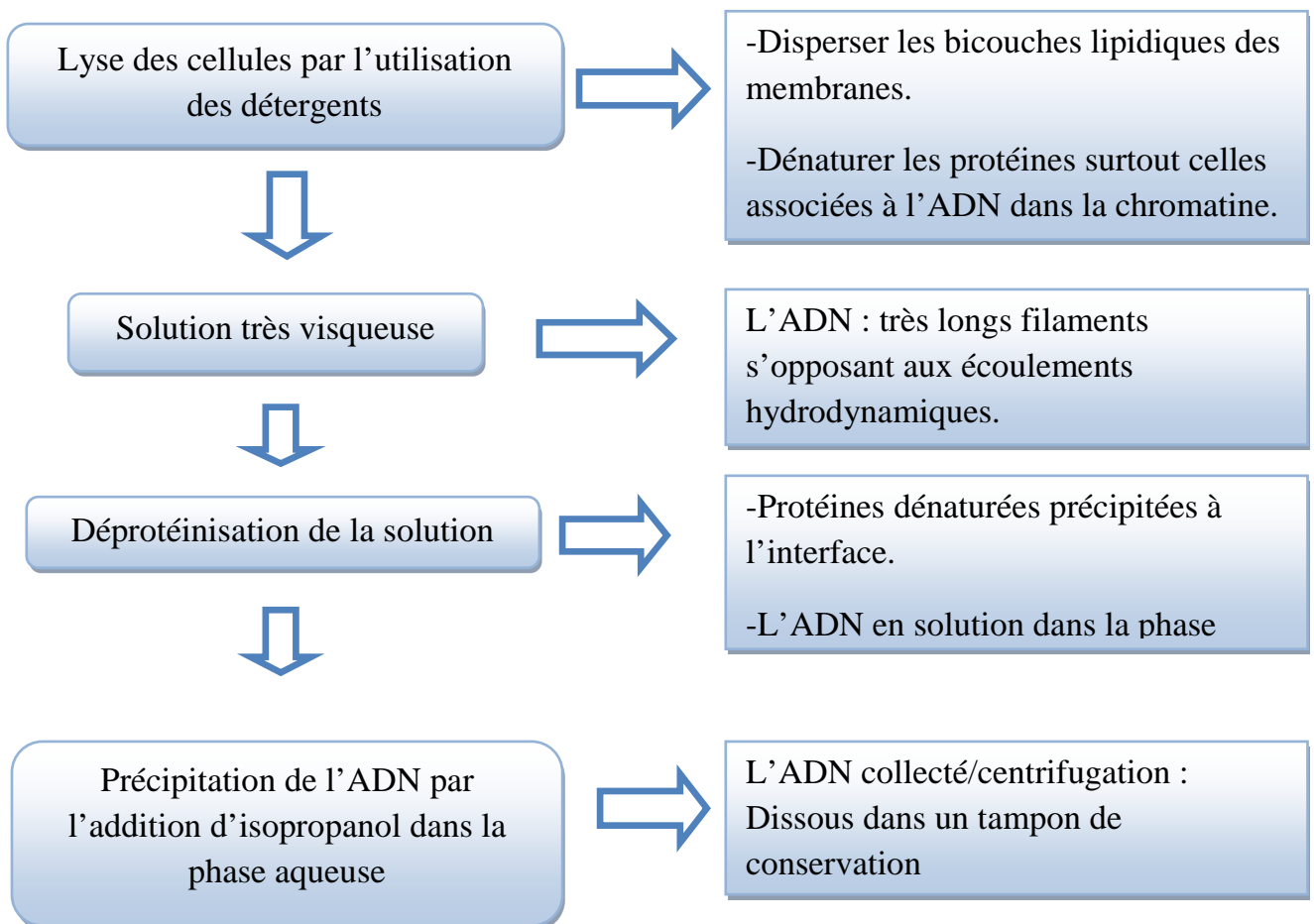
Toutes les méthodes moléculaires débutent par l'extraction de l'ADN, cette étape est essentielle car la quantité et la qualité de l'ADN microbien récupéré conditionne les deux étapes ultérieures de l'analyse.

#### 6.1. Extraction d'ADN

L'extraction des acides nucléiques est la première étape dans la plupart des études de biologie moléculaire. L'objectif des méthodes d'extraction dans le cas présent est d'obtenir des acides nucléiques non fragmentés à partir des souches levuriennes dans le cas des cultures liquides, afin de pouvoir mener une analyse précise en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ( **Lipp *et al.*, 2001**). La qualité des acides nucléiques compte parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR. La technique développée par **Ausubel *et al.*, (1995)** permet d'extraire efficacement l'ADN génomique des levures dans le cas des cultures pures liquides mais aussi des suspensions cellulaires collectées à la surface des boîtes de Pétri.

### ➤ Principe

Différents protocoles sont préconisés pour l'extraction de l'ADN avec, cependant un même schéma de principe qui consiste essentiellement à la lyse des cellules, suivie de l'élimination des protéines, puis la concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool (**Figure №15**).



**Figure № 15** : Principe d'extraction de l'ADN génomique.

### 6.1.1. Rôle des réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN

- ❖ **Dodécylsulfate de sodium (SDS)** : Il détruit les membranes cellulaires, dénature les lipoprotéines membranaires et libère ainsi l'ADN tout en préservant sa structure (De Vroey, 2002).
- ❖ **Tris-EDTA (TE)** : c'est un tampon généralement utilisé pour faire dissoudre l'ADN. Il est constitué de :
  - **Tris** : sert à tamponner le milieu réactionnel au niveau optimal pour l'activité de la **Taq** polymérase.
  - **L'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA)** : agent chélatant ayant une grande affinité avec les ions Mg présents dans la *DNAse* qui dégrade l'ADN ; L'EDTA se lie avec les ions Mg et anéantit l'action de la *DNAse*.
- ❖ **Acétate de potassium** : L'addition du **KAC** neutralise le milieu, précipite le SDS ainsi que certaines protéines, sous forme de complexes associés aux molécules de SDS et de potassium. Ces agrégats sont éliminés par centrifugation.
- ❖ **Isopropanol** : Avant extraction, l'alcool pur à 95% doit être refroidi pour permettre l'élimination des résidus présents dans nos échantillon. Les acides nucléiques présents dans la phase aqueuse peuvent être récupérés sous forme solide à la suite de précipitation par l'alcool éthylique ou par isopropylique qui élimine les protéines associées à l'ADN (Moulessehoul, 2006).
- ❖ **Ethanol** : L'éthanol est utilisé pour laver le culot en vue d'éliminer les traces de l'alcool (isopropanol) utilisé précédemment.

### 6.1.2. Méthode d'extraction de l'ADN génomique des levures (selon l'IFV de Nantes)

- Inoculer une quantité des colonies isolées des boites à partir de la biomasse présente à la surface de la gélose YPG gélosé dans un volume de 1,5 ml de bouillon (YPG+chloramphénicol), puis incubé à 25°C pendant 24h.
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm.
- Récupérer le culot et éliminer le surnageant.
- Mélanger le culot obtenu avec 660 µl de mélange 50 TE/SDS/10% (tampon de lyse).
- Vortexer, puis incubé à 65°C/5 min.
- Ajouter 340 µl d'acétate de potassium pour chaque microtube, (bien mélanger en inversant le microtube).
- Mettre au réfrigérateur (arrêter la réaction : acétate de potassium-tampon de lyse) jusqu'à ce que la suspension devienne semi-solide (30 minutes).
- Centrifugation 10 minutes à 13000 rpm.
- Prendre 750 µl de surnageant et mélanger avec 750 µl d'isopropanol.
- Centrifuger à 13000 rpm / 10 minutes.
- Éliminer le surnageant et rincer délicatement le culot d'ADN avec 120 µl de l'éthanol 95%.
- Suspendre le culot dans 300 µl de TE 1X et placer 5 minutes à 65°C.
- Conserver au réfrigérateur (4°C).

### 6.2. Vérification qualitative et quantitative de l'ADN extrait

Le contrôle qualitatif et quantitatif des ADN extraits est réalisé avant chaque utilisation. Plusieurs méthodes dont l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (migration 30 minutes à 130 V) pourrait être recommandée à cet effet (**Filofteia, 2010**). La quantité et la qualité de l'ADN génomique ont été ainsi évaluées par électrophorèse en gel d'agarose, ou la migration a été effectuée sous un voltage constant de 130V pendant 30 min. Le gel d'agarose est additionné du bromure d'éthidium, puis l'ADN génomique a été visualisé par illumination sous une lampe UV à ondes (360 nm). Par

la suite, le gel a été photographié et la concentration en ADN a été déterminée par comparaison de l'intensité de la fluorescence de la bande d'ADN à celle des bandes de concentrations connues du standard d'ADN. Un ADN de qualité est caractérisé par l'absence d'une trainée fluorescente causée par la migration de plusieurs fragments d'ADN de faibles masses moléculaires (**Chantal, 1996**).

### 6.3. Amplification de l'ADN par la PCR

Le principe de la **PCR** repose sur la variation des températures afin d'amplifier l'ADN.

**6.3.1. Dénaturation** : elle consiste en une séparation des deux brins de l'ADN matrice en deux fragments simples brins. Elle est réalisée grâce à une élévation de la température à **95°C** pendant **30s**. Cette élévation de température va pouvoir rompre les liaisons hydrogènes entre les bases libérant ainsi les deux brins.

**6.3.2. Hybridation des amorces** : cette étape consiste en la fixation des amorces sur l'ADN matrice simple brin suite à une baisse de la température allant jusqu'à **46°C** pendant **30s**, sachant que la température d'hybridation varie en fonction du pourcentage de **GC** des amorces utilisées. Les amorces contenues dans le mélange réactionnel se fixent sur l'ADN matrice simple brin au niveau des zones qui leur sont complémentaires. Plus les amorces sont parfaitement complémentaires de leur site de fixation, plus elles sont stables et solidement fixées. C'est sur cette portion de l'ADN en double brin que la polymérase va pouvoir se fixer et débiter la synthèse du brin complémentaire au brin matrice.

**6.3.3. Extension (polymérisation)** : le résultat de cette étape est la synthèse du brin d'ADN complémentaire au brin matrice par la **Taq** polymérase. Elle est effectuée à la température idéale du fonctionnement de la polymérase soit à **72°C** pendant **1 min**. De plus, cette élévation de température permet de rompre les hybridations non spécifiques

d'amorces. La polymérase attachée à l'extrémité 3' de l'amorce rajoute des **dNTPs** sur cette extrémité réalisant ainsi la synthèse de nouveau brin (**Thiao, 2005**).

Après chaque cycle, le nombre des copies de départ est doublé.

La **PCR** nécessite :

- ✓ De faibles quantités d'**ADN** (moins de **1µg**) possédant la séquence cible à amplifier.
- ✓ Des ions **MgCl<sub>2</sub>**.
- ✓ Les deux amorces nucléotidiques complémentaires des séquences cibles à amplifier.
- ✓ L'**ADN** polymérase ou **Taq polymérase** (qui reste stable à **94°C**).
- ✓ Un mélange des quatre **dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP)**.

#### 6.4. PCR-Delta (Delta 12/Delta 21)

Le typage des souches de *Saccharomyces cerevisiae* est réalisé par PCR selon la méthode développée par **Legras et Karst, (2003)** avec les amorces :  $\delta$  12(5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') et  $\delta$  21(5'-CATCATTAACACCGTATATGA-3'). Le mélange réactionnel utilisé à cet effet est résumé dans le **tableau N° 07**.

**Tableau N° 07** : La composition du mélange réactionnel utilisé pour PCR-Delta (Selon l'IFV)

Produits	Volume en µl pré mix MP	Volumes en µl pré mix eurobio
H <sub>2</sub> O	1220	1230
Tampon 10X	160	160
dNTP	64	64
Amorce Delta 1 ou 12	8(40pmol/réaction)	8
Amorces Delta 12 ou 21	8(40pmol/réaction)	8
Mgcl2	80	80

Après l'amplification, les profils de PCR Delta sont obtenus par électrophorèse, migration pendant 40 minutes à 100-120 V.

### 6.5. PCR-RFLP (ITS1-ARNr 5,8S-ITS2)

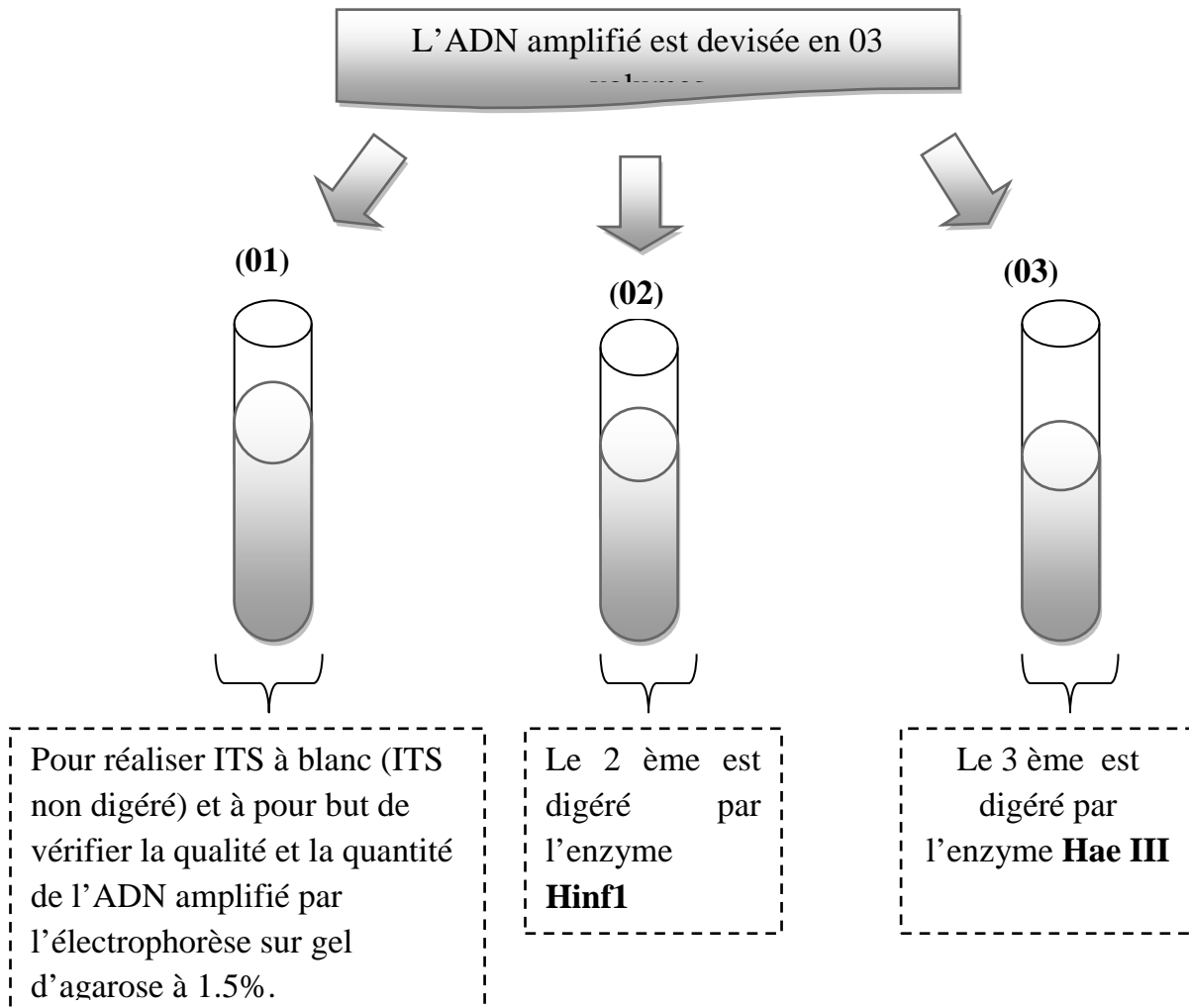
La séquence ITS1-ARNr 5.8S-ITS2 présente une région conservée chez la majorité des espèces levuriennes et des régions variables. Les amorces : ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') décrites comme amorces universelles par **White *et al.*, (1990)** ont été utilisées dans cette étude. Le mélange réactionnel est résumé dans le **tableau N° 08**.

**Tableau N° 08** : La composition du mélange réactionnel utilisé pour PCR-ITS-RFLP (Selon l'IFV)

Produits	Volume en µl pré mix MP	Volumes en µl pré mix eurobio
H <sub>2</sub> O	1220	1230
Tampon 10X	160	160
dNTP	64	64
Amorce ITS1	12,8 (40pmol/réaction)	12,8
Amorces ITS4	12,8 (40pmol/réaction)	12,8
Mgcl <sub>2</sub>	80	80
DMSO	31(2%)	31(2%)

Après l'amplification, les profils de PCR-ITS-RFLP sont obtenus par électrophorèse, migration pendant 40 minutes à 100-120 V.

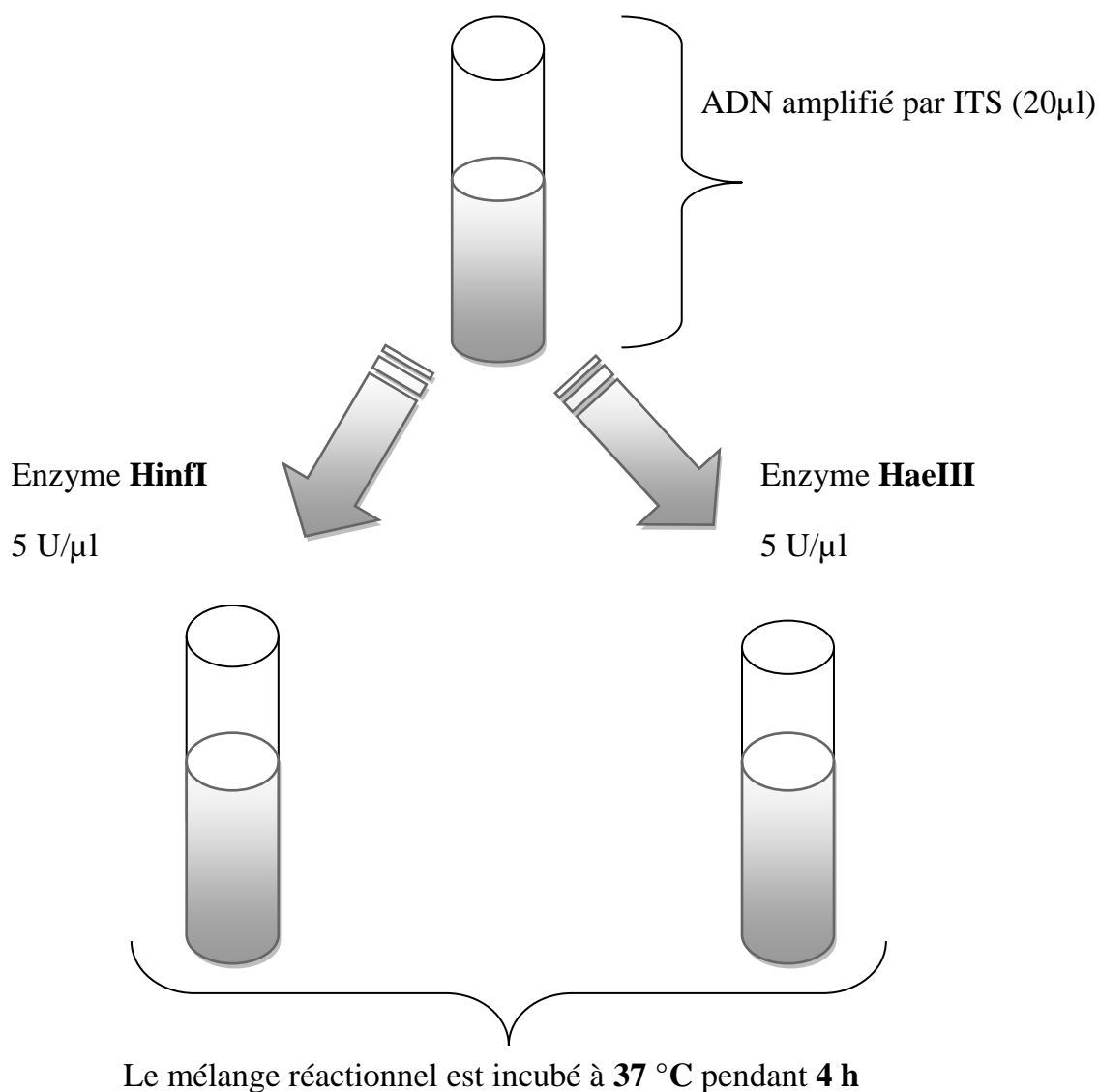
Le mélange réactionnel est réalisé de la manière suivante :



**Figure N° 16 :** Protocole du traitement de l'ADN (amplifié par PCR-ITS) par des enzymes de restriction.

## 6.6. La digestion enzymatique

La digestion enzymatique consiste à couper un double brin d'ADN en un point précis. On parle d'endonucléase car elle coupe à l'intérieur au lieu de dégrader l'ADN à partir des extrémités libres (Chantal, 1996). Dans le but d'identifier les différentes espèces de levures. Les produits PCR-ITS sont traités par les enzymes de restriction qui reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques ou des motifs (le site de restriction) (Renouf, 2006). L'emploi de 2 enzymes de restriction (Hae III et Hinf I) sur les produits d'amplification de la région (ITS1-ADNr5,8S-ITS2) a permis d'obtenir les profils RFLP selon le schéma N° 17 ci-dessous (Voir Annexe 4).



**Figure N° 17:** Protocole de l'amplification de la région cible par PCR-ITS-RFLP.

### 6.7. Electrophorèse sur gel d'agarose

La purification d'un fragment d'ADN (**les produits PCR Delta + PCR-ITS-RFLP**) double brin est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose, celui-ci étant constitué d'un mélange d'agarose à 1,5% et de tampon TBE 1X, le gel est mélangé avec le bromure d'éthidium (20µl BET/200ml TBE) et coulé à chaud dans la cuve d'électrophorèse. 20µl du mélange contenu dans chaque microtube de PCR, mélangés à 5µl de tampon de charge contenant du bleu de bromophénol, sont déposés sur les puits. Des fragments d'ADN de masse moléculaire connue appelés marqueurs sont également déposés. Ces derniers permettent de corréler la distance de migration des fragments d'ADN à leur taille (en paires de bases). Dans le cas de notre étude, le nombre et la longueur des fragments ont été comparés au marqueur de taille (**100 pb**).

Un voltage de 120V/30 minutes est ensuite appliqué jusqu'à la migration des fragments. Les différentes bandes nucléotidiques résultant de l'électrophorèse sont visibles sur le gel sous éclairage UV (254 nm) et photographiées avec une caméra à UV.

#### 6.7.1. Programme du thermocycleur

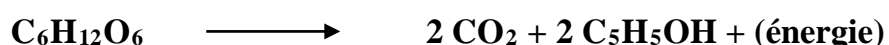
1. L'étape initiale se déroule à une température de 95°C pendant 5minutes.
2. La dénaturation se déroule à une température de 95°C pendant 30 secondes.
3. L'hybridation (40-50°C) pendant 30 secondes.
4. L'élongation (72°C) pendant 1 min.
5. L'étape finale se déroule à une température de 72°C pendant 5minutes.
6. Le refroidissement (4°C).

} 34 fois

## 7. Caractérisation biotechnologique des souches de *Saccharomyces cerevisiae*

### 7.1. Fermentation alcoolique : Capacité des souches de *Saccharomyces cerevisiae* à produire de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>

La fermentation alcoolique se caractérise par l'assimilation du glucose et par le rejet des produits de fermentation (dioxyde de carbone et d'éthanol). Cette réaction se déroule en milieu anaérobie (sans O<sub>2</sub>) selon la réaction:



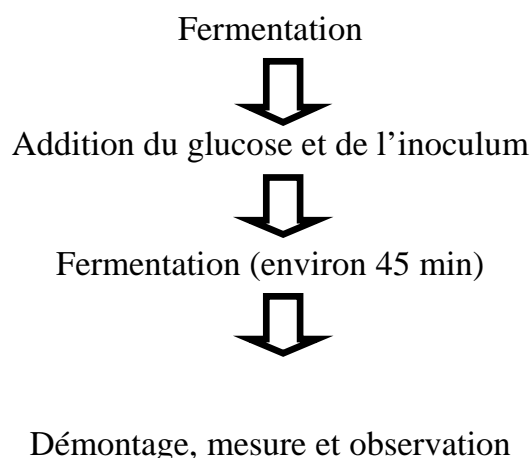
On parle d'oxydation incomplète de la matière organique (glucose).

#### 7.1.1. Préparation des souches à caractériser

Après revivification des souches de *Saccharomyces cerevisiae* (conservées dans le glycérol à 25%) sur la surface du milieu (YPG+ Gentamicine) pendant 24 h à 25°C, vient ensuite l'étape de la récupération et de la pesée de la masse levurienne formée à fin de caractériser son pouvoir fermentaire.

➤ **Équipements, Matériels** (Voir Annexe 2).

#### Résumé de protocole expérimental



Durée totale de l'expérience : environ **1 h**.



**Figure N° 18:** Dispositif de mesure du CO<sub>2</sub> produit permettant la collecte du gaz (Pol, 1996).

### ➤ Méthode

**Etape 1 :** Remplir le cristalliseur avec de l'eau à environ la moitié de sa capacité.

**Etape 2:** Remplir complètement l'éprouvette de 250 ml avec de l'eau et le boucher hermétiquement avec la paume de la main.

**Etape 3:** Renverser l'éprouvette en immergeant son ouverture dans le cristalliseur, puis retirer la main et fixer l'éprouvette à la pince.

**Etape 4 :** Raccorder le tube flexible au connecteur inséré dans le bouchon troué en bois.

**Etape 5 :** Introduire l'autre extrémité du tube flexible dans l'éprouvette remplie d'eau.

### 7.1.2. Addition de glucose et de l'inoculum

**Étape 6 :** Mettre en suspension 1 g de chaque souche de « *Saccharomyces cerevisiae* » dans 20 ml d'eau distillée dans le ballon en verre.

**Étape 7 :** Mettre le ballon sur un agitateur réglé à 30°C.

**Étape 8 :** Verser 0.8 g de glucose dans le ballon et agiter jusqu'à dissolution complète de sucre.

**Étape 9 :** Boucher hermétiquement le ballon avec le bouchon troué en bois, pour que le gaz produit par fermentation puisse s'échapper à travers le tube flexible et être recueilli dans l'éprouvette.

**Étape 10 :** Placer l'ampoule à décanter dans le 2<sup>ème</sup> trou du bouchon et laisser le robinet ouvert pendant 15 min.

**Étape 11 :** Dès que les 15 min sont achevées, fermer le robinet de l'ampoule à décanter.

**Étape 12 :** Durant toute la fermentation, agiter périodiquement la culture en imprimant un mouvement rotatif à l'ampoule à décanter et observer comment le gaz produit s'accumule dans l'éprouvette en y déplaçant l'eau.

Lorsque le volume de gaz dans l'éprouvette restera inchangé pendant au moins 5 minutes, malgré les agitations périodiques, vous saurez que la fermentation est terminée.

### 7.1.3. Démontage, mesure et observations

**Étape 13:** Lorsque la production de gaz cesse, retirer le tube de l'éprouvette et noter le volume total de gaz qui s'y accumulé tout au long de la fermentation en faisant notamment attention à la lecture des graduations sur l'éprouvette, car elle est inversée.

**Étape 14 :** Calculs

#### ➤ Détermination de la masse d'éthanol produite

Dans les conditions normales de température et de pression qui régnaient lors de l'expérience, 1 mole de gaz occupe un volume de 22,4 litres, soit 22 400 ml.

Connaissant le volume de gaz produit par la fermentation, on détermine le nombre de moles de gaz qui ont été produites :

$$\frac{1 \text{ mole}}{22\,400} \times x \text{ ml} = y \text{ mole de gaz}$$

Selon l'équation suivante :  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2$ , la fermentation alcoolique génère autant de moles de gaz que de moles d'éthanol. On en déduit donc que la fermentation produit :  $y'$  moles d'éthanol.

$y = y'$  = le même nombre de moles.

Sachant qu'une mole d'éthanol a une masse de 42 g, la masse d'éthanol produite serait égale à :

$$\frac{42 \text{ g}}{1 \text{ mole}} \times y' \text{ mole} = z \text{ g d'éthanol}$$

## 7.2. Etude de l'activité enzymatique de l'invertase des souches de *Saccharomyces cerevisiae*

Le saccharose est le composé le plus répandu des diholosides. Il est extrait de la betterave et de la canne à sucre. C'est un sucre non réducteur qui par hydrolyse chimique ou enzymatique, libère une molécule de glucose et une molécule de fructose, les deux oses étant des sucres réducteurs. Son pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D$  à  $20^\circ\text{C} = +66,5$ ; alors que le mélange obtenu par hydrolyse possède un pouvoir rotatoire global lévogyre. Ce mélange est désigné sous le nom de sucre inverti (inversion du pouvoir rotatoire).

**L'invertase** ou la  **$\beta$ -fructosidase** de la levure est une enzyme capable d'hydrolyser le saccharose en ses composants (Glucose et Fructose). Il existe aussi la glucosidase ou

saccharase dans l'intestin. L'invertase peut être aussi appelée sucrase ou  $\beta$ -D-fructofuranoside fructohydrolase (EC: 3.2.1.26 dans la nomenclature internationale).

L'activité enzymatique peut être étudiée en dosant les sucres réducteurs libérés après hydrolyse par la méthode au 3,5 dinitrosalicylate (DNS) (Chaari et Ben Saleh, 2009). L'unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 mg d'hexose réducteur (cas de l'invertase : glucose plus fructose). L'activité enzymatique de l'invertase est définie comme le nombre de micro-moles de saccharose hydrolysé par minute.

### 7.2.1. Extraction de la fraction soluble des souches de *Saccharomyces cerevisiae*

- Broyer dans un mortier, énergiquement pendant 5 minutes, 40 g des souches de *S.C* en présence de 10 ml d'eau.
- Ajouter ensuite 10 ml d'H<sub>2</sub>O et continuer le broyage pendant 5 minutes, pour briser la membrane résistante des cellules de levure.
- Ajouter 80 ml d'eau distillée.
- Centrifuger la suspension cellulaire 10 minutes à 4300 tours par minute.
- Après centrifugation, récupérer la phase liquide ou le surnageant qui contient les molécules solubles des cellules entre autres l'invertase. Jeter le culot solide formé de débris cellulaires et garder le surnageant pour les manipulations ultérieures.

➤ **Équipements, Matériels** (voir Annexe 3).

**7.2.2. Etablissement de la courbe étalon :** (Concentrations connues des sucres invertis (glucose et fructose) en fonction de la densité optique DO).

-Préparer une gamme étalon à partir d'une solution mère de glucose +fructose de concentration de 5 mM selon le tableau ci-dessous.

**Tableau N° 09:** Dosage des sucres inverti par la méthode de DNS : gamme étalon (Chaari et Ben Saleh, 2009).

## Matériel et Méthodes

N° tube	Blanc	1	2	3	4	5
(Glucose + Fructose) 5mM(ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
H <sub>2</sub> O (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
DNS (ml)	1	1	1	1	1	1
<b>Chauffage pendant 5 minutes à 100°C</b>						
H <sub>2</sub> O (ml)	8	8	8	8	8	8
<b>Agiter, lire la DO à 550 nm</b>						

- On trace la courbe  $DO = f(S)$  c'est-à-dire la densité optique en fonction de la quantité des sucres en portant (en ordonnées) la densité optique de l'absorption des sucres en fonction des micro moles de sucres (en abscisses), puis établir la pente de la droite.

---

## RESULTATS ET DISCUSSION

---

## 1. Isolement des levures à partir de différents cépages

Les levures sont classées d'après leur forme, leur mode de reproduction, leur possibilité de former un voile, de fermenter les sucres, d'assimiler les nitrates et d'utiliser l'éthanol. L'isolement et la purification par repiquages successifs des levures prélevés à partir de 3 cépages Muscat noir, Cinsault et Carignan nous a permis d'obtenir une collection de 34 isolats de levures réparties comme suit (Tableau N° 10) :

- 11 isolats de levures obtenus à partir de cépage Muscat noir (La région El-maleh, wilaya d'Ain Temouchent).
- 11 isolats de levures obtenus à partir de cépage Cinsault (La région Abdelmalek Ramdane, wilaya de Mostaganem).
- 12 isolats de levures obtenus à partir de cépage Carignan (La région Abdelmalek Ramdane, wilaya de Mostaganem).

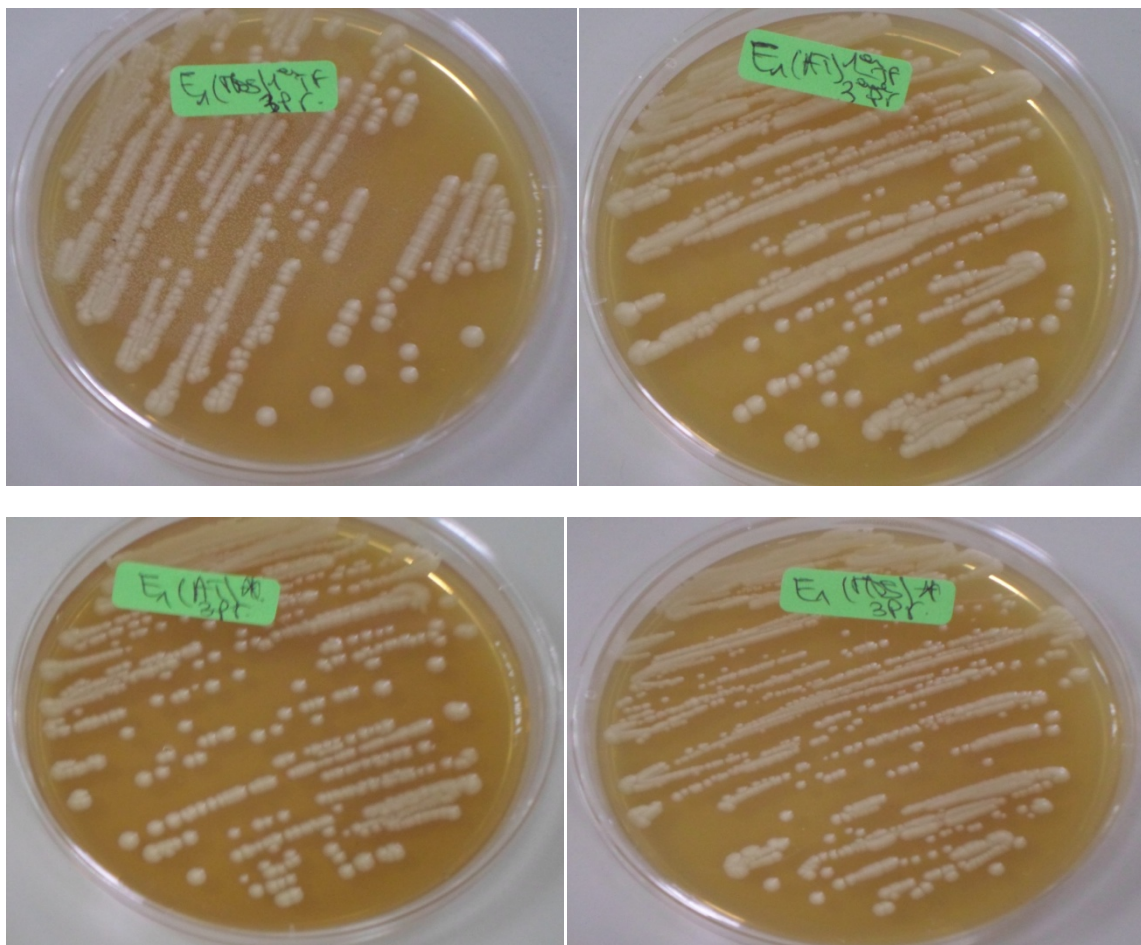
**Tableau N° 10 :** Les différents isolats de levures isolés.

Cépage	Les isolats
<b>Muscat noir</b> (1 <sup>er</sup> jour de fermentation)	Mn <sub>1</sub> (6 <sup>ème</sup> J), Mn <sub>2</sub> (5 <sup>ème</sup> J), Mn <sub>3</sub> (5 <sup>ème</sup> J), Mn <sub>4</sub> (6 <sup>ème</sup> J), Mn <sub>5</sub> (8 <sup>ème</sup> J), Mn <sub>6</sub> (8 <sup>ème</sup> J), Mn <sub>7</sub> (8 <sup>ème</sup> J), Mn <sub>8</sub> (3 <sup>ème</sup> J), Mn <sub>9</sub> (3 <sup>ème</sup> J), Mn <sub>10</sub> (6 <sup>ème</sup> J), Mn <sub>11</sub> (9 <sup>ème</sup> J)
<b>Cinsault</b> (1 <sup>er</sup> jour de fermentation)	Cn <sub>1</sub> (6 <sup>ème</sup> J), Cn <sub>2</sub> (5 <sup>ème</sup> J) , Cn <sub>3</sub> (5 <sup>ème</sup> J) , Cn <sub>4</sub> (6 <sup>ème</sup> J), Cn <sub>5</sub> (6 <sup>ème</sup> J) , Cn <sub>6</sub> (6 <sup>ème</sup> J) , Cn <sub>7</sub> (6 <sup>ème</sup> J) , Cn <sub>8</sub> (6 <sup>ème</sup> J) , Cn <sub>9</sub> (6 <sup>ème</sup> J) , Cn <sub>10</sub> (5 <sup>ème</sup> J) , Cn <sub>11</sub> (9 <sup>ème</sup> J)
<b>Carignan</b> (1 <sup>er</sup> jour de fermentation)	Cr <sub>1</sub> (3 <sup>ème</sup> J), Cr <sub>2</sub> (3 <sup>ème</sup> J) , Cr <sub>3</sub> (9 <sup>ème</sup> J), Cr <sub>4</sub> (6 <sup>ème</sup> J), Cr <sub>5</sub> (6 <sup>ème</sup> J), Cr <sub>6</sub> (3 <sup>ème</sup> J), Cr <sub>7</sub> (3 <sup>ème</sup> J) , Cr <sub>8</sub> (6 <sup>ème</sup> J), Cr <sub>9</sub> (6 <sup>ème</sup> J) , Cr <sub>10</sub> (6 <sup>ème</sup> J), Cr <sub>11</sub> (6 <sup>ème</sup> J) , Cr <sub>12</sub> (3 <sup>ème</sup> J)

### 2. Identification Microbiologique des isolats de levures

#### 2.1. Etude des caractéristiques culturales

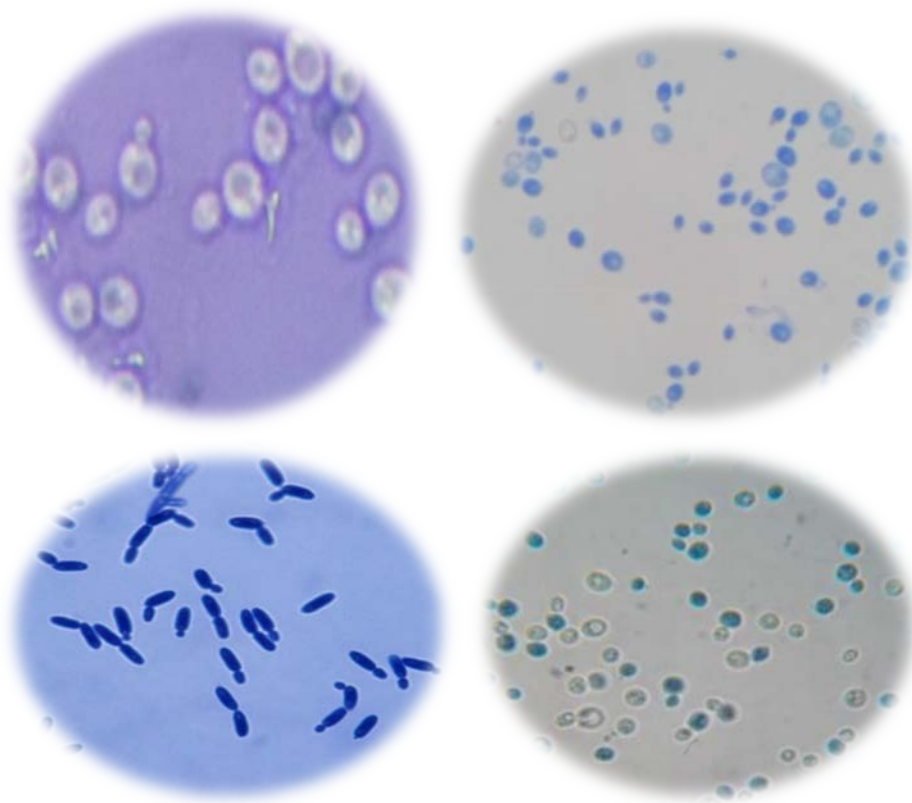
L'examen macroscopique des cultures « levuriennes » après incubation à 25°C pendant 4-5 jours montre des colonies crémeuses (**Figure N° 19**), généralement bien isolées, de couleur blanchâtre, crème ou parfois jaunâtre et à contour irrégulier et opaque. Par ailleurs, les colonies des isolats sont lisses et caractérisées par des tailles moyennes, cependant, certains isolats présentent une odeur de la levure de bière et parfois une odeur intense.



**Figure N° 19:** Observation macroscopique de certains isolats de levures isolés.

### 2.2. Etude des caractéristiques cellulaires

L'observation microscopique nous a permis d'authentifier la forme cellulaire des isolats isolés et leurs modes de reproduction végétative. Parmi les **34** isolats, **31** d'entre eux sont sphériques ou cylindriques, de forme allongée ou courte (**Figure N° 20**), et présentent par ailleurs, différents modes de reproduction végétative (monopolaire, bipolaire et même multipolaire), alors que les **3 isolats** restants (**Mn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> J)**, **Cn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> J)** et **Cr<sub>3</sub> (9<sup>ème</sup> J)**), ils sont caractérisés par des formes ovoïdes et propagent par bourgeonnement monopolaire. L'uniformité des cellules obtenues après isolement confirme la purification parfaite des isolats étudiés. Selon **Larpent, (1991)**, les levures se présentent sous forme de cellules uniques libres indépendantes ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique variée qui peut être sphérique, ovoïde, cylindrique, apiculé en bouteille ou pyramidale.



**Figure N° 20:** Observation microscopique de certains isolats de levures isolés.

(Grossissement 40X)

### 3. Identification Moléculaire des isolats de levures

La morphologie des micro-organismes est sujette à des variations prononcées en fonction de l'espèce, ses particularités et ses conditions de culture. Ce polymorphisme contribue à rendre difficile leur dépistage et leur identification par simple observation microscopique. Donc, bien que simple à réaliser, ces méthodes sont longues et exigent beaucoup de prises de données, de plus les chevauchements peuvent conduire à des erreurs d'identification. Une détection rapide, intéressante en production peut se faire essentiellement par des méthodes de biologie moléculaire. Le développement de cette dernière a permis d'étudier les microorganismes en vue de comprendre leur évolution par l'utilisation des techniques qui ciblent directement les molécules d'ADN.

#### 3.1. Extraction d'ADN des isolats

L'extraction des acides nucléiques est la première étape dans la plupart des études de la biologie moléculaire. L'objectif de cette étape est d'obtenir des acides nucléiques non fragmentés tirés des souches levuriennes afin de pouvoir mener une analyse précise en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Pour réussir la meilleure extraction d'ADN, des précautions de manipulation sont nécessaires. L'extraction d'ADN des isolats de levures nous a permis d'observer une faible masse de couleur blanche précipitée au fond du micro tube, ensuite cette dernière a été inoculée dans un tampon préalable TE 1X et doit être conservée jusqu'au moment d'utilisation.

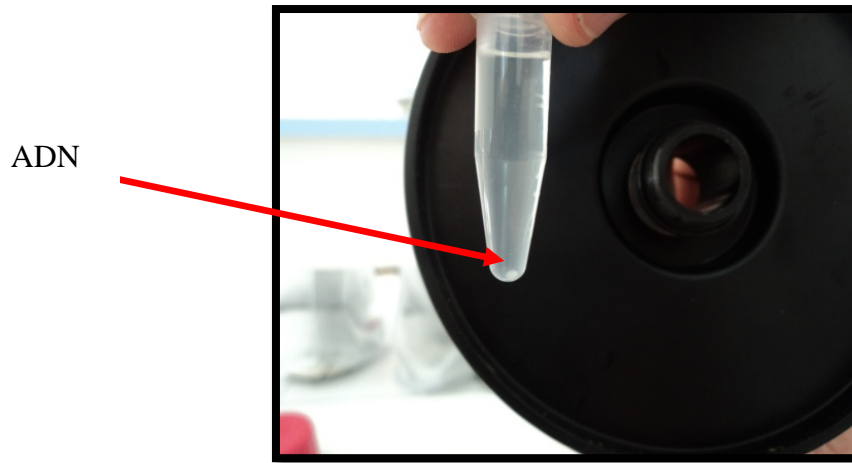


Figure № 21: Photo d'ADN après extraction.

### 3.2. Vérification qualitative et quantitative de l'ADN extrait des isolats

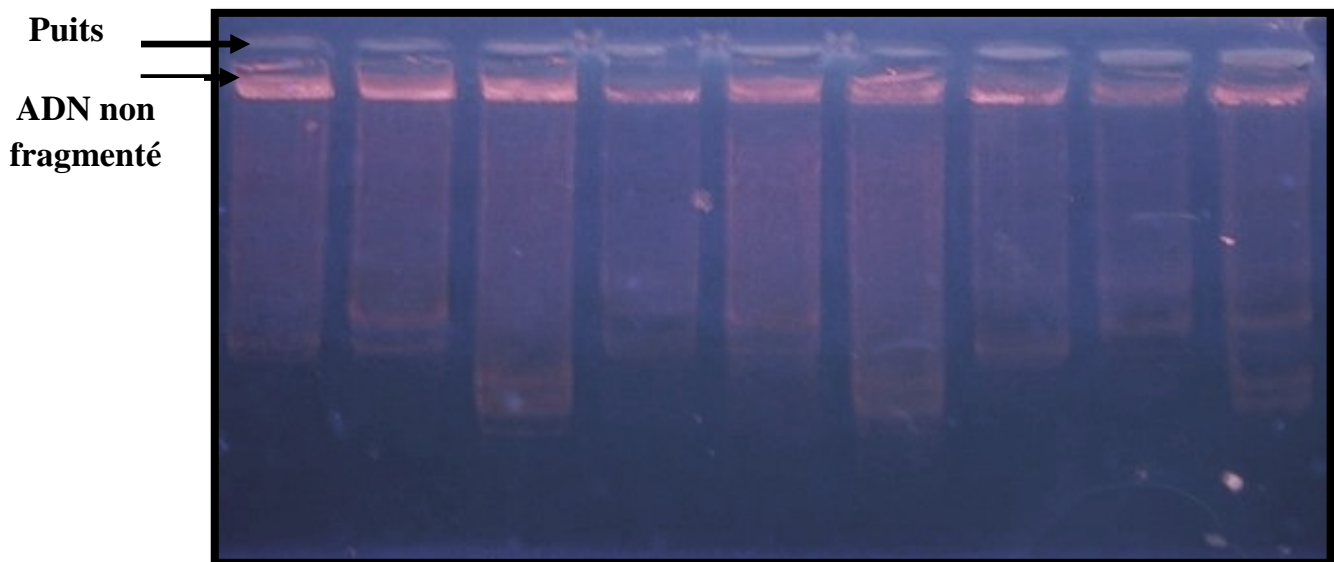


Figure № 22 : Visualisation de l'ADN extrait de certains isolats après migration sur gel d'agarose (Electrophorèse à blanc).

Les multiples applications scientifiques et technologiques impliquant l'étude de l'ADN font appel à différentes techniques. Parmi elles, l'électrophorèse sur gel d'agarose est l'une des plus communément utilisées, car elle permet de séparer des molécules en fonction de leur taille, préalable indispensable dans de multiples applications notamment pour identifier des fragments d'ADN (**Didier, 1996**). Les fragments d'ADN de nos isolats sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, ainsi la révélation de l'ADN sur le gel est réalisée par le bromure d'éthidium qui est incorporé dans le gel d'agarose à l'état liquide (avant qu'il soit solide). Une fois l'électrophorèse est terminée, les fragments d'ADN sont rendus visibles par exposition du gel aux rayons UV à l'obscurité.

Les migrations des fragments d'ADN dépendent de la taille du fragment plus que la charge de celui-ci. Plus le fragment a une taille élevée, moins la migration électrophorétique par rapport aux puits sera importante, c'est le cas de la migration d'ADN de nos échantillons. Les gels d'agarose permettent la séparation de fragments d'ADN relativement de grandes tailles.

En observant la **figure N° 22**, il se révèle que les isolats traités ont permis une extraction d'ADN satisfaisante en quantité (vu la largeur des bandes) et en qualité (vu le taux de fragmentation de l'ADN extrait). Les fragments d'ADN des isolats sont séparés en fonction de leurs poids moléculaires. Les isolats présentent des fragments d'ADN de grandes tailles puisque les bandes sont très proches des puits du gel et la migration est moins importante. Les quantités d'ADN obtenues sont largement suffisantes pour la réaction d'amplification (PCR). Selon **Boulouis *et al.*, (2001)**, l'électrophorèse des fragments d'ADN en gel d'agarose permet des séparations jusqu'à 20-25 Kb (20000-25000 pb).

### 3.3. Résultats de PCR-DELTA des isolats de levures isolés à partir des cépages Muscat noir, Cinsault et Carignan

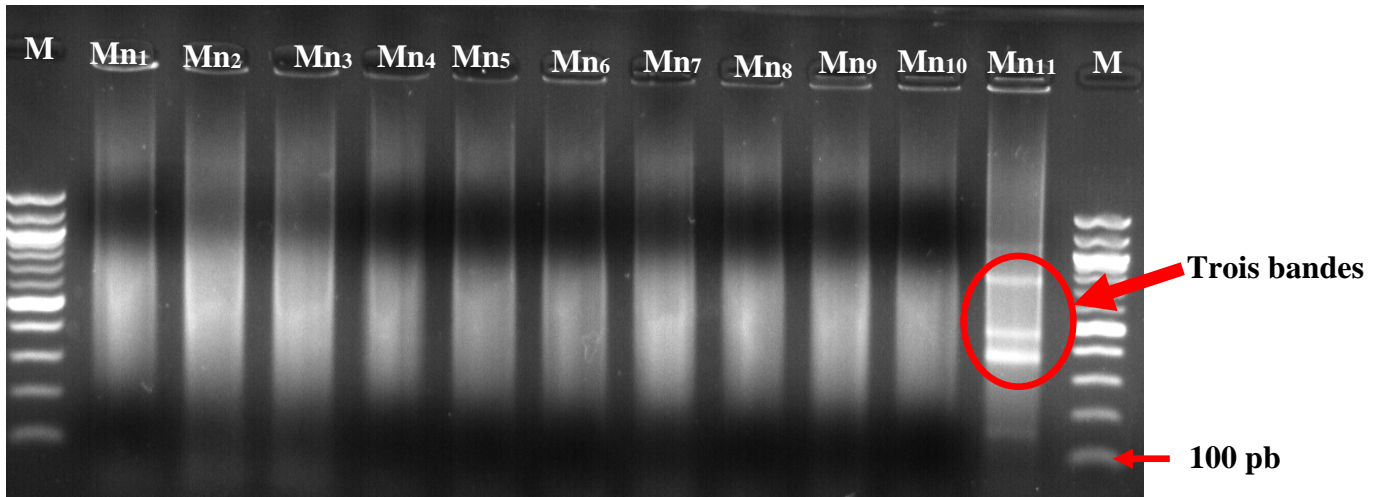
Le génome de *S.cerevisiae* contient un grand nombre de séquences répétées dont les rétrotransposons Ty et les séquences qui leur sont relatives, comme les LTR (ou Long Terminal Repeats) qui les flanquent. Les éléments *delta* sont des LTR qui se retrouvent de part et d'autre des rétrotransposons de type Ty1 et Ty2 et ont été utilisés comme cible pour la méthode de PCR *Delta*. Cette technique nous a permis d'amplifier des régions plus conservées, ciblées par les amorces  $\delta 12$  et  $\delta 21$  afin d'obtenir un nombre de bandes plus élevé sur un gel d'électrophorèse.

L'analyse par **PCR-DELTA** sur l'ADN total extrait de chaque espèce isolée nous a permis de déterminer l'appartenance de l'isolat ou non à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et de comparer entre eux les profils génétiques de deux isolats afin de définir s'ils représentent des souches différentes ou non. Dans un second temps, les isolats ayant été identifiés comme non *Saccharomyces*, font l'objet d'une amplification d'ADNr 5,8S afin que leurs profils soient comparés à ceux des principales espèces non *Saccharomyces*.

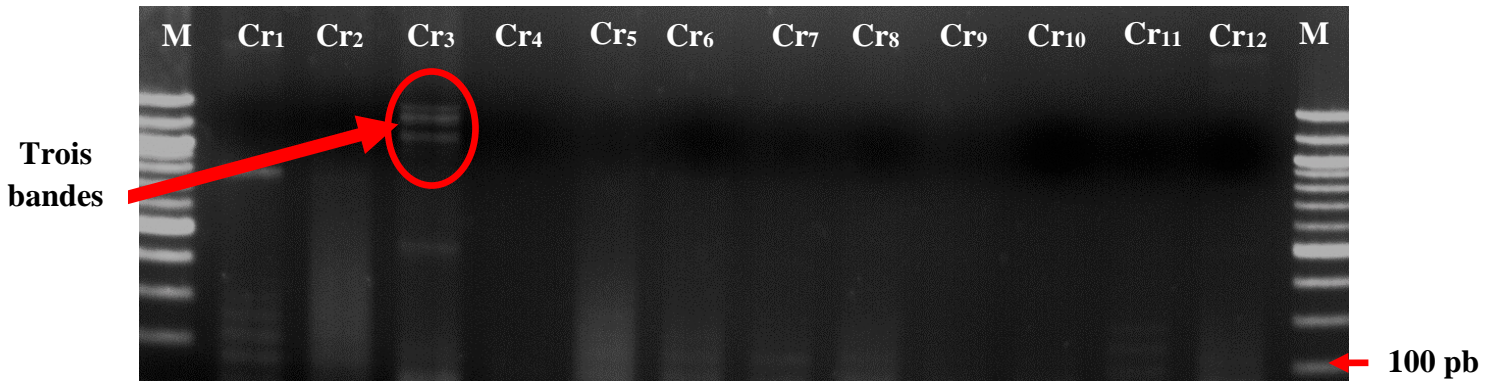
Cette technique permet ainsi, de distinguer entre les espèces *Saccharomyces* et les non *Saccharomyces* de nos isolats. Les électrogrammes suivants (**Figures N° 23,24 et 25**) montrent que les 10 premiers isolats issus des cépages Muscat noir et Cinsault sont des espèces non *Saccharomyces*, puisque aucun profil d'amplification n'est observé sur leurs colonnes, donc ils appartiennent à d'autres espèces ou ils seront identifiés par la PCR-ITS-RFLP. En ce qui concerne les deux derniers isolats (**Mn<sub>11</sub>** et **Cn<sub>11</sub>**), on remarque l'apparition de trois bandes sur la colonne de différentes tailles moléculaires, alors on peut prédire que cet isolat appartient aux espèces des *Saccharomyces* car seule *Saccharomyces cerevisiae* possède des éléments Delta et cette technique n'est appliquée qu'à cette espèce. Par ailleurs, parmi les 12 isolats isolés à partir du cépage Carignan, l'isolat (**Cr<sub>3</sub>**) présente différentes bandes sur le gel d'électrophorèse contrairement aux autres isolats, ce qui nous fait penser qu'il fait partie des espèces de *Saccharomyces*.

L'étude de l'écologie des levures non *Saccharomyces* connaît un essor important depuis ces dernières années, on se focalise non seulement sur la répartition des espèces rencontrées sur le raisin mais également sur leur succession durant la fermentation alcoolique (**Barata et al, 2012 ; Ciani et Picciotti, 1995 ; Mora et Mulet, 1991 ; Renouf et al, 2005 ; Setati et al., 2012**). Un grand nombre des levures *Non Saccharomyces* peut coloniser la surface des baies de raisin. En effet, plusieurs auteurs soutiennent l'idée que, bien que minoritaires, les levures *Saccharomyces* proviennent de la surface des raisins, et que leur présence ou absence change d'une grappe à une autre au sein d'une même parcelle (**Combina et al., 2005 ; Martini, 1993 ; Raspor et al, 2006**). **Mortimer et Polsini, 1999** estiment qu'une baie de raisin sur 1000 est porteuse des *Saccharomyces cerevisiae*. Par ailleurs, ces mêmes auteurs rapportent que les grappes endommagées (naturellement dans le vignoble) portent des populations importantes avec 1 baie sur 4 porteuses de *Saccharomyces cerevisiae*. En revanche, selon d'autres auteurs, *Saccharomyces cerevisiae* est indétectable sur le raisin (**Combina et al., 2005 ; Raspor et al, 2006**).

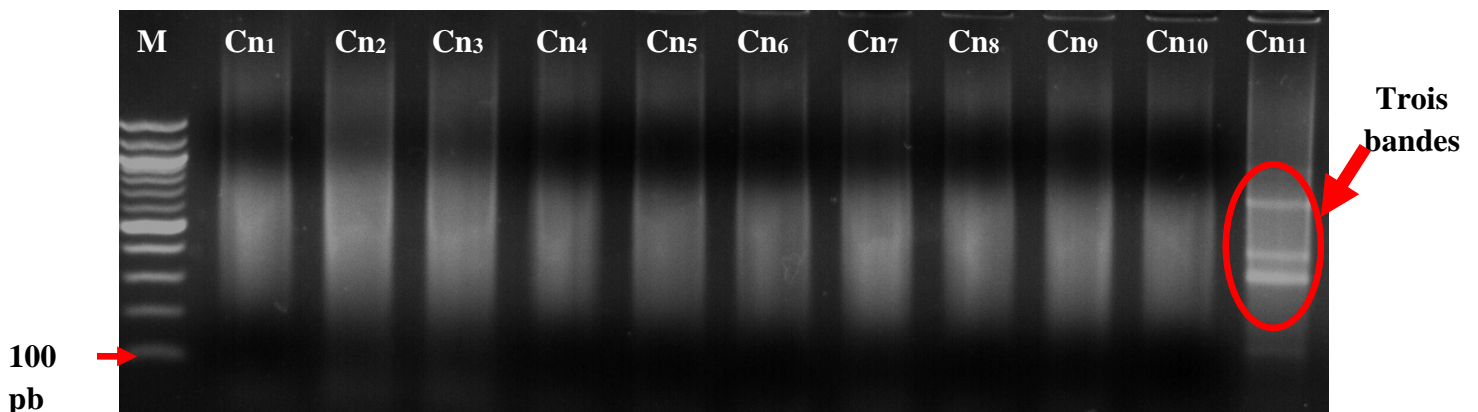
Il s'avère à travers les résultats notre étude, que la majorité des espèces de levures sont représentées par des levures non *Saccharomyces* (**31 isolats**) contre seulement **3 isolats** identifiés comme appartenant à l'espèce *Saccharomyces* (**Mn<sub>11</sub>, Cn<sub>11</sub> et Cr<sub>3</sub>**). Selon (**Amerine et al., 1982 ; Lafon-Lafourcade, 1983**), les levures non *Saccharomyces* poussent bien pendant les stades précoces de la fermentation, lorsque la concentration d'éthanol est encore faible, étant remplacé plus tard par les levures *Saccharomyces* qui sont plus tolérantes à l'éthanol et plus concurrentielles pour la croissance dans les milieux avec des concentrations élevées en sucre. Plusieurs auteurs ont étudié l'origine des souches de *Saccharomyces cerevisiae* principalement responsables de la fermentation spontanée des moûts de raisin (**Esteve et al., 2000 ; Clemente et al., 2004 ; Schuller et al., 2005 ; Valero et al., 2007 ; Wang et al., 2013 ; Ayoub, 2006**). Les baies de raisin endommagées sont des dépôts riches de *Saccharomyces cerevisiae*, démontrant que le vignoble peut être un réservoir naturel de cette levure (**Valero et al., 2007**). De plus, la diversité des souches de *S.cerevisiae* diffère selon chaque plante et grappe de raisin.



**Figure № 23:** Profils PCR-Delta des 11 isolats de cépage Muscat noir (M : Marqueur de taille 100 pb de l'IFV)



**Figure № 24:** Profils PCR-Delta des 12 isolats de cépage Carignan (M : Marqueur de taille 100 pb de l'IFV)



**Figure № 25:** Profils PCR-Delta des 11 isolats de cépage Cinsault (M : Marqueur de taille 100 pb de l'IFV)

### 3.4. Résultats de PCR-ITS-RFLP des isolats de levures isolés à partir des cépages Muscat noir, Cinsault et Carignan

Les méthodes moléculaires se basant sur l'analyse des unités répétées de l'ADN ribosomique (ADNr) sont les plus largement adoptées pour la délimitation des espèces de levures. On a le plus souvent recours à l'amplification et à la restriction de la région variable ITS1-5,8S-ITS2 (ITS pour Internal Transcribed Spacer) grâce à des amorces situées dans des séquences flanquantes conservées dans les unités 18S et 26S. Cette technique nous a permis d'amplifier une partie de l'ADN ribosomique, la région ITS de nos isolats de levures. Cette région étant théoriquement identique pour tous les individus d'une espèce donnée, mais différente d'une espèce à l'autre, elle est la base de nombreuses études taxonomiques.

Tous les isolats de levures obtenus (**34 isolats**) à partir des moûts des différents cépages (Muscat noir, Cinsault et Carignan) ont été analysés, afin de confirmer d'une part l'appartenance des 3 isolats (**Mn<sub>11</sub>, Cn<sub>11</sub> et Cr<sub>3</sub>**) à l'espèce de *Saccharomyces cerevisiae*, et d'autres part d'identifier les isolats restants appartenant aux espèces non *Saccharomyces* (**31 isolats**). Pour cela, la région de l'ARNr de l'unité de répétition comprend deux régions non codantes désignées comme interne espaceurs transcrits (ITS1 et ITS2) et le gène ARNr 5,8S ont été amplifiés et digérés par deux enzymes de restriction (Hinf I et HaeIII). Les profils obtenus par chaque isolat ont été comparés avec les souches de référence présentes dans le guide de détermination de l'IFV (2012). Les résultats obtenus lors de cette étude sont répartis en trois parties :

**Partie 1 : Cas de cépage Muscat noir**

**3.4.1. Les espèces de levures isolées à partir du raisin Muscat noir**

11 isolats de levures ont été identifiés comme appartenant à 4 genres et 6 espèces différents parmi lesquels *Torulaspota* (05 isolats), *Hanseniaspora* (03 isolats), *Candida* (02 isolats) et *Saccharomyces* (01 isolat) (**Tableau N° 11**). Ces différents genres de levures sont bien documentés dans la littérature comme présents sur le raisin et en début de fermentation alcoolique (**Zott et al., 2008 ; Barata et al ., 2012**).

**Tableau N° 11** : Fréquences des espèces de levures isolées à partir du cépage Muscat noir.

Source d'isolement	Espèces	Fréquences d'isolement (Nombre des isolats)
Cépage <b>Muscat noir</b>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	04
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	03
	<i>Candida solani</i>	01
	<i>Candida pseudointermedia</i>	01
	<i>Torulaspota pretoriensis</i>	01
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	01

L'examen des résultats obtenus indique que 5 isolats de levures sélectionnés (**Mn<sub>1</sub>, Mn<sub>2</sub>, Mn<sub>3</sub>, Mn<sub>4</sub>, Mn<sub>10</sub>**) appartiennent au genre *Torulaspota* (tableau 11), selon le guide de détermination de l'IFV (2012), tandis que 4 isolats ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *Torulaspota delbrueckii* (**Mn<sub>1</sub>, Mn<sub>2</sub>, Mn<sub>3</sub>, Mn<sub>4</sub>**) et l'isolat restant (**Mn<sub>10</sub>**) appartient à l'espèce *Torulaspota pretoriensis*. Le profil moléculaire de 3 isolats de levures (**Mn<sub>5</sub>, Mn<sub>6</sub>, Mn<sub>7</sub>**) indique qu'ils appartiennent à l'espèce *Hanseniaspora uvarum*, selon le guide de détermination de l'IFV (2012). Cependant, la caractérisation moléculaire et les caractéristiques micro-macroscopiques montrent que les isolats (**Mn<sub>8</sub>**) et (**Mn<sub>9</sub>**) appartiennent aux espèces *Candida solani* et *Candida pseudointermedia* respectivement. Par ailleurs, la combinaison des deux résultats

(études morphologiques et moléculaires) indique que l'isolat (**Mn<sub>11</sub>**) appartient à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tableau № 12 :** Taille en paires de bases des produits de PCR et des fragments de restriction obtenus avec deux endonucléases différentes (Hinf I et HaeIII)

Espèces	ITS total (pb)	Fragments de restriction (pb)	
		Hinf I	HaeIII
<i>Torulaspota delbrueckii</i> (Mn <sub>1</sub> , Mn <sub>2</sub> , Mn <sub>3</sub> , Mn <sub>4</sub> )	800	410+380	800
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (Mn <sub>5</sub> , Mn <sub>6</sub> , Mn <sub>7</sub> )	770	350+190+160	750
<i>Candida solani</i> (Mn <sub>8</sub> )	600	280+300	400
<i>Candida pseudointermedia</i> (Mn <sub>9</sub> )	400	200+110	400
<i>Torulaspota pretoriensis</i> (Mn <sub>10</sub> )	800	380+200+190	800
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Mn <sub>11</sub> )	850	370+360+110	320+230+170+120

Les baies de raisin sont la source primaire de levures lors de la fermentation du moût (**Fleet *et al.*, 1998**). Dans différentes régions viticoles au monde, les travaux d'isolement et d'identification des levures ont montré que les genres *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspota*, *Dekkera*, *Schizosaccharomyces* et *Sporidiobolus* sont les plus fréquemment retrouvées (**Sabate *et al.*, 2002 ; Fleet *et al.*, 1998 ; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004 ; Raspor *et al.*, 2006 ; Nisiotou *et al.*, 2007**). D'autres espèces non *Saccharomyces*, comme, *Candida intermedia*, *Torulaspota delbrueckii* et *Hanseniaspora spp* constituent également une partie importante de la diversité de la communauté de la baie et sont présentes durant la fermentation alcoolique, en particulier lors des stades pré fermentaires (**Zott *et al.*, 2008**).

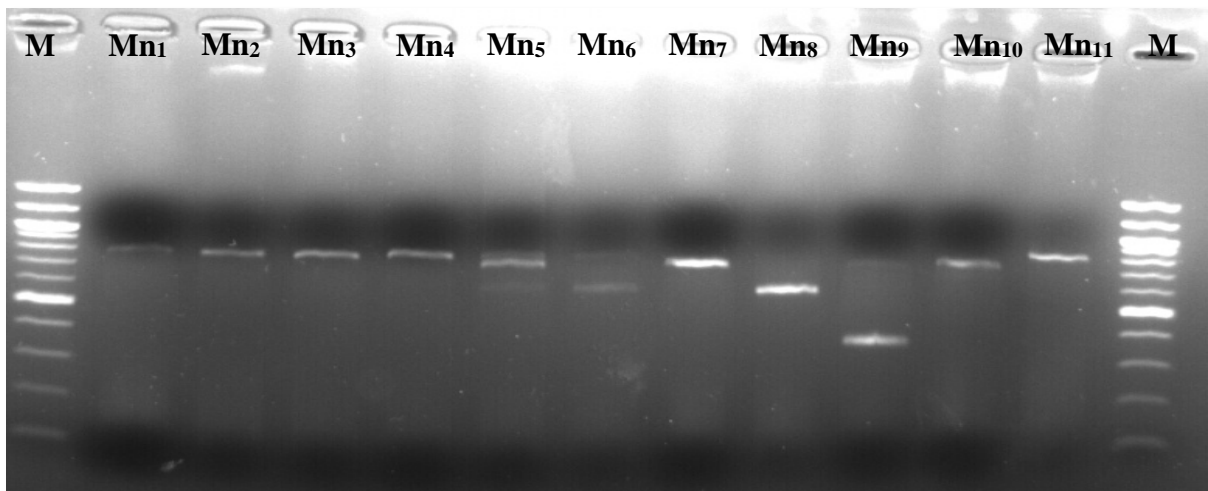


Figure N° 26 : Visualisation de la région (ITSI-ADNr5, 8S-ITSII) amplifiée chez les 11 isolats de Muscat noir.

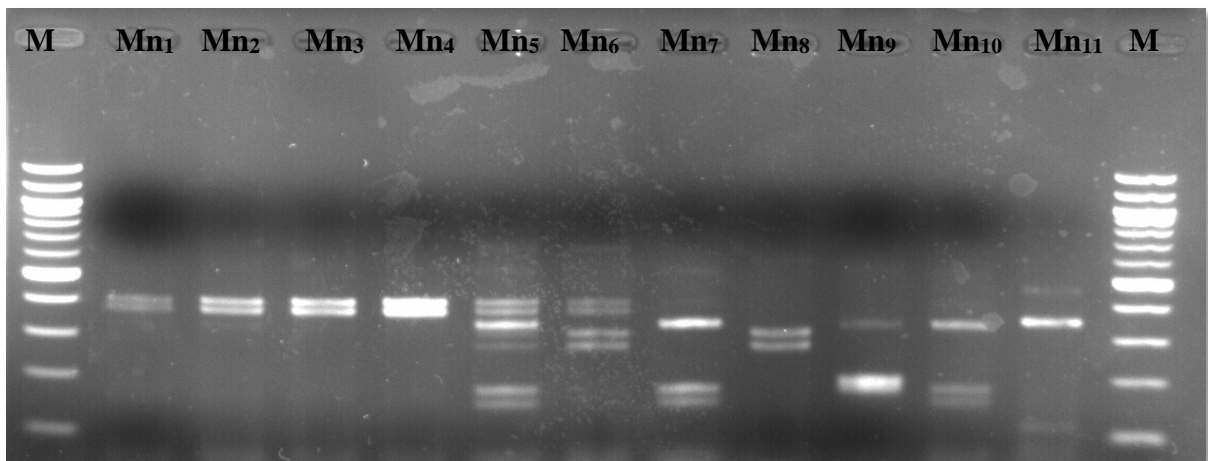


Figure N° 27 : Visualisation de la région (ITSI-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la **Hinf I** chez les 11 isolats de Muscat noir.

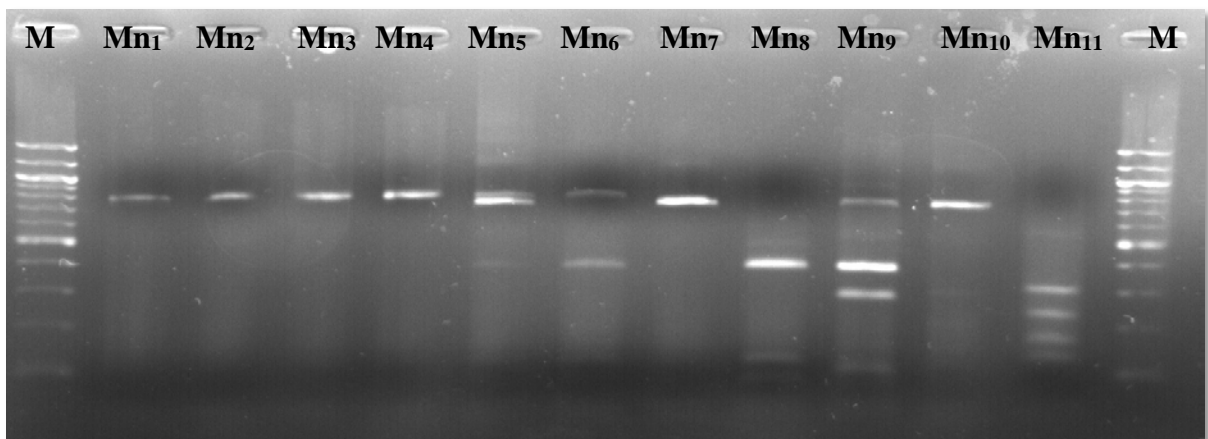


Figure N° 28 : Visualisation de la région (ITSI-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la **HaeIII** chez les 11 isolats de Muscat noir.

Le moût de raisin (Muscat noir) constitue un excellent réservoir de levures non *Saccharomyces* comme en témoignent les résultats obtenus, ou nous avons rencontré différentes espèces fermentaires comme par exemple *T. delbrueckii*, une levure non *Saccharomyces* naturellement présente dans le moût et sur les baies de raisin et qui a été décrite dans la littérature par de nombreux auteurs pour son impact positif sur la qualité et la complexité des vins (Ciani et Maccarelli, 1998 ; Ciani et Picciotti, 1995 ; Herraiz *et al.*, 1990), ainsi que pour la pureté de sa fermentation avec notamment une faible production d'acidité volatile, d'acétaldéhyde, diacétyl et d'acétoïne (Plata *et al.*, 2003 ; Bely *et al.*, 2008 ; Viana *et al.*, 2008). Cette levure a été également décrite comme étant cryophile et osmotolérante (Hernandez-Lopez *et al.*, 2008). Parmi les autres levures non *Saccharomyces* isolées à partir du moût de raisin, notons les espèces *Hanseniaspora uvarum*, *Candida solani*, *Candida pseudointermedia*. En effet les levures à faible activité fermentaire, comme principalement les espèces du genre *Hanseniaspora* et à un degré moindre des genres *Candida* prédominent sur le raisin et dans les premiers stades de la fermentation alcoolique. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par (Rementeria *et al.*, 2003 ; Renouf, 2006 ; Barata *et al.*, 2012).

Par ailleurs, ces observations mettent en avant la variabilité des espèces au sein de chaque genre de levure notamment dans les genres *Torulaspora* (*T. delbrueckii*, *T. pretoriensis*) et *Candida* (*C. Solani*, *C. pseudointermedia*). Cependant, une seule espèce de *Saccharomyces cerevisiae* a été isolée à partir du moût. C'est l'agent principal de la fermentation alcoolique. Lors d'une fermentation spontanée avec la flore indigène, les levures non *Saccharomyces* prédominent dans le moût durant la phase pré-fermentaire ainsi qu'au début de la fermentation alcoolique avant que les levures *S. cerevisiae* colonisent le milieu pour achever la fermentation (Zott *et al.*, 2008 ; Fleet, 2008 ; Renouf *et al.*, 2005). Néanmoins, les levures non *Saccharomyces* sont très présentes, même majoritaires, dans le moût de raisin **Muscat noir** par rapport aux levures *Saccharomyces*.

**Partie 2 : Cas de cépage Cinsault**

**3.4.2. Les espèces de levures isolées à partir du raisin Cinsault**

11 isolats de levures ont été identifiés comme appartenant à 4 genres et 4 espèces différents : *Pichia* (04 isolats), *Torulaspota* (05 isolats), *Zygosaccharomyces* (01 isolat), *Saccharomyces* (01 isolat) (**Tableau N° 13**).

**Tableau N° 13** : Fréquences des espèces de levures isolées à partir du cépage Cinsault.

Source d'isolement	Espèces	Fréquences d'isolement (Nombre des isolats)
Cépage <b>Cinsault</b>	<i>Pichia fermentans</i>	04
	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	05
	<i>Zygosaccharomyces microellipsoide</i>	01
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	01

L'examen des résultats obtenus indique que 4 isolats de levures sélectionnées (**Cn<sub>1</sub>**, **Cn<sub>2</sub>**, **Cn<sub>3</sub>**, **Cn<sub>4</sub>**) appartiennent à l'espèce *Pichia fermentans* (tableau 13), selon le guide de détermination de l'IFV (2012). Le profil moléculaire de 5 isolats de levures (**Cn<sub>5</sub>**, **Cn<sub>6</sub>**, **Cn<sub>7</sub>**, **Cn<sub>8</sub>**, **Cn<sub>9</sub>**) indique qu'ils appartiennent à l'espèce *Torulaspota delbrueckii*, selon le guide de détermination de l'IFV (2012). Cependant, la caractérisation moléculaire et les caractéristiques micro-macroscopiques montrent que l'isolat (**Cn<sub>10</sub>**) appartient à l'espèce *Zygosaccharomyces microellipsoide*. Par ailleurs, la combinaison des deux résultats (études morphologiques et moléculaires) indique que l'isolat (**Cn<sub>11</sub>**) appartient à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tableau № 14 :** Taille en paires de bases des produits de PCR et des fragments de restriction obtenus avec deux endonucléases différentes (Hinf I et HaeIII).

Espèces	ITS total (pb)	Fragments de restriction (pb)	
		Hinf I	HaeIII
<i>Pichia fermentans</i> (Cn <sub>1</sub> , Cn <sub>2</sub> , Cn <sub>3</sub> , Cn <sub>4</sub> )	450	250/200	340/90
<i>Torulaspora delbrueckii</i> (Cn <sub>5</sub> , Cn <sub>6</sub> , Cn <sub>7</sub> , Cn <sub>8</sub> , Cn <sub>9</sub> )	800	410/380	800
<i>Zygosaccharomyces</i> <i>microellipsoide</i> (Cn <sub>10</sub> )	825	420/400	800
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Cn <sub>11</sub> )	850	370/360/110	320/230/170/120

Dans le vignoble, les levures peuvent être transportés du sol aux raisin par des insectes ou par le vent (Valero *et al.*, 2007). Dans les fermentations spontanées, les non *Saccharomyces* telles que *Torulaspora*, *Candida*, *Hanseniaspora* et *Pichia* se développent généralement au début de la fermentation alcoolique avant d'être progressivement remplacées par *Saccharomyces*. Les levures non *Saccharomyces* sont très présentes, même majoritaires dans le moût de raisin Cinsault comme en témoignent les résultats obtenus, ou nous avons rencontré différentes espèces fermentaires, comme par exemple l'espèce *Pichia fermentans* qui représente une partie de la flore indigène des peaux de raisin, utilisée pour la fabrication de la bière. En outre, cette espèce a montré le même niveau de tolérance au soufre et le même taux de croissance que *Saccharomyces cerevisiae* (Clemente *et al.*, 2004). Parmi les autres espèces non *Saccharomyces* isolées à partir du moût de raisin, l'on note l'espèce *Torulaspora delbrueckii*, cette levure est très majoritaire dans les deux moûts de raisin (Cinsault et Muscat noir). C'est une levure naturellement présente sur les baies de raisin (Herraiz *et al.*, 1990 ; Ciani et Picciotti, 1995 ; Ciani et Maccarelli, 1998 ).

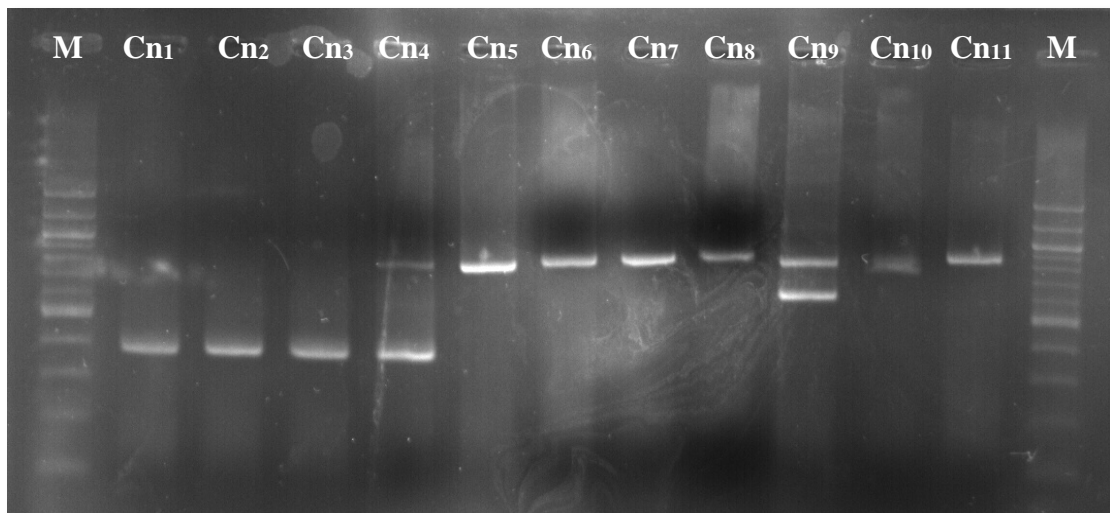


Figure № 29 : Visualisation de la région (ITSI-ADNr5, 8S-ITSII) amplifiée chez les 11 isolats de Cinsault.

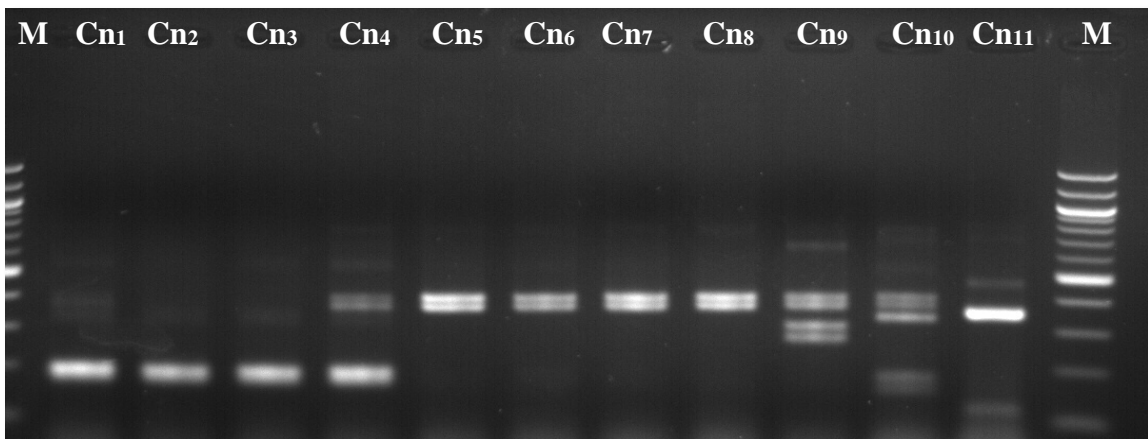


Figure № 30 : Visualisation de la région (ITSI-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la Hinf I chez les 11 isolats de Cinsault.

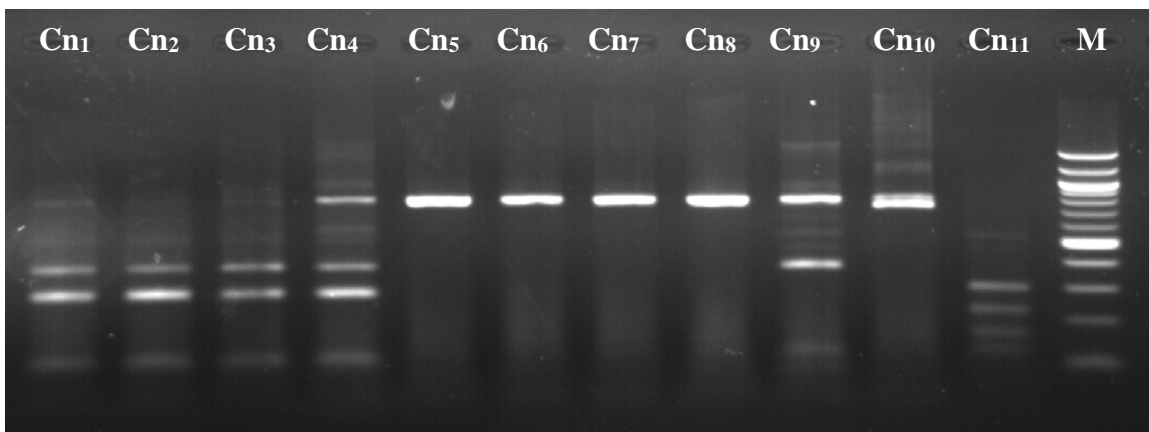


Figure № 31 : Visualisation de la région (ITSI-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la HaeIII chez les 11 isolats de Cinsault.

Notons par ailleurs, que seulement une espèce de *Zygosaccharomyces microellipsoide* (**Cn<sub>10</sub>**) et autre de *Saccharomyces cerevisiae* (**Cn<sub>11</sub>**) ont été isolé du moût. Les fermentations sont déclenchées par la croissance de diverses espèces de *Pichia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Meteschinikowia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea* et *Zygosaccharomyces*. Leur croissance est généralement limitée aux deux ou trois premiers jours de fermentation, c'est alors que les espèces de *Saccharomyces* les plus fortement tolérantes à l'éthanol prennent en charge la fermentation (**Fleet et al., 1993**). Il a été rapporté selon de nombreux auteurs dans d'autres études sur la fermentation de raisin pour la production du vin, que les espèces appartenant aux genres *Pichia*, *Candida*, *Torulasporea* et *Zygosaccharomyces* sont très fréquemment isolées (**Esteve et al., 2000 ; Clemente et al., 2004 ; González et al., 2007 ; Urso et al., 2008 ; Settanni et al., 2012; Ortiz et al., 2013 ; Wang et al., 2013**).

Dans le cas de nos essais, le moût de raisin constitue un réservoir riche de levures non *Saccharomyces*. Les principales espèces de levures ont été représentées par les espèces : *T. delbrueckii*, *P. fermentans* et *Zygosaccharomyces*, alors qu'un seul isolat (**Cn<sub>11</sub>**) a été identifié comme *Saccharomyces cerevisiae*. C'est ainsi qu'il est encore une fois mis en évidence la prédominance des espèces non *Saccharomyces* dans le moût de raisin Cinsault. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par (**Raspor et al., 2006 ; Setati et al., 2012**). Par ailleurs, **Fleet et al., (2008)**, précisent qu'au cours d'une fermentation spontanée avec la flore indigène, les levures non *Saccharomyces* prédominent dans le mout pendant la phase de pré fermentation et au début de fermentation alcoolique, avant que la levure *S. cerevisiae* colonise le milieu pour continuer le processus fermentaire.

**Partie 3 : Cas de cépage Carignan**

**3.4.3. Les espèces de levures isolées à partir du raisin Carignan**

12 isolats de levures ont été identifiés comme appartenant à 3 genres et 5 espèces différents : *Pichia* (6 isolats), *Candida* (5 isolats) et *Saccharomyces* (1 isolat) (tableau N° 15).

**Tableau N° 15 :** Fréquences des espèces de levures isolées à partir du cépage Carignan.

Source d'isolement	Espèces	Fréquences d'isolement (Nombre des isolats)
Cépage <b>Carignan</b>	<i>Candida intermedia</i>	01
	<i>Candida magnoliae</i>	01
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	01
	<i>Pichia deserticola</i>	06
	<i>Candida gropengiesseri</i>	03

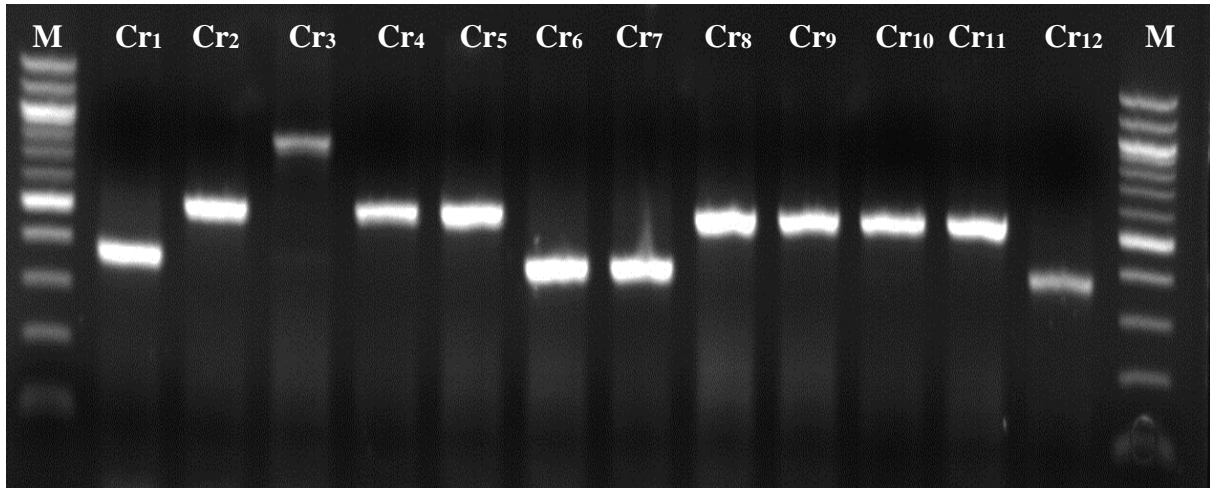
L'examen des résultats obtenus indique que 5 isolats de levures sélectionnés (**Cr<sub>1</sub>**, **Cr<sub>2</sub>**, **Cr<sub>6</sub>**, **Cr<sub>7</sub>** et **Cr<sub>12</sub>**) appartiennent au genre *Candida* (tableau 15), selon le guide de détermination de l'IFV (2012), tandis que les isolats **Cr<sub>1</sub>** et **Cr<sub>2</sub>** appartiennent aux espèces *Candida intermedia* et *Candida magnoliae* respectivement, alors que, les isolats (**Cr<sub>6</sub>**, **Cr<sub>7</sub>** et **Cr<sub>12</sub>**) ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *Candida gropengiesseri*. Par ailleurs, la combinaison des deux résultats (études morphologiques et moléculaires) indique que l'isolat (**Cr<sub>3</sub>**) appartient à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Le profil moléculaire des 6 isolats de levures (**Cr<sub>4</sub>**, **Cr<sub>5</sub>**, **Cr<sub>8</sub>**, **Cr<sub>9</sub>**, **Cr<sub>10</sub>** et **Cr<sub>11</sub>**) nous montre leur forte ressemblance à l'espèce *Pichia deserticola* selon le guide de détermination de l'IFV (2012).

**Tableau N° 16 :** Taille en paires de bases des produits de PCR et des fragments de restriction obtenus avec deux endonucléases différentes (Hinf I et HaeIII).

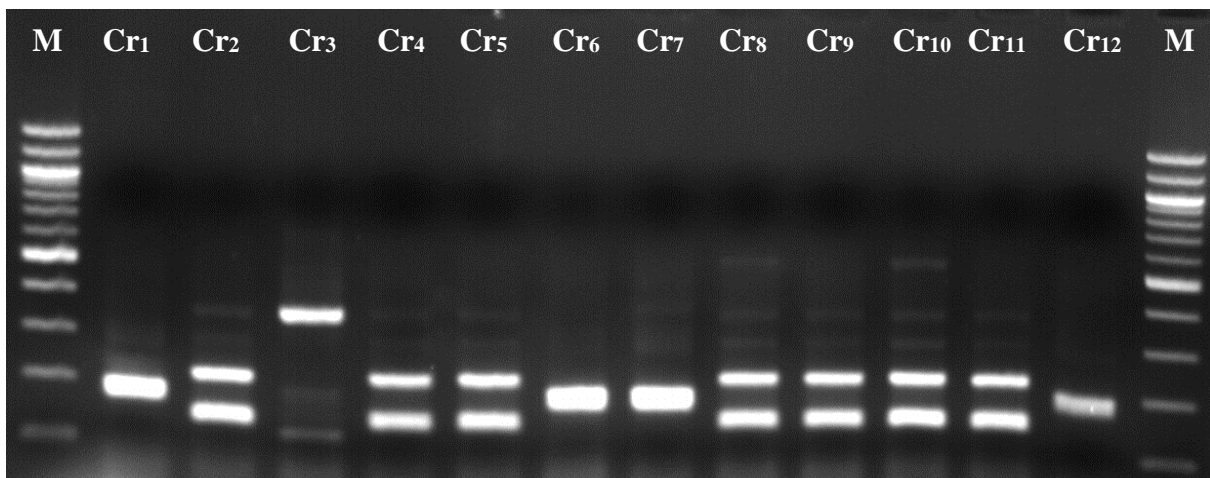
Espèces	ITS total (pb)	Fragments de restriction (pb)	
		Hinf I	HaeIII
<i>Candida intermedia</i> (Cr <sub>1</sub> )	400	210/190	400
<i>Candida magnoliae</i> (Cr <sub>2</sub> )	450	220/190	290/150
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Cr <sub>3</sub> )	850	370/360/110	320/230/170/120
<i>Pichia deserticola</i> (Cr <sub>4</sub> , Cr <sub>5</sub> , Cr <sub>8</sub> , Cr <sub>9</sub> , Cr <sub>10</sub> , Cr <sub>11</sub> )	450	250/210	280/100/80
<i>Candida gropengiesseri</i> (Cr <sub>6</sub> , Cr <sub>7</sub> , Cr <sub>12</sub> )	410	190	290/150

Les espèces de levures présentes sur la surface des baies de raisin sont significativement limitées en nombre, par contre, le moût de raisin Carignan est très riche en levures non *Saccharomyces* comme en témoignent les résultats obtenus (tableau). *Pichia deserticola* est l'espèce majoritairement isolée (**6 isolats**), suivi par d'autres espèces appartenant au genre *Candida* (**5 isolats**), et enfin une seule espèce de *Saccharomyces cerevisiae* a été isolée à partir du moût. La présence de levures non *Saccharomyces* dans les moûts de raisin a été largement documentée (**Fleet, 1997 ; Pretorius et al., 1999**), elles sont connues pour être le plus souvent associées aux fermentations du raisin, dont les genres *Pichia*, *Torulaspota*, *Candida* et *Hanseniaspora* prédominent, suivies et à moindre ampleur par les genres de *Kluveromyces* et *Metschikowia*. En outre, la variabilité des espèces au sein du même

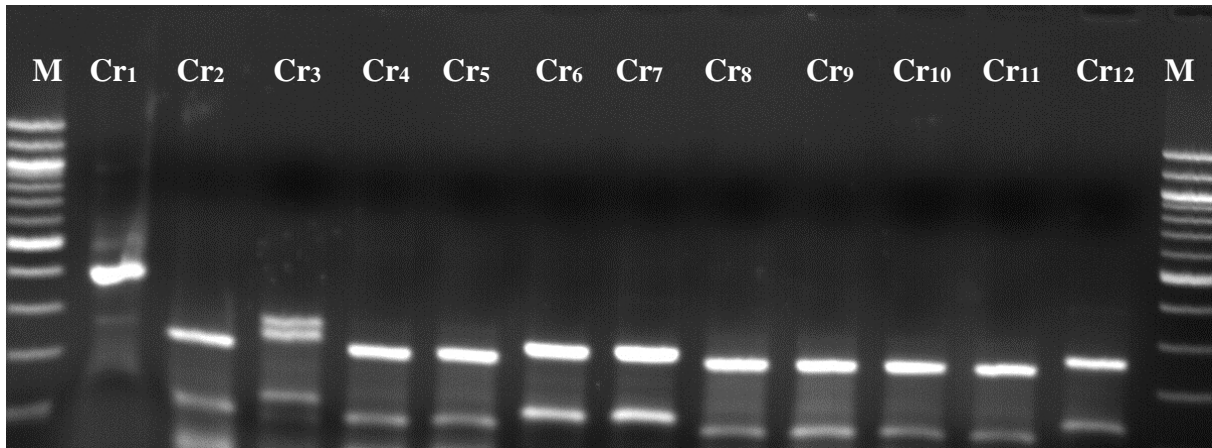
genre a été aussi rapportée, notamment dans le genre *Candida* (*C.intermedia*, *C.magnoliae* et *C.gropengiesseri*)



**Figure N° 32 :** Visualisation de la région (ITSI-ADNr5, 8S-ITSII) amplifiée chez les 12 isolats de Carignan.



**Figure N° 33 :** Visualisation de la région (ITSI-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la **Hinf I** chez les 12 isolats de Carignan.



**Figure N° 34 :** Visualisation de la région (ITS1-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la **Hae III** chez les 12 isolats de Carignan.

selon **Heard et al., (1988)**, différentes populations de levures non *Saccharomyces* poussent généralement plusieurs jours avant la fermentation, néanmoins, les espèces de *Candida* et *Pichia* persistent tout au long de la fermentation, bien qu'elles soient à un niveau inférieur aux souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

Les grappes de raisin Carignan constituent un réservoir naturel des levures non *Saccharomyces* indigènes. Ces espèces de levures ont été représentées par les espèces *C.intermedia*, *C.magnoliae*, *Pichia deserticola* et *C.gropengiesseri*, alors qu'un seul isolat (**Cr<sub>3</sub>**) a été identifié comme *Saccharomyces cerevisiae*. La croissance et/ou la persistance des différents espèces de levures non *Saccharomyces* dans les fermentations est probablement déterminée par différentes sensibilités à la température et à l'éthanol ainsi qu'à certains d'autres facteurs (**Fleet, 1997**). Par ailleurs, les températures de fermentation plus basses (entre 10 et 20°C) ont été montrées largement favorables pour la croissance et/ou la persistance des espèces *Pichia* et *Candida* (**Heard et al., 1988**), ceci probablement en raison de la tolérance de ces levures à l'éthanol produit à des températures plus basses (**Gao et al., 1988**). Dans le même sens et selon **Charoenchai et al., (1998)**, les espèces appartenant aux genres *Pichia* et *Candida* présentent des taux de croissance comparables à celui de *Saccharomyces cerevisiae* à basse température (10°C).

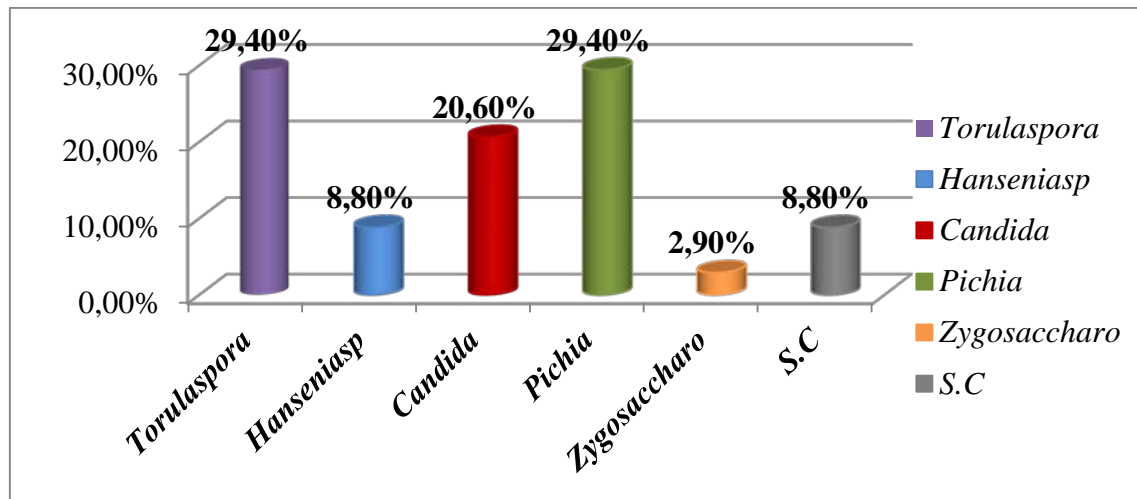
Il est couramment admis que le démarrage de la fermentation est réalisé par des levures non-*Saccharomyces*, fermentaires mais peu résistantes à l'éthanol (telles que *Pichia sp*, *Candida sp* *Hanseniospora Uvarum*, et *Torula sp*). Ces levures vont

rapidement être inhibées par leur propre production d'éthanol alors que les levures plus résistantes à l'éthanol se développent telles que les levures *Saccharomyces cerevisiae*).

### 3.5. Taux de répartition des différentes espèces de levures isolées

Les baies de raisin des 3 cépages abritent une grande variété de levures indigènes, nous avons étudiés la biodiversité des souches de *Saccharomyces cerevisiae* naturellement présentes dans les différents cépages algériens (Muscat noir, Cinsault et Carignan), mais d'autres levures indigènes non *Saccharomyces* ont été également isolées à partir de moûts des raisins. Les différentes espèces de levures ont été identifiées par les techniques moléculaires de PCR-Delta afin d'identifier les souches de *Saccharomyces cerevisiae*, et de PCR-ITS-RFLP pour connaître les autres espèces non *Saccharomyces*.

Parmi les 34 isolats isolés à partir des différents cépages, 3 isolats de levures appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (8,80%), les autres isolats représentent des espèces non *Saccharomyces*, ces isolats de levures ont été identifiés comme appartenant aux différents genres dont *Torulaspota* (29,40%), *Candida* (20,60%), *Pichia* (29,40%), *Hanseniaspora* (8,80%) et *Zygosaccharomyces* (2,90%) (Figure № 35). Par ailleurs, *Torulaspota delbrueckii* est l'espèce majoritairement isolée à partir des moûts de raisin de Muscat noir et de Cinsault, tandis que *Pichia deserticola* est l'espèce dominante dans le moût de raisin de Carignan. D'autres espèces appartenant aux genres *Hanseniaspora* et *Zygosaccharomyces* ont également été isolées en moindre proportion.



**Figure N° 35:** Fréquences des genres de levures isolés à partir des 3 cépages (Muscat noir, Cinsault et Carignan).

Les espèces de levures non *Saccharomyces* à la surface du raisin varient fortement au cours de la maturation. De la véraison à la maturation, une succession des levures NS est observée. Ainsi, à la véraison les grappes sont essentiellement colonisées par les levures Basidiomycètes (Exemple : *Cryptococcus*, *Rhodotorula*) et à maturité du raisin, les levures Ascomycètes ayant un métabolisme oxydatif ou faiblement fermentaires prennent le relai et deviennent majoritaires, c'est le cas des genres *Candida*, *Torulaspora*, *Hansaniaspora* et *Pichia*. Néanmoins, selon (**Pretorius et al., 1999**), *Torulaspora delbrueckii* est indéniablement l'espèce dominante représentant entre 50 et 75% de la population levurienne totale sur raisin mature alors que d'autres espèces appartenant aux genres *Candida* et *Hansaniaspora* sont présentes en faibles proportions. Toute fois, lorsque les baies de raisin sont sérieusement endommagées, l'augmentation de la concentration de sucre à la surface favorise le développement des levures Ascomycètes à forte activité fermentaire comme *Zygosaccharomyces spp* (**Barata et al., 2012**).

Concernant les levures *Saccharomyces* intervenant lors des fermentations spontanées, leur origines sont différemment rapportés, selon certains auteurs, *Saccharomyces cerevisiae* est indétectable sur le raisin (**Combina et al., 2005 ; Raspor et al., 2006**). En revanche, l'analyse directe de la présence des *Saccharomyces* rapportée par **Valero et al., (2007)**, en utilisant du raisin récolté aseptiquement et aussitôt mis en fermentation dans des conditions stériles, montre que 68% des échantillons sont parties

en fermentation, dont 42% ont été complètes et 28% ont été dominées par *S. cerevisiae*. Dans une autre étude basée sur la manipulation aseptique du raisin, il a été démontré que les espèces principalement observées au cours de la fermentation sont *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* (Clemente *et al.*, 2004). Ces études montrent, en effet, que l'espèce *S. cerevisiae* peut être trouvée sur le raisin, avec dans certains cas un taux suffisant pour amorcer la fermentation (Schuller *et al.*, 2005).

#### 4. Identification Biotechnologique des souches de *Saccharomyces cerevisiae*

##### 4.1. Résultats du dosage de CO<sub>2</sub> et d'éthanol chez les souches de *S.C*

La fermentation est un processus métabolique convertissant généralement des glucides en gaz et en alcools pour extraire une partie de l'énergie chimique tout en réoxydant les coenzymes réduites par ces réactions (Divol, 2004). La fermentation alcoolique est réalisée notamment par les levures et convertit des glucides tels que le glucose, le fructose et saccharose, diholoside formé des deux précédents en éthanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) et dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> avec production d'une faible quantité d'énergie métabolique sous forme d'ATP (Timson, 2007). Le métabolisme énergétique de *Saccharomyces cerevisiae* peut être de type respiration aérobie (chaînes respiratoires mitochondriales) ou fermentatif (fermentation alcoolique). En présence de fortes concentrations en sucres comme le glucose, le fructose ou le saccharose (par exemple supérieures à 1.5 à 2.5 g/L), en condition aérées, *S.c* adopte un métabolisme énergétique essentiellement fermentatif (à 80%) et très peu de glucose est respiré (Sonderegger et Sauer, 2003).

Afin de caractériser les souches de *Saccharomyces cerevisiae* à l'échelle biotechnologique, un test de fermentation alcoolique est réalisé pour mesurer la capacité de ces souches à produire le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> et de l'éthanol. Les 3

souches de *S.c* **Mn<sub>11</sub>** (AT), **Cn<sub>11</sub>** (MOS) et **Cr<sub>3</sub>** (MOS) sont examinées afin de calculer l'accumulation de CO<sub>2</sub> produit ainsi que l'éthanol durant la fermentation alcoolique. Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau N° 17**.

**Tableau N° 17:** Quantités de CO<sub>2</sub> et d'éthanol résultant de la fermentation alcoolique des souches de *S.C*.

Souches	Quantité du CO <sub>2</sub> (moles)	Quantité d'éthanol (mg)
<b>Mn<sub>11</sub></b> (9 <sup>ème</sup> J) (AT)	$9,14.10^{-4} \pm 3,42.10^{-5}$	$38,4 \pm 9,45$
<b>Cn<sub>11</sub></b> (9 <sup>ème</sup> J) (MOS)	$10,26.10^{-4} \pm 7,74.10^{-5}$	$43,09 \pm 32.46$
<b>Cr<sub>3</sub></b> (9 <sup>ème</sup> J) (MOS)	$7,95.10^{-4} \pm 3,42.10^{-5}$	$33,39 \pm 14.34$

Chaque souche de levure *S.C* est examinée 3 fois (3 répétitions pour chacune).

D'après les résultats du **tableau N° 17**, on remarque que les 3 souches **Mn<sub>11</sub>** (9<sup>ème</sup> J) (AT), **Cn<sub>11</sub>** (9<sup>ème</sup> J) (MOS) et **Cr<sub>3</sub>** (9<sup>ème</sup> J) (MOS) produisent des quantités importantes et non négligeables de CO<sub>2</sub> et d'éthanol lors de la fermentation. La plus grande quantité de CO<sub>2</sub> est estimée chez la souche **Cn<sub>11</sub>** (9<sup>ème</sup> J) (MOS) ( $10,26.10^{-4}$  moles  $\pm 3,42.10^{-5}$ ) avec un taux d'éthanol de **43,09 mg  $\pm 32.46$** . Tandis que les souches **Mn<sub>11</sub>** (9<sup>ème</sup> J) (AT) et **Cr<sub>3</sub>** (9<sup>ème</sup> J) (MOS) présentent des quantités de CO<sub>2</sub> et d'éthanol variables qui sont de l'ordre de  $9,14.10^{-4} \pm 3,42.10^{-5} / 38,4$  mg  $\pm 9,45$  et  $7,95.10^{-4} \pm 3,42.10^{-5} / 33,39$  mg  $\pm 14.34$  respectivement. Quantitativement, les résultats

obtenus montrent l'existence d'un pouvoir fermentaire très remarquable chez les 3 souches de *Saccharomyces cerevisiae* puisque la quantité de glucose fournie a été complètement convertie en gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) et en éthanol. En anaérobie, les levures sont capables de fermenter le glucose en éthanol, en dioxyde de carbone, avec production de glycérol, de certains acides et esters (Leyral et Vierlin, 2007 et Lai, 2010). Le bilan énergétique de cette fermentation est décrit par l'équation qui suit :



Cependant, le métabolisme des levures est orienté par la source carbonée et les conditions environnementales pour être oxydatif ou fermentaire. Dans la voie de dégradation des glucides, la glycolyse convertit les sucres en pyruvate et l'entrée dans cette voie varie selon le glucide, tandis que la destinée du pyruvate dépend à la fois du sucre utilisé et de l'espèce de levure considérée (Merden, 2007). Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* Mn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> J) (AT), Cn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> J) (MOS) et Cr<sub>3</sub> (9<sup>ème</sup> J) (MOS) dégradent le glucose par un métabolisme fermentatif, ceci nous a permis ensuite de calculer les produits formés (CO<sub>2</sub> et l'éthanol). Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif.

Les levures sont actuellement utilisées à l'échelle industrielle pour la panification, la production de protéines hétérologues, de molécules pharmaceutiques ou d'éthanol carburant. La mise en œuvre de la levure dépend de la production, par exemple les produits issus de la panification et les protéines recombinants sont produits en métabolisme oxydatif, alors que la production d'éthanol carburant est réalisée en métabolisme fermentaire (Wei *et al.*, 2007). La levure *Saccharomyces cerevisiae* utilise le glucose comme substrat et elle le fermente premièrement en pyruvate (1 molécule de glucose donne 2 molécules de pyruvate) par la voie de la glycolyse, ensuite, elle transforme le pyruvate en éthanol par fermentation alcoolique. En fermentation anaérobie, 95% des sucres consommés par la levure sont transformés en CO<sub>2</sub> et éthanol (Van *et al.*, 2007).

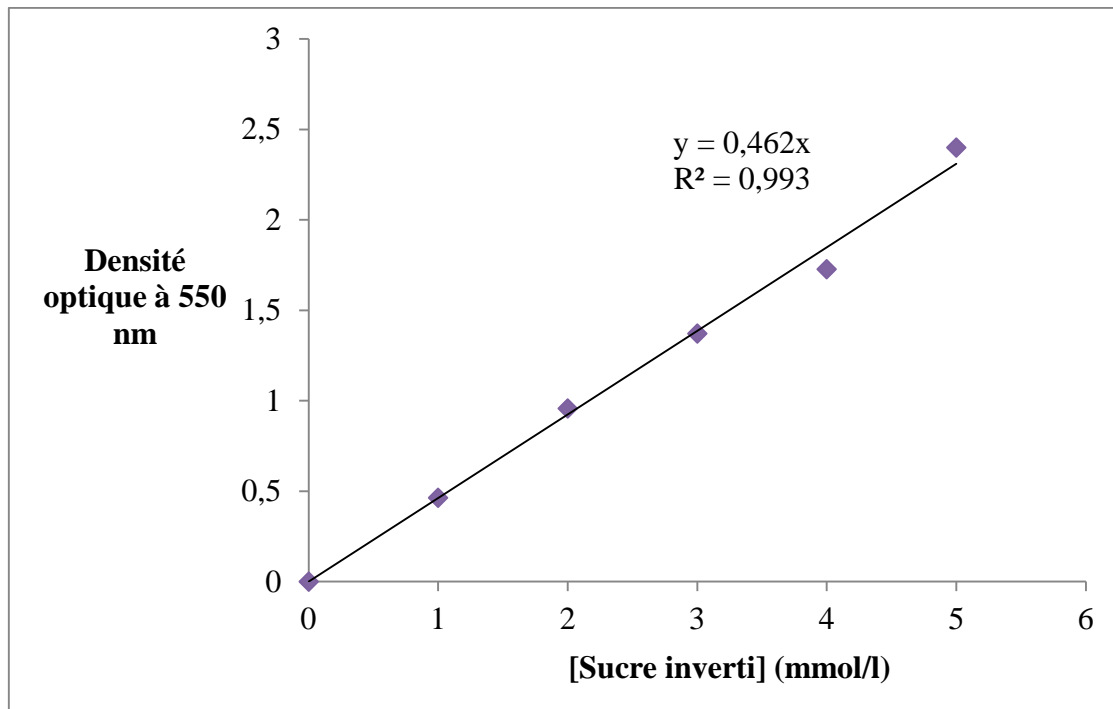
Il existe différents domaines d'utilisation des levures, parmi lesquels figurent la panification et la fabrication d'éthanol industriel, c'est ainsi que les espèces de *S.c*

isolées des différents cépages peuvent servir dans le domaine industriel, notamment pour la production de dioxyde de carbone et d'éthanol.

### 4.2. Résultats de l'activité enzymatique de l'invertase chez les souches de *Saccharomyces cerevisiae*

La fabrication de substances utiles conduit à une gamme de produits très variés et révèle des possibilités infinies chez les micro-organismes. La production de molécules d'intérêt, ainsi que le traitement des déchets passera de plus en plus par la mise en œuvre d'enzymes ou de cellules entières. Parmi les micro-organismes d'intérêt industriel, on trouve la souche *Saccharomyces cerevisiae*. Elle a un rôle important dans le domaine alimentaire où elle fait l'objet d'une production de masse pour servir de levure de boulangerie ou pour la synthèse d'enzymes. L'invertase est l'enzyme caractéristique de cette souche. Elle catalyse l'hydrolyse du saccharose en sucre inverti utilisé dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité enzymatique de l'enzyme invertase chez les 3 souches de *Saccharomyces cerevisiae* **Mn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> J) (AT)**, **Cn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> J) (MOS)** et **Cr<sub>3</sub> (9<sup>ème</sup> J) (MOS)** isolées à partir des cépages (Muscat noir, Cinsault et Carignan). Cette activité  $\beta$  fructosidasique est estimée par la quantité de produits formés de glucose et de fructose en fonction du temps. Ces produits sont ensuite révélés grâce à leurs propriétés réductrices par un réactif chimique, le 3,5 dinitrosalicylique (DNS). En milieu alcalin et à chaud, ce dernier réagit avec les sucres réducteurs et sa coloration vire au rouge-orange. La quantité de sucre inverti (glucose et fructose) libérée lors de la réaction enzymatique est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage (**Figure N° 36**), ainsi l'activité enzymatique de l'invertase est définie comme le nombre de micro-moles de saccharose hydrolysée par minute ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{m}^{-1}$ ).



**Figure № 36 :** Droite d'étalonnage pour la méthode de DNSA.

En se basant de la courbe d'étalonnage, nous avons pu déterminer pour les 03 souches de *S.C* les concentrations de sucre inverti (glucose et fructose) libérées lors de la réaction enzymatique. Ces concentrations sont estimées à 1,54 mmol/l, 1,46 mmol/l et 1,34 mmol/l chez les souches **Cn<sub>11</sub>**, **Mn<sub>11</sub>** et **Cr<sub>3</sub>** respectivement (**Tableau № 18**). Ces valeurs obtenues nous permettent de déduire que le nombre de micro-moles de saccharose hydrolysé par minute chez ces souches est très important, les concentrations étant respectivement de l'ordre de 1540  $\mu\text{mol/l/min}$ , 1460  $\mu\text{mol/l/min}$  et 1340  $\mu\text{mol/l/min}$ . C'est ainsi que l'on peut affirmer qu'il existe une seule enzyme qui peut provoquer la dégradation de saccharose en glucose et fructose (Invertase), grâce à la compatibilité existant entre le substrat et l'enzyme, donnant ainsi un produit. Il se révèle aussi, que la souche **Cn<sub>11</sub>** est une souche saccharolytique possédant une activité  $\beta$ -fructofuranosidase élevée.

**Tableau № 18 :** Résultats de l'activité enzymatique de l'invertase chez les souches de *S.C*.

Souches	Densité optique à 550 nm	Concentrations de sucre inverti (mmol/l)	Activité enzymatique ( $\mu\text{mol/l/min}$ )
<b>Mn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> J)</b> (AT)	0,673	1,46	1460
<b>Cn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> J)</b> (MOS)	0,71	1,54	1540
<b>Cr<sub>3</sub> (9<sup>ème</sup> J)</b> (MOS)	0,62	1,34	1340

L'intensité de la coloration est proportionnelle aux quantités de glucose et fructose libérées dans le milieu réactionnel à la suite de l'hydrolyse du saccharose (**Loncle, 1992**). L'invertase est produite par une large variété de micro-organismes (**Rubio et al., 2006**), parmi les quels on peut citer les levures appartenant aux genres *Saccharomyces* et *Candida* (**Ghetou et al., 2004**). Cependant, chez les levures on retrouve des invertases endo et exo-cellulaires (**Chu et al., 1985**). L'invertase endocellulaire est obtenue à partir de la levure de bière *Saccharomyces cerevisiae* par lyse des cellules. L'hydrolyse du saccharose est complexe car de nombreuses variables conditionnent la productivité, parmi les quelles la température, le pH, l'agitation ...etc (**Chang et al., 1996**). La présence de fructofuranisidase chez nos souches de *S.C* pourrait trouver des applications en biotechnologie alimentaire.

Les enzymes saccharolytiques sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour hydrolyser le saccharose en glucose et fructose plus solubles ce qui permet en confiserie de faire des bonbons dont la partie centrale reste liquide. L'invertase sert également à fabriquer du miel artificiel (**Santana et al., 2005**).

### 5. Discussion générale

D'une manière générale, en microbiologie des levures, l'étude se fait sur des cellules vivantes et permet de visualiser la morphologie cellulaire des souches. L'observation microscopique fait apparaître des cellules de formes ovoïdes, cylindriques et sphériques. Les levures possèdent différents types de bourgeonnements (monopolaire, bipolaire et multipolaire). La formation de ces derniers est influencée par plusieurs facteurs, parmi lesquels l'hétérothalisme c'est-à-dire pour que la sporulation puisse avoir lieu, les types sexués doivent être compatibles. La composition du milieu est aussi un facteur important avec notamment, la présence d'une source de carbone fermentescible, d'une teneur en azote limitante et une bonne aération, nécessaires pour la sporulation (**Bourgeois et al., 1998**). Par ailleurs, la réduction de la concentration en oxygène dissout peut stimuler la formation des spores chez certaines espèces d'*Hanseniaspora* et enfin, le facteur température ou la plupart des espèces sporogènes

sporulent entre 18 et 20°C, alors que les valeurs de 12 à 15°C sont favorables pour *Metschnikowia* (Larpent, 1997).

Par rapport aux résultats obtenus et en référence aux nombreuses études, il s'avère que la morphologie des micro-organismes est sujette à des variations prononcées en fonction de l'espèce, ses particularités et ses conditions de culture. Ce polymorphisme contribue à rendre difficile leur dépistage et leur identification par simple observation microscopique (Thuriaux, 2004). Les techniques moléculaires facilitent l'investigation du génome des levures par amplification, d'une part des génomes situées entre les éléments Delta grâce à la **PCR-Delta** afin de différencier entre les espèces *Saccharomyces* et non *Saccharomyces*, et d'autre part d'amplifier des régions (ITS1-5,8S-ITS2) situées en tandem dans l'ADNr par **PCR-ITS-RFLP**. Ces régions sont très conservées au cours de l'évolution (Turner, 2000).

Cependant, une forte relation existe entre la diversité phénotypique et la diversité moléculaire, il n'y a pas de doute que les deux sont responsables de la variation phénotypique et de son évolution et que la diversité moléculaire des souches constitue bien entendu le fondement de la diversité phénotypique (Janvier, 2007).

Les baies de raisin des cépages étudiés (Muscat noir, Cinsault et Carignan) présentent une grande variété de levures indigènes. Ceci nous a permis de mettre en évidence une biodiversité des souches, dont *Saccharomyces cerevisiae* naturellement présentes dans ces cépages, mais aussi d'autres levures indigènes non *Saccharomyces*. Les souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* isolées se caractérisent par leurs puissants pouvoirs fermentaires, produisant des quantités importantes de CO<sub>2</sub> et d'éthanol, ainsi que la présence de l'enzyme l'invertase. Ces souches pourraient ainsi trouver des applications en biotechnologie alimentaire comme par exemple la panification et la confiserie. L'invertase, produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae*, est principalement employée dans l'industrie agroalimentaire (confiserie) où le fructose est préféré au lieu du saccharose car étant plus doux et ne se cristallise pas facilement.

Les levures constituent une source importante de synthèse de diverses enzymes utilisées dans l'industrie. L'invertase est l'une de ces enzymes, elle est sécrétée par

diverses levures et utilisée industriellement pour produire du glucose et du fructose invertis. (**Didier, 1996; Haq et al., 2002**). Ces sucres sont employés en agro-alimentaires (confiseries, biscuiteries, ... etc.), ils sont préférés au saccharose parce que ils sont doux et ne cristallisent pas. En Algérie cette enzyme est importée en totalité.

---

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

Actuellement, la combinaison de diverses caractéristiques morphologiques (forme et mode de reproduction végétative), physiologiques, biotechnologiques et moléculaires permet l'identification et la classification correcte des micro-organismes.

Une approche génétique a été développée dans ce travail et a permis une identification de 34 isolats de levures à partir du raisin issu des cépages algériens (Muscat noir, Cinsault et Carignan). Nos premiers travaux ont permis de mettre en avant une méthode d'isolement et de conservation des levures par des stries successives sur un milieu de culture spécifique (YPG+Gentamycine), suivie d'une étape dite d'enrichissement et de réactivation, considérée comme étape clé afin d'optimiser le taux de recouvrement de la population levurienne. D'autre part, l'application des techniques moléculaires (PCR-Delta et PCR-ITS-RFLP) aux levures des terroirs reconnus tels que les raisins est assez sensible pour détecter les différences entre les communautés fongiques d'un cépage à l'autre et répond ainsi à un besoin autant en recherche qu'en industrie. Les baies de raisin des cépages Muscat noir, Cinsault et Carignan constituent un excellent réservoir de levures comme en témoignent les résultats obtenus. Ces derniers ont montré que les 34 souches isolées sont génétiquement éloignées les unes des autres. Néanmoins en parallèle, une étude culturale (macro et microscopique) des souches de levures isolées a permis de renforcer davantage l'étude moléculaire. Globalement, des différences notables sont retenues entre les différents cépages quant à la répartition qualitative et quantitative des espèces levuriennes :

- ✓ Pour le cépage Muscat noir : 11 isolats de levures ont été identifiés comme appartenant à 4 genres et 6 espèces différents : *Torulasporea delbrueckii* (4 souches), *Hanseniaspora uvarium* (03 souches), *Candida solani* (01 souche), *Candida pseudointermedia* (01 souche), *Torulasporea pretoriensis* (01 souche) et *Saccharomyces cerevisiae* (01 souche).
- ✓ Pour le cépage Cinsault : 11 isolats de levures appartiennent à 04 genres et 04 espèces différentes : *Pichia fermentans* (04 souches), *Torulasporea delbrueckii* (05 souches), *Zygosaccharomyces microellipsoide* (01 souche) et *Saccharomyces cerevisiae* (01 souche).

- ✓ Pour le cépage Carignan : 12 isolats de levures identifiés comme appartenant à 03 genres et 05 espèces différentes : *Pichia deserticola* (06 souches), *Saccharomyces cerevisiae* (01 souche), *Candida gropengiesseri* (03 souches), *Candida intermedia* (01 souche) et *Candida magnoliae* (01 souche).

Parmi les 34 souches isolées à partir des mouts, 03 d'entre elles appartiennent à l'espèce de *Saccharomyces cerevisiae*, les souches restantes sont considérées comme espèces non *Saccharomyces*.

Les souches appartenant à l'espèce de *Saccharomyces cerevisiae* se propagent par bourgeonnement monopolaire, ayant des formes végétatives ovoïdes, caractérisées par leur puissant pouvoir fermentaire c'est-à-dire une forte capacité de production de CO<sub>2</sub> et d'éthanol (10,26.10<sup>-4</sup> moles/43,09 mg, 9,14.10<sup>-4</sup>/38,4 mg et 7,95.10<sup>-4</sup>/33,39 mg pour respectivement les souches Mn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> j), Cn<sub>11</sub> (9<sup>ème</sup> j) et Cr<sub>3</sub> (9<sup>ème</sup> J)), et avec la présence de l'enzyme l'invertase qui permet l'hydrolyse de saccharose en glucose et fructose.

Les souches espèces non *Saccharomyces* quant à elles, se multiplient par différents modes de reproduction végétative (monopolaire, bipolaire et même multipolaire), caractérisées par des formes végétatives allongées ou courtes de type cylindrique, parfois sphérique.

Enfin, les outils de la biologie moléculaire ont apporté une révolution notoire dans les tests d'identification précise des levures. Les deux techniques moléculaires utilisées dans notre étude (PCR-Delta et PCR-ITS-RFLP) restent fiables, néanmoins une confirmation avec d'autres enzymes de restriction (HhaI, CfoI, TaqI...etc) est indispensable, avec un séquençage approprié pour diversifier l'intra spécifique. Au terme de cette étude, nous recommandons les investigations visant à caractériser biotechnologiquement les souches de *Saccharomyces cerevisiae* identifiées, et encourageons toutes les études s'intéressant à l'identification et la caractérisation des levures issues d'autres cépages dans toutes les régions d'Algérie.

---

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Alfenore S, Molina-Jouve C, Guillouet SE, Uribelarrea JL, Goma G, Benbadis L. (2002).** Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl Microbiol Biotechnol* P: **67-72**

**Amerine, M. A., Berg, H. W., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L., Webb, A. D. (1982).** The technology of wine making. AVI Publishing Company, Westport.

**Arnaud C. et Deluc J.M. (2007).** Le vin essence de vie. Ed.DIE. Paris. P: **3**

**Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. (1989).** Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, New York.

**Ausubel, F.M., F. Katagiri, M. Mindrinos and J. Glazebrook. (1995).** Use of *Arabidopsis thaliana* defense-related mutants to dissect the plant response to pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. P: **4189-4196**.

**Ayoub M.J. (2006).** Molecular and phenotypical diversities of autochthonous oenological *Saccharomyces cerevisiae* strains from Lebanon, thèse de doctorat en Microbiologie et Génétique Moléculaire. Ed. Institut National Agronomique Paris-Grignon.

**Barata A ., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2012).** The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. P: **243-259**.

**Bely M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., and Dubourdieu, D. (2008).** Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. P: **312 - 320**.

**Bettane M., Desseauve T. (2010).** Le grand guide de Vin de France. Ed. la Martinière 2010. P : **38**.

**Blin C.P. (2002).** Etude comparative du catabolisme de l'acide ricinoléique chez les levures du genre *Sporidiobolus* : mise en évidence et caractérisation du système bêta-oxydase impliqué. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation. Université de Bourgogne, France.

**Blouin J. (2007).** Les parasites de la vigne. Stratégie de protection raisonnée. Traduit de l'espagnol sous la direction de Daniel Gouadec par Gaulou-Brain.J et Amos-Sanchez. Ed. Dunod 2007. P: **138-145**.

**Bokulich Nicholas A., Moe Ohta, Paul M. Richardson, David A. Mills. (2013).** Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. *PLoS ONE*, **8** (6), e66437.

- Bouchet P., Guignard J.L., Pouchus Y.F., Villard J. (2005).** Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. 2<sup>ème</sup> édition.07/2005. Elsevier Masson. P : **125-130**.
- Bouix M., Leveau J.Y. (1991).** Les levures *Ds* : Bourgeois C.M., Leveau Y.J. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 21. Lavoisier-Tec&Doc. P : **206-229**.
- Bouix M., Leveau J.Y. (1999).** Production des enzymes. In : Scriban R. (Ed) : Biotechnologie. Ed. Lavoisier. P : **334**.
- Boulouis P., Haddad N., Maillard R. (2001).** Techniques d'étude moléculaire des isolats : principe et fiabilité. *Revue. Épidémiologie et Santé Animale*. P : **39-21-29**.
- Bourat G. (1992).** Propriétés des micro-organismes, traité génie des procédés. Journal de technique de l'ingénieur, PARIS. Volume 6.
- Bourgeois C.M et Larpent J.P. (1996).** Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2. Ed. France. P : **35-130**.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J. (1998).** Microbiologie alimentaire. Tome 1, Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire, Technique et Documentation Lavoisier, Paris. P: **161-171**.
- Botstein D., White RL., Skolnick M., Davis R.W. (1980).** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Free PMC Article.
- Bruns TD., White TJ et Taylor JW. (1991).** Fungal molecular systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 22. P : **525-564**.
- Cadet A. (2005).** Le cépage *vitis vinifera* L. CV FER Servaradou : étude de la nutrition minéral et des relations cépages ; terroir, qualité de vin. Thèse. Institut National polytechnique de Toulouse France.
- Cadez N., Zupan j., Raspor P. (2010).** The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Research*. P: **619-630**.
- Cahagnier, B., Dragacc, S., Frayssinet, C., J.M. Frémy, Hennebert, G.L., Lesage-meessen, L., Multon, J.L., Richard-Molard, D. & Roquebert, M.F. (1998).** Moisissures des aliments peu hydrates. *Lavoisier Tec&Doc*, France.

**Chang H.N., Seong G.H., Yoo I.K., Park J.K., Seo J.H. (1996).** Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquid-core alginate capsules. *Biotechnology and Bioengineering*. 51. P: **157-162**.

**Chu F.K., Takase K., Guanino D., Maley F. (1985).** Diverse properties of external and internal forms of yeast invertase derived from the same gene. *Biochemistry*. 24. P : **6125-6132**.

**Callon M., Foray D. (1997).** Introduction : Nouvelle économie de la Science ou socio-économie de la recherche scientifique. *Revue d'économie industrielle*. Volume 79. P : **13-35**.

**Camonis J.H. (1990).** Modulation de l'activité des protéines RAS et régulation du cycle de division cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat. Paris. P : **196**.

**Carbonneau A., Deloire A. et Jaillard B. (2007).** La vigne : physiologie, terroir, culture. Ed. Dunod. Paris. P : **9-42**.

**Castellucci F. (2011).** Outils de la biologie moléculaire pour l'identification de la levure de la vinification *Saccharomyces cerevisiae* et d'autres espèces liées à la vinification. Antoine Van Leeuwenhoek 78 P: **87-97**.

**Chaari K., Ben saleh R. (2009).** Cours de Biochimie II. Université Virtuelle de Tunis.

**Chantal, G. (1996).** Caractérisation génétique des régions ITS des *phytophthora* spp qui causent le pourridié des racines du framboisier au québec. Thèse de Doctorat, Université de Laval. Département de phytologie. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation.

**Charoenchai, C., G. H. Fleet, and P. A. Henschke. (1998).** Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* P: **283-288**.

**Ciani M., Maccarelli F. (1998).** Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* P: **199-203**.

**Ciani M., Picciotti G. (1995).** Validity of Genevois' equation in wine yeast selection. *Ann. Microbiol. Enzim.* P : **201-207**.

**Clavijio A., Calderon I., Paneque P. (2010).** Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology*. P : 241-245.

**Claude J., Kaplan M et Delpech. (2007).** Biologie moléculaire et médecine, 3<sup>ème</sup> édition Lavoisier. Paris. P : 848.

**Clemente-Jiménez J.M., Mingorance-Cazorla L., Martinez-Rodriguez S., Rodriguez-Vico F. (2004).** Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*. P : 149-155.

**Cofalec. (2006).** Caractérisation des levures de boulangerie. Adopté par Comité de fabrication de levures de panification de l'union européenne. Paris. P: 1-10.

**Combina M., Mercado L., Borgo P., Elia A., Jofré V., Ganga A., Marinez C., Catania C, (2005).** Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*. P: 1055-1061.

**Cordero-Bueso G., Arrayo T., Serrano A., Tello J., Aporta I., Vélez MD, Valero E. (2011).** Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. P : 132-139.

**De Vroey C. (2002).** Extraction d'ADN, cours. ED. Université Libre de Bruxelles.

**Didier P. (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. Ed. Ellipes. Paris.

**Divol B. (2004).** Caractéristiques des souches de *Saccharomyces cerevisiae* responsables de refermentations, thèse de doctorat. Ed. Institut National de Polytechnique Toulouse France.

**Esteve-Zarzoso B, Gostíncar A, Bobet R, Uruburu F, Querol A (2000).** Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedès' area (Spain). *Food Microbiol.* P : 553-562.

**Etiénne E, Cilauser et Honsset P. (2006).** Roingre and Masson. Biochimie génétique 9<sup>ème</sup> édition. P : 294.

**Filofteia C. (2010).** Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'Université de bourgogne discipline : Sciences de l'alimentation. Université de bourgogne, Institut universitaire de la vigne et du vin (Institut jules guyot) 193. P: 1-58.

**Fleet, G. H. (1997).** Food fermentations wine. *In* M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.), Food microbiology: fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington, D.C. P: **671-694**.

**Fleet, G. H. (1998).** The microbiology of alcoholic beverages. *In* B. J. B. Wood (ed.), Microbiology of fermented foods, 2nd ed., vol. 1. Blackie Academic & Professional, New York, N.Y. P: **217-262**.

**Fleet, G. H., and G. M. Heard. (1993).** Yeasts growth during fermentation. *In* G. H. Fleet (ed.), Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers, Philadelphia. P: **27-54**.

**Fleet G. H (2008)** .Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Res. P: **979-995**.

**Galet P. (1991).** Précis de pathogènes viticoles. Dehan, Montpellier, France.

**Ganter P. F., 2006. Yeast and Invertebrate Associations. In D. G. Péter & P. C. Rosa (2006).** (Éd.), Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. P: **303-370**. Springer Berlin Heidelberg.

**Gao, C., and G. H. Fleet. (1988).** The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* P: **405-410**.

**Ghetou M, Brahim G. (2004).** Improvement of *Aspergillus niger* invertase production stationary fermentative systems-Roum. Biotechnology.Lett. 9 (6). P: **1933-1938**.

**Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H. & Davis R.W. (1996).** Life with 6000 genes. *Sciences.* P : **563-574**.

**González SS, Barrio E, Querol A. (2007).** Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *J Appl Microbiol* 102:1018-1025.

**Guillaume G. (2001).** Bases scientifiques et technologiques de l'œnologie. Ed. Lavoisier. Paris. P : **4-67**.

**Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD. Paris. P : **651-655**.

**Guiraud J.P et Rose J.P. (2004).** Pratique de normes en microbiologie alimentaire AFNOR. P : **228-235**.

**Guiraud J, Galzy P (1998).** L'analyse Microbiologique dans les industries alimentaires (ed) JP Guiraud et P Galzy Paris. P : **43-92**.

**Haq I, Shafiq K., Ali S., Qadeer M-A. (2002).** Production of enzyme invertase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Indus. J. Plant Sci.* P : **55-60**.

**Heard, G. M., and G. H. Fleet. (1988).** The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* P: **23-28**.

**Heard, G. M., and G. H. Fleet. (1985).** Growth of natural yeast flora during fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.* P: **727-728**.

**Heard, G. M., and G. H. Fleet. (1986).** Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Aust.* P: **22-25**.

**Hernández-Lopez, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., Ferreira, V. (2008).** The development of varietal aroma from non-fermented grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry.* P : **1064 - 1077**.

**Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P.J., Cabezudo, M.D. (1990).** The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture.* P : **313 - 318**.

**Hédalgo L, Jack B, Jeane C. (2005).** Taille de la vigne. Paris. P : 1. Institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne (I.T.A.F). (2000) : Guide variétal de la vigne. Ed. Blida. P : **10-28**.

Institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne (I.T.A.F), (2000) : Guide variétal de la vigne. Ed. Blida. PP : **10-28**.

Institut français de la vigne et du vin (IFV) de Nantes, (2012).

**Janvier C., (2007).** Recherche d'indicateurs de la santé des sols, thèse de doctorat. Ed. Institut National Agronomique. Paris-Grignon.

**Labrecque M.H. (2003).** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Mémoire du grade de maître des sciences (M. Sc.). Ed. Université Laval.

**Lafon-Lafourcade, S. (1983).** Wine and brandy. In: Biotechnology (Ed: Reed G.). Verlag Chemie, Heidelberg. P : **81-161**.

- Lai Q.P. (2010).** Utilisation des levures non-*Saccharomyces* en œnologie : études des interactions entre *Torulasporea delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
- Larpent J.P. (1991).** Biotechnologie des levures. Ed. Masson. Paris. P : **266-373**.
- Larpent J. P. (1992).** La microbiologie de la fermentation panaière. (Ed) Technologie et documentation. Cedex. P : **51**.
- Larpent J.P et Larpent-Gourgoud M. (1997).** Mémento technique de microbiologie. 3<sup>ème</sup> édition, Lavoisier-Ted&Doc, Paris. P : **217-240**.
- Larpent J. P., Gourgoud M. (1985).** Elément de microbiologie. Ed. Herman. Paris. P : **464**.
- Larpent-Gourgoud M. et Sanglier J-J. (1992).** Biotechnologie. Principes et méthodes. Ed. DOIN. Paris. P : **569**.
- Leclerc H. Meyer A. et Deiana J. (1995).** Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et techniques. DOIN éditeurs, Paris. P : **73-92**.
- Legras J-L. Karst F (2003).** Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. FEMS Microbiology Letters, 221. P : **249-255**.
- Leyral G. & Vierlin E. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments: Hygiène et sécurité alimentaires, édit Wolters Kluwer, Amsterdam. P : **287**.
- Loncle D. (1999).** Génie enzymatique. Paris. DOIN. P : **24-259**.
- Luc P. (2005).** Identification d'un substrat naturel de l'endoprotéase YAPSINE 1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat. Université Laval. Faculté des sciences et de génie.
- Maftah A. et Julien R. (1999).** Biologie moléculaire, 2<sup>ème</sup> édition. Dunod. P : **1-121**.
- Marden J. P. (2007).** Contribution à l'étude du mode d'action de la levure *saccharomyces cerevisiae* sc 47 chez le ruminant : Approche thermodynamique chez la vache laitière. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
- Marlène COT. (2006).** Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol. Thèse Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. France.
- Martini A. (1993).** Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research*. P : **165-176**.

- Mercier C. (1997).** Transgènes et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à des fins nutritionnels. In : Frenet G. (Ed), intérêts nutritionnels et diététique du lait de chèvre. Nord-France. P: **169-177**.
- Mora. J and Mulet. A (1991).** Effects of Some Treatments of Grape Juice on the Population and Growth of Yeast Species During Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*. P: **133-136**.
- Mortimer.R and Polsinelli. M (1999).** On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*. P: **199-204**.
- Moulessehoul. S (2006).** Biologie moléculaire. Ed. Alger. P : **8-42**.
- Navarre C. (1998).** Œnologie, 4<sup>ème</sup> édition. Ed. Lavoisier Tec&Doc. France. P : **1-91**.
- Navarre C. (2010).** Œnologie, 7<sup>ème</sup> édition. Ed. Lavoisier Tec&Doc. Paris France. P : **15-87**.
- Ness. F, Lavallée. F, Dubourduo. D, Aigle. M, Dulau. L. (1993).** Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food Agriculture*. P: **89-94**.
- Nisiotou, A. and G.-J.E. Nychas, 2007.** Yeast Populations Residing on Healthy or Botrytis-Infected Grapes from a Vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8). P: **2765-2768**.
- Ocón Elena, A. R. Gutiérrez , Patrocinio Garijo, Pilar Santamaría. (2010).** Quantitative and qualitative analysis of non-Saccharomyces yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. *European Food Research and Technology*. P: **885-891**.
- Ortiz M J, Barrajón N, Baffi M A, Villena M A, Briones A (2013).** Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties. *LWT - Food Sci Technol* P:**372-377**.
- Oteng-Gyang K. (1984).** Introduction à la microbiologie dans les pays chaud. Ed. Lavoisier. Paris. P : **43-46**.
- Pierre T. (2004).** Les organismes modernes. La levure, édition belin, Paris.
- Plata C., C. Millan, J.C. Mauricio, J.M. Ortega. (2003).** Formation of ethyl acetate and isomyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol*. 20. P: **217-224**.
- Pol D. (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. Edition marketing, 158. P: **21-56**.

**Polomska X, Juszczak P, Cadez N, Raspor P, Robot M et Wojtatowicz M. (2007).** Comparison of physiological and PCR-RFLP-DNA identification of yeast species commonly found in cheese, revue P: **221-226**.

**Pommier S. (2003).** Dynamique de populations microbiennes en cultures mixtes : étude expérimentale en bioréacteur à membranes et modélisation du phénomène killer chez *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse. France.

**Prakitchaiwattana C.J. (2004).** Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*. P: **865-877**.

**Pretorius I. S. (2000).** Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* (Chichester, England). P: **675-729**.

**Pretorius, I. S., T. J. van der Westhuizen, and O. P. H. Augustyn. (1999).** Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. P: **61-74**.

**Raspor P. (2006).** Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*. P: **97-102**.

**Read D. (2009).** Génétique médicale de la biologie à la pratique clinique, édition de Boek. Université de Paris. P : **95**.

**Regnault J.P. (1990).** Microbiologie générale. Ed. Paris. P: **271**.

**Rementeria A. (2003).** Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the « Txakoli de Bizkaia » region (Basque Country, North Spain). *International Journal of Food Microbiology*. P: **201-207**.

**Renouf. V, Claisse .O, Lonvaud-Funel.A. (2005).** Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. P: **316-327**.

**Renouf V. (2006).** Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interaction et équilibres-relation avec la qualité du vin. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse. France.

**Retoumard D. (2005).** La vigne. Ed. Rustica. Paris. P : 5.

**Reynier A. (2007).** Manuel de viticulture, 10<sup>ème</sup> édition TEC&DOC. Paris. P : 61, 64, 69, 120.

**Ribereau-Gayon P, Dubourdiou D, Donèche B et Lonvaud A. (1998).** Traité d'œnologie : microbiologie du vin, vinification. Ed. Dunod. Paris. P : 20.

**Roland M. (2008).** PCR (Polymerase Chain Reaction). Metal Ions in life Sciences, Volume 4. Edited by Astrid Sigel. P: 377- 411.

**Rubio .MC, Navarro. AR. (2006).** Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiol Technol*. P: 601-606.

**Sabate. J, Cano. J, Esteve-Zarzoso. B, Guillamon. M. (2002).** Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*. P : 267-274.

**Santana de Almeida. AC, Costa de Araujo. L, Mendes Costa .A, Moraes de Abren. CA, Gomes de Andrade Lima .MA, Perez Fernandez Palha M. de LA. (2005).** Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporim cladosporiodes*. *J. Biotechnol*. P: 54-62.

**Schuller D, Alves H, Dequin S, Casal M. (2005).** Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*. P: 167-177.

**Setati. ME, Jacobson. D, Andong. UC, Bauer. F. (2012).** The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PloS One*, 7 (12), e52609.

**Settanni L, Sannino C, Francesca N, Guarcello R, Moschetti G. (2012).** Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Biosci Bioeng*. P: 606-614.

**Sonderegger M. & Sauer U. (2003).** Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Appl Environ Microbiol*. P: 1990-1998.

- Thiao M. (2005).** Caractérisation et étude de la survie et de la compétitivité en pépinière et au champ de souches de *Rhizobium* inoculées chez *Gliricidia septium* (Hacq) Steud. Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta (UCAD). Sénégal. P: **116**.
- Thuriaux P. (2004).** Les organismes modèles de la levure. Ed. Belin. P: **15, 17, 23, 24, 27, 42 et 44**.
- Timson D.J. (2007).** Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, Dynamic Biochemistry. *Process Biotechnology and Molecular Biology*. P: **63-73**.
- Tortura G.J, Funke B.R, Case C.I. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition du renouveau pédagogique. Canada. P : **945**.
- Tortora G.J., Anagnostakos, N.P. (1987).** Principes d'anatomie et de physiologie. Ed. INC, 5 ème édition. P: **688-693**.
- Turner P.C, Mc Lennan A.G, Bates A.D, White M.R.H. (2000).** L'essentiel en biologie moléculaire. Ed. Lavoisier Paris. P: **174**.
- Urso R, Rantsiou K, Dolci P, Rolle L, Comi G, Cocolin L. (2008).** Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Res.* P: **1053-1062**.
- Valero . E, Cambon. B, Schuller. D, Dequin. S. (2007).** Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Research.* P: **317-329**.
- Verscheure M, Lognay G, Marlier M. (2002).** Les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons, revue. Ed. Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Belgique.
- Vergeade J., Guiraud J., Larpent J.P. & Galzy P. (1976).** Étude de la flore levure du Saint-Nectaire. *Le Lait.* P : **555-556**.
- Viana, F., J.V. Gil, S. Genovés, S. Vallés, P. Manzanares. (2008).** Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology.* P: **778-785**.
- Walker G.M, Wiley J and Chahster S. (1997).** Yeast physiology and biotechnology.  
**Walker G. M. & White N. A. (2005).** Introduction to Fungal Physiology. In «Kavanagh K., *Fungi: Biology and applications*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester » P: **267**.

**Wang C, Liu Y (2013).** Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingayang, China. *Food Microbiol.* P:172-177.

**White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. (1990).** Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes tiré de PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H.

**Zott, K., C. Miot-Sertier, O. Claisse, A. Lonvaud-Funel and I. Masneuf-Pomarede, (2008).** Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology.* P: 197-203.

---

# ANNEXES

---

**Annexe 1** : Les milieux de culture et les réactifs utilisés.

### 1- Milieux de culture

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

-Eau distillée	1L
-Glucose	20g
-Agar	20g
-Peptone	10g
-Extrait de levure	10g

pH= 5,8 (Stérilisation 125°C pendant 20 minutes).

### 2- Les réactifs

- ❖ **Les réactifs utilisés pour l'identification moléculaire**

- **Gel d'agarose**

-Agarose + résorbor	1,5g
-TBE	100ml
-BET	10 $\mu$ l

- ❖ **Les réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN**

- **Préparation du 50 TE (tampon pour le ECP et la préparation du mélange 50 TE/SDS 10%)**

-EDTA	3,75g
-Tris	3,03g
-Eau bi-distillée	1L

- **Préparation de SDS**

-SDS à 10%	2g
-Eau bi-distillée	20ml

---

- **Préparation du mélange 50TE/SDS 10% (tampon pour l'extraction d'ADN)**

-Tampon 50TE

-10% SDS

- **Préparation de l'acétate de potassium 5 mol par litre (tampon pour l'extraction d'ADN)**

-Acétate 98,14g

-Eau bi-distillée 100ml

- ❖ **Les réactifs utilisés pour l'électrophorèse**

- **Préparation du TBE 10X à pH 8 (tampon pour préparer la TBE 1X)**

**TBE 1X= TBE 10X dilué au 1/10<sup>2</sup>**

-Tris 107,80g

-Borate 55g

-EDTA 7,44g

-Eau bi-distillée 1L

- **Composition du marqueur 100 pb**

Dans le microtube contenant 100 pb DNA Ladder, ajouter

-100µl du colorant bleu de bromophénol

-900µl de TE/1X

**Annexe 2 :** Les équipements et matériels pour l'expérimentation du dosage de CO<sub>2</sub> et d'éthanol.

### **1-Equipements**

-Agitateur

-Balance de précision

-Statif

-Pince à burette

## 2-Matériels

- Eprouvette graduée en verre de 250ml
- Cristalliseur en verre
- Ballon en verre
- Ampoule à décanter
- Bouchon troué en bois
- Tube flexible
- Contenant pour peser

**Annexe 3 :** Matériels et réactifs utilisés pour l'étude de l'activité enzymatique de l'invertase.

## 1-Matériels

- Eprouvette de 50 ml
- Pipettes graduées
- Support de tubes à essai
- Tubes à essai
- Spectrophotomètre

## 2-Réactifs

- Solution de Glucose 2,5 mM
- Solution de Fructose 2,5 mM
- Solution de DNS

### Préparation de réactif à l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS)

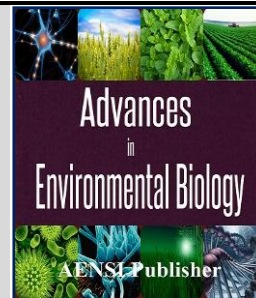
- Dissoudre 1g de DNS dans 20 ml de soude (NaOH) 2N
  - Ajouter doucement une solution de 30g de tartrate double de Na.K dissout dans 50 ml d'eau distillée
  - Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée et agiter jusqu'à obtention d'une solution homogène de couleur orange-rouge (si nécessaire chauffer légèrement le mélange)
- Le réactif DNS doit être conservé dans un flacon bien fermé et à l'abri de la lumière.

**Annexe 4 :** Composition des mélanges réactionnels des enzymes HinfI et HaeIII.**Tableau 1 :** La restriction par la HinfI.

<b>Produit</b>	<b>Volume (µl)</b>
ADN amplifié par ITS	20
Buffer	2.5
Enzyme Hinf I (5 Unités/µl)	1

**Tableau 2 :** La restriction par la Hae III.

<b>Produit</b>	<b>Volume (µl)</b>
ADN amplifié par ITS	20
Buffer	2.5
Enzyme Hinf I (5 Unités/µl)	1



## Isolation and Molecular Identification (PCR-Delta and PCR-RFLP-ITS) of the yeast from Black muscat grape cultivated in El malah (Wilaya of Ain Temouchent, Algeria)

<sup>1</sup>Nadia BERBER, <sup>2</sup>Rachid AISSAOUI, <sup>1</sup>Ahmed Mohamed Ali BEKADA, <sup>3</sup>Morvan COARER

<sup>1</sup>Technology of Food and Nutrition Laboratory (University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem), 27000, ALGERIA.

<sup>2</sup>Bioconversion Laboratory (University of Mustapha STAMBOULI, Mascara), 29000, ALGERIA.

<sup>3</sup>Microbiology and Biotechnology Laboratory (French Institute of Vine and Wine of Nantes), 44000, France.

### Address For Correspondence:

Nadia BERBER, Technology of Food and Nutrition Laboratory (University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem), 27000, ALGERIA.  
E-mail: [nadia.berber27@gmail.com](mailto:nadia.berber27@gmail.com)

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY) <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Received 16 November 2016; Accepted 17 December 2016; Available online 22 December 2016

### ABSTRACT

The grape is an exemplary product of microbial diversity, it is considered as home to many wild microorganisms (yeast). In this context, we explored in this study, the divergence of the indigenous yeast flora in the vineyards of the region El Malah (Wilaya of Ain Temouchent, Algeria) by collecting varietal grape samples (Black Muscat). A high molecular diversity of the flora has been demonstrated, using two molecular techniques, where one is interested in the study of variability of rDNA, more precisely the region 5,8S rRNA ITS1-ITS2 by PCR-RFLP-ITS and the region Delta by PCR-Delta is an additional study which helped sort the yeast *Saccharomyces* and non *Saccharomyces*. So 6 yeast species belonging to the 11 studied at 4 different types were characterized according to their molecular profiles. Thus the strains studied were characterized by two restriction enzymes (HinfI and HaeIII). Meanwhile, microscopic and macroscopic studies of classical identification of yeast were able to strengthen these results. Among the yeast species identified: *Torulaspota delbrueckii*, *Torulaspota pretoriensis*, *Candida solani*, *Candida pseudointermedia* and *Saccharomyces cerevisiae*. This variety is an excellent tank of non *Saccharomyces* yeasts as evidenced by the results. However, the tools of molecular biology have brought a notorious revolution in precise yeast identification tests. The PCR-RFLP-ITS is one of the most widely used methods of identification.

**KEYWORDS:** Grape, Yeast, Black Muscat, PCR-Delta, PC-RFLP-ITS, HinfI, HaeIII.

### INTRODUCTION

Yeasts are naturally present on soils, plant surfaces, especially grape berries, or in wine-growing areas [3,23]. Their dissemination is assured by wind, insects and humans through its various interventions on the environment [1,13]. The yeast species present on the surface of the grape berries are significantly limited in number. The density of the yeasts evolves during the maturation of the grapes. The evolution of yeast populations may be related to the increase in the area of the bay and the availability of nutrients: during the maturation of the bunch, the berries grow, the nutrient content Surface area increases, sugar concentration increases and acidity decreases [4,9]. The representation of the different yeasts varies during the development of the grape berry according to several parameters: grape variety, climatic conditions, soil, wine practices, age of vines, health status of the cluster and the degree of maturity of the grape [8,10,33].

Black Muscat is a black table grape varietal. It is characterized by beautiful black cohosh, juicy flesh, staining grain is sometimes clear. This variety is fairly resistant to drought and likes in sunny areas. The grape

whether table or tank is the habitat of many wild microorganisms since it is considered the kingdom of yeasts. However, the high sugar content of the Muscat grape must (300 g / l) promotes the growth of yeast, these microorganisms play an essential role in the food industry. They participate in the development of many food products (bread, dairy, brewery) and the production of metabolites (lipids, proteins, enzymes), but also the upgrading of agricultural and industrial waste. However, many yeast species produce a very important primary metabolite namely ethanol, used as fuel or for other industrial purposes [17]. Two strains of bacteria were isolated from the gut of termite in different media. It was observed that these isolates have produced ethanol from rice straw ( $7.52 \pm 0.5$  to  $9.33 \pm 0.4$  g/L) followed by corn stove ( $6.35 \pm 0.6$  to  $6.95 \pm 0.5$  g/L) having theoretical yields of ethanol 43.31 % (rice straw) and 39.62 % ( corn stove) [16]. The aim of this study is to isolate, characterize microscopically and identify the indigenous species of yeasts found in the grape variety (Black Muscat) grown in the region of El Maleh (Ain Temouchent, Algeria) to develop and express the diversity of the phylogenetic heritage based on the two molecular techniques (PCR-Delta and PCR-RFLP-ITS). Our work is an initiative for the creation of a "Souchier" typical yeast our country Algeria.

## MATERIAL AND METHODS

### *Grape picking Source (Black Muscat):*

The samples are taken randomly in the month of September 2014 in the vineyards of the city El Malah, a town located 11 Km from Ain Temouchent. We collected with sterile scissors, about 500 g healthy grapes, and it was collected in sterile bags. A laboratory arrival, they are scuffed and crushed to obtain a mash and ferment for one day at 25 ° C in order to increase the viability and quantity of the desired yeast [30].

### *Isolation, purification and conservation of cultures:*

We conducted a series of seeding by the method streaks on plates of agar cultures (YPG + Gentamicin) which aims to have pure cultures. The operation is repeated in each time taking random an isolated colony. Next, the purified strains are placed in a glycerol solution (sterile) with approximately 25% and stored in the freezer at -18 ° C.

### *Microbiological identification:*

#### *Study of characters crop:*

After incubating the cultures for 3 days at 25-28 ° C on agar medium (YPG + Gentamicin), macroscopic observation can describe the appearance of colonies (size, pigmentation, contour, viscosity ...) [17].

#### *The cellular characteristics:*

Microscopic observation to define the shape, arrangement and mode of cell division. These characteristics are observed on microscopic slides to fresh (40 x objective) [25].

### *Molecular identification:*

#### *DNA extraction:*

The isolation of DNA from biological samples is a crucial step in the process of DNA-based molecular biological assays [27]. Before extracting genomic DNA from strains levuriennes, these have been cultured in the medium (liquid YPG + Gentamicin), then a small amount of culture was taken and centrifuged to separate the cells. After the supernatant was removed and the lysis of the resulting pellet of cells was performed by addition of a volume of 660 µl of SDS-50TE mix (lysis buffer). Then the mixture was incubated at 65°C for 10 minutes. To neutralize the medium, a volume of 340 µl of potassium acetate was added to the mixture, the latter is placed in the refrigerator for 30 minutes until the suspension became semi-solid. Then a second centrifugation was performed for 10 minutes and a volume of 750 µl of supernatant was mixed with 750 µl of isopropanol followed by a final centrifugation to precipitate DNA. Then, the collected DNA pellet was rinsed gently with approximately 100 µl of 95% ethanol, then suspended in a volume of 300 µl of TE1x (storage buffer) and incubated at 65 ° C for 15 minutes. Finally, the DNA was stored refrigerated 4°C until use. (According to IFV Nantes, 2012).

### *Amplifying the target region by the two molecular techniques (PCR-Delta and PCR-RFLP-ITS):*

#### *PCR-Delta (Delta 12 / Delta 21):*

Typing of strains of *Saccharomyces cerevisiae* is performed by PCR using the method developed by [18] with the primers: δ 12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3 ') δ 21 (5'-CATCATTAACACCGTATATGA-3 '). The reaction mixture is summarized in Table 1.

**Table 1:** The composition of the reaction mixture used for PCR-Delta according to (IFV)

Products	Volume (µl)	Volumes (µl)
H2O	1220	1230
Tampon 10X	160	160
dNTP	64	64
Delta 1 or 12	8(40pmol/reaction)	8
Delta 2 or 21	8(40pmol/reaction)	8
Mgcl2	80	80

**PCR-RFLP-ITS:**

The sequence ITS1 5.8S rRNA ITS2 present a conserved region in the majority of yeast species and the variable regions. The primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') described as universal primers by [35]. The reaction mixture is summarized in Table 2. Then, in order to identify the different species of yeast, the products of PCR-ITS are treated with two restriction enzymes *HinfI* and *HaeIII* [3].

**Table 2:** The composition of the reaction mixture used for PCR-ITS according to (IFV)

Products	Volume (µl)	Volume (µl)
H2O	1220	1230
Tampon 10X	160	160
dNTP	64	64
ITS1	12,8 (40pmol/reaction)	12,8
ITS4	12,8 (40pmol/reaction)	12,8
Mgcl2	80	80
DMSO	31(2%)	31(2%)

Purification of a DNA fragment (PCR-Delta +PCR-RFLP-ITS) double-strand is performed by electrophoresis on Agarose gel. The gel is mixed with ethidium bromide and cast hot in the electrophoresis tank. 20 µl contained in each tube PCR, mixed with 5 µl of loading buffer containing bromphenol blue, are deposited on the wells. Fragments of known molecular weight DNA called markers are also deposited: they are used to correlate the migration distance of the DNA fragments to their size (in base pairs). In this study, the number and length of the fragments were compared to the size marker (100 bp). according to (IFV). Then, applying a voltage of 120V / 30 minutes until the migration of the fragments [5]. The nucleotide different bands resulting from the electrophoresis are shown on the gel under UV light (254 nm) and photographed with a camera UV.

## RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and purification by successive subcultures made after collection of yeasts in September 2014 from the Black Muscat grapes grown in the El Maleh area (Wilaya of Ain Temouchent). This allowed us to get a collection of 11 yeast isolates.

**Study cultivation of isolated yeasts:**

Macroscopic examination of cultures "levuriennes" after incubation at 25 ° C for 4-5 days shows generally well isolated colonies are whitish, cream or sometimes yellowish opaque and irregular outline, they have an intense smell. Microscopic observation has allowed us to identify cell shape of isolated isolates and vegetative reproduction modes. Of the 11 individual isolates, 10 are spherical or cylindrical, elongated or short form and are budding as vegetative reproduction mode. The remaining isolate is characterized by an oval shape and has a monopolar budding, it has a smell of yeast. The uniformity of cells confirms the purification of isolates studied. According to [17], yeasts are in the form of independent free single cell or combined in pairs with characteristic morphology for example: spherical, ovoid, cylindrical, apiculé, bottled, pyramidal.

**Molecular study of isolated yeasts:****DNA extraction:**

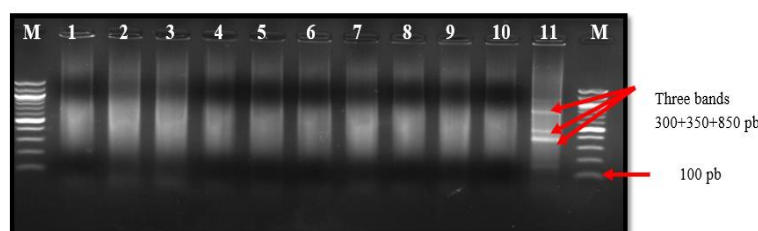
DNA extraction has allowed us to observe a small white mass rushed to the microtube bottom, then it was inoculated in a buffer prior TE1x and must keep to the time of use.

**PCR-Delta:**

This technique allows to distinguish between the species *Saccharomyces* and Non *Saccharomyces* our results, the graph (Fig.1) shows that the first 10 isolates of the species Non *Saccharomyces* since no amplification profile is observed on their columns, so they belong to other species or they will be identified by

PCR-RFLP-ITS. Regarding the last isolate (isolate 11), we see the emergence of three bands on the different molecular size column (300 + 350 + 800 bps), then we can predict that this isolate belongs to the species *Saccharomyces*. The study of the ecology of Non *Saccharomyces* yeast known significant growth since the last few years, we focus not only on the distribution of species found on grapes but also their succession during alcoholic fermentation [1,6,20,30,32]. Many of the Non *Saccharomyces* yeast can colonize the surface of grape berries. Indeed, school supports the idea that although minority, *Saccharomyces* yeasts from the surface of the grapes, and that their presence or absence exchange of a cluster to another, within the same plot [9,19,28]. [21]do consider that grape berry on 1000 carries *Saccharomyces cerevisiae*. However, these same authors found that damaged grapes (naturally in the vineyard) are significant populations with Bay 1 of 4 carriers of *Saccharomyces cerevisiae*. However, according to other authors, *Saccharomyces cerevisiae* is undetectable on grapes [9,28].

In our study, major yeast species were represented by Non *Saccharomyces* yeast (10 isolates) while only one isolate was identified as *Saccharomyces*(isolate 11), so our work highlights the predominance of Non-*Saccharomyces* species or sound samples isolated from the grape must of Muscat black grape. During a spontaneous fermentation with native flora, Non-*Saccharomyces* yeasts predominate in the must during the pre-fermentation stage and at the beginning of the alcoholic fermentation before the yeast *S. cerevisiae* colonize the middle to complete the fermentation [36,12,30]. However, Non-*Saccharomyces* yeasts are very present, even the majority, in the grape must (Black Muscat) compared to *Saccharomyces* yeasts.



**Fig. 1:** Profiles PCR-Delta of 11 isolates. Lanes M correspond to molecular size standards (100-bp DNA ladder from IFV)

#### PCR-RFLP-ITS:

A total of 11 isolates of yeasts isolated from the Black Muscat grape juice were analyzed. To identify these yeasts, the region of the rRNA repeat unit comprises two non-coding regions referred to as internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S rRNA gene were amplified and digested by two enzymes of restriction (HinfI and HaeIII). The profiles obtained from each isolate were compared with reference strains in the determination of the IFV Guide (2012). The results of this study are summarized in Table 3. The size of the PCR products and restriction fragments of the major species identified in this study are shown in Table 4.

#### The species of yeasts isolated from the grape (black Muscat):

11 yeast isolates were identified as belonging to 4 genera and 6 different species: *Torulaspota* (05 strains), *Hanseniaspora* (03 strains), *Candida* (02 strains), *Saccharomyces* (01 strain) (Table 3). These different kinds of yeast are well documented in the literature as present on grapes and the start of alcoholic fermentation [36,1].

**Table 3:** Frequency of yeast species isolated from the grape "Black Muscat"

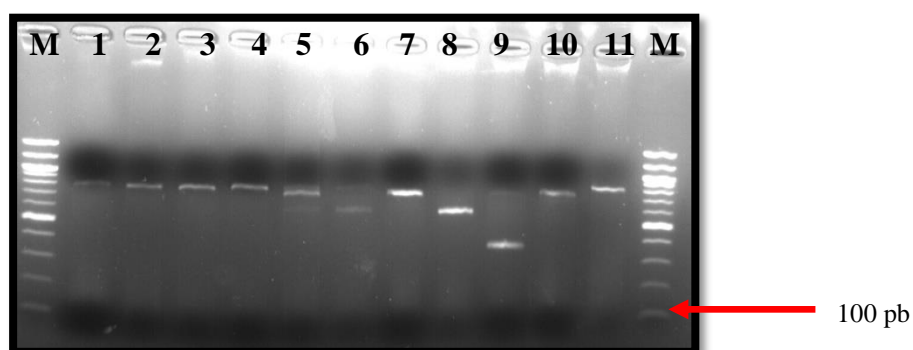
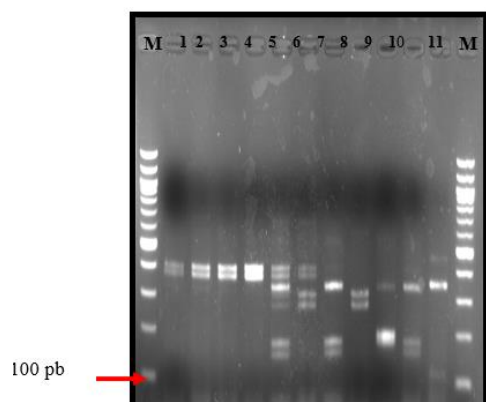
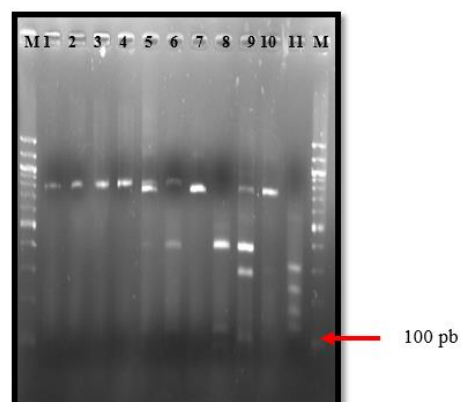
Isolation source	Species	Frequency of isolation(Number of strains)
Black Muscat grape variety	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	04
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	03
	<i>Candida solani</i>	01
	<i>Candida pseudointermedia</i>	01
	<i>Torulaspota pretoriensis</i>	01
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	01

**Table 4:** Size in bp of the PCR products and the restriction fragments obtained with two different endonucleases (Hinf I and HaeIII) of the major species identified in this study

Species	Amplified product (pb)	Restriction fragments (pb)	
		Hinf I	HaeIII
<i>Torulaspota delbrueckii</i> (Strains 1, 2, 3,4)	800	410+380	800
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (Strains 5, 6,7)	770	350+190+160	750
<i>Candida solani</i> (Souche 8)	600	280+300	400
<i>Candida pseudointermedia</i> (Strain 9)	400	200+110	400
<i>Torulaspota pretoriensis</i> (Strain 10)	800	380+200+190	800

The review of the results indicates that 5 selected yeast strains (strain 1, 2, 3, 4,10) belong to the genus *Torulaspota* (Table 4), according to the determination of IFV guide (2012), while 4 strains were identified as belonging to the species *Torulaspota delbrueckii* and the remaining strain (strain 10) belongs to the species *Torulaspota pretoriensis*. The molecular profile of three yeast strains (strain 5, 6, 7) indicates that they look like the species *Hanseniaspora uvarum*, according to the determination of IFV guide (2012). However, the molecular characterization and micro-macroscopic characteristics show that the strains (8) and (9) belonging to the species *Candida solani* and *Candida pseudointermedia* respectively. Furthermore, the combination of the two results (morphological and molecular studies) indicated that the strain (11) belongs to the species *Saccharomyces cerevisiae*.

Grape berries are the primary source of yeast during the fermentation of the must [11](Fig 2, 3, 4). In different wine regions in the world, insulation works and identification of yeasts showed that *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota Dekkera*, *Schizosaccharomyces* and *Sporidiobolus* are most frequently found [31,12,26,30,22]. Other species Non-Saccharomyces as *Candida zemplinina*, *Torulaspota delbrueckii* and *Hanseniaspora spp* are also an important part of the diversity of the community of the bay and are present during the fermentation, in particular during the stages pre fermentative [36].

**Fig. 2:** Viewing the amplified region (rRNA 5,8S ITS1-ITS2) in 11 isolates**Fig. 3:** Viewing the region (rRNA 5, 8S ITS1-ITS2) digested by HinfI in 11 isolates**Fig. 4:** Viewing the region (rRNA 5, 8S ITS1-ITS2) digested by HaeIII in 11 isolates

In our study, the grape must (Black Muscat) is an excellent reservoir of Non-Saccharomyces yeasts as evidenced by the results obtained, we met different fermentative species such as *T. delbrueckii* is a non-Saccharomyces yeast naturally present in the must and the grape berries which has been described in the literature for its positive impact on the quality and complexity of wines [6,7,15] and for the purity its fermentation with especially low production of volatile acidity, acetaldehyde, diacetyl and acetoin [2,24,34]. This yeast is also described as cryophile and osmotolerant [14]. Among the Non-Saccharomyces yeasts isolated from our grape must, we have the species *Hanseniaspora uvarum*, *Candida solani* and *Candida pseudointermedia*. Indeed yeast fermentation activity low, mainly as the species of the genus *Hanseniaspora* and to a lesser degree the genera *Candida* predominate on grapes and in the early stages of fermentation. These results are in agreement with the literature. According to [2,30,1], at the earliest stages, the Basidiomycetes species are dominant, and the increasing number of Ascomycetes species, especially those that have fermentation capacity is observed at maturity stages (*Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*). This study highlights the variability of species in each genus of yeast especially in *Torulaspota* genres (*T. delbrueckii*, *T. pretoriensis*) and *Candida* (*C. Solani*, *C. pseudointermedia*). However, only one species of *Saccharomyces cerevisiae* was isolated from the must. This is the main agent of fermentation. Fermentations are initiated by the growth of various species of *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, and *Zygosaccharomyces*. Their growth is generally limited to the first two or three days of fermentation, after which they die off. Subsequently, the most strongly fermenting and more ethanol tolerant species of *Saccharomyces* take over the fermentation [11].

#### Conclusion:

This study is based on the evaluation of a grape variety grown in Algeria (Black Muscat) .A genetic approach has been developed in this work and has achieved an identification of 11 isolates belonging to 4 genera and 6 different species: *Torulaspota*, *Hanseniaspora*, *Candida* and *Saccharomyces*. This variety is an excellent tank of Non Saccharomyces yeasts as evidenced by the results. In terms of our study, we strongly encourage investigations to characterize biotechnologically these identified strains, and to encourage all studies concerned with the identification and characterization of other grape varieties in all regions of Algeria.

However, yeasts open up avenues of research for the future. Constantly improved, production systems make it possible to envisage the production of very different proteins, for the human or veterinary pharmacy. The final objective, drawn in the short and long term, is set in the development of the yeasts identified and then selected to serve mainly the agro-food domains (bread, dairy, brewery...) and new biotechnologies.

#### REFERENCES

- [1] Barata, A. *et al.*, 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3): 243-259.
- [2] Bely, M., P. Stoeckle, I. Masneuf-Pomarède and D. Dubourdiou, 2008. Impact of mixed *Torulaspota delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 312-320.
- [3] Bokulich, N.A. *et al.*, 2013. Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. *PLoS ONE*, 8 (6): e66437.
- [4] Cadez, N. *et al.*, 2010. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Research*, 10(5): 619-630.
- [5] Chantal, G., 1996. Caractérisation génétique des régions ITS des *phytophthora* spp qui causent le pourridié des racines du framboisier au québec.
- [6] Ciani, Maurizio, et Maccarelli, Francesco, 1998. Oenological properties of non- *Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 199-203.
- [7] Ciani, M., et G. Picciotti, 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeast associated with wine-making. *Biotechnol Lett.*, 17: 1247-1250.
- [8] Clavijo, A. *et al.*, 2010. Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3): 241-245.
- [9] Combina, M., 2005. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5): 1055-1061.
- [10] Cordero-Bueso, G. *et al.*, 2011. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1): 132-139.
- [11] Fleet, G.H., et G.M. Heard, 1993. Yeasts-growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland., pp: 27-57.
- [12] Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8: 979-995.

- [13] Ganter, P.F., 2006. Yeast and Invertebrate Associations. In D. G. Péter & P. C. Rosa (Éd.), Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, 303-370. Springer Berlin Heidelberg.
- [14] Hernández-Orte, P., M. Cersosimo, N. Loscos, J. Cacho, E. Garcia-Moruno and V. Ferreira, 2008: The development of varietal aroma from non-f oral grapes by yeasts of different genera. Food Chemistry, 107: 1064 - 1077.
- [15] Herraiz, T., G. Reglero, M. Herraiz, P.J. Martin-Alvarez, M.D. Cabezudo, 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. American Journal of Enology and Viticulture. 41: 313-318.
- [16] Iram batool *et al.*, 2016. Ethanol production from agricultural residues by simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) by using termites and *Saccharomyces cerevisiae*. Adv. Environ. Biol., 10(7) July 2016, Pages: 107-115.
- [17] Larpent, J.P., 1991. Biotechnologie des levures. Ed. Masson. Paris, p: 426.
- [18] Legras, J-L., F. Karst, 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. FEMS Microbiology Letters, 221: 249-255.
- [19] Martini, A., 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Wine Research, 4(3): 165-176.
- [20] Mora, J. and A. Mulet, 1991. Effects of Some Treatments of Grape Juice on the Population and Growth of Yeast Species During Fermentation. American Journal of Enology and Viticulture, 42(2): 133-136.
- [21] Mortimer, R. and M. Polsinelli, 1999. On the origins of wine yeast. Research in Microbiology, 150(3): 199-204.
- [22] Nisiotou, A. and G.-J.E. Nychas, 2007. Yeast Populations Residing on Healthy or Botrytis-Infected Grapes from a Vineyard in Attica, Greece Applied and Environmental Microbiology, 73(8): 2765-2768.
- [23] Ocón, E. *et al.*, 2010. Quantitative and qualitative analysis of non-Saccharomyces yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. European Food Research and Technology, 230(6): 885-891.
- [24] Plata, C., C. Millan, J.C. Mauricio, J.M. Ortega, 2003. Formation of ethyl acetate and isomyl acetate by various species of wine yeasts. Food Microbiol., 20: 217-224.
- [25] Pol., D., 1996. Travaux pratiques de biologie des levures. Edition marketing, 158: 21-56.
- [26] Prakitchaiwattana, C.J., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. FEMS Yeast Research, 4(8): 865-877.
- [27] Raghad J. Fayyad and Ahmed S. Dwaish., 2016. New modified protocol of DNA extraction Comparison with other extraction method for polymerase chain reaction analysis of genomic DNA from Cyanophyceae isolates. Adv. Environ. Biol., 10(9) September 2016, Pages: 77-82.
- [28] Raspor, P., 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. International Journal of Food Microbiology, 109(1-2): 97-102.
- [29] Rementeria, A., 2003. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the « Txakoli de Bizkaia » region (Basque Country, North Spain). International Journal of Food Microbiology, 86(1-2): 201-207.
- [30] Renouf, V., 2006. Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : Interactions et équilibres – Relation avec la qualité du Vin. Thèse de doctorat, Faculté d'oenologie, Université Bordeaux 2.
- [31] Sabate, J., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. Microbiological Research, 157(4): 267-274.
- [32] Setati, M.E., 2012. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. PloS One, 7(12): e52609.
- [33] Valero, E. *et al.*, 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. FEMS Yeast Research, 7(2): 317-329.
- [34] Viana, F., J.V. Gil, S. Genovés, S. Vallés, P. Manzanares, 2008. Rational selection of non-Saccharomyces wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. Food Microbiology, 25: 778-785.
- [35] White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor, 1990. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H.
- [36] Zott, K., C. Miot-Sertier, O. Claisse, A. Lonvaud-Funel and I. Masneuf-Pomarede, 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. International Journal of Food Microbiology, 125: 197-203.