

Université Abdelhamid
Ibn Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

N° 004/SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDE

Présenté par

BELMAZIZ Meriem & DJALAL Faouzia

Pour l'obtention du diplôme de

MASTEREN (AGRONOMIE)

Spécialité : Contrôle de la Qualité des Aliments.

THÈME

**Analyses microbiologiques, biochimiques et
biotechnologiques des levures issues du cépage Cinsault
cultivé dans la commune Ben Abdelmalek Ramdane
(Wilaya de Mostaganem)**

DEVANT LE JURY

Président	Mr.BENAKRICHE.B	Professeur	Université de Mostaganem.
Directeur de mémoire	Mr. BEKADA. A	Professeur	Université de Mostaganem.
Co encadreur	M ^{lle} .BERBER.N	Doctorante	Université de Mostaganem.
Examineur	Mr.BEN MILOUD.DJ	Docteur	Université de Mostaganem.

Année universitaire : 2016 – 2017

Remerciement

Tout d'abord, nous remercions le "bon dieu " tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donnée durant tous les années d'études.

*Nous tenons à remercier notre encadreur monsieur, **BEKADA. A**, Maitre de conférences à d'avoir accepté de nous encadrer, pour toute son aide, sa disponibilité, ainsi ses conseils judicieux et ses encouragements précieux nous ont donné la force de continuer et de terminer ce travail.*

*Mes remerciements les plus chaleureux et respectueux à notre Co encadreur **M^{elle} BERBER. N** doctorante à l'université de Mostaganem, qui a fait preuve d'une grande patience et a été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail, ses conseils, ses orientations, son soutien moral et scientifique ainsi que l'intérêt porté pour notre sujet de recherche qui nous avons permis de mener à terme ce projet.*

*Je tiens à remercier Monsieur, **BENAKRICHE. B**, professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de soutenance. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.*

*Nos vifs remerciements s'adressent également à notre examinateur, monsieur **BENMILOU. Dj**, docteur à l'université de Mostaganem, d'avoir honoré et accepté d'examiner ce travail.*

*Notre sentiments les plus profonds et remerciements infinis à tous mes enseignants pour leurs patiences et servitudes surtout de département d'Agronomie. Et tous les techniciens de laboratoires S.N.V de l'université **Abd El Hamid Ben Badis** de Mostaganem.*

Enfin, nos dernières remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont à tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

Merci à tous

Dédicaces

Tous d'abord, louangent au bon Dieu qui nous a offert la chance et la force de poursuivre nos études.

Je dédie ce modeste travail, fruit de notre parcours universitaire :

- *A la mémoire de mon très cher père, qui nous a quittés trop tôt en reconnaissance de son amour et sa gentillesse, il a été le guide vigilant et le conseil juste de mon enfance.*
- *A ma très chère mère, qui m'a permis de devenir ce que je suis aujourd'hui, car toute réussite dans ma vie est grâce aux sacrifices de ma tendre mère, rien de ce que je dirai ne suffira pour lui exprimer ma gratitude alors merci maman.*
- *A mes très chères sœurs et frères: **Rachida, Chahrazed, Mohamed et Ismail.***
- *A tous ceux qui portent le nom : **Belmaziz et Tazi.***
- *A mes meilleurs amis et surtout Hayat, Amina, Soumya, Naima, Oum el kheir et mon binôme **Fouzia.***
- *A mes amis de parcours contrôle de la qualité des aliments et tous les étudiants d'Agronomie.*
- *A tous qui me connu de près ou de loin.*

Meriem.

Dédicaces

Avec l'aide du dieu tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :

- *A la mémoire de mon très cher père, qui nous a quittés trop tôt en reconnaissance de son amour et sa gentillesse, il a été le guide vigilant et le conseil juste de mon enfance.*
- *A ma très chère mère, qui ma permis de devenir ce que je suis aujourd'hui, car toute réussite dans ma vie est grâce aux sacrifices de ma tendre mère, rien de ce que je dirai ne suffira pour lui exprimer ma gratitude alors merci maman.*
- *A mes frères et mes sœurs et mon binôme*
- *Ames oncles et tantes*
- *Ames cousins et cousines*
- *A toute la famille DJAALAL.*
- *Ames amis et voisins du village et à tous ceux qui me connaissent.*
- *A la promotion des 2016/2017 de contrôle de la qualité des aliments.*
- *A tous ceux et celles qui aiment me voir réussir dans ma vie.*

Fouzia

Table des matières

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale

Partie I: Etude bibliographique

Chapitre I : Raisin et Levures

I.1. La vigne.....	01
I.1.1.L'histoire de la vigne.....	01
I.1.2.Définition de la vigne et du raisin.....	01
I.1.3.Classification de la vigne.....	02
I.1.4. Physiologie et constituants chimiques.....	03
I.1.4.1. Etude de la physiologie.....	03
I.1.4.2. Etude des constituants chimiques.....	05
I.1.5. La flore microbienne du raisin et son origine.....	07
I.2. Notion de cépage.....	08
I.2.1. Le cépage.....	08
I.2.2.La diversification entre les cépages.....	08
I.2.3. Vignoble en Algérie.....	08

Chapitre II : Etude fondamentale des levures

II.1.Caractéristiques microbiologiques des levures.....	12
II.1.1. Habitat.....	12
II.1.2. Morphologie et structure.....	13
II.1.3. Cytologie.....	13
II.1.4 Reproduction.....	14

II.2. Différenciation des levures.....	16
II.2.1. Caractères botaniques.....	17
II.2.2. Caractères morphologiques.....	18
II.2.3. Caractères biochimiques.....	18
II.2.4. Caractères moléculaires.....	18
II.3. Classification des levures.....	19
II.4. Physiologie et croissance des levures.....	20
II.4.1. Les besoins nutritifs.....	20
II.4.2. Les conditions physicochimiques de croissance.....	21
II.5. Techniques d'identification des levures.....	22
II.5.1. Méthodes classiques d'identification des levures.....	22
II.5.1.1. Etude des caractères cultureux.....	22
II.5.1.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires.....	23
II.5.1.2.1. Aptitude à la filamentation	24
II.5.1.2.2. Morphologies particulières.....	24
II.6. Caractères physiologiques et biochimiques	25
II.6.1. Fermentation des sucres.....	25
II.6.2. La production du glycérol	25
II.6.3. Assimilation des composés carbonés.....	25
II.6.4. Assimilation de sources azotées	25
II.7 Identification moléculaire.....	26

II.7.1. Le mécanisme moléculaire chez les eucaryotes.....	26
II.7.1.1. La réplication d'ADN in vivo.....	26
II.7.1.2. La réplication d'ADN in vitro « la PCR ».....	26
II.7.2. Méthode de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR).....	27
II.7.3. Visualisation de l'ADN par électrophorèse.....	28
II.7.4. Techniques moléculaires pour l'identification des levures.....	28
II.7.5. Technique d'identification moléculaire au niveau de l'espèce.....	29
II.7.5.1. PCR- ITS.....	29
II.8. Identification des levures au niveau de la souche.....	29
II.8.1. PCR-RELP (restriction fragments length polymorphism).....	29
II.9. Les différentes méthodes d'identification des levures.....	30

Chapitre III : Les domaines d'utilisation des levures

III.1. Levures en biotechnologie.....	31
III.1.1. Les levures dans les industries agro-alimentaires.....	31
III.1.1.1. Utilisation des levures pour la production des boissons alcoolisées....	31
III.1.1.2. Utilisation des levures pour la panification.....	33
III.1.1.3. Les levures dans les industries des produits laitiers.....	34
III.1.1.4. Les levures dans les industries des produits carnés.....	35
III.1.1.5. Production des métabolites.....	35

III.1.2.Les levures dans le domaine autre qu'agroalimentaire.....	36
III.1.2.1. Les levures et la production de médicaments	36
III.1.2.2. La levure : hôte eucaryote pour le clonage	37

Partie II : Etude Expérimentale

Matériels et méthodes

1-Objectif et intérêt de l'étude.....	38
2- Présentation de la région de la récolte.....	38
3- Source de prélèvement des levures	39
4-Les milieux de cultures utilisés	39
5- Isolement, purification et conservation des isolats	40
5-1- Techniques de prélèvement des levures	41
5-2-Préparation de l'extrait de raisin	41
5-3- Isolement des levures.....	41
5-4- Purification des levures.....	41
5-5- Conservation des levures.....	42
6- Etude des caractéristiques culturales	42
6-1- Observation macroscopique.....	42
6-2- Observation microscopique.....	42
6-3- Test de la filamentation	43
6-4- Test de sporulation (Test de reproduction sexuelle.....	43
7- Caractères biochimiques et physiologiques	44
7-1- Tests de fermentations des sucres.....	44
7-3- Test d'assimilation de composés azotés	44
8- Caractérisation biotechnologique	44

8-1- Fermentation alcoolique chez la levure : méthode de mesure et caractérisation des produits formés (CO ₂ et l'éthanol)	44
8-2- Etude de l'activité enzymatique de l'invertase	48

Résultats et discussions

1- Etudes des caractéristiques culturaux des souches isolées du cépage Cinsault...50	50
1-1- Etude macroscopique	50
1-2- Etude microscopique	50
1-3- Aptitude de filamentation.....	50
1-4- Test de sporulation.....	50
2- Etude des caractères biochimiques	57
2-1- Test d'assimilation de composés azotés	57
2-2- Tests de fermentations des sucres.....	59
3- Etude des caractères biotechnologiques.....	62
3-1-Résultats du test de la fermentation alcoolique (Capacité des levures à produire de l'éthanol et du CO ₂).....	62
3-2- Résultats de l'étude de l'activité enzymatique de l'invertase.....	63

Conclusion générale

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Tableau	Pages
<i>Tableau n°01</i> : Quelques levures isolées des raisins.	07
<i>Tableau n°02</i> : Classification des levures.	19
<i>Tableau n°03</i> : Nombre d'espèces de levures qui ont été retrouvées au moins une fois sur le raisin, le vin, le matériel vinaire, etc.	32
<i>Tableau n°04</i> : Levures pour applications boulangères différentes.	33
<i>Tableau n°05</i> : Levures et les enzymes industrielles produites.	36
<i>Tableau n°06</i> : Ensemble des caractères macroscopiques.	42
<i>Tableau n°07</i> : Dosage des sucres inverti par la méthode de DNS : gamme étalon.	49
<i>Tableau n°08</i> : Observation microscopique, macroscopique et les caractères morphologiques chez la souche Cinsault 01 .	51
<i>Tableau n°09</i> : Observation microscopique, macroscopique et les caractères morphologiques chez la souche Cinsault 02 .	52
<i>Tableau n°10</i> : Observation microscopique, macroscopique et les caractères morphologiques chez la souche Cinsault 03 .	53
<i>Tableau n°11</i> : Observation microscopique, macroscopique et les caractères morphologiques chez la souche Cinsault 04 .	54
<i>Tableau n°12</i> : Observation microscopique, macroscopique et les caractères morphologiques chez la souche Cinsault 05 .	55
<i>Tableau n° 13</i> : Résultats d'étude des caractères biochimiques des souches isolées du Cinsault.	61
<i>Tableau n°14</i> : Les résultats du test de la fermentation alcoolique des souches isolées du Cinsault.	62
<i>Tableau n°15</i> : Les résultats du test de l'activité enzymatique de l'invertase des souches isolées du Cinsault.	63

Liste des figures

Figure	Pages
<i>Figure 01.</i> Classification des vitacées.	02
<i>Figure 02.</i> Physiologie de la vigne.	03
<i>Figure 03.</i> Structure de la grappe de raisin.	04
<i>Figure 04.</i> Structure de la baie de raisin.	04
<i>Figure 05 :</i> Structure d'un pépin de raisin.	05
<i>Figure n°06 :</i> Structure cellulaire des levures.	13
<i>Figure n°07 :</i> représentation idéalisée d'une cellule de levure	14
<i>Figure n° 08 :</i> Division de cellules levuriennes par bourgeonnement.	16
<i>Figure n° 09:</i> Cycle de reproduction de la levure.	17
<i>Figure n°10 :</i> Le mode de reproduction des levures.	24
<i>Figure n°11 :</i> Filamentisation des levures.	24
<i>Figure n°12:</i> Les trois phases de cycle de PCR.	28
<i>Figure n°13 :</i> Principe général de la PCR-RFLP.	30
<i>Figure n°14 :</i> La région de la récolte (Ben Abdelmalek Ramdane Mostaganem).	38
<i>Figure n°15:</i> Le cinsault	39

Figure n°16 : Schéma représentatif du protocole expérimental.	40
Figure n°17 : Résumé de protocole expérimental de a fermentation alcoolique.	45
Figure n° 18 : Montage de la fermentation alcoolique.	46
Figure n°19 : Observation de milieu d'assimilation de l'urée ensemencé par les souches après l'incubation à 37°C pendant 24 heures.	57
Figure n°20 : Observation de milieu d'assimilation de l'urée ensemencé par les souches après l'incubation à 37°C pendant 48 heures.	57
Figure n°21 : Observation de milieu d'assimilation de nitrate ensemencé par les souches après l'incubation à 37°C pendant 24 heures.	58
Figure n°22 : Observation de milieu d'assimilation de nitrate ensemencé par les souches après l'incubation à 37°C pendant 48 heures.	58
Figure n°23 : Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.	59
Figure n°24 : Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.	59
Figure n°25 : Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.	60
Figure n°26 : Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.	60
Figure n°27 : Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.	61

Liste des abréviations

A : Adénine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNC : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomiaux

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

AP-PCR: Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction

ARDRA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARNt : Acide ribonucléique transporteur

ATP: Adénosine Triphosphate

C : Cytosine

Cm : Centimètre

CO₂ : Dioxyde de carbone

°C: Degrés Celsius

DAF: DNA Amplified Fingerprinting

dNTP : Désoxyribonucléotides-tri-Phosphates

g : Gramme

G: Guanine

G+C: Guanine + Cytosine

ha : Hectare

h : Heure

IFV : Institut français de la vigne et du vin

IGS ou IGR : Intergenis spacer

ITS : Internal transcribed spacer (espace transcrit intergénique)

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

L : Litre

Mb : Million de bases

Mg/L: Milligramme par litre

Min : Minute

ml: Millilitre

mM : Millimole

NAD+ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NTS : Non Transcribed Spacer

OGA : Gélose glucosée à l'oxytétracycline

Pb : Paires de base : (unité de mesure de la taille d'un fragment d'ADN)

PCR : Polymerase chain reaction (réaction en chaîne par polymérase)

PCR-Q : PCR en temps réel « quantitatif »

PDA: Potato dextrose agar

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electrophorèse sur gel en champ pulsé)

pH: Potentiel Hydrogène

RAPD : Random Amplified Polymorphism

rpm: rotation par minute

RE : Réticulum endoplasmique

REP: Repetitive Extragenic Palindromic

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RT: La reverse transcriptase

sec: Seconde

T : Tyamine

T°: Température

Taq : de *Thermus aquaticus*

UFC : Unité formant colonie

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

µl: Microlitre.

Introduction

Les levures sont naturellement présentes sur les sols, les surfaces végétales, en particulier les baies de raisin, ou dans les zones viticoles. 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 grâce à leurs propriétés physiologiques très caractéristiques. L'ingénierie de ses levures a donc trouvé dans l'industrie de la fermentation un champ d'application privilégié pour produire divers métabolites comme les arômes et l'éthanol.

L'identification des levures fait appel à des caractères cultureux et morphologiques, à la sexualité, à des critères physiologiques. (*Guiraud et Galzy, 1980*), et aussi aux différentes méthodes de la biologie moléculaires avec un degré de précision satisfaisant.

Les connaissances scientifiques et techniques ainsi acquises ont permis de cultiver et d'utiliser de grandes quantités de levures dans les procédés de fermentation industrielle, mais aussi pour la production de vitamine B, de thianine, des antibiotiques et des hormones stéroïdes. En tant que sous-produit de procédés de fabrication, les levures sont utilisées comme nourriture animale. Une autre transformation majeure des levures est leur autolyse et concentration par divers procédés pour produire des extraits de levures qui sont utilisés comme éléments nutritionnels ou agents de sapidité en alimentation humaine, et plus récemment les levures sont utilisées comme des probiotiques. Cependant, les levures 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.

L'intérêt de ce travail est de caractériser les levures indigènes isolées du cépage de raisin (Cinsault) au niveau des vignobles provenant de la région de Mostaganem, afin d'accéder précisément à leur biodiversité au sein de la flore microbienne sauvage.

Notre travail est scindé en deux parties principales :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique basée sur la description des cépages de raisin en se basant essentiellement sur le Cinsault, puis une étude fondamentale des levures, ensuite les différentes méthodes d'identification de ces microorganismes.

La deuxième partie expérimentale est basée sur l'isolement, purification, identification classique des levures ainsi que une caractérisation biotechnologique de ces dernières. Ensuite une partie représente et discute l'ensemble des résultats obtenus à la suite de cette étude puis on a terminé par une conclusion générale.

Partie
bibliographique

Chapitre I

Vigne et raisin

I.1. La vigne

I.1.1.L'histoire de la vigne

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, 2010*). Il est certain que la vigne existe sur notre planète depuis plusieurs millions d'années. En Europe et en Amérique et en Asie. Cette plante recouvrerait la planète au premier pas l'homme, à l'époque les cépages fragiles ont disparu, d'autres ont résisté comme la vigne sauvage européenne *vitis vinifera sp. Sylvestris*, cette vigne est la base des vignes cultivées tout autour de la méditerranée jusqu'à Afghanistan, au nord jusqu'au Caucase et en Europe centrale (*Arnaud et Delluc, 2007*).

On retrouve les premières traces de culture de la vigne algérienne dans l'antiquité, sous la domination de la Phénicie puis de l'Empire romain. L'invasion musulmane mettra un terme à la production de vin, mais pas à la culture de la vigne pour la consommation de raisins de table et de raisins secs. L'Algérie est alors une colonie française depuis 1830. Son vignoble va connaître une expansion considérable, allant jusque près de 400 000 hectares de vignes dans les années 1930, et 18 millions d'hectolitres produits, faisant de l'Algérie le plus grand exportateur de vin de l'avant-guerre. Cette situation développera les complémentarités entre le marché français et le vignoble algérien jusqu'à l'indépendance en 1962. Les vins sont alors régis par la législation française et ont bien souvent le statut de Vins de Qualité Supérieure.

Après l'indépendance, avec la réduction des importations françaises, le pays se retrouve en surproduction. L'économie nationale se focalise alors sur l'industrie, le vin devenant un produit « tabou ». Une politique d'arrachage est menée, ne laissant que 25 000 hectares pour le raisin de cuve. Aujourd'hui le vignoble algérien revit, il avoisine les 70 000 hectares. Les efforts entrepris pour améliorer la qualité des vins portent leur fruit. Et bien que la surface de vignes se soit fortement réduite, l'Algérie conserve une place importante dans le monde du vin (*Melloni et Swinnen, 2013*). Depuis l'arrivée de phylloxera (insecte détruisant les raisins) en Europe en XIX siècle, les plantes de vigne sont essentiellement obtenus par greffage qui est un système de multiplication qui consiste à fixer un greffon sur un porte greffe (*Reynier, 2007*).

I.1.2.Définitions de la vigne et du raisin

La vigne est une liane à feuilles caduques, un arbuste sarmenteux et grimpant, une plante pérenne, et capable de vivre plusieurs siècles qui peut atteindre une vingtaine de mètres (*Hédalgo et al, 2005*). La vigne est une espèce ligneuse, grimpante et pérenne, qui peut se multiplier par voie sexuée, par bouturage ou par greffage. Elle est cultivée pour ses fruits, les baies de raisin, utilisées pour la production de vin, de raisin de table et de raisins secs (*Kappel, 2010*).

La vigne appartient à la famille des vitacées également appelées ampélidacées, qui comprennent un millier d'espèces. L'espèce la plus connue de genre *Vitis* et le *vinifera* dont sont issus les cépages de cuve et de table (*Reynier, 2007*).

Le raisin 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*).

I.1.3. Classification de la vigne

La botanique classe les vignes dans la famille des vitacées. Toutes les vignes cultivées, ou sauvages, appartiennent au genre *Vitis*. En Europe, le réarrangement des territoires ruraux et les épidémies de mildiou ou du phylloxéra ont provoqué la disparition des vignes sauvages.

Les vignes cultivées sont issues d'une unique espèce : *Vitis vinifera*, au sein de laquelle il existe différents cépages. Un cépage est une variété de vigne qui produit soit du raisin de table (Italia, Chasselas...) soit du raisin de cuve (Merlot, Chardonnay...). L'identification des cépages est basée sur l'observation des caractères morphologiques comme la couleur des baies et la forme des feuilles. Cette étude s'appelle l'ampélogie (*Blouin et Peynaud, 2001*).

Selon certains, le nombre de variétés de vigne cultivées dans le monde se situerait entre 7000 et 10000. Les cépages de *vitis vinifera* en constituant la très grande majorité, le reste comprenant des variétés d'autres espèces. En France, on dénombre une cinquantaine de cépages couramment utilisés pour produire du raisin de cuve. Les plus plantés sont :

*En rouge: Merlot, Grenache, Cabernet-Sauvignon, Syrah, Carignan, Gamay, Cabernet Fran, Point noir.

*En blancs: Ugni blanc, Chardonnay, Sauvignon, Semillon, Melon, Chenin, Colombard, Riesling (*Huglin et Schneider 1998*).

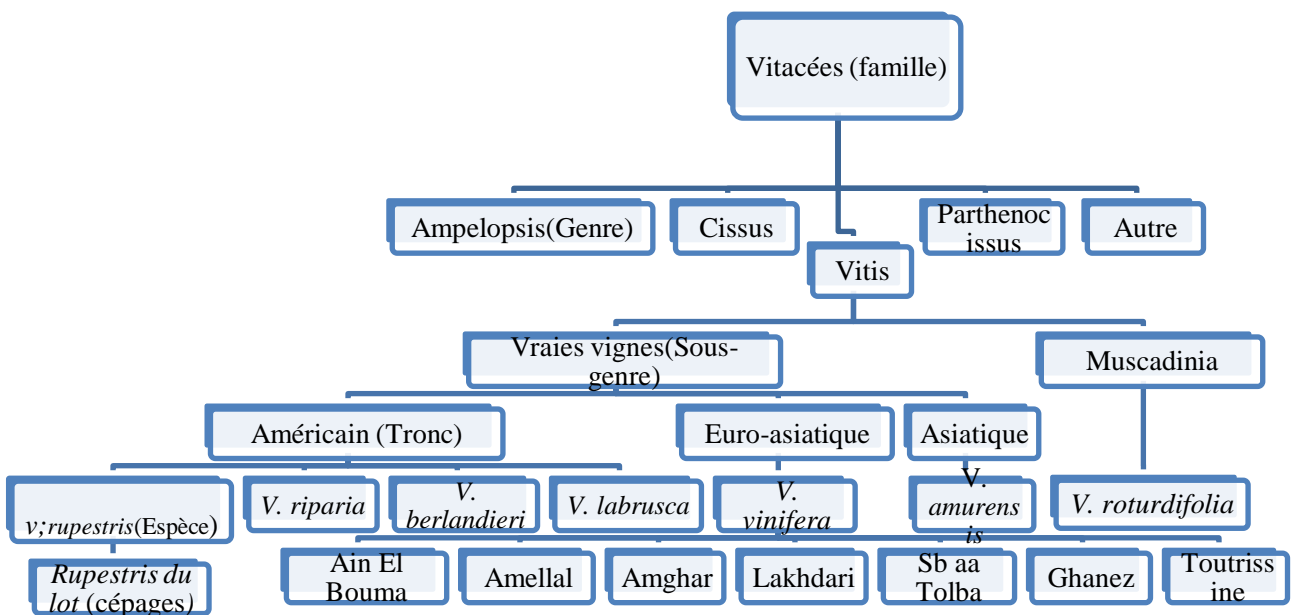
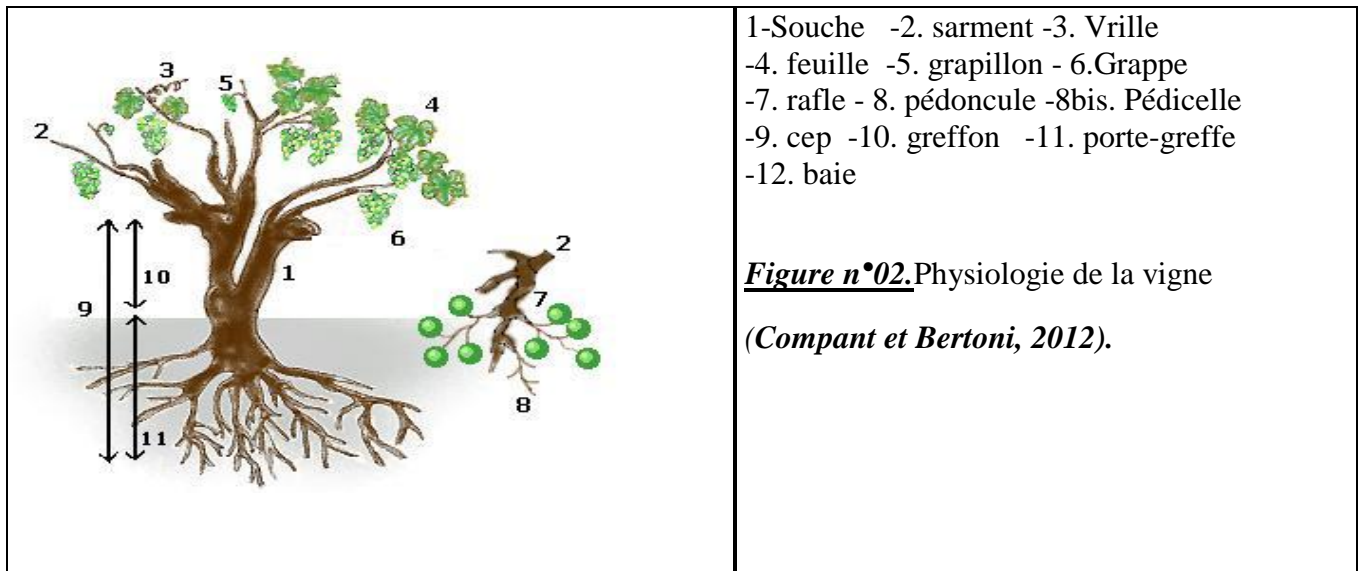


Figure n° 01. Classification des vitacées (*Reynier, 2007*).

I.1.4. Physiologie et constituants chimiques

I.1.4.1. Etude de la physiologie



La vigne est une plante pérenne qui peut être cultivée pendant 30 ou 40 ans (voire un siècle) mais qui n'entre pas en production avant 3 ou 4 ans après sa plantation. Sous climat tempéré, on observe une succession de cycles annuels qui sont interdépendants les uns des autres. En effet, les conditions de végétation apparaissant lors d'un cycle et peuvent avoir une influence sur les cycles futurs. En pratique, on décrit les stades phénologiques de la vigne au moyen de stades-repères dont ceux de **Baggiolini** sont communément utilisés dans la littérature (**Reynier, 1991**).

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

La grappe de raisin : qui contient :

- La rafle ; charpente de la grappe
- Les raisins ; fruits charnus comprenant eux-mêmes:
 - *Une peau : la pellicule
 - * Une chair: la pulpe
 - * Des graines: les pépins

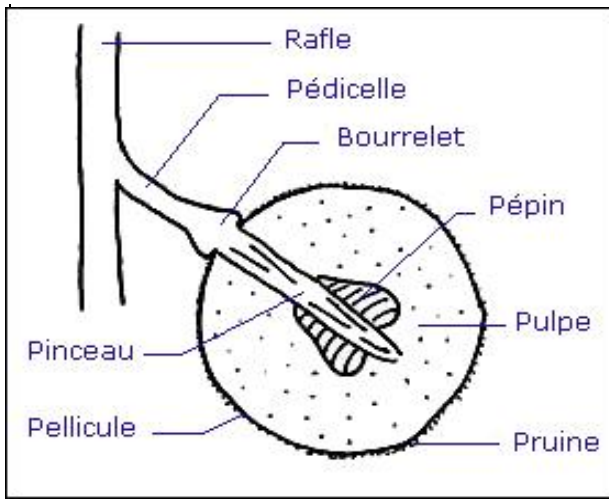


Figure n°03. Structure de la grappe de raisin (Ribéreau. et al, 1998).

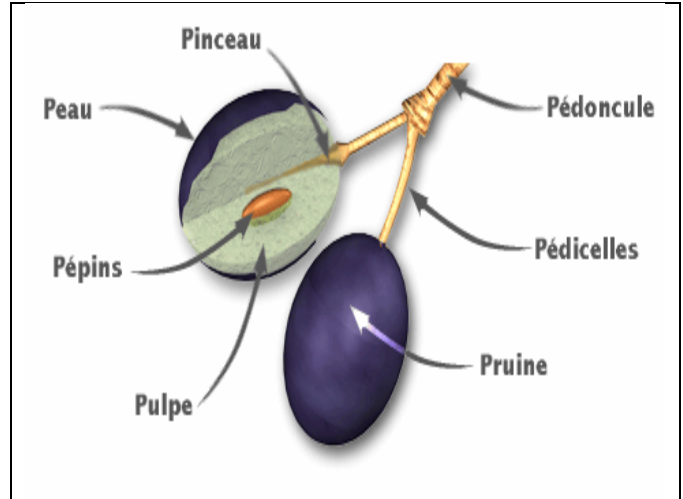


Figure n° 04. Structure de la baie de raisin

A. Etude de la rafle

C'est la charpente d'une inflorescence en grappe de grappe, elle est donc ramifiée. La ramification la plus longue forme l'axe principal de l'inflorescence; on l'appelle rachis. Les ramifications les plus courtes supportent le grain; on les appelle *pédicelles*. Elles se terminent par un élargissement sur lequel s'insère le grain; on l'appelle le bourrelet. Les dimensions relatives de ces différentes ramifications donnent à la grappe une forme plus ou moins compacte. A la véraison la rafle a atteint ses dimensions définitives (Arnaud. et al, 2007).

Dans cette rafle, on trouve les constituants chimiques suivants :

- ✓ Des tanins : Ils constituent **3%** du poids de la rafle. Si l'on mâche un fragment de rafle, on perçoit une saveur âpre, astringente. Elle correspond au "goût de rafle" dû à la présence de tanins.
- ✓ De l'eau : Elle représente **78 à 80%** du poids de la rafle. Cette dernière est très riche en eau. Ainsi, laissée en contact avec les autres parties de la vendange.
- ✓ Des matières minérales : Elles représentent **2 à 3 %** du poids de la rafle. Elles sont surtout sous forme de sels de potassium (Navarre, 1998).

B. Etude de la pellicule du raisin

Elle est constituée de tissus à forte concentration cellulaire, on distingue:

- ❖ l'épiderme: assise de cellule recouverte en surface par une sorte de vernis.
- ❖ la cuticule: sur laquelle se trouve une poussière, la pruine. C'est cette dernière qui donne l'aspect velouté du grain; de plus, elle rend la pellicule non mouillable et retient les levures et les bactéries amenées par le vent.

- ❖ l'hypoderme: tissu constitué de couches de cellule renfermant des matières colorantes et odorantes, responsables respectivement de la couleur et du fruité du raisin. Généralement ces substances ne se trouvent que dans la pellicule; exception faite des cépages teinturiers dont la pulpe est colorée, et des cépages muscats dont les arômes se trouvent également dans la pulpe (*Reynier, 1991*).

C. Etude de la pulpe

La pulpe est la partie la plus importante de la vendange. Non seulement elle représente **80 à 85%** du poids de la grappe, mais en plus, elle est constituée à maturité, de cellules possédant d'énormes vacuoles gorgées de substances élaborées. Leur paroi très mince est susceptible de se lacérer. Ainsi la pulpe est plus ou moins juteuse. On y distingue:

- ❖ une zone externe : peu épaisse; elle tapisse la face interne de la pellicule du raisin
- ❖ une zone intermédiaire : la plus volumineuse; ses cellules très riches en substances métabolisées ont leur paroi désorganisée à maturité. Lors de la cueillette ou des traitements mécaniques de la vendange, ce sont elles qui libéreront leur jus en premier. Ceci explique pourquoi les premiers jus libérés sont les meilleurs;
- ❖ une zone interne, elle abrite les pépins (*Reynier, 1991*).

D. Etude des pépins

On devrait trouver 4 pépins par fruit. Cependant dans les raisins d'une même grappe, leur nombre est variable. Il peut aller jusqu'à 9 parfois 11. Certaines variétés sont apyrènes c'est à dire qu'elles n'ont pas de pépins, donc on observe des téguments durs et lignifiés qui protègent un embryon et un albumen (*Navarre, 1998*).

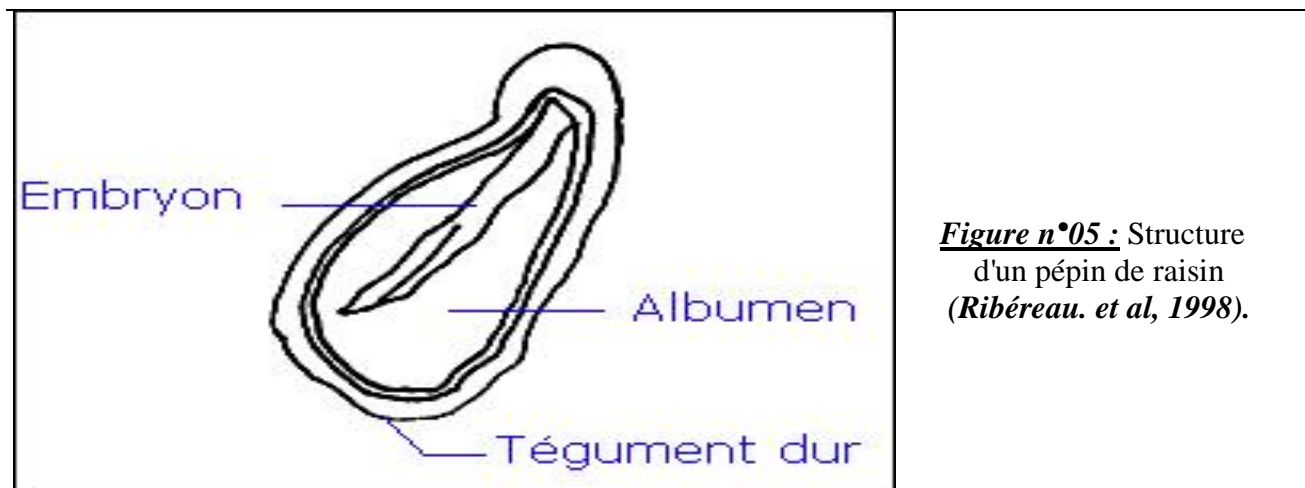


Figure n°05 : Structure d'un pépin de raisin (*Ribéreau. et al, 1998*).

I.1.4.2. Etude des constituants chimiques

a) *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, voir **350 g**.

* 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.

b) 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 (*Navarre, 1998*).

* **L'acide citrique** : on ne le retrouve dans les raisins qu'à l'état de trace.

c) 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 (*Puch et Laurent, 2000*).

d) 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.

* **Les composés terpéniques** : le citronellol, le géraniol et le nérol.

* **Le linalol** : le plus odorant, apporte un goût de bois de rose (*Guillaume, 2001*).

e) Les matières pectiques : Ce sont des corps insolubles, les protopectines. Associées à la cellulose et l'hémicellulose. On distingue : les acides pectiques, les pectines et les protopectines.

f) 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.

* **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 (*Navarre, 1998*).

Remarque : Dans le raisin on trouve évidemment de l'azote sous forme ammoniacale.

g) **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 (*Chancrin, 1996*).

h) **Les matières minérales** : Elles représentent 2 à 3% du poids de la pellicule, 1 à 2% de celui de la pulpe. La plupart sont sous forme de sels de potassium ou de calcium. Ce sont des monométalliques (des sulfates, des chlorures ou des phosphates). On trouve également dans le raisin des métaux à l'état de trace ex : arsenic (*Navarre, 1998*).

I.1.5. La flore microbienne du 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).

La microflore des raisins est composée d'une grande variété de microorganismes : levures, bactéries et moisissures. Leur présence et leur pourcentage à la surface des raisins sont influencés par plusieurs facteurs : le cépage, les conditions climatiques et de la maturation (du sol, du cépage, du domaine, de la disponibilité en eau et nutriments et de la température), les pratiques culturales (traitements, foulage, pressurage, sulfitage), la localisation géographique du vignoble, du matériel viticole, l'âge de la vigne (*Aline et al., 2012*). Au moment des vendanges, les populations dénombrées sont comprises entre 10³-10⁵ UFC/baie pour les levures et 10²-10³ UFC/baie pour les bactéries (*Renouf, 2006*).

En ce qui concerne les levures, les espèces retrouvées sur la baie ont des activités [pectolytique](#), [cellulolytique](#) ou [oxydatives](#). Les espèces *Saccharomyces* et autres espèces fermentaires sont presque indécélables à ce stade de développement. Lors de la vendange, les espèces de la baie laissent place aux espèces fermentaires. On retrouve alors principalement des levures [apiculées](#). Ces levures assurent la fermentation alcoolique spontanée. Elles présentent une faible tolérance à l'alcool, elles sont [cryophiles](#) et peuvent produire de l'acide acétique ainsi que de l'acétate d'éthyle en grande quantité. Le raisin contient plusieurs micro-organismes tels que des *Oenococcus*, des *Saccharomyces*, parfois des *Brettanomyces* (qui composent la majorité des levures non-*Saccharomyces*) et une population de bactéries acétiques négligeable (*Aline et al, 2012*)

Les espèces de levures significativement présentes sur le raisin sont de nombre limité. 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 sa forme sporogène *Hanseniaspora uvarium*), on rencontre aussi *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida*, *Stellata*, *Pichia membranefaciens*, *Pischia fermentans*, *Hanssnula anomala* mais en moindre proportion (*Ribéreau. et al, 1998*).

Tableau n°01. Quelques levures isolées des raisins (*Frédéric, 2001*).

Majoritaires	Autres
<i>Aureobsidium pullulans</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
<i>Brettanomyces</i>	<i>Saccharomyces sp.</i>
Autres levures peu ou non fermentaires (<i>Rhodotorula ...</i>)	

I.2. Notion de cépage

I.2.1. 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*). Le cépage n’est donc pas à proprement parler une unité taxonomique botanique, mais une entité empirique dont le continu botanique reste variable : c’est une collection des clones suffisamment voisins les uns des autres pour qu’ils aient pu être confondus par le vigneron sous un même nom (*Levadoux, 1971*).

I.2.2. La diversification entre les cépages

Elle est basée sur :

A. La couleur de la peau du raisin

- ❖ **Cépages rouges (noir)** : Merlot, Grenache noire, Point noir, Cabernet-Sauvignon, Syrah, Carignan, Gamay, Cabernet Fran, cinsault, Aramon.
- ❖ **Cépages blancs** : Ugni blanc, Chardonnay, Sauvignon, Semillon, Melon, Chenin, Colombard, Riesling, Grenache blanc clairette (*Huglin et Schneider 1998*).

B. L’observation des caractères morphologiques

- La couleur des bourgeons et des baies ;
- la forme des feuilles et des rameaux ;
- la dimension des grappes ;
- le goût, ...etc.

1.2.3. Vignoble en Algérie

L’encépagement de l’Algérie est le reflet fidèle de la longue histoire de ce pays qui aussi loin que les documents nous permettent de la connaître, enregistre un contact brassage de peuples et des civilisations. Antérieurement à l’introduction de la culture de la vigne, le sol algérien portait des vignes sauvages ou lambrusques appartenant tous à l’espèce commune *vitisvinifera L.* Ces vignes se sont conservées jusqu’à nos jours, elles croissent abondamment le long de la corniche Bedjaia-Djидjelli, mais elles ne sont pas toutes cantonnées en ce point, on en trouve encore dans certaines îles de l’oued Seybouse et plus rarement, car elles ont été détruites récemment par les maladies cryptogamiques, en des positions écartées, tapissant les falaises de l’intérieur (*Levadoux, 1971*).

a) 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 (*Levadoux, 1971*).

La réglementation a délimité les aires d'implantation des raisins de cuve au nombre sept appellations : Ain Bessem-Bouira ; Coteaux de Zaccar, Coteaux de Mascara, Médéa, Coteaux de Tlemcen, Dahra, Monts de Tessalah (*I.T.A.F, 2000*).

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

✓ **Carignan*

Originaire d'espagnole, le Carignan est très productif et résiste bien à la sécheresse, au vent et sensible à l'oïdium et au mildiou, ce qui lui a valu un grand succès autrefois en Afrique du Nord et dans le Sud de la France. Ce cépage donne un vin tannique à la robe d'un rouge profond.

Le bourgeonnement du Carignan est très cotonneux et les jeunes feuilles sont brillantes et de couleur jaunâtre. Après l'indépendance de l'Algérie en 1962, sa culture se déplace dans le sud de la France et il occupe aujourd'hui 1500 ha au Maroc, beaucoup moins en Algérie et en Tunisie (*Johnson, 2014*).

✓ **Cabernet franc*

Parent au cabernet-sauvignon, le cabernet franc est réputé pour sa plus grande finesse et le plus proche de la vigne sauvage, donc c'est un cépage robuste de bon rendement peu sensible aux principales maladies de la vigne comme le mildiou et l'oïdium. Ces jeunes feuilles sont vertes avec une touche de rouge et des plages bronzées ; avec des grappes sont de taille moyenne, allongées et les baies sont de petite taille, sphérique, de couleur noire bleuté, et donnent un jus à la fois sucré et légèrement astringent.

Il sublime ses arômes de fruits rouges tant dans le Val de Loire pour donner un vin qui contient moins de composés phénoliques et moins de tannins, ce qui se traduit par une robe plus claire et une moindre aptitude au vieillissement en cave (*Johnson, 2014*).

✓ **Cabernet sauvignon*

Les rameaux sont longs, durs et cassants, et les bourgeons cotonneux ont des touches de rouge vif sur leur pointe. Les jeunes feuilles sont rougeâtres, puis rosées, les grappes sont de taille moyenne à petite cylindro-conique, et formées de petites baies sphériques assez serrées, de couleur noire bleuté pruinées et à reflets blanchâtres. Leur jus est épais et visqueux, de saveur douce.

Le cabernet sauvignon est très sensible au terroir, tant pour le climat que pour la nature du sol. Il donne un vin très chargé en tanins (polyphénols). C'est un autre atout du cépage qui permet de protéger son vin de l'oxydation et au micro altération (*Johnson, 2014*).

✓ **Cinsault*

Résistant à la sécheresse et très productif, donne un vin fruité et peu alcoolisé, peu acide, pauvre en tanins et de couleur pâle qui modère en assemblage la rudesse d'autres cépages et peut se décliner tant qu'en rouge. Son bourgeonnement est cotonneux à bordure rouge, sa feuille est découpée en 5 lobes. Les grappes sont allongées, cylindro-coniques avec de grosses baies elliptiques d'un noir bleuté, très chargées en jus (*Johnson, 2014*).

✓ **Merlot*

Facile à cultiver, produisant un vin fruité aux arômes de cerise, cassis et mure, parfaitement équilibré. Les jeunes feuilles sont de couleur verte, tout comme l'entre-nœud des rameaux. Les feuilles adultes sont vert foncé, cunéiformes avec 5 à 7 lobes, avec des grappes de taille moyenne cylindro-coniques et baies sphériques de couleur bleu-noir. La pulpe est juteuse de saveur agréable (*Johnson, 2014*).

✓ **Merlot bourgogne*

Cépage blanc produisant le muscadet qui un vin blanc frais et léger aux arômes discrets d'amande verte et de citronnelle, de citron souvent avec une note iodée.

Son rameau a des entre-nœuds de couleur verte, ses feuilles sont rondes et entières, les grappes sont petites et cylindriques, compactes avec des petites baies sphériques à la peau épaisse, jeune doré à maturité (*Johnson, 2014*).

✓ **Autres cépages*

Cultivés en petites superficies mais donnent de la finesse. Citons le mourvèdre, le pinot et la syrah. Ces cépages ne sont pas originaires des pays viticoles méditerranées. Son bourgeonnement est cotonneux blanc à liséré carminé.

b) Cépages de table en Algérie

L'époque de maturité joue un grand rôle économique et permet de classer les cépages suivant à l'échelle commerciale en :

**Cépages précoces* : En Algérie, sont considérés comme cépages précoces les raisins arrivant à 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*

Connu comme raisin de table, étalon de référence pour sa précocité, débouillant aux premiers jours de printemps et venant à maturité très tôt. Les jeunes feuilles de couleur rougeâtre et les rameaux projettent des vrilles très longues. Les grappes de taille moyenne cylindrique aillées; avec des baies sphériques à la peau fine et résistante, de couleur vert clair à jaune doré, devant ambré et taché de roux à maturation; la pulpe est souple et juteuse à saveur agréable (*Johnson, 2014*).

✓ *Le Cardinal*

Cépage d'un beau 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 (*Johnson, 2014*).

** 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.

✓ ***Dattier de Beyrouth***

Un beau cépage blanc, avec de très belles grappes à baies allongées en forme de datte. C'est le cépage actuellement le plus cultivé en Algérie (60% de la superficie des raisins de table). Il est cultivé dans des zones sub-littorales comme cépage de saison et dans des coteaux et montagnes comme cépage tardif.

✓ ***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*).

✓ ***Valensi ou Mokrani***

Cultivé dans les régions de Tlemcen, Média, Mascara, Maghnia. Cépage vigoureux et très fertile, donne des rendements appréciables. Il doit être cultivé de préférence en zone de montagne où il acquiert sa beauté caractéristique.

c) Cépages à raisin sec en Algérie

✓ ***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 a été chaud et sec. La grappe est très grande, à baies de couleur rouge, de grande moyenne taille.

Chapitre II
Etude
fondamentale
des levures

Historique

Les levures sont les premiers micro-organismes utilisées par l'homme depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain par fermentation (***Bouix et Leveau, 1991 et Pol, 1996***). Elles sont également les premiers micro-organismes à être observés au microscope par A. Van Leeuwenhoek 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. A la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Büchner. A 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***).

Elle est largement utilisée comme « usine cellulaire » pour plusieurs applications, comme la production de protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutiques, de divers produits chimiques et plus récemment pour la production de bioéthanol (***Lim et al, 2011 ; Martin et al 2012 ; Neagu et Bahrim, 2012***).

II.1.Caractéristiques microbiologiques des levures

Le mot levure, selon (***Phaff et al.1968***), provient du mot latin « levare » qui se traduit par lever. Ce mot a été appliqué aux levures en raison de l'aptitude de ces micro-organismes à produire de CO₂ pendant la fermentation et à lever la surface mousseuse d'un milieu liquide de fermentation (***Oteng-Gyang, 1984***).

Les levures sont des eucaryotes chimio -hétérotrophe, c'est-à-dire qu'elles sont capables de tirer leur énergie à partir des réactions d'oxydo-réduction ou de fermentation de composés chimique tels que les sucres, faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par leur caractère unicellulaire et l'absence de vrai mycélium (***Guiraud et Galzy, 1998 ; Guiraud, 1996***).

II.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 (***Bouix et Leveau, 1991***).En effet, les milieux fortement concentrés en sucre représentent un de leur environnement préférés, comme les sirops, le miel, les fleurs et de nombreux fruits (les pommes, les raisins) (***Leclerc, 1975 et Oteng-Gyang, 1984***). 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 (***Leveau et Bouix, 1993 et Pol., 1996***). Par ailleurs, le sol constitue un large réservoir assurant leur survie dans des conditions défavorables (***Leclerc, 1975***).

II.1.2. Morphologie et Structure

Les levures sont des cellules eucaryotes. Elles présentent une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de golgi et de plus d'un chromosome (*saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes) (**Labrecque, 2003**). Les cellules végétatives sont généralement ovoïdes ou sphériques, mais il existe d'autres formes spécifiques : triangulaires, ogivales, en forme de citron ou même en forme de bouteille. Leur taille cellulaire varie de quelques microns jusqu' à 25 à 30 microns. Certaines peuvent former des associations cellulaires ou se présenter sous forme filamenteuse à un certain stade de leur vie (**Bouix et Leveau, 1991**). Les colonies sont, en général, blanches (très rarement roses ou rouges) et régulières (**Guiraud, 1998**).

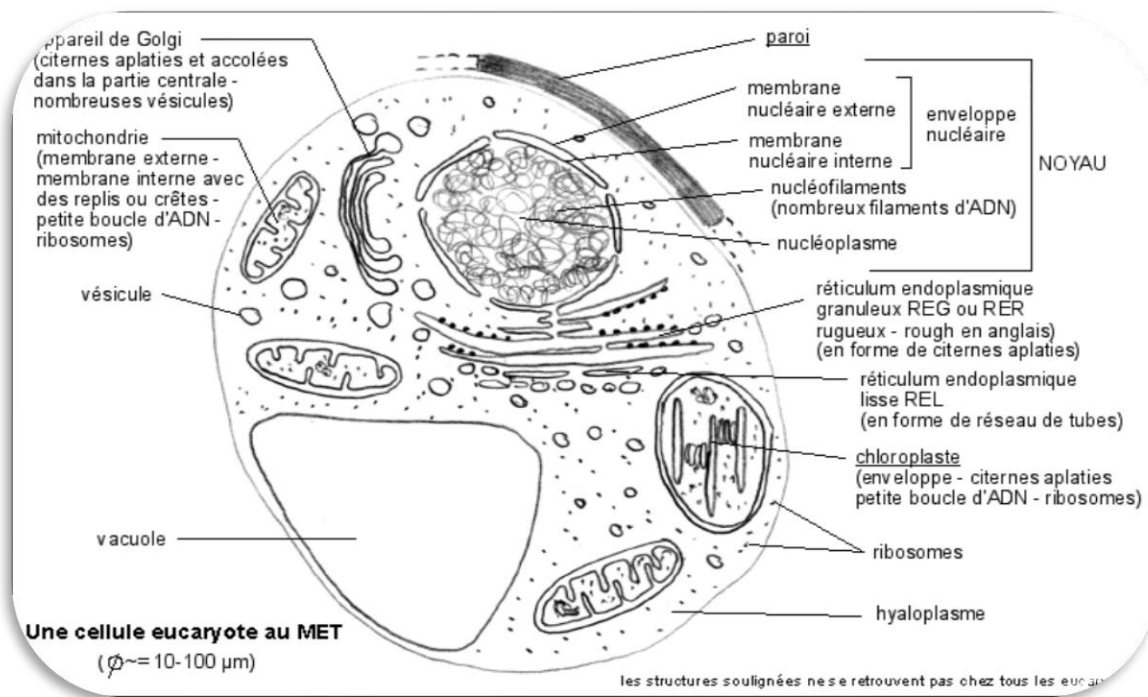


Figure n°06 : Structure cellulaire des levures (*Thuriaux, 2004*)

II.1.3. Cytologie

Les levures sont des cellules eucaryotes. Elles présentent une structure plus complexe que celle des bactéries, notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil golgi.

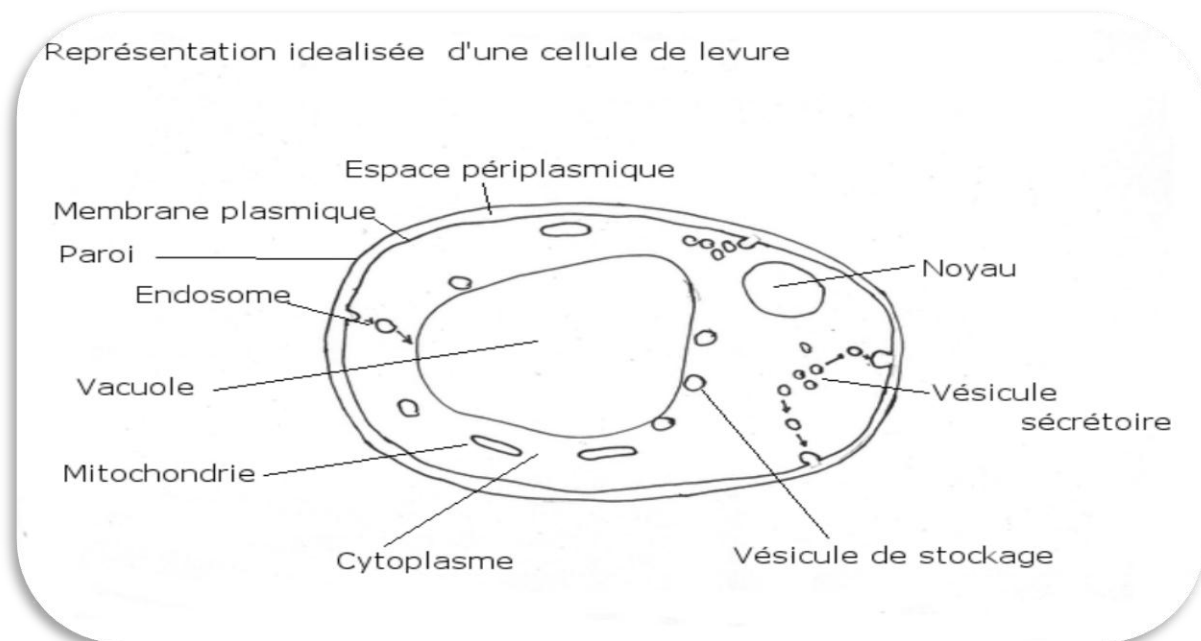


Figure n°07 : représentation idéalisée d'une cellule de levure.

❖ La paroi cellulaire

C'est une structure dynamique externe qui englobe toute la cellule conférant sa rigidité et sa forme caractéristique. Elle représente 15 à 20% de la matière sèche de la cellule, d'épaisseur 150 à 230 nm. Sa composition chimique qui est sujette à des variations importantes suivant les espèces, le cycle cellulaire et les conditions de culture (*Aguilar-Uscanga et François, 2003*), comprend environ 80% de polysaccharides principalement des mannanes (*Peat et al., 1969 et Manners et masson, 1969*), en proportion quasi égales, 10 à 20% de protéines, 7 à 10% de lipides, 5% de sels minéraux et 1 à 3% de chitine qui se trouve majoritairement au niveau des cicatrices de bourgeonnement afin de maintenir l'intégrité de la paroi (*Suarit et al., 1988 et Lipke et Ovale, 1998*). La couche intérieure de la paroi est en grande partie responsable de sa force mécanique et fournit aussi les sites d'attachement pour les protéines qui forment sa couche extérieure (*Klis et al., 2002*). Cette structure joue un rôle important en maintenant une structure élastique qui assure une protection osmotique et constitue une barrière physique.

❖ L'espace périplasmique

C'est une espèce qui est délimitée par la membrane plasmique et la couche interne de la paroi et représente le seul site de localisation cellulaire des enzymes telles que l'invertase (*Neumann et Lampen, 1967*), la phosphatase acide (*Schurr et yagile, 1971 et Arnold, 1981*), les β -galactosidases, les β -glucanases (1-3) et β (1-6) et des protéases (*Barnett et Robinow, 2002*).

❖ La membrane plasmique (ou le plasmalemma)

C'est une membrane simple et fragile qui se trouve sous la paroi avec une épaisseur de 7,5 nm, retenant l'ensemble des constituants intracellulaires et résistante aux PH acides mais altérée par des PH alcalins. Les membranes biologiques sont composées de deux types de constituants principaux : les lipides et les protéines. La diversité des membranes étant très grande, les compositions lipidiques diffèrent selon les organismes.

Dans la composition lipidique de la membrane plasmique, on distingue les phospholipides et les stérols. Parmi ces derniers c'est l'ergostérol qui est le dérivé majeur et dont la teneur varie d'une espèce à l'autre et en fonction de l'âge des cellules. Les autres stérols sont des précurseurs de l'ergostérol. Un grand nombre de travaux démontrent qu'en aérobiose les levures contiennent surtout des stérols insaturés tels que l'ergostérol, tandis qu'en anaérobiose elles renferment des quantités non négligeables de squalènes, triterpène linéaire intermédiaire de la biosynthèse des stérols. Ces derniers qui sont soit libres soit estérifiés avec un acide gras augmentent la rigidité de la membrane et diminuent sa perméabilité. Les phospholipides, qui sont intimement associés aux protéines et aux stérols, assurent à la membrane sa fluidité permettant ainsi le bon fonctionnement des processus métabolique (*Bayley et Parks, 1975*).

❖ Le cytoplasme

Le cytoplasme renferme en plus des organites cellulaires tels que les mitochondries (qui contiennent des ADN, ARN, ARN polymérase et des enzymes respiratoires) et l'appareil de golgi, des vacuoles (ou se trouve le pool des acides aminés en plus des purines, des orthophosphates polymérisés et des hydrolases) et des ribosomes. Il contient également des enzymes, notamment celles de la glycolyse et de la fermentation alcoolique, des polysaccharides, des polyphosphates, du glycogène et du tréhalose (*Larpen, 1991*)

❖ Le noyau et le réticulum endoplasmique(RE)

La levure possède en général un seul noyau qui est entouré d'une enveloppe à deux membranes ou la membrane externe est en relation continue avec un système membranaire cytoplasmique important, le réticulum endoplasmique. En de multiples endroits les membranes externe et interne fusionnent pour former des pores, ces derniers permettent les échanges entre le noyau et le reste de la cellule. Il contient le génome de la levure qui est réparti sur les chromosomes dont la structure est semblable à celle des autres eucaryotes avec un enroulement de l'ADN en « grains de chapelet » formés par des nucléosomes constitués d'histones de type H2a, H2b, H3 et H4. Ce nucléosome, découvert grâce aux progrès de la biophysique et de la microscopie électronique est considéré comme unité de base comprenant 146 paires de bases d'ADN, enroulés autour d'un octamère de protéines histones.

Le nombre des chromosomes varie selon les espèces, pouvant atteindre 3 chez *Hansenula holstii*, 2 chez *H.anomala* et 16 chez *S.cerevisiae haploïde*.

❖ 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 (*Larpent, 1997*).

II.1.4. Reproduction

Les levures ont un mode de multiplication bien spécial. Elles se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexué (sporulation) en fonction des conditions favorables ou défavorables du milieu (*Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997*). De plus, les populations des levures connaissent un cycle de vie complexe, dans lequel on trouve alternativement des cellules haploïdes et des cellules diploïdes. Pour la plupart des levures, la reproduction asexuée est la forme majeure de multiplication (*Bonaly, 1991*). Elle s'effectue par bourgeonnement ou par fission (scissiparité) à partir d'une cellule mère. La reproduction sexuée s'effectue par conjugaison des deux cellules qui donnent naissance à un zygote.

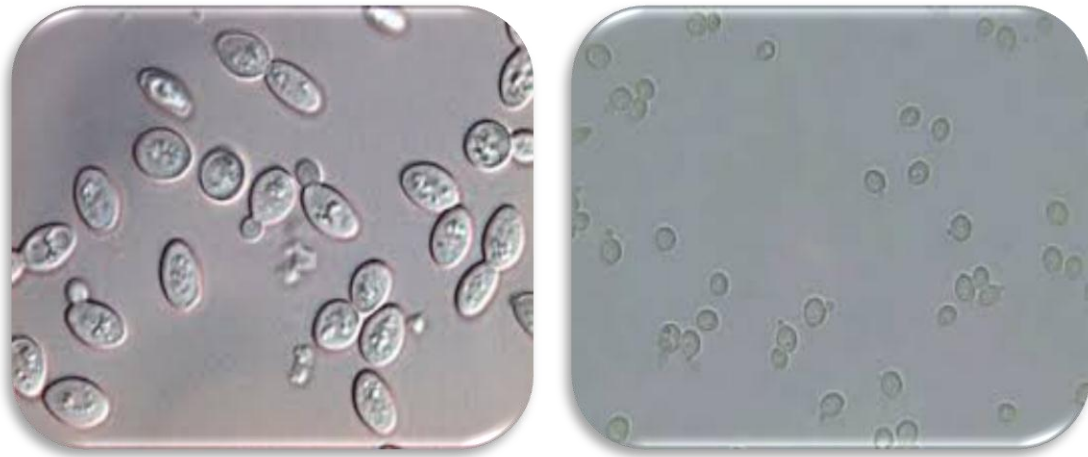


Figure n° 08 : Division de cellules levuriennes par bourgeonnement (*Leclerc et al, 1995*).

Après différenciation et méiose un asque à 4 ascospores haploïdes se forme (*Oteng-Gyang, 1984*).

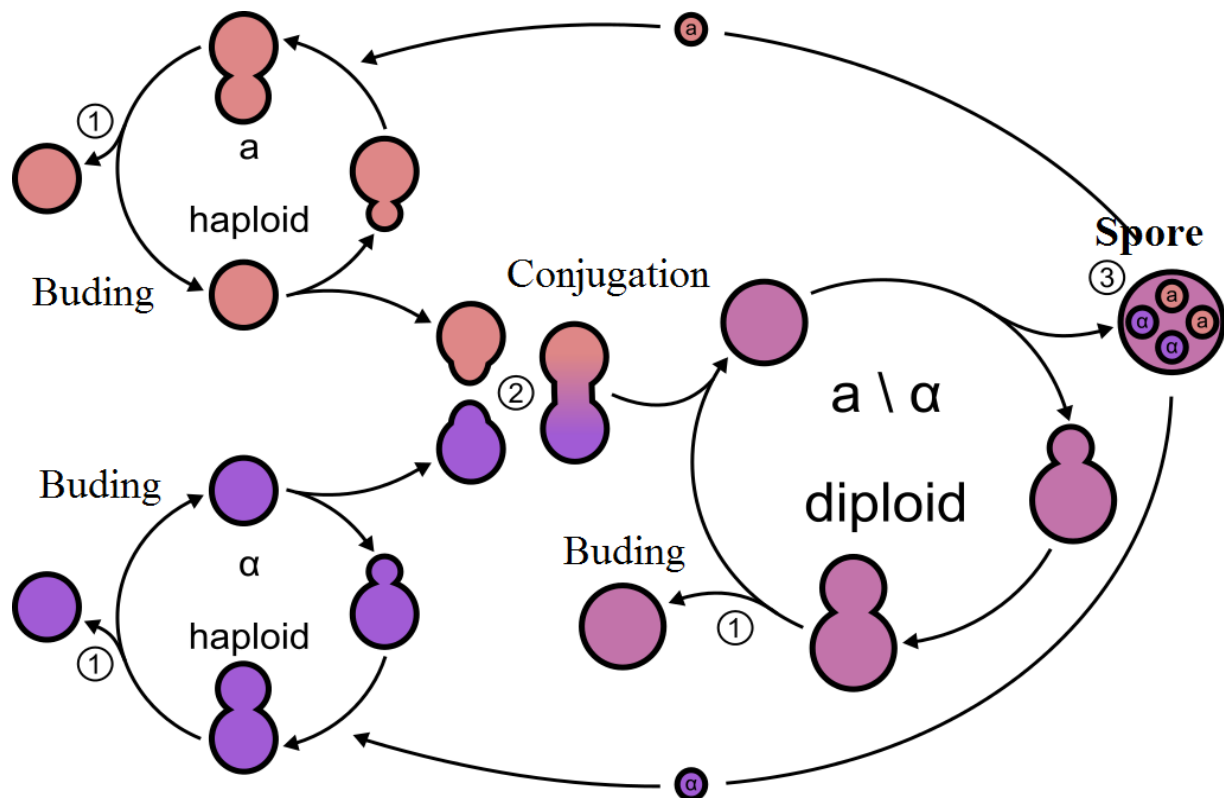


Figure n° 09: Cycle de reproduction de la levure (Leclerc et al., 1995).

II.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 de 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 (Ribéreau et al., 1998).

II.2.1. Caractères botaniques

Ils permettent de distinguer :

- * Les levures sporogènes, qui rassemblent de nombreux genres : *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Nadsonia*.
- * Les levures asporogènes, qui rassemblent les genres *Rhodotorula*, *Kloeckra*, *Candida*, *Brettanomyces* (Ribéreau et al., 1998).

II.2.2. Caractères morphologiques

Les cellules de levures sont généralement ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques. Leur taille va de 2 à 3 microns et même jusqu'à 5 microns chez certaines espèces de levures. Les cellules peuvent après bourgeonnement rester liées les unes aux autres et constituer aussi un pseudomycélium. Plus ou moins différencié suivant les genres ou les espèces. Dans certaines conditions, d'autres levures peuvent produire de mycéliums caractéristiques de champignons filamenteux, comportant des cloisons transversales ou septa et présentant une croissance apicale (*Bourgeois et al, 1988*).

II.2.3. Caractères biochimiques

Les levures étant dépourvues de chlorophylle sont incapables de produire les composés organiques nécessaires à leur croissance à partir de substrats minéraux comme le font les végétaux supérieurs, les algues et quelques bactéries. Elles sont donc saprophytes et quelques fois parasites. Pour leur croissance, elles ont besoin d'oxygène, de sources organiques de carbone, d'azote minéral ou organique, de divers minéraux, d'une température et d'un pH adéquats. Certaines d'entre elles ont également besoin d'un ou plusieurs vitamines comme par exemple la thiamine (vitamine B1), biotine (vitamine B8), inositol (vitamine B7), acide pantothénique (vitamine B5) (*Karlson, 1970*) et d'autres facteurs de croissance. Toutes sont capables d'utiliser le D-glucose, le D-fructose et le D-mannose. Certaines levures produisent des lipides (*Lipomyces starkeyi*) d'autre ont une activité lipolytique. Elles utilisent de nombreux substrats carbonés soit uniquement par voie oxydative (*Cryptococcus, Rhodotorula*), soit pour la plupart, après une phase aérobie de démarrage de la croissance, par métabolisme fermentaire (anaérobie) conduisant à la production d'éthanol et de CO₂. Les levures ne provoquent pas d'intoxications alimentaires et seules *Condida albicans* et *Cryptococcus neoformans* sont pathogènes (*Bourgeois et al., 1988*).

II.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 (*Ribéreau et al., 1998*).

II.3. Classification des levures

La classification de référence est actuellement celle de (*Kreger-Van, 1984*) qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente classification de (*Lodder, 1971*). En particulier, de nouveaux critères taxonomiques sont pris en considération pour permettre des études plus rigoureuses. Il s'agit d'un groupe hétérogène, qui d'un point de

vue taxonomique, comprend une soixantaine de genres et près de 500 espèces (**Kreger-Van, 1984**). Les levures se divisent en 3 grandes classes :

- Les ascomycètes : genres sexués, où les produits de la méiose ou ascospores sont endogènes et enfermés dans une structure issue du zygote : l'asque.
- Les basidiomycètes : genres sexués, où les produits de la méiose ou basidiospores (chez les levures sont souvent appelés ballistospores) sont exogènes et émis à l'extérieur du zygote.
- Les deutéromycètes ou levures imparfaites : genres asexués ne se multipliant que par reproduction végétative.

Tableau n°02 : Classification des levures (Kreger-Van., 1984).

Les levures ascomycètes	levures basidiomycètes	Les levures imparfaites
<p>Saccharomycetaceae</p> <p>1. Schizosaccharomycetoidea</p> <p><i>Schizosaccharomyces</i></p> <p>2. Saccharomycetoidea</p> <p><i>Ambrosiozyma</i></p> <p><i>Arthroascus</i></p> <p><i>Arxiozyma</i></p> <p><i>Citeromyces</i></p> <p><i>Clavispora</i></p> <p><i>Cyniclomyces</i></p> <p><i>Debaryomyces</i></p> <p><i>Dekkera</i></p> <p><i>Guilliermondella</i></p> <p><i>Hansenula</i></p> <p><i>Issatchenkia</i></p> <p><i>Kluyveromyces</i></p> <p><i>Lodderomyces</i></p> <p><i>Pachysolen</i></p> <p><i>Pachytichospora</i></p> <p><i>Pichia</i></p> <p><i>Saccharomyces</i></p> <p><i>Saccharomycopsis</i></p> <p><i>Schwanniomyces</i></p> <p><i>Sporopachydermia</i></p> <p><i>Stephanoascus</i></p> <p><i>Torulaspora</i></p> <p><i>Wickerhamiella</i></p> <p><i>Wingea</i></p> <p><i>Yarrowia</i></p> <p><i>Zygosaccharomyces</i></p> <p>3. Lipomycetoidea</p> <p><i>Lipomyces</i></p>	<p>Levures formant des teliospores</p> <p><i>Leucosporidium</i></p> <p><i>Rhodosporidium</i></p> <p><i>Sporidiobolus</i></p> <p>Filobasidiaceae</p> <p><i>Filobasidiella</i></p> <p><i>Filobasidium</i></p> <p>Levures non classées</p> <p><i>Sterigmatosporidium</i></p>	<p>Sporobolomycetaceae</p> <p><i>Bullera</i></p> <p><i>Sporobolomyces</i></p> <p>Cryptococcaceae</p> <p><i>Aciculoconidium</i></p> <p><i>Brettanomyces</i></p> <p><i>Candida</i></p> <p><i>Cryptococcus</i></p> <p><i>Eeniella</i></p> <p><i>Fellomyces</i></p> <p><i>Kloeckera</i></p> <p><i>Malassezia</i></p> <p><i>Oosporidium</i></p> <p><i>Phaffia</i></p> <p><i>Rhodotorula</i></p> <p><i>Schizoblastosporion</i></p> <p><i>Sterigmatomyces</i></p> <p><i>Sympodiomyces</i></p> <p><i>Trichosporon</i></p> <p><i>Trigonopsis</i></p>

<p>4. Nadsonioideae <i>Hanseniaspora</i> <i>Nadsonia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Wickerhamia</i></p> <p>5. Spermophthoraceae <i>Coccidiascus</i> <i>Metschnikowia</i> <i>Nematospora</i></p>		
---	--	--

II.4. Physiologie et croissance des levures

II.4.1. Les besoins nutritifs

Les nutriments sont apportés au milieu de culture de façon graduelle pour maintenir une faible concentration de glucose afin d'encourager la respiration et la reproduction cellulaire des levures. Les éléments chimiques nécessaires à la croissance des levures sont :

✓ Sources de carbone

Il est maintenant bien établi que la plupart des levures utilisent des sucres comme source principale de carbone et par conséquent d'énergie. D'autres levures particulières utilisent des sources de carbone non conventionnelles (éthanol, glycérol) (*Barnett, 1976 et Tamaki et Hama, 1982*). Cependant, leur croissance sur des substrats non-glucidiques les oblige à synthétiser des sucres exigés pour la biosynthèse macromoléculaire, en particulier celle des polysaccharides complexes (*Walker et al., 1997*).

✓ Source d'azote

Comme les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre, elles dépendent de ses formes oxydées ou réduites pour la synthèse des composés azotés structuraux et fonctionnels de la cellule (*Babjeva et al., 1977*). La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques dans la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (*Guiraud, 1998*). L'assimilation des ions d'ammonium (fournis dans le milieu ou dérivés du catabolisme d'autres composés azotés) est largement répandue chez les levures. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés, comme source d'azote (*Walker et al., 1997*).

✓ 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 (*Suaritet al., 1988*). Les oligo-éléments sont essentiels pour la cellule, puisqu'ils réagissent comme cofacteurs de divers enzymes impliquées dans le métabolisme microbien. Ils sont

nécessaires en très petites quantités mais un excès provoquera la dénaturation d'enzymes et une perturbation de la morphologie et de la physiologie cellulaire et de la vitesse de croissance (*Blom et al., 2000*). Les oligo-éléments augmentent la production de l'éthanol de 20% par *Sacharomyces cerevisiae* (*Guiraud, 1996*). De plus, d'autres facteurs sont essentiels comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique), qui interviennent lors des réactions enzymatiques, comme des coenzymes (*Aguilar Uscanga, 2003*).

II .4.2. Les conditions physicochimiques de croissance

✓ La température

Les températures d'incubation, sont généralement proches de celles qui permettent la propagation des levures dans leurs environnements naturels et se situent entre 25°C et 30°C. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans certains habitats, à savoir les régions à températures constamment basses ou élevées (*Vishniac et Hempfling, 1979*).

✓ Le pH

Les levures présentent une tolérance élevée aux pH extrêmes. Elles tolèrent des gammes très larges allant de 2.4 à 8.6. Entre ces valeurs, le pH intracellulaire est compris entre 5.8 et 6.8 (*Bouix et Leveau, 1991*). Cependant, Phaff et ses collaborateurs (1978) ont noté que la plupart des levures connues, ont une bonne croissance à des pH proches de 3.

✓ 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 genres : *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*. Les autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire comme ; *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Brettanomyces* soit respiratoire comme ; *Candida*, les *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula* et *Torulopsis*) (*Bouix et Leveau, 1991*).

✓ L'aération

Les levures peuvent être classées selon leur mode de production énergétique, utilisant la respiration ou la fermentation. Il est important de noter que ces processus sont principalement réglés par des facteurs environnementaux (*Walker et al., 1997*). En effet, toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes, certaines sont aérobies strictes et d'autres sont aéro-anaérobies facultatives (*Bouix et Leveau, 1991*).

✓ 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 xérotolérantes (*Bourgeois. et al., 1996*).

II .5. Techniques d'étude des levures

II .5.1 Méthodes classiques d'identification des levures

L'identification des levures est basée sur les caractères cultureux : la forme, la couleur des colonies et l'aspect de la culture sur milieu liquide et solide (*Bouix et al., 1999; Guiraud, 1998*), les caractères morphologiques et cellulaires (le mode de reproduction végétative, aptitude à la filamentation) et les caractéristiques sexuelles et les caractères biochimiques (la fermentation et l'assimilation de différents substrats) (*Guiraud, 1998 ;Kreger, 1984*).

II.5.1.1 Etude des caractères cultureux

Les formes de levures doivent être examinées de préférence sur des cultures jeunes, c'est-à-dire après 24 à 48 heures de développement en milieu liquide ou sur milieu solide. Les aspects de la culture en milieu liquide et sur gélose seront notés. Ainsi, dans des milieux liquides en aérobiose comme en anaérobiose, de nombreuses espèces de levure flocculent. Le moment de l'apparition de la floculation, la taille et la forme de flocons, le nombre de cellules, les constituants, la disposition des cellules dans le flocon sont des caractères qui varient entre les espèces et même entre les souches d'une même espèce. La floculation des levures est un phénomène qui revêt une importance technique et économique significative en industrie agro- alimentaire (*Stewart et Russell, 1981*).

II.5.1.2 Etude 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*).

II.5.1.2 .1.Morphologique cellulaire normale et mode de reproduction végétative

Les caractéristiques morphologiques des cellules végétatives sont étudiées d'après des préparations microscopiques effectuées entre lame et lamelle à partir de cultures en milieu liquide et en milieu solide (*Bourgeois, Leveau, 1980*). L'examen à lieu à partir du milieu liquide ou du milieu solide à partir zones au moins. Pour l'observation microscopique utilisée des préparations à l'état frais au grossissement x10 puis x40(*Joseph-Pierre et Guirod, 1998*). L'étude microscopique permet de définir:

- La forme soit sphérique, ovoïde, allongée ou la taille des cellules en milieu liquide et sur milieu solide;
- Le mode de reproduction végétative par scissiparité ou bourgeonnement et dans le cas le nombre et la position (polaire, latérale) du (ou des) bourgeon (s) sur la cellule mère (*Bourgeois, Leveau, 1980*).

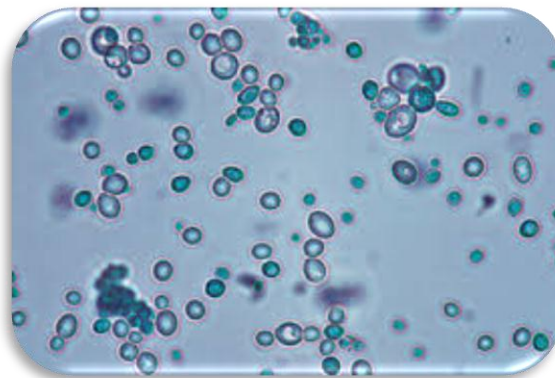


Figure n°10 : Le mode de reproduction des levures.

➤ **Aptitude à la filamentation**

Dans certaines conditions de culture. Les levures peuvent donner des formes mycéliennes qui sont parfois mises en évidence par un examen microscopiques. La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation d'une souche doit cependant s'effectuer sur un milieu spécifique comme le milieu PDA ou YPG (*Guiraud, 2003*).

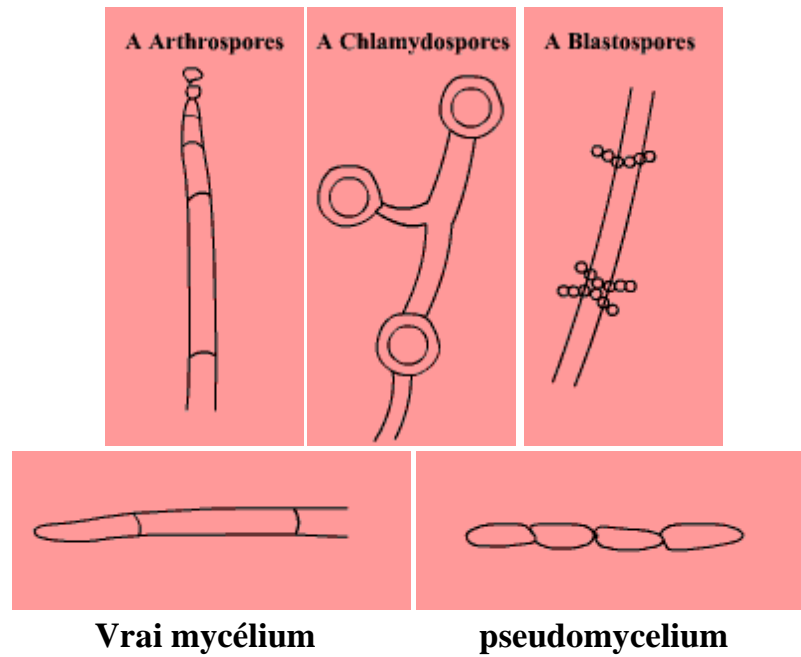


Figure n°11 : Filamentation des levures (*Guiraud, 1998*).

➤ Morphologies particulières

Les chlamydoconidia et les ballistospores apparaissent dans des milieux pauvres sous tension d'oxygène réduite. Leur recherche s'effectue à partir des milieux spécifiques. Le milieu classique pour la production de chlamydoconidia chez *Candida albicans* est le riz agar (*Cahaghier, 1998*).

II.6. Caractères physiologiques et biochimiques

II.6.1. Fermentation des sucres

La description standard des levures se base sur la capacité à fermenter certains sucres, examinés dans des tubes de Durham pendant une période fixe. La caractérisation de la fermentation qu'elle soit vigoureuse, bonne, lente ou faible, dépend de la quantité de gaz dégagé dans le tube d'insertion (*Kreger-van Rij, 1984*).

II.6.2 Production du glycérol

Industriellement, le glycérol est un sous-produit de l'industrie des savons et du biodiesel (100 Kg de glycérol sont produits pour 1 tonne de savon⁴ ou de biodiesel). Le glycérol produit industriellement, possède généralement une pureté de 75-90%. En effet, de l'eau et des sels résiduels (provenant des catalyseurs) sont les principaux contaminants du glycérol.^{6, 7, 8} Le Tableau 2 montre quelques données sur la composition du glycérol (ou glycérine) produit par l'industrie du biodiesel.

Les procédés de purification du glycérol nécessitent la suppression des sels résiduels), l'élimination du méthanol provenant du procédé de méthanolyse des huiles végétales et l'élimination de l'eau. Ces procédés sont très coûteux en énergie et font intervenir des étapes de distillation, d'échanges ioniques (en utilisant des zéolites ou des résines échangeuses d'ions), d'adsorption sur charbon actif, de précipitation, de cristallisation ou bien encore de dialyse. Certaines techniques de séparation impliquent également l'utilisation du vide.

II.6.3 Assimilation des composés carbonés

L'importance de l'assimilation des substrats carbonés comme critère pour la distinction des levures est soulignée par **Wickerham et Burton (1948)** et **Wickerham, (1951)**. Ces composés sont choisis pour leur intérêt distinctif, bien que la connaissance détaillée de leur utilisation, du point de vue biochimique, fait souvent défaut (*Ostergaard et al., 2000*).

II.6.4 Assimilation des sources azotées

Les levures assimilent généralement l'ammonium, les peptones, les acides aminés et parfois l'urée. Certains substrats azotés comme les nitrates, les nitrites, l'éthylamine, la cadavérine, l'urée, etc.... ne sont utilisés que par certaines espèces ; propriété spécifique pour leur identification (*Guiraud, 1998*).

II.7 Identification moléculaire

Depuis quelques années, le développement des méthodes analytiques et moléculaires a permis aux scientifiques de réaliser une classification des microorganismes selon des caractéristiques biochimiques basées sur l'étude de trois grandes classes principales de molécules :

- Les métabolites primaires, composés nécessaires aux fonctions vitales de l'organisme ;
- Les métabolites secondaires tels que les alcaloïdes ou les terpènes, qui n'ont pas de fonctions vitales ;
- Les sémantides qui portent l'information génétique : acide désoxyribonucléique (ADN), acide ribonucléique (ARN) et protéines.

II.7.1. Le mécanisme moléculaire chez les eucaryotes

II.7.1.1. 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, 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 tels que la gyrase et l'hélicase qui favorisent le déroulement du double brin d'ADN, et l'ADN polymérase qui est responsable de l'élongation d'ADN (*Etienne et al.,2006*).

II.7.1.2.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 la copie consiste à hybrider un ADN dénaturé à deux amorces nucléotiques, qui permettent la copie du brin qu'elles encadrent, à l'aide d'une ADN polymérase thermorésistante. Chaque couple d'amorces est composé d'une 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 du brin antiparallèle (*Domergue et le Roux, 2007*).

La polymérisation est réalisée en présence de désoxynucléotides triphosphates (dATP,dTTP,dCTP, dGTP) et de l'ADN polymérase (taq) isolée 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 ciblée (*Domergue et le Roux, 2007*).

II.7.2. Méthode de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR)

La PCR est une suite de cycles (thermocycleur), qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température. De plus, chacun de ces paliers est caractérisé par une réaction chimique distincte. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles (*Roland, 2008*).Un cycle de PCR comporte donc trois phases dans l'ordre suivant :

- **La dénaturation**

La température est réglée à **95°C**.A ce moment-là, l'ADN se dénature, En effet l'ADN perd sa structure caractéristique en double hélice, les liaisons hydrogène reliant les bases de chaque brin d'ADN étant instables à cette température. L'ADN double brin (2 brins) est dénaturé en ADN simple (1 brin) .

- **L'hybridation**

Ensuite la température est descendue à la température dite d'hybridation. Cette dernière est généralement comprise entre 45°C et 50°C et elle est fonction de la composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) des amorces.

Les amorces reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène. On dit que les amorces s'hybrident au brin d'ADN. Selon les lois de l'hybridation (complémentarité des séquences d'ADN, spécificité d'hybridation obtenue à une température donnée).

- **L'élongation**

Puis la température est réglée à 72°C, température idéale pour l'activité de la Taq polymérase. Cette étape permet à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce au dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel (Claude. et al., 2007).

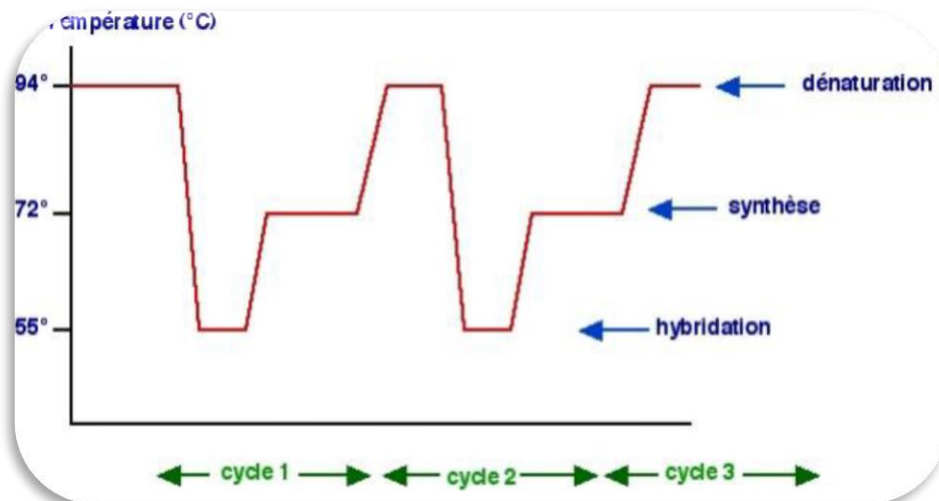


Figure n°12 : Les trois phases de cycle de PCR (Cézard, 2009).

II.7.3. 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, se 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 au travers d'un réseau solide non mobile (généralement un gel en agarose ou polyacrylamide).

Ce réseau permet de retenir les molécules en fonctions 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*).

II.7.4. 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'espèce) de la diversité microbienne. (*Renouf, 2006*) et afin d'être le plus discriminant possible, il 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 mais également des séquences variables spécifiques d'un genre, d'une espèce voire d'une souche. (*Filofteia, 2010*).

II.7.5. Technique d'identification moléculaire au niveau de l'espèce

II.7.5.1. PCR- ITS

Les méthodes moléculaires se basant sur l'analyse des unités répétées de l'ADN ribosomique (ADNr) sont le 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 ITS1-5.8 S-ITS2 (*ITS pour Internal Transcribed Spacer*) grâce à des amorces situées dans des séquences flanquantes conservées dans les unités 18 S et 26 S (*Ayoub, 2006*).

Cette technique permet d'amplifier une partie de l'ADN ribosomique, la région **ITS** (*Internal transcribed Spacer*) des levures, moisissures ou bactéries. Cette région étant théoriquement identique pour tous les individus d'une espèce donné, mais différente d'une espèce à l'autre, elle est la base de nombreuses études taxonomiques.

Différents auteurs ont utilisé les régions 18 S ou même les régions NTS (Non Transcribed Spacer) pour identifier des espèces de levures par PCR-RFLP. Mais les séquences 26 S de l'ADNr ou ITS sont les plus utilisées pour l'identification des espèces par PCR-RFLP (*Zott, 2009*).

PCR ITS c'est la région de l'ADNr comprenant les ITS 1 et 4 ainsi que le gène de l'ARNr 5.8 S est amplifiée par PCR (*Janvier C., 2007*) avec les amorces.

- ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')
- ITS 4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (*Polomska, 2007*).

II.8. Identification des levures au niveau de la souche

II.8.1. PCR-RELP (restriction fragments length polymorphism)

La technique de RFLP est le résultat d'une combinaison d'une digestion par des enzymes de restriction à nombre élevé de sites de coupure et d'une électrophorèse simple (*Boulouis. et al., 2001*). L'ADNr 18 S ou 26 S avec ou sans l'IGS (espace intergénique) entre les gènes de l'ADNr 18 S et 26 S sont amplifiés avec des amorces universelles

définies en alignant les séquences disponibles, le produit de la PCR est ensuite digéré par les enzymes de restriction (*Moussa, 2011*).

Le RFLP est un véritable marqueur génétique. En effet, il correspond à un emplacement strictement défini sur le génome et se caractérise par sa viabilité d'une espèce à l'autre (*Ludes. et al., 1992*). La PCR-RFLP est basée sur l'étude d'un gène ou d'un fragment d'ADN. Plusieurs auteurs ont utilisé un fragment de l'ADN ribosomal tel que les unités 5.8 S (très conservées), 18 S et 25 S (très conservées mais plus utiles que 5.8 S), les espaceurs (interne ou externe qui sont des régions non codantes et variables) ou encore intergenic Spacer(IGS) qui sépare deux copies de l'ADN ribosomal (*Verscheure.et al., 2002*).

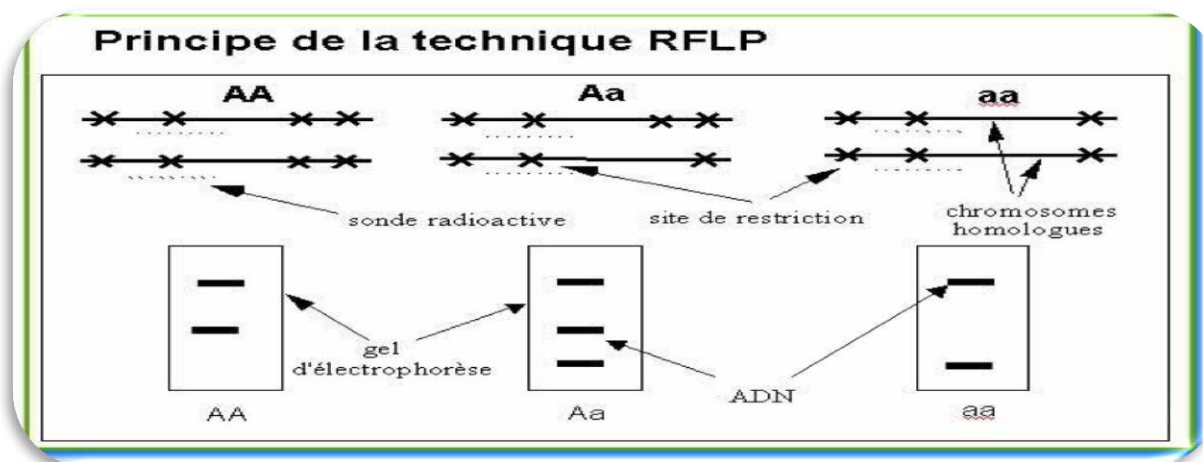


Figure n°13: Principe général de la PCR-RFLP (*Verscheure.et al., 2002*).

II.9. Les différentes méthodes d'identification des levures

Une liste non exhaustive des différentes techniques PCR est :

- **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.
- **L'inverse PCR** : elle permet l'amplification d'une séquence inconnue d'ADN lorsqu'elle encadre une région de séquence connue.
- **La RAPD-PCR** (Random Amplified polymorphie DNA-PCR) : elle utilise une paire d'amorces identiques d'environ 10 paires de bases choisies au hasard.

L'AS-PCR (AUEie Specific-PCR) : elle est à rapprocher de la PCR spécifique standard. Elle utilise l'amplification particulière de séquences du gène ITS2 situé sur l'ARN ribosomal. C'est une PCR multiplexe, ou plusieurs amorces spécifiques de différentes familles sont introduites en même.

Chapitre III

Les domaines

d'utilisation des

levures

III.1. Levures en biotechnologie

Les levures occupent une place primordiale dans l'industrie alimentaire. Plus de **500** espèces de levures ont été décrites, mais l'espèce de loin la plus utilisée est *Saccharomyces cerevisiae* dont diverses souches interviennent dans la préparation du pain, vin, bière et d'autres boissons alcooliques. La production annuelle mondiale de levure est supérieure à **2** millions de tonnes.

La levure se comporte de façon très différente selon qu'elle est ou non en présence d'air.

Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie,) et dans la production des enzymes (l'invertase, lactase, lipase et les amylases) et dans la production de la biomasse (*Simon et Meunier, 1970*), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles, industriels et à la production des protéines (*Scriban, 1984*) (*Lecterc et al, 1995*). 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) (*Mercier, 1997 et Blin, 2002*).

III.1.1. Les levures dans les industries agro-alimentaires

De nombreux produits de consommation quotidienne sont élaborés grâce à l'activité précieuse et importante des micro-organismes. Les levures, par leur activité de fermentation assurent des caractéristiques bien particulières de texture et d'arôme, mais aussi une bonne sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits.

Les Levures qui en sont responsables sont toutes regroupées sous la même appellation de bactéries lactiques. Depuis des siècles jusqu'à l'avènement des biotechnologies, où la biologie moléculaire et le génie génétique permettent de transformer facilement les micro-organismes pour les rendre plus performants, la fermentation concernent tous les types de produits alimentaires comme le lait (fromages, crèmes, yaourt et autres laits fermentés), la viande (saucisse fermentée et produit saumuré sec), les végétaux (vins, bières, cidres) et les pains (*Abdelguerfi. A, Ramdane, 2003*).

III.1.1.1. Utilisation des levures pour la production des boissons alcoolisées

Le rôle le plus ancien des levures est la fabrication des 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.

En anaérobiose, la levure catalyse la fermentation alcoolique, transformant une molécule de glucose en deux molécules de CO₂ et deux molécules d'éthanol, ainsi qu'une production faible d'énergie sous forme d'ATP.

Cependant en aérobiose elle produit beaucoup d'énergie (*Béguin et al, 2008*).

Les levures sont largement répandues dans le domaine alimentaire. Les utilisations traditionnelles, telles que le vin, le cidre, la bière, le saké et autres boissons alcoolisées (rhum, whisky, gin, vodka), des produits à base de soja (sauce de soja, miso), le pain et les produits laitiers (fromage, kéfir) sont connues par la majorité des gens. Les levures ont bien d'autres utilités dans le

domaine biotechnologique. Puisque plusieurs pays du monde ne produisent pas suffisamment de protéines pour l'alimentation de leurs populations, beaucoup de travaux ont été faits afin d'utiliser les levures comme sources de protéines (*Phaff et al, 1978*).

A. Les vins

Le vin, tout comme la bière, est né quand l'homme commença à domestiquer les récoltes et qu'il les stocka. Dans le cas du raisin, en présence d'une aération bénéfique, les fermentations spontanées devaient permettre d'obtenir un produit, certes stimulant être vigoureux, mais pas toujours très savoureux.

On retrouve des traces de l'existence du vin en Mésopotamie, en Arménie, en Egypte et en Grèce.

Longtemps inexpliquée, la fermentation alcoolique du jus de raisin n'a été maîtrisée que très tard. C'est ainsi qu'au Moyen âge, les vins étaient additionnés de miel, d'épices ou piments sans soute pour atténuer certains défauts de fermentation. Une grande majorité des opérateurs utilisent désormais les levures sélectionnées pour sécuriser les fermentations et marquer le vin sur des critères spécifiques, recherchés par le consommateur (arômes agréables, acidité moindre...) (*Bourgeois C-M et Larpent J-P 1996*).

Cependant, une frange grandissante de professionnels pour des raisons culturelles ou médiatiques fait le choix de fermentations spontanées.

Quelles que soient les raisons objectives ou subjectives de ces choix, le vinificateur doit maîtriser de manière fiable les conditions de développement de ces flores levuriennes, afin qu'elles puissent durablement exprimer leurs potentialités au cours de la fermentation alcoolique et éviter les accidents et les déviations organoleptiques (*Béguin et al, 2008*).

Une relation entre la levure et la fermentation alcoolique a été pour la première fois mise en évidence *Cagnard Latour, Schwann et Kutzingau* 19^{ème} siècle (*Pasteur, 1866*), dans ses études sur le vin, qui apporta la preuve formelle que la fermentation était provoquée par des cellules vivantes.

Tableau n°03 : Nombre d'espèces de levures qui ont été retrouvées au moins une fois sur le raisin, le vin, le matériel vinaire, etc. (*Bourgeois et Larpent, 1996*).

Espèce	Nombre D'apparition	Espèce	Nombre D'apparition
- <i>Brettanomyces</i>	11	- <i>Leucosporidium</i>	2
- <i>Candida</i>	29	- <i>Metschnikowia</i>	2
- <i>Cryptococcus</i>	6	- <i>Nadsonia</i>	1
- <i>Debaryomyces</i>	8	- <i>Pichia</i>	9
- <i>Dekkera</i>	2	- <i>Rhodotorula</i>	7
- <i>Endomyces</i>	1	- <i>Saccharomyces</i>	57
- <i>Endomycopsis</i>	2	- <i>Saccharomycodes</i>	2
- <i>Hanseniaspora</i>	6	- <i>Schizzosaccharomyces</i>	7
- <i>Hansenula</i>	6	- <i>Sphaerulina</i>	1
- <i>Hyaladendron</i>	1	- <i>Sporobolomyces</i>	1
- <i>Kloeckera</i>	8	- <i>Torulopsis</i>	22
- <i>Kluyveromyces</i>	4	- <i>Trichosporon</i>	6

B. Les cidres

Microbiologie du cidre est voisine de celle du vin. Les levures intervenant dans la fermentation alcoolique sont : *G. Kloeckera*, *S. ellipsoïdes*, *S. uvarum*. Ces levures sont celles retrouvées normalement sur les pommes. Une fermentation malolactique, qui est le fait de levures hétérofermentaire, et presque toujours observée. Le cidre est une boisson de faible teneur en alcool (2 à 3°) (*Béguin et al, 2008*).

Au fur et à mesure du déroulement de la fermentation, l'anaérobiose s'établit et ces souches laissent la place à des levures appartenant au genre *Saccharomyces*, mieux adaptées à l'éthanol et pouvant assurer la totalité de la fermentation des sucres (*Larpen, 1991*).

C. Les bières

La bière est une boisson alcoolique qui s'obtient par la fermentation du moût préparé avec du malt d'orge ou de froment, qu'on a fait bouillir en présence d'eau avec généralement du houblon. Certaines quantités de céréales non maltées (maïs et riz, par exemple) peuvent éventuellement être utilisées pour la préparation du moût. L'addition de houblon a pour effet de développer des principes amers et aromatiques et de permettre une meilleure conservation du produit. Elle est parfois aromatisée en cours de fermentation à l'aide de cerises ou d'autres produits.

On ajoute parfois à la bière des sucres, des colorants, du dioxyde de carbone ou encore d'autres substances (*Béguin et al, 2008*).

III.1.1.2. Utilisation des levures pour la panification

La levure de boulangerie est caractérisée par le fait qu'elle est composée de cellules vivantes de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*: 19 de levure fraîche contient environ 10^{10} cellules. Le pain traditionnel correspond au produit résultant de la cuisson dans un four d'une pâte pétrie et composée uniquement de farines panifiables, en mélange ou non d'eau potable et de sel de cuisine. Cette pâte est fermentée par des agents de fermentation autorisés, employés simultanément ou non: levure de panification, levain. On ajoute éventuellement des additifs ou adjuvants dont l'emploi est limité et autorisé (*Larpen, 1992*).

Tableau n°04 : Levures pour applications boulangères différentes (*Guinet et Godon, 1994*).

Application	Genre	Espèce
Multiusage	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Pâtes très sucrées	<i>Saccharomyces</i> <i>Saccharomyces</i>	<i>S. Rosei</i> <i>S. Rouxii</i>
Renforcement flaveur	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. delbrückii</i>

	<i>Candida</i>	<i>C. Lusitania</i>
Starters Levin	<i>Saccharomyces</i> <i>Torulopsis</i> <i>Candida</i>	<i>S. exigus</i> <i>T. holmii</i> <i>C. milleri</i>

III.1.1.3. Les levures dans les industries des produits laitiers

III.1.1.3.1. Les fromages

La présence de levures dans les fromages n'est pas inattendue compte tenu du pH acide, de la faible activité de l'eau, et de la teneur élevée en sel, ainsi que du stockage au froid des produits (*Larpent, 1991*).

Ces micro-organismes font partie de la flore normale du lait cru (environ 10^4 UFC/ml) et sont presque entièrement détruits par pasteurisation (*Hermier et al, 1992*). Ils sont présents à tous les stades de la fabrication du fromage à raison de 10^6 et 10^8 cellules/g (*Larpent, 1991*).

Quelques espèces dominent : *Saccharomyces (cerevisiae, fragilis, lactis)*, *Torulopsis*, *Candida (versatilis, lipolytica, paralipolytica)*, ainsi que *Kluyveromyces (marxianus, bulgaricus, fragilis)*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces Rouxii*. Chaque pâte se différencie par leur importance relative, voire l'existence de certains genres (*Pichia, Rhodotorula, Hansenula ...*) (*Hermier et al, 1992*).

La flore varie selon la technique fromagère, en particulier le salage, qui sélectionne des levures tolérantes au sel en surface puis dans le fromage au fur et à mesure de la pénétration (*Leveau. J-Y et Bouix. M, 1993*). Avant salage, les principales espèces sont identifiées comme des levures fermentant le lactose :

- *Kluyveromyces marxianus var. lactis* et sa forme imparfaite (*Candida sphaerica* qui représente 34% de la population) ;
- *Candida lipolytica* (*Larpent, 1991*).

III.1.1.3.2. Les kéfirs

Le kéfir, également écrit kéfyr ou képhyr, est le plus célèbre et le plus ancien des laits fermentés acido-lactiques. Produit traditionnellement dans le Caucase septentrional à partir de lait de vache, brebis ou chèvre, il est maintenant fabriqué industriellement dans quelques pays au premier rang desquels figure l'exemple Union Soviétique (*De Roïssart et Luquet, 1994*).

Ce sont des boissons gazeuses peu sucrées, légères en alcool (moins de 1%) et contenant des acides organiques et des vitamines. Il résulte de l'association de bactéries lactiques et de levures qui produisent une fermentation principalement lactique et faiblement alcoolique du grain de kéfir. La boisson lactée se caractérise par un aspect lisse et mousseux, une consistance crémeuse, un goût plus ou moins acide, piquant et levuré (*Leroï, 1993*).

III.1.1.4. Les levures dans les industries des produits carnés

A la surface des boyaux de viande fermentée (saucisses) se développent de petits points blancs, la fleur, composée de cristaux de sel, de microcoques et de levures dont les plus représentatives sont *Candida deformans*, *Candida zeylanoïdes*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula rubra*... (*Bourgeois et Larpent, 1996*).

Plusieurs auteurs ont montré que le genre *Debaryomyces* prédominait (*Larpent, 1991*).

Ces produits sont habituellement obtenus à partir de maigre et de gras de viande additionnés de sels, glucides et épices. Les viandes ne sont pas pasteurisées comme le lait et apportent donc une quantité considérable de micro-organismes, sauf si des techniques de décontamination sont appliquées (*Bourgeois et Larpent, 1996*).

III.1.1.5. Production des métabolites

Les levures permettent aussi la production de métabolites (lipides, acides organiques, polysaccharides, enzymes, vitamines). Par exemple, les acides gras à longue chaîne produits par les levures sont une base pour la synthèse de parfums synthétiques. La production de gamma-décalactone par *Yarrowia lipolytica* permet d'obtenir un composé aromatique ayant une plaisante odeur de pêche (*Pagot et al., 1997*). Un autre exemple concerne la levure *Kluyveromyces marxianus* qui produit l'enzyme lactase utilisée pour réduire le lactose contenu dans les produits laitiers. Cette hydrolyse du lactose contenu dans la crème glacée prévient ainsi la cristallisation du sucre (*Phaff et al., 1978*). Puisque les levures ont démontré leur efficacité dans la production et la biotransformation de nombreux aliments, leur utilisation dans des procédés de dépollution pourrait être très intéressante.

III.1.1.5.1. Les enzymes

Les levures peuvent produire quelques enzymes industrielles. Le tableau ci-dessous exprime quelques espèces et les enzymes produites.

La production commerciale d'enzyme alimentaire (la chymosine, un des composants actifs de la présure de veau utilisée en fromagerie) par la levure *Kluyveromyces lactis* démontre l'utilité de cette levure. La production est de bonne qualité, et ces levures sont plus efficaces que la levure de boulangerie ; Pour l'instant ces levures sont incapables de réaliser certaines modifications caractéristiques de protéines humaines (*Larpent, 1991*).

Tableau n°05: Levures et les enzymes industrielles produites (*Larpent, 1991*).

Enzymes	Organismes
<i>Invertase</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>B-glucosidase</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Amylase</i>	<i>Schuanniomyces alluvius</i>

Gluco-amylase	<i>S. diastaticus</i>
Lipase	<i>C.cylindraceae</i>
α - galactosidase	<i>Pichia guillermondii</i>

III.1.1.5.2. Les vitamines

Les levures constituent une source exceptionnelle abondante en vitamines hydrosolubles du groupe **B** (B₁, B₂, B₆) ainsi qu'en vitamine **PP** et acide pantothénique. Cependant, la vitamine B₁₂ est absente sauf dans la levure de bière et les levures lactiques qui en contiennent des traces (*Grandet. J, 1989*).

Un apport quotidien de 5 g de levure met l'organisme à l'abri de subcarences vitaminiques, si fréquentes de nos jours (*Vrignaud. Y, 1991*).

Pour que l'organisme tire profit du potentiel vitaminique, il faut toujours utiliser des levures tuées. En effet, l'ingestion de cellules vivantes pourrait entraîner de véritables avitaminoses qui s'expliquent par le fait que les levures captent à leur profit certaines vitamines apportées par d'autres aliments. Ainsi, les levures de bière collectent la thiamine du malt sur lequel elles se développent, ce qui expliquerait leur richesse en vitamine B₁ par rapport aux levures poussant sur d'autres substrats (*Grandet. J, 1989*).

III.1.2. Les levures dans le domaine autre qu'agroalimentaire

III.1.2.1. Les levures et la production de médicaments

L'utilisation de micro-organismes pour la production de protéines à haute valeur ajoutée (hormones , vaccins ...) a été l'une des premières applications envisagées pour le génie génétique .Elle permet de s'affranchir des problèmes liés à la difficulté de purifier ces protéines à partir de leurs producteurs naturels (l'homme par exemple), de s'assurer l'absence de contaminants redoutés (virus , prions) et , pour un industriel , de maîtriser totalement la chaîne de production (*Larpent, 1991*).

En **1977**, la première hormone peptidique, la somatostatine, était produite dans la bactérie *Escherichia coli* .Mais des problèmes de purification ont amené les chercheurs vers d'autres organismes comme les levures. Les levures offrent les mêmes facilités expérimentales ou industrielles que les bactéries, en particulier culture aisée en fermenteurs à haute densité cellulaire, tout en possédant une machinerie cellulaire proche de cellule humaine (*Larpent, 1991*).

Les levures utilisant afin de bio transformer grâce à son action métabolique des matières premières en molécules plus intéressantes, notamment en médicaments. Un grand nombre de réactions chimiques (hydroxylation, phosphorylation, oxydation, réduction...) est ainsi réalisé par des micromycètes (*Curvularia, Rhizopus, Aspergillus, Fusarium*). Citons par exemple, la conversion des stéroïdes, dans laquelle la 11 α -hydroxylation du noya stéroïdien conduit à l'hydrocortisone et à la prednisolone (*Larpent, 1991*).

A. La production de vaccin contre l'hépatite B

Le premier vaccin recombinant, contre le virus de l'hépatite B, a été produit dès 1981 par une levure de boulangerie recombinée *Saccharomyces cerevisiae* et agréé peu après pour la

vaccination humaine .Ce vaccin est depuis très largement utilisé à travers le monde, et en Europe en particulier.

Mais les niveaux de production restent peu élevés, les protéines sont souvent anormales.

B .La production d'enzymes alimentaires

La production commerciale d'enzyme alimentaire (la chymosine, un des composants actifs de la présure de veau utilisée en fromagerie) par la levure *Kluyveromyces lactis* démontre l'utilité de cette levure .La production est de bonne qualité, et ces levures sont plus efficaces que la levure de boulangerie ; Pour l'instant ces levures sont incapables de réaliser certaines modifications caractéristiques de protéines humaines (*Larpent, 1991*).

III.1.2.2. La levure : hôte eucaryote pour le clonage

La levure *S.cerevisiae* est couramment utilisée comme cellule hôte pour le clonage et l'expression des gènes eucaryotes. Cinq raisons expliquent ce choix :

* Bien que la levure soit un organisme eucaryote, elle peut être cultivée à peu près de la même façon que des cellules bactériennes.

*La génétique de la levure a été intensément étudiée, et les chercheurs disposent d'une carte génétique très développée et d'un catalogue de mutations étendu (**Klug. et al, 2006**).

*Le génome complet de la levure a été séquencé et la plupart des gènes de l'organisme ont été identifiés.

*Pour étudier la fonction de certaines protéines eucaryotes, il est nécessaire d'utiliser une cellule hôte qui peut modifier la protéine post-traductionnelle. Les cellules hôtes bactériennes ne peuvent pas exécuter ces modifications et elles dégradent rapidement les protéines mal conformées.

*Partie
expérimentale*

Matériels

Et

Méthodes

1- Objectif et intérêt de l'étude :

Les levures présentes naturellement dans le raisin. Elles sont responsables de la fermentation spontanée du jus de raisin et participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires et dans la production des enzymes, de la biomasse, du glycérol, des protéines, ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles.

Notre étude consiste à isoler, purifier, caractériser microscopiquement et identifier les espèces de levures trouvées dans le cépage (**Cinsault**) cultivé dans la plaine de **Ben Abdelmalek Ramdane (Mostaganem)** ; ainsi que à la caractérisation biotechnologique et biochimique de nos souches afin de les mettre en valeur.

2- Présentation de la région de la récolte :

Les vignobles sont situés dans la plaine **Ben Abdelmalek Ramdane**, qui est une commune se trouvant à 20 Km de Mostaganem. D'un climat tempéré, elle est à une altitude moyenne de 245 mètres et reçoit environ 350 à 400 mm d'eau par an.



Figure n°14: La région de la récolte (Ben Abdelmalek Ramdane Mostaganem).

3- Source de prélèvement des levures

Les échantillons sont prélevés dans les vignobles sélectionnés à **Ben Abdelmalek Ramdane** (Mostaganem). Le cépage soumis à l'étude est :

Le Cinsault

Est un vieux cépage noir à jus blanc d'origine provençale très répandus dans le Midi de la France. Sa qualité est inversement proportionnelle à son rendement C'est en Languedoc et en Vallée du Rhône qu'il s'est définitivement installé. Ses grappes sont grandes, composées de grosses baies à la chair juteuse et très sucrées mais se sont pauvre en tannin. Mais sa couleur pâle et son goût éphémère le réservent surtout aux rosés. Ils leur apportent souplesse, finesse et fruité.

C'est un cépage tardif qui a besoin de soleil et qui résiste bien à la sécheresse, assez productif mais fragile face aux maladies. Il préfère les sols pauvres pour une production de qualité.



Figure n°15 : Le cinsault

4- Les milieux de cultures utilisés

Le milieu de culture utilisé lors de cette étude est **YPG** pour l'isolement des levures (*Guiraud, 2003 et IFV de Nante, 2000*) et le milieu *Fowell* pour l'étude des caractéristiques sexuelles de ces isolats et les milieux pour l'assimilation de nitrate et de l'urée ainsi que le milieu **Wickerham** concernant à la fermentation des sucres.

5- Isolement, purification et conservation des isolats

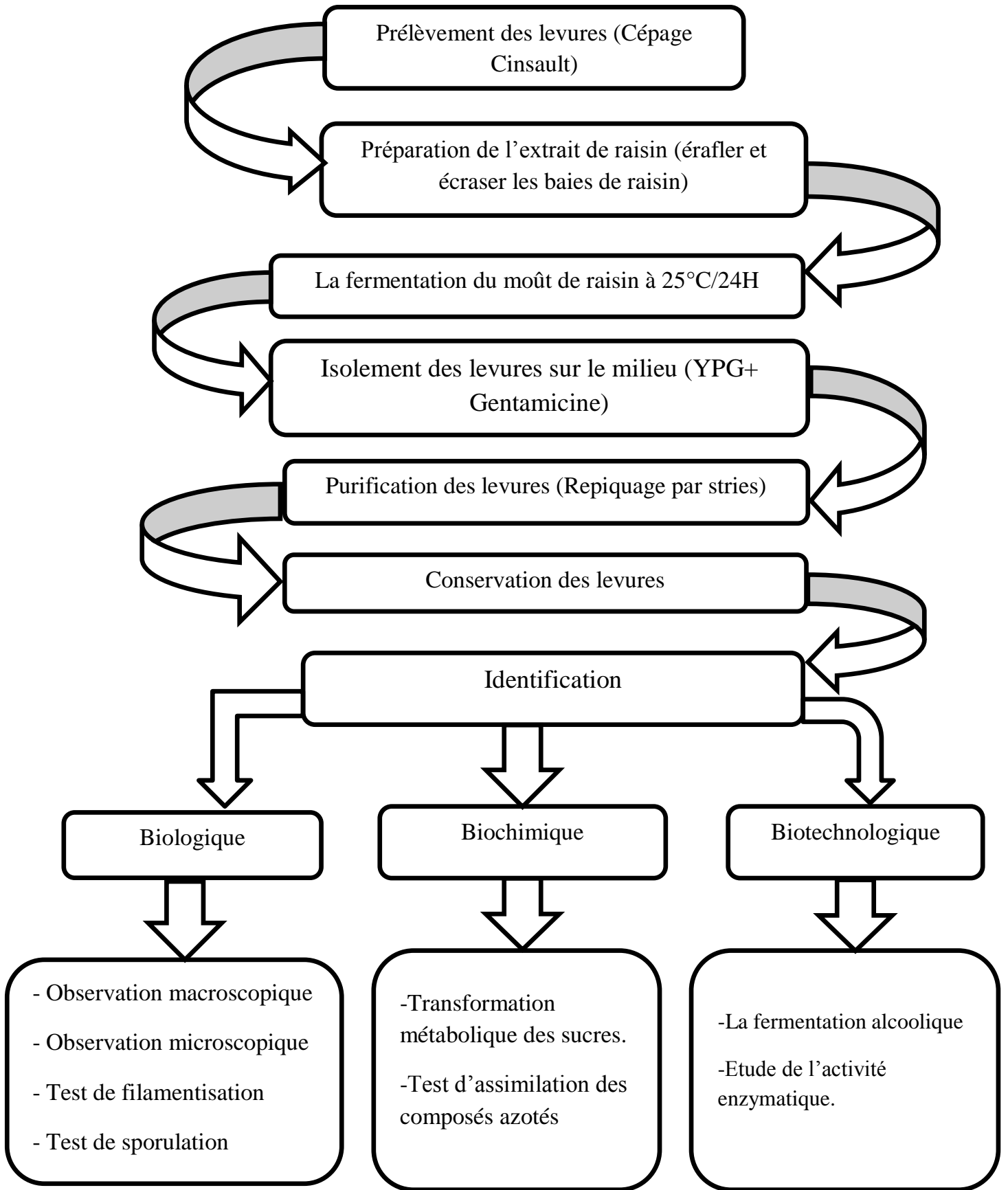


Figure n°16: Schéma représentatif du protocole expérimental.

5-1- Techniques de prélèvement des levures

Nous avons prélevé avec des ciseaux stériles environ 500 g de grappes de raisins sains, et nous les avons recueillis dans des sachets stériles.

5-2- Préparation de l'extrait de raisin

A l'arrivée au laboratoire les baies de raisin de cépage Cinsault sont déposées indépendamment sur un lit de milieu de culture gélosé (YPG) dans une boîte de pétri pour un moment de 10 à 12 h ; puis les baies sont retirées et une partie des levures censées être présentes sur le raisin s'est installée sur notre milieu de culture.

Des grappes de raisin sont éraflées et écrasées afin d'obtenir un moût et laisser fermenter pendant une journée à 25°C afin d'augmenter la quantité et la viabilité des levures recherchées.

5-3- Isolement des levures

Car à l'aide d'une pipette de pasteur flambée on ensemence d'autres boîtes contenant le milieu de culture d'une façon aléatoire avec le jus obtenus ou le moût recueilli à partir de cépage (Cinsault) de 1^{ère} journée de la fermentation. Cette opération est effectuée selon la manière suivante :

- * 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 moût de premier jour de la fermentation en respectant les règles de la stérilité.
- * Étaler l'inoculum en une zone périphérique sur une surface de 1 cm².
- * Flamber l'anse, l laisser refroidir, disséminer l'inoculum précédemment déposé en l'étalant en stries serrées sur une moitié de la boîte.
- * Faire pivoter la boîte d'un quart de tour. Flamber à nouveau l'anse, laisser refroidir. 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.
- * Placer dans la position renversée les boîtes stériles dans l'étuve.
- * Avant d'être mises à l'incubation (25°C/1j-5j), les boîtes doivent être soigneusement codées et arrangées (*Boukhennoufa, 2014*).

5-4- Purification des levures

Nous avons effectué une série d'ensemencement par la méthode des stries sur des boîtes de culture gélosé (YPG + gentamycine) dont 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.

5-5- Conservation des levures

La méthode de conservation des souches la plus utilisée et la plus simple consiste à repiquer les souches en tube sur gélose inclinée (YPG + gentamycine), les cultures sont incubées pendant 3 à 5 jours, pour permettre une croissance maximale, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations. Les levures se conservent très bien au réfrigérateur 3 à 6 mois (*Guiraud, 2003*).

6- Etude des caractères culturels

6-1- Observation macroscopique :

Après l'incubation des cultures pendant 3 jours à 25-28°C sur milieu gélosé (YPG + Gentamycine), une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies (taille, pigmentation, contour, viscosité ...).

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

La forme	Ronde
Le relief	Bombé ou plat
Le contour	Régulier ou irrégulier
La taille	Moyenne, petite, grosse
La surface	Lisse ou rugueuse
La couleur	Blanche ou opaque
Autres caractères	La consistance ou l'odeur

6-2- Observation microscopique:

L'observation microscopique permet de définir la forme, l'arrangement et le mode de division des cellules.

✓ Observation vitale sans coloration :

Ces caractéristiques sont observées sur des préparations microscopiques à l'état frais (objectifs × 40) par un prélèvement d'une colonie à partir d'un milieu solide par une anse et la déposer dans un tube contenant 10 ml d'eau distillée et on l'agite violemment jusqu'à ce que la colonie soit dissociée, on prélève une goutte de cette suspension et on la dépose entre une lame et une lamelle puis on passe à l'examen microscopique (*Pol, 1996*).

✓ Observation vitale avec coloration (Bleu de méthylène) :

L'observation au microscope des lames colorées au bleu de méthylène nous a permis de définir les formes : sphériques, ovoïdes, allongées, cylindriques ... (*Larpen, 1991*).

Méthode de la coloration avec bleu de méthylène :

- Déposer une goutte de bleu de méthylène sur la lame identifiée ;
- Prendre une colonie à l'aide de la pipette ;
- Mélanger l'échantillon à la goutte de bleu de méthylène ;
- Recouvrir d'une lamelle en évitant la formation des bulles d'air

- Observer rapidement la préparation au microscope, à l'objectif X40 (*Boukhennoufa, 2014*).

6-3- Aptitude à la filamentation :

La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation, est observée à partir d'une culture sur lame microscopique (objectifs X 40 puis X100). Pour cela, le milieu YPG + Gentamicine fondu est déposé à la pipette sur une lame microscopique préalablement stérile dans une boîte de Pétri. Quand le milieu est solidifié, la levure à examiner est ensemencée en une strie longitudinale. La lame est incubée dans la boîte de Pétri contenant un peu d'eau stérile pour éviter la dessiccation du milieu. L'observation microscopique se fait après 3 à 5 jours à 30°C d'incubation (au grossissement X 40 ou X 100). La bordure de la culture est examinée, si la levure filamentée, la nature de mycélium (pseudomycélium ou vrai mycélium), son abondance, sa ramification sont notées.

La différenciation entre vrai mycélium et pseudomycélium se fait sur la base de deux constatations :

- * La cellule terminale d'un filament de mycélium vrai est plus grande que l'avant dernière ;
- * Les filaments de pseudomycélium présentent des constriction au niveau de deux cellules consécutives. On peut noter dans certains cas, la présence de blastospores et de chlamydozoospores (*Guiraud, 2003*).

6-4- Test de sporulation (Test de reproduction sexuelle) :

Le milieu utilisé pour étudier la propriété de nos souches à former des ascospores est le milieu « **Fowell + Gentamycine** ». C'est un milieu recommandé pour mettre en évidence les ascospores.

Le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes, puis réparti aseptiquement dans des tubes inclinés, ensuite ensemencés et incubés à 25°C pendant une semaine à un mois.

Les observations se font sur des préparations microscopiques pour examiner la forme de l'asque et des ascospores, ainsi que le nombre et la position des ascospores dans l'asque (*Didier, 1997*).

-Méthode de la coloration des spores sur frottis :

1. Réaliser un frottis épais et le laisser sécher à l'air ;
2. Recouvrir de solution de vert de malachite ;
3. Chauffer légèrement sur la veilleuse d'un bec Bunsen jusqu'à évaporation sans faire bouillir;
4. Rincer pendant 1 minute sous un filet d'eau ;
5. Recouvrir de solution de Safranine et laisser agir 20 s ;
6. Rincer sous un filet d'eau et laisser sécher ;
7. Observer au microscope directement sans lamelle (GrX40).

Résultats :

Les levures et la paroi des asques sont colorées en rose tandis que les ascospores sont colorées en vert. (*Berber, 2013*).

7- Etude des caractères biochimiques

7-1-Tests de fermentation des sucres (méthode de Kluver, 1974) :

Les tests d'information sont effectués avec des sucres très purs à des concentrations de 6%. Les sucres étudiés sont : glucose, fructose, saccharose, sucrose et lactose.

Le milieu utilisé est celui proposé par **Wickerham (1951)** qui contient un indicateur coloré (rouge de phénol), le milieu est réparti en tubes à essai, à raison de **9 ml** par tube, et chaque tube reçoit une cloche de Durham.

Les sucres à tester sont mis séparément dans chaque tube, l'ensemble est ensuite autoclaver à **120°C**, pendant **20 min**.

Après refroidissement, les milieux sont ensemencés et portés à l'incubation à **30°C** pendant **72h**. Les tubes examinés chaque jour pour voir le pourcentage de gaz dégagé dans la cloche et le virage du couleur de l'indicateur coloré (**Berber, 2013**).

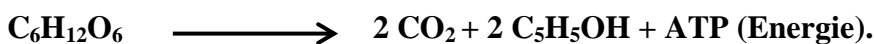
7-2- Tests d'assimilation des composés azotés

Les milieux utilisés pour tester la capacité des levures à assimiler les composés azotés, contiennent du glucose comme seule source de carbone, et enrichis avec des sources d'azote et des vitamines de groupes B (Cyanocobalamine : Vit B₁₂). Ces milieux sont incubés à 37°C pendant 24 h. (**Bacha, 2008**).

8- Caractérisation biotechnologique

8.1. Fermentation alcoolique chez la levure : méthode de mesure et caractérisation des produits formés (CO₂ et l'éthanol) :

La fermentation alcoolique se caractérise par l'assimilation du glucose et par le rejet des produits de fermentation (dioxyde de carbone et l'éthanol). Cette réaction se déroule en milieu anaérobie :



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

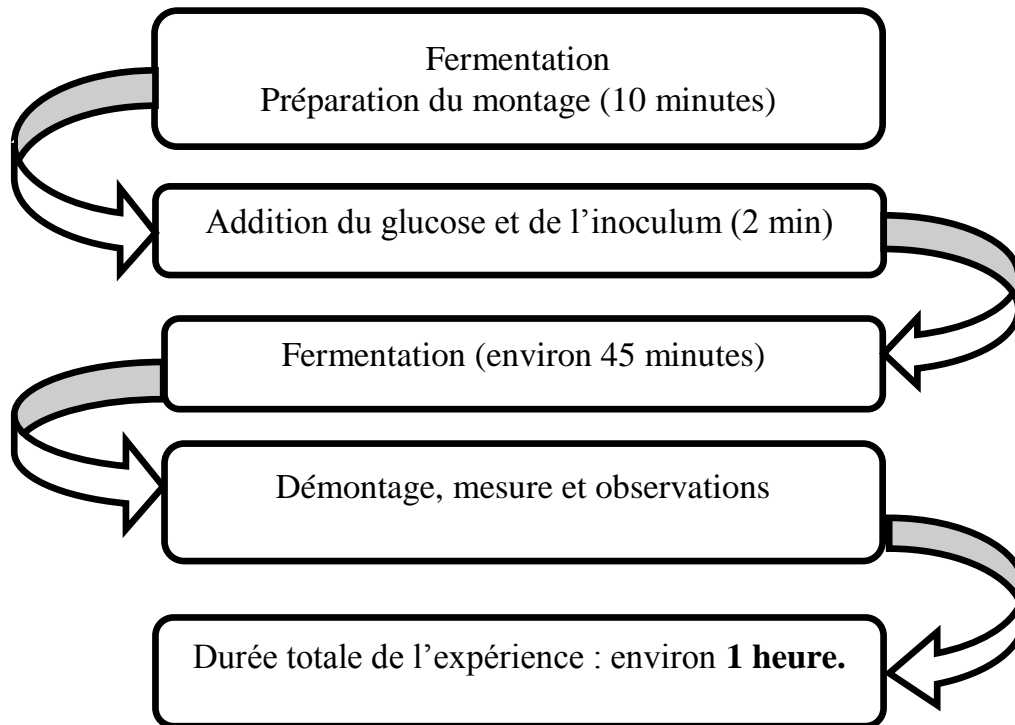


Figure n°17: Résumé de protocole expérimental de a fermentation alcoolique.

Remarque :

La durée de la fermentation est estimée à une température de **25°C**. Elle pourra être plus longue ou plus courte si la température de fermentation est plus basse ou plus élevée.

1- Équipements, Matériels (voir annexe n°05)

2- Produits chimiques : - Glucose

3- Matériels biologiques :

Lorsqu'on obtient des colonies isolées de nos souches, une toute petite quantité de la biomasse présente à la surface de la gélose **YPG** est collectée avec la pointe d'un cure-dents préalablement autoclavé (environ **1 g**).

4- Méthode :

***Préparation du montage** (Effectuer le montage selon la figure suivante).



Figure n° 18 : Montage de la fermentation alcoolique (*Berber, 2013*).

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

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

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

L'éprouvette devrait être entièrement remplie d'eau. Si de l'air est introduit, recommencer les étapes 2 et 3. Vous pouvez négliger une petite bulle d'air occupant un volume de moins de 1 ml.

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

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

Remarque :

L'extrémité du tube devrait être bien entrée dans l'éprouvette pour éviter qu'elle n'en ressorte pendant l'expérience, mais sans être trop haute, de façon à pouvoir bien observer les bulles de gaz qui s'en échapperont (*Berber, 2013*).

****Addition de glucose et de l'inoculum***

Étape 6 : Mettre en suspension 1 g de levures 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 2ème 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.

** 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, calculez le nombre de moles de gaz qui ont été produites.

$$\frac{1 \text{ mole}}{22400} \times x \text{ ml} = y \text{ mole de gaz}$$

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 n'en déduit donc que la fermentation produit : y' mole d'éthanol. $y = y' =$ le même nombre de mole.

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

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

8.2. Etude de l'activité enzymatique de l'invertase :

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 sont des sucres réducteurs. Son pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D$ à 20°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 **β -fructosidase** de la levure est une enzyme capable d'hydrolyser le saccharose en ses composants (Glucose et Fructose).

- α -D-glycopyranosyl- β -D-fructofuranoside (= saccharose).
- Invertase
- H₂O
- D(+) glucopyranose + D (-) fructofuranose.

Il existe aussi la glucosidase ou saccharase dans l'intestin. L'invertase peut être aussi appelée sucrase ou β -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 l'une des méthodes suivantes :

- La méthode au 3,5 dinitrosalicylate (DNS) ;
- La méthode au ferricyanure de potassium ;
- Par réduction à la liqueur de Fehling ;
- En dosant le glucose par une méthode enzymatique (glucose oxydase) (**CHAARI Kacem & BEN SALAH Riadh**).

L'unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 mg d'hexose réducteur (cas de l'invertase : glucose plus fructose) en 3 minutes (Fischer et Ohtes).

L'activité enzymatique de l'invertase est définie comme le nombre de micro-moles de saccharose hydrolysé par minute.

-Extraction de la fraction soluble des levures et établissement d'une gamme étalon.

- Broyer dans un mortier, énergiquement pendant 5 minutes, **40 g** de levure en présence de **10 ml** d'eau.
- Ajouter ensuite **10 ml** d'H₂O et continuer le broyage pendant 5 minutes, pour briser la membrane résistante des cellules de levure. Il est recommandé de broyer énergiquement ou ajouter de l'alumine pour faciliter l'extraction.
- 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.

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

A - Matériels et Réactifs

- ◆ Eprouvette de 50 ml
- ◆ Pipettes graduées
- ◆ Support de tubes à essai
- ◆ Tubes à essai
- ◆ Spectrophotomètre
- ◆ Solution de Glucose 2,5 mM (Millimole)
- ◆ Solution de Fructose 2,5 mM
- ◆ Solution de DNS

B - Mode opératoire

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° 07 : Dosage des sucres inverti par la méthode de DNS : gamme étalon (**Chaari Kacem & Ben Salah Riadh**).

N° tube	Blanc	01	02	03	04	05
(Glucose + Fructose) 5mM (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
H ₂ O (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
DNS (ml)	1	1	1	1	1	1
Chauffage pendant 5 minutes à 100°C						
H ₂ O (ml)	8	8	8	8	8	8
Agiter, lire la DO à 550 nm						

- Tracer la courbe $DO = f(S)$ c.à.d. la densité optique en fonction de la quantité des sucres en portant (en ordonnée) la densité optique de l'absorption des sucres en fonction des micro moles de sucres (en abscisses).

- Etablir la pente de la droite.

Résultats

Et

Discussions

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 (*Carette, 2005*).

Notre recherche est basée sur l'identification des levures purifiées issus d'un cépage de la commune **Ben Abdelmalek Ramdane (Mostaganem)**, à savoir le cépage **Cinsault** afin d'avoir des souches prêtes à l'utilisation dans des différents domaines : agroalimentaire, agricole, pharmaceutique, ...etc.

Les levures isolées en mois Septembre 2016 à partir de cépage cinsault ont été purifiées par repiquages successifs. Cela nous a permis d'obtenir une collection de 5 souches de levures désignées comme suit :

Cinsault **01**, Cinsault **02**, Cinsault **03**, Cinsault **04** et Cinsault **05**.

1- Etudes des caractéristiques culturaux des souches isolées du cépage Cinsault :

1-1- Etude macroscopique :

L'étude macroscopique effectuée sur les colonies de souches préalablement isolées nous a permis de faire une présélection basée essentiellement sur leur caractéristiques morphologiques telles que l'aspect, la forme et la couleur, et auxquelles nous avons rajouté l'odeur, un paramètre aussi important dans la pré-identification des levures.

I-2- Etude microscopique :

L'observation au microscope des lames effectuée sur les colonies des souches nous a permis de définir les formes : sphériques, ovoïdes, allongées, cylindriques et le mode de reproduction : monopolaire, bipolaires par bourgeonnement.

I-3-Aptitude de la filamentation :

La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation, est observée à partir d'une culture sur lame microscopique (objectifs X 40), pour noter la nature de mycélium (pseudomycélium ou vrai mycélium), son abondance et sa ramification.

I-4-Test de sporulation :

Les observations se font sur des préparations microscopiques pour examiner la forme de l'asque et des ascospores, ainsi que le nombre et la position des ascospores dans l'asque. Les levures et la paroi des asques sont colorées en rose tandis que les ascospores sont colorées en vert.

Tableau n°08: Observation microscopique, macroscopique et les caractères morphologiques chez la souche Cinsault 01.


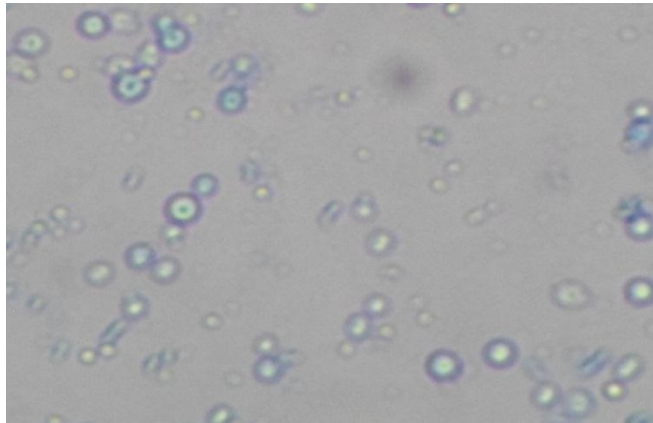
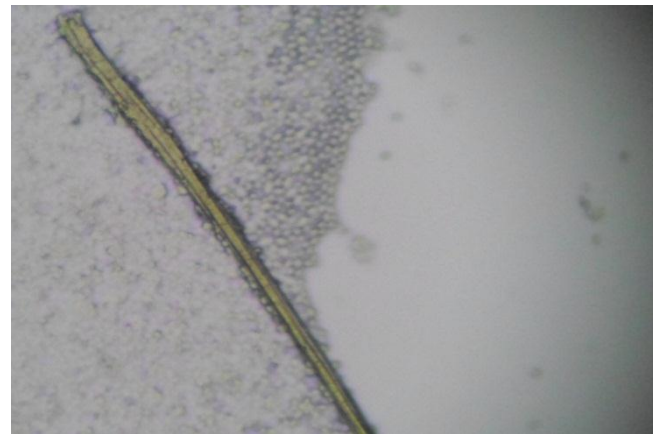
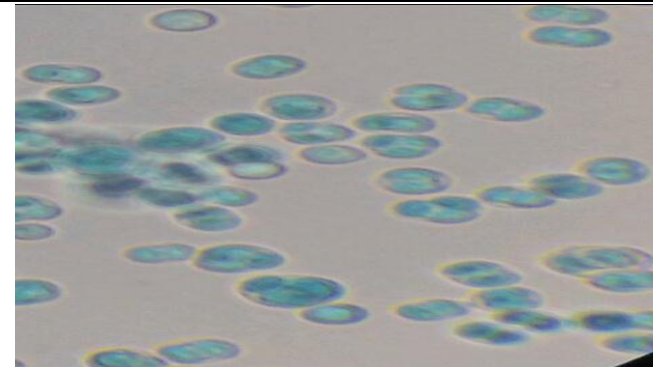
<p>Observation macroscopique</p>		<p>*Des colonies crémeuses de couleur blanche opaque, de taille moyenne et de surface lisse de forme ovoïde et ont une odeur de levure de boulangerie.</p>
<p>Observation microscopique</p>		<p>*La forme végétative est sphérique. *Le mode de reproduction est bipolaire par bourgeonnement.</p>
<p>Aptitude de la filamentisation</p>		<p>*Présence de mycélium</p>
<p>Test de sporulation</p>		<p>*La présence de trois spores par cellule.</p>

Tableau n°09 : Observation microscopique, macroscopique et les caractères morphologiques chez la souche Cinsault 02.


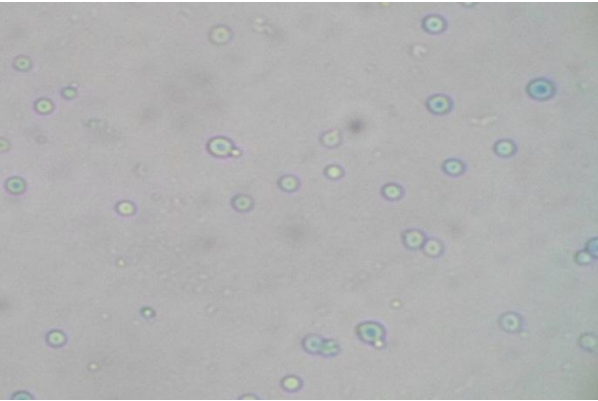

<p>Observation macroscopique</p>		<p>*Des colonies de couleur beige opaque, de taille moyenne et de surface convexe de forme ovoïde en et ont une odeur intense.</p>
<p>Observation microscopique</p>		<p>*La forme végétative est sphérique. *Le mode de reproduction est monopolaire par bourgeonnement.</p>
<p>Aptitude de la filamentisation</p>		<p>*Présence de mycélium</p>
<p>Test de sporulation</p>		<p>*La présence de trois spores par cellule.</p>

Tableau n°10 : Observation microscopique, macroscopique et les caractères morphologiques chez la souche Cinsault **03**.


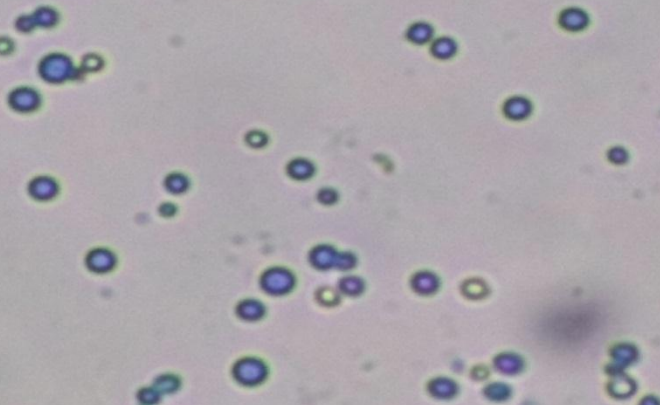

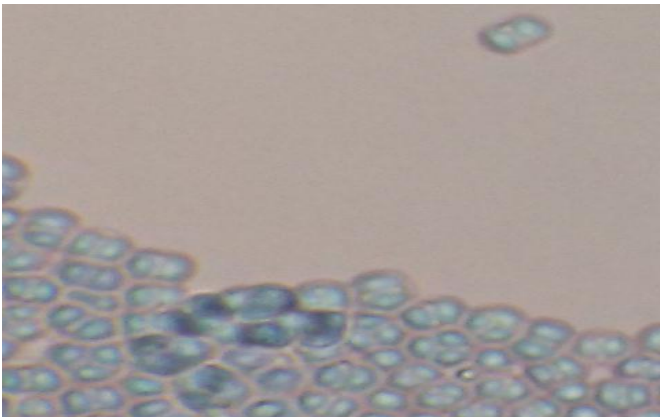
<p>Observation macroscopique</p>		<p>*Des colonies crémeuses de couleur beige presque opaque, de surface convexe et de forme arrondie et ont une odeur intense.</p>
<p>Observation microscopique</p>		<p>*La forme végétative est sphérique. *Le mode de reproduction est monopolaire par bourgeonnement.</p>
<p>Aptitude de la filamentation</p>		<p>*Présence de mycélium</p>
<p>Test de sporulation</p>		<p>*La présence de quatre spores par cellule.</p>

Tableau n°11 : Observation microscopique, macroscopique et les caractères morphologiques chez la souche Cinsault 04.


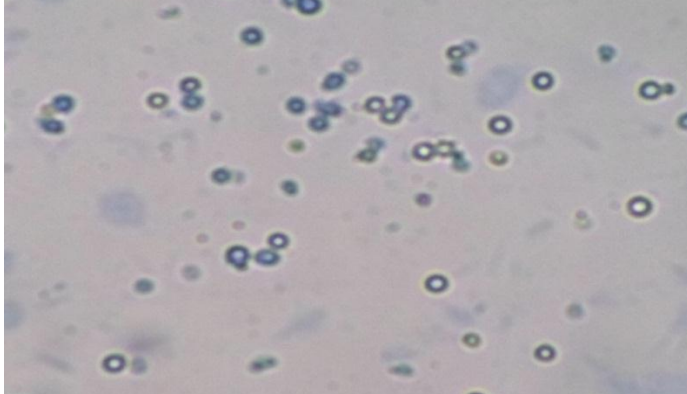

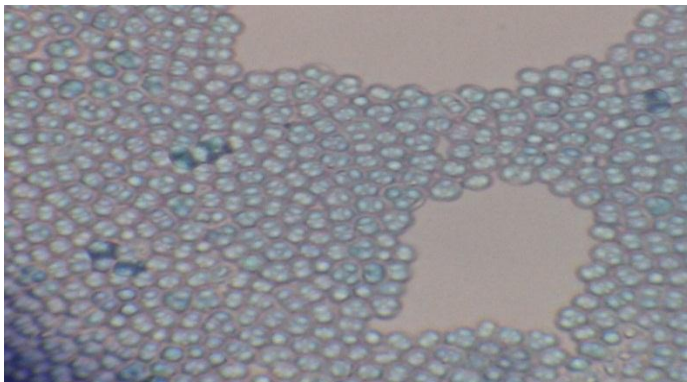

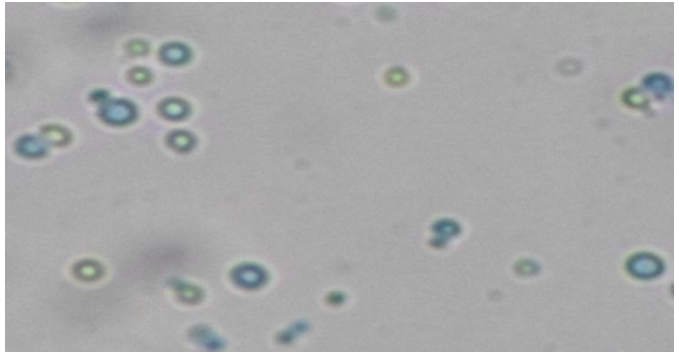
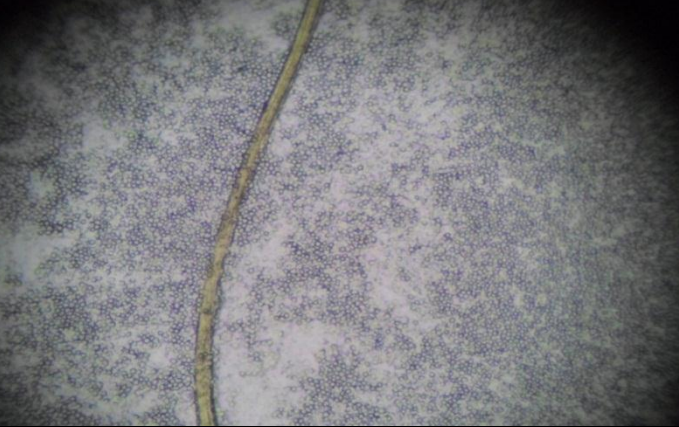
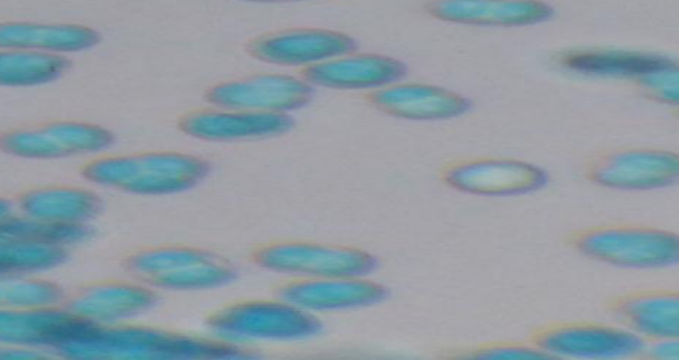
<p>Observation macroscopique</p>		<p>*Des colonies crémeuses de couleur blanche presque opaque, de taille moyenne et de surface lisse de forme ovoïde et ont une odeur intense.</p>
<p>Observation microscopique</p>		<p>*La forme végétative est sphérique. *Le mode de reproduction est monopolaire par bourgeonnement.</p>
<p>Aptitude de la filamentisation</p>		<p>*Présence de mycélium</p>
<p>Test de sporulation</p>		<p>*La présence de quatre spores par cellule.</p>

Tableau n° 12: Observation microscopique, macroscopique et les caractères morphologiques chez la souche Cinsault **05**.

<p>Observation macroscopique</p>		<p>*Des colonies crémeuses de couleur beige, de taille moyenne et de surface convexe de forme arrondie et ont une odeur intense.</p>
<p>Observation microscopique</p>		<p>*La forme végétative est sphérique. *Le mode de reproduction est monopolaire par bourgeonnement.</p>
<p>Aptitude de la filamentisation</p>		<p>*Présence de mycélium</p>
<p>Test de sporulation</p>		<p>*La présence de deux spores par cellule.</p>

Discussion générale :

Selon les caractères macroscopiques et microscopiques, toutes les levures sont caractérisées par une forme sphérique.

L'isolement des levures est effectué à partir du jus de raisin fermenté. Une goutte du jus a été étalée sur les boîtes de pétries contenant YPG.

Après 24 heures d'incubation à 25°C, des colonies de levure ont été purifiées puis identifiées.

Après l'incubation, deux couleurs sont observées : blanche (concernant la souche **01** et la souche **04**) et beige (concernant les souches **02**, **03**, et **05**), la forme des colonies a été identique (sphériques) pour toutes les souches.

Un mode de reproduction monopolaire est observé chez toutes les souches isolées sauf la première souche présente un mode bipolaire par bourgeonnement.

Dans la 1^{ère} et la 2^{ème} souche, un nombre de trois spores par cellules est constaté, et pour la 3^{ème} et la 4^{ème} souche, on observe un nombre de quatre spores par cellule, contrairement un nombre de deux spores par cellule concernant la 5^{ème} souche.

La présence de mycélium est détectée chez toutes les souches isolées.

2- Etude des caractères biochimiques des souches :

2-1-Test d'assimilation des composés azotés :

***Assimilation de l'urée :**

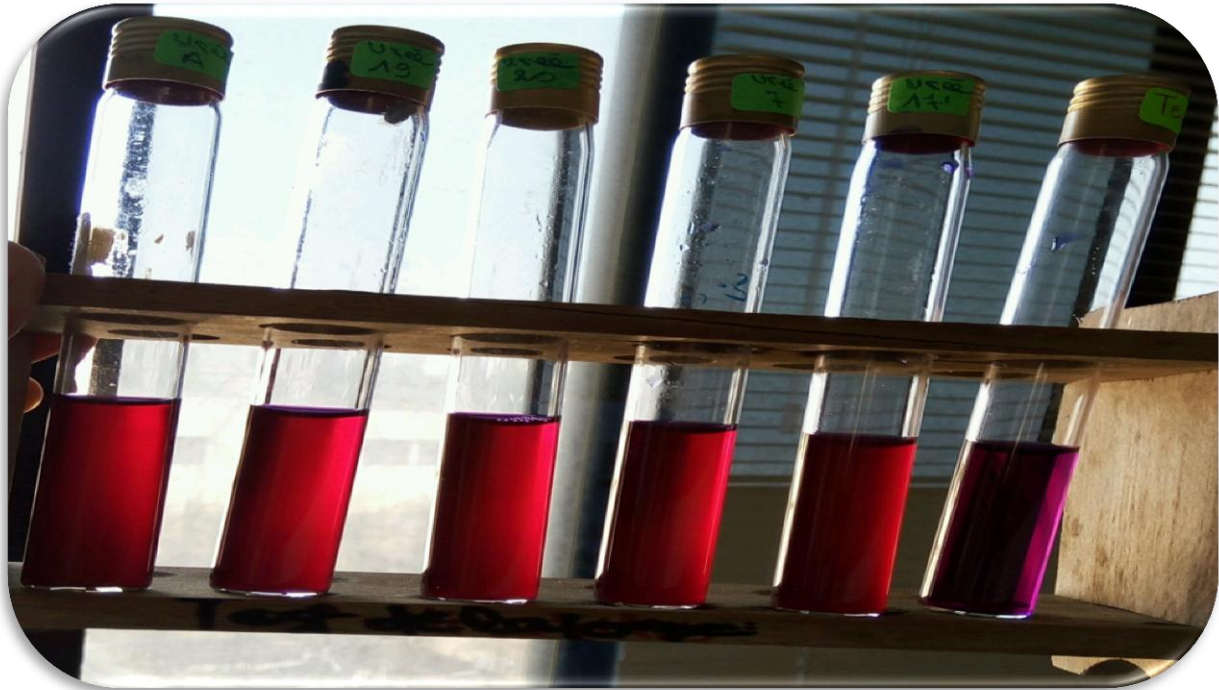


Figure n°19: Observation de milieu d'assimilation de l'urée ensemencé par les souches après l'incubation à 37°C pendant 24 heures.



Figure n°20: Observation de milieu d'assimilation de l'urée ensemencé par les souches après l'incubation à 37°C pendant 48 heures.

***Assimilation de nitrate :**



Figure n°21: Observation de milieu d'assimilation de nitrate ensemencé par les souches après l'incubation à 37°C pendant 24 heures.



Figure n°22: Observation de milieu d'assimilation de nitrate ensemencé par les souches après l'incubation à 37°C pendant 48 heures.

2-2-Test de la fermentation des sucres

A* Glucose :



Figure n°23: Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.

B* Saccharose :

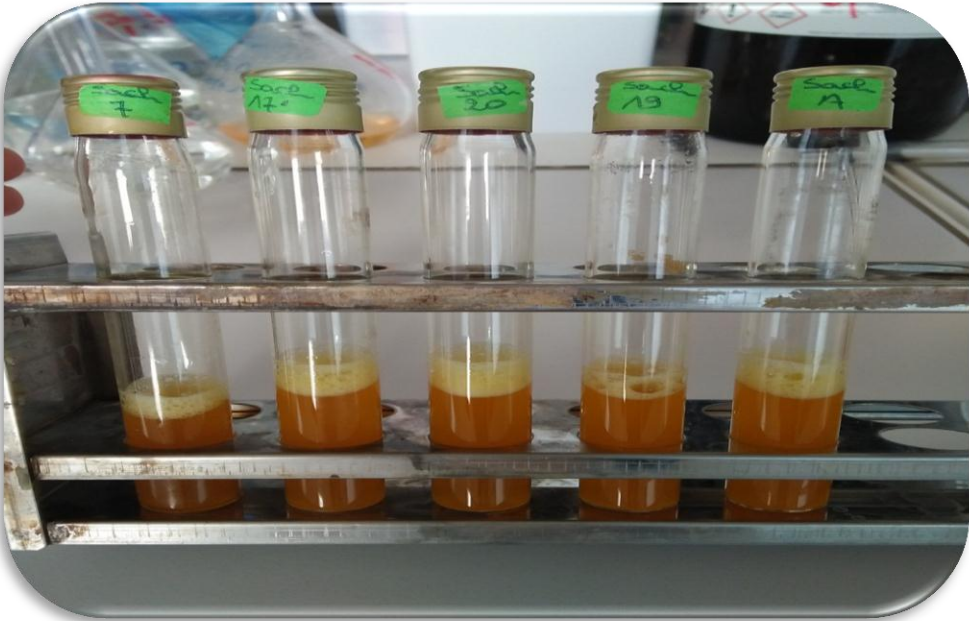


Figure n°24: Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.

C*



Figure n°25: Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.

D* Lactose :

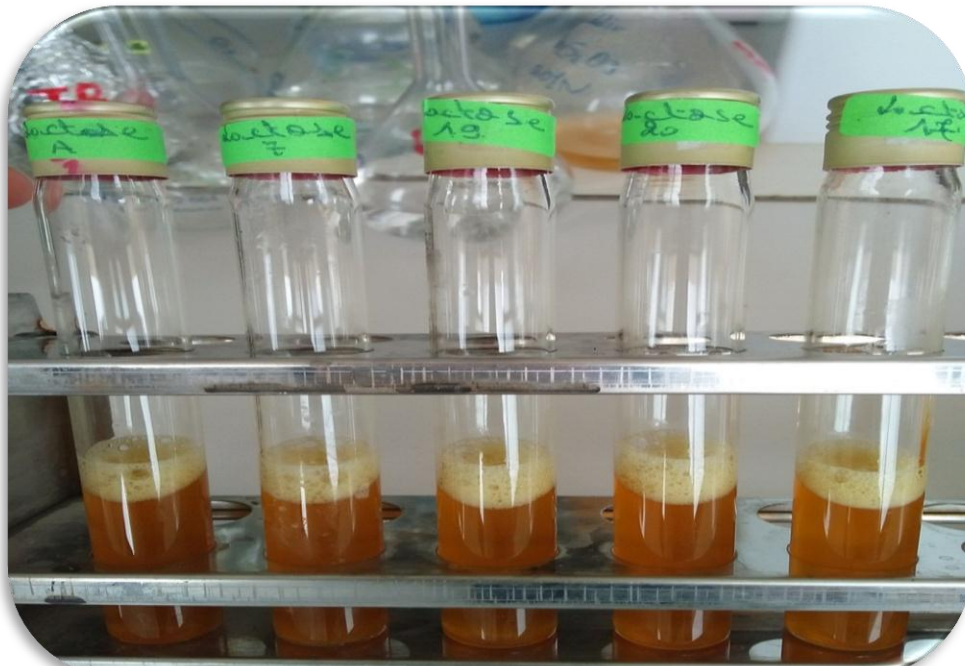


Figure n°26: Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.

E* Sucrose :



Figure n°27: Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.

Tableau n° 13: Résultats d'étude des caractères biochimiques des souches isolées du Cinsault :

<i>La souche</i> <i>Le sucre</i>	<i>Cinsault 01</i>	<i>Cinsault 02</i>	<i>Cinsault03</i>	<i>Cinsault 04</i>	<i>Cinsault 05</i>
Glucose	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
L'urée	+	+	+	+	+
Nitrate	+	+	+	+	+

En observant les résultats de test de fermentation des sucres obtenus, on remarque que les 5 souches isolées à partir de cépage Cinsault sont capables de fermenter tous les sucres testés

(Glucose, fructose, saccharose, sucrose et lactose). Cette fermentation est observée par un dégagement de gaz après incubation des souches levuriennes.

Concernant le test d'assimilation des composées azotées, on remarque que nos 5 souches levuriennes assimilent les deux composées (nitrate et urée). Ce test nous a permis de constater que nos souches n'appartiennent pas à la catégorie des *Saccharomycetaceae* selon **Lodder, 1970** ; **Moore et al, 1988**, car plusieurs genres de levures se montrent incapables d'utiliser les nitrates : *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, et *Debaryomyces*. Dans d'autres genres comme *Candida*, et *Torulopsis*, la situation diffère selon les espèces.

3- Etude des caractères biotechnologiques:

3-1-Résultats du test de la fermentation alcoolique (Capacité des levures à produire de l'éthanol et du CO₂) :

Afin d'avoir une caractérisation biotechnologique des levures isolées, un test de fermentation alcoolique a été réalisé pour avoir la capacité de ces levures à fermenter le glucose.

Un taux d'éthanol très varié a été calculé pour les 5 différentes souches qui varient de 18,5 à 38,4 mg/l. Ces résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°14: Les résultats du test de la fermentation alcoolique des souches isolées du Cinsault.

Souche	Volume de gaz produit (ml)	Nombre de moles de gaz produit (mole)	Nombre de moles d'éthanol (moles)	Masse d'éthanol produite (mg)
Cinsault 01	20.5	$9,15 \cdot 10^{-4}$	$9,15 \cdot 10^{-4}$	38,4
Cinsault 02	17	$7,58 \cdot 10^{-4}$	$7,58 \cdot 10^{-4}$	31,8
Cinsault 03	15.5	$6,9 \cdot 10^{-4}$	$6,9 \cdot 10^{-4}$	28,9
Cinsault 04	13	$5,8 \cdot 10^{-4}$	$5,8 \cdot 10^{-4}$	24.5
Cinsault 05	10	$4,4 \cdot 10^{-4}$	$4,4 \cdot 10^{-4}$	18.5

Le test de la fermentation alcoolique va nous permettre d'observer un pouvoir de fermentation remarquable chez la 1^{ère} et la 2^{ème} souche si on l'a comparé avec la 5^{ème} souche.

3-2- Résultats de l'étude de l'activité enzymatique de l'invertase :

Tableau n°15: Les résultats du test de l'activité enzymatique de l'invertase des souches isolées du Cinsault.

Souches	Densité optique à 550 nm	Concentrations de sucre inverti (mmol/l)	Activité enzymatique ($\mu\text{mol/l/min}$)
Souche 01	0,673	1,46	1460
Souche 02	0 ,061	0.132	132
Souche 03	0,028	0.060	60
Souche 04	0.032	0.069	69
Souche 05	0.095	0.205	205

En se basant de la courbe d'étalonnage (Annexe 06), nous avons pu déterminer les concentrations de sucre inverti (glucose et fructose) libérées lors de la réaction enzymatique par les 5 souches de levures. (**Tableau n 15**).

Chez la 1^{ère} souche on observe que le nombre de micromoles de saccharose hydrolysé par minute est très important, par rapport aux souches. Il est de l'ordre de **1460 $\mu\text{mol/l/min}$** .

L'invertase est produite par une large variété des microorganismes parmi lesquels, on peut citer les levures appartenant aux genres (*Candida*, *Saccharomyces*...), pour la dégradation de saccharose en glucose et fructose (*Carlson. M et Botstein, 1982, Trumbly, 1986 ;Costaglioli et al., 1997, Bahrim. et Gheteu, 2004*). Il existe aussi des invertases endo et exocellulaires (*Chu et al., 1985*).

Conclusion

Les objectifs que nous nous étions fixés au début de cette étude étaient d'isoler, purifier et identifier des souches levuriennes isolées du moût de raisin de cépage Cinsault (récolté de la région de Ben Abdelmalek Ramdane Wilaya de Mostaganem).

Au terme de ce travail, pour tous les tests microscopiques et macroscopiques des souches levuriennes isolées à partir du moût de raisin par des stries successives sur un milieu de culture (YPG + Gentamicine), ainsi que d'autres tests de sporulation, aptitude à la filamentation, tests biochimiques et biotechnologiques ont montré la présence de 5 souches, qui sont ensuite sélectionnées selon leurs capacités à assimiler les composés azotés et leurs pouvoir fermentaire.

D'après nos résultats obtenus lors de cette étude et selon les caractères macroscopiques et microscopiques, nous avons constaté, les levures sont classées dans une seule catégorie grâce à la forme sphérique identique observée dans toutes les souches isolées. Contrairement pour la couleur des colonies, les souches doivent classées en deux catégories, l'une de couleur blanche (concernant la 1^{ère} et la 4^{ème} souche) et l'autre beige (concernant la 2^{ème}, 3^{ème} et 5^{ème} souche). Un mode de reproduction monopolaire est observé chez toutes les souches isolées sauf la 1^{ère} souche présente un mode bipolaire par bourgeonnement. Dans la 1^{ère} et la 2^{ème} souche, un nombre de trois spores par cellule est constaté, et pour la 3^{ème} et la 4^{ème} souche, on observe un nombre de quatre spores par cellule, contrairement un nombre de deux spores par cellule concernant la 5^{ème} souche. La présence de mycélium est détectée chez toutes les souches isolées.

- ✓ **La 1^{ère} souche** se propage par bourgeonnement bipolaire, caractérisant ainsi par une forme végétative sphérique. Ces propriétés ressemblent à l'espèce *Candida albicans*. Un puissant pouvoir fermentaire et une présence de l'enzyme l'invertase sont observés.
- ✓ Concernant les autres souches (**S2, S3, S4 et S5**), elles se multiplient par un bourgeonnement monopolaire, caractérisant ainsi par une forme végétative sphérique. Ces caractéristiques ressemblent à deux espèces du même genre : *Torulaspota delbrueckii* et *Trichosporon asahii*. Ces souches caractérisent par un métabolisme fermentaire moyen, avec une présence de l'enzyme l'invertase.

Un travail complémentaire s'impose en vue d'identifier les différentes souches de levures isolées à partir du mout de raisin en utilisant des diverses techniques de la biologie moléculaire qui peuvent apporter une révolution notoire dans les tests d'identification précise des levures. **La PCR-ITS-RFLP** est une des méthodes d'identification les plus utilisées.

Références

bibliographiques

-A-

- *Abdelguerfi. A, Ramdane. S.A ,2003.** Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture, Bilans des Expertises sur «La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie » MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31 (TOME XI).
- *Adrian. J, Frangne R et Potus. J, 1996 .**Les parois des levures alimentaires et leurs incidences nutritionnelles. Méd. et Nul. PP : 32-170.
- *Aguilar Uscanga, B-R., 2003.** Influence des paramètres de croissance et des conditions de mise en œuvre sur la composition et l'architecture de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse INSA Toulouse.
- *Aline L.F, Vincent. R et Pierre. S, 2012.** Microbiologie du vin : bases fondamentales et applications .Revue Des œnologues - Maîtriser la biodiversité microbienne du vin. PP : 2.
- *Anonyme, 1999.**Usine cellulaire, division levures RDT info. PP : 4- 20.
- *Arnaud C. et Delluc J.M., 2007.** Le vin essence de vie. Ed. DIE. Paris. PP : 3.
- *Ausubel, F.M., Brent R., Kingston R., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K, 1989.***Current* Protocols in molecular biology.John Wiley : New York. PP :35-48.

-B-

- *Babjeva I-P, Moavad .K-H and Marchenko .A-I,1977.** Microbiologia. PP: 270.
- Bahrim. G et Gheteu. M, 2004.** Improvement of *Aspergillus Niger* invertase production in stationary fermentative system. Roum. Biotechnology. Lett. PP: 09.
- *Barnett J.A., Payne R.W. & yarrow D. 2000.** Yeasts, characteristics and identification. Cambridge University Press. Cambridge. PP : 752-758.

***Bayley. R-B et Parks. L-W, 1975.** Yeast sterol esters and their relationship to the growth of yeast .J Bacterial .PP:606-612.

***Berber. N, 2013.** Essai d'Identification Moléculaire (PCR-ITS-RFLP) et Caractérisation Biotechnologique des levures indigènes dans les vignobles de la plaine de Ghriss, El Keurt (Mascara) Cépage de raisin: Cinsault, mémoire de Master en biotechnologie Alimentaire. Ed. Université Abd El Hamid Ibn Badis de Mostaganem.

***Bettane M, 2010.** Vin et vigne .Ed. Insem. PP: 15-20.

***Béguin. J, Coarer. M, Poulard. A, Poupault. P et Vinsonneau .E ,2008.**Maîtrise des fermentations spontanées et dirigées. Institut Français de la Vigne et du Vin. PP : 29-48.

***Bellam et Fould .S, 1996.** Levure et panification .Nathan Communication .Paris. PP : 73.

***Blin. H, 2002.** Champagne . Edition Blin, Limitée Extra Brut. France. PP : 98.

***Blom, J., Mattos, M.J.T.D., et Grivell, L.A., 2000.** Redirection of the Respiratory Fermentative Flux Distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by Over expression of the Transcription Factor Hap4p. Appl. Environ. Microbiol. PP : 1970 -1973.

***Blouin .J, 2007.** Dictionnaire de la vigne et du vin. Ed. DUNOD. Paris. PP : 48.

***Blouin, J., Peynaud, E., 2001.** Connaissance et travail du vin. 3ème Ed. Dunod, Paris, France. PP : 89.

***Bonaly .R, 1991.** Morphologie et reproduction asexuée des levures Ds : Larpent J.P., Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. PP: 4-18.

***Boukhenoufa. A, 2014.**Identifications microbiologiques, biochimiques, biotechnologique et moléculaire (PCR- ITS- RFLP) des levures issues du cépage *sultanine* de la commune d'Ain Merane (Wilaya de Chlef). Mémoire de Master en

Biotechnologie Alimentaire. Ed. Université Abd El Hamid Ibn Badis de Mostaganem.

***Bouix .M. et Leveau J-Y, 1991.** Les levures .Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3. PP : 206-229.

***Bouix M. et Leveau J-Y, 1993.** Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier TEC& DOC, Paris. 08. PP : 2-92.

***Boulouis H.J., Nadia Haddad et R. Maillard, 2001.** Techniques d'étude moléculaire des isolats : principe et fiabilité de, épidémiol, et santé anim, revue 39. PP : 21-29.

***Bourgeois. C-M, Mesclé. J-F. et Zucca. J, 1988.** Microbiologie alimentaire, Tome 1. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires, Technique et Documentation Lavoisier, Paris. 8, p : 161-171.

***Bourgeois .C-M et Larpent .J-P, 1996.** Microbiologie alimentaire Tome 2 : Aliments fermentés et fermentations alimentaires - 2^{ème} édition Ed. Tec & Doc. PP: 523.

***Bourgeois. C-M, Mesclé. J-F, Zucca. J, 1996.** Microbiologie alimentaire Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. 2^{ème} Edition Ed. Tec & Doc. PP: 672.

-C-

***Cadet .A, 2005.**Le cépage vitis vinifera L. CV FER Servaradou : étude de la nutrition minérale et des relations cépages, terroir, qualité de vin. Toulouse.

***Galzy .P, Moulin. G et Adrian. I, 1996.** Présence et utilisation des levures en alimentation humaine Industrie Agro-alimentaire. PP : 2- 113.

***Cézard F. 2009.** La biotechnologie en 28 fichiers. Paris. PP : 35-48.

***Champagnat .A et Adrian. J, 1974.** Pétrole et protéines. Ed. Doin. PP: 195.

***Claude J., Kaplan M. et Delpech, 2007.** Biologie moléculaire et médecine, 3ème édition. Paris. PP : 59-70.

***Compant. S et Bertoni. G. 2012.**Généralités sur la Vigne. ENSAT.PP :215.

-D-

***De Roissart. H et Luquet F-M, 1994.** Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques .VoL2 Ed. Loriga. PP: 614.

***Domergue, O. et Le Roux, 2007.**Amplification d'ADN bactérien, PCR-RELP, Extraction d'ADN sur gel d'agarose, Correction de séquence /Blast, Construction d'arbre phylogénétique.TP de L3 de l'Université d'Oran Es-Senia.PP :150.

-E-

Early. R, 1998. The technology of dairy products. 2^{ème} édition Ed. Thomson Science. PP: 446.

Etienne, E.cllauser et Honsset, p, 2006.Roingre and Masson.Biochimie génétique 9^{ème} Edition. PP :294.

-F-

***Filofteia, 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. PP : 1-58.

*Fiche technique **Soussana (94 - Thiais)** : Prisca, Florine.

***Frédéric T., 2001.** Le grain de raisin. Article.

-G-

***Grandet. J, 1989.** Les levures-aliment Bull. Soc. Mycologique de France, 1989, PP : 170.

***Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H. & Davis R.W, 1996 .**Life with 6000 genres. Sciences. PP:563-574.

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

***Guiraud, J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire. (Ed) Dunod. Paris, PP: 320.

***Guiraud. J-P, 1998.**Microbiologie alimentaire Ed. Dunod. PP: 320-652.

***Guinet .R et Godon. B, 1994.** La panification Française Ed. Tec & Doc, 1994. PP : 521.

-H-

***Hagler. A-N and Mendonca .H- L, 1981.**Applied and environmental Microbiology. PP : 41, 173.

***Hédalgo. L, Jack. B et Jeane. C, 2005.** Taille de la vigne, Paris. P : 1.

***Hermier. J, Lenoir. J et Weber .F, 1992.** Les groupes microbiens d'intérêt laitier Ed. CEPIL (Centre de Formation Permanente et de Perfectionnement des Cadres des Industries du lait). PP : 568.

***Huglin. P, Schneider. C., 1998.** Biologie et écologie de la vigne. 2^{ème} édition. Ed Lavoisier, Paris. PP : 370.

-J-

*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.

-J-

***Johnson. P-H, 2014.** Guide des cépages et terroirs. Dunod. 5 rue Laromigulière, 75005 Paris. PP: 180.

***Joseph- Pierre .G, 1998.** Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie. Agro-alimentaire. Ed. Dunod. PP : 652.

-K-

***Kappel. C.D, 2010.** Biologie intégrative du métabolisme de la baie de raisin.

***Klug .W-S, Clummings. M-R et Spincer. C- A, 2006.** La génétique. Ed. Colorado. PP : 107-468 et 480.

***Kreger -Van Rij N-J, 1984.** The yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical
Suarit, R., Gopal, P-K, et Sherped, M-G, 1988. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbial*, 134. PP: 359 - 368.

-L-

***Labrecque M-H, 2003.** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène, Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Ed, Université Laval. p : 19-24.

***Larpent J-P, 1991.** Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires - produits laitiers et carnés. Ed. APRIA. PP : 242-260.

***Larpent .J-P, 1991.** Biotechnologie des levures. Ed. Masson. Paris. PP : 97-426.

***Larpent .J-P, 1992.** La microbiologie de la fermentation panaière. Ed. APRIA/JCDIUPA. PP : 65.

***Larpent J.P, Larpent G.M. 1997.**Mémento technique de microbiologie. 3^{ème} édition, Technique et documentation Lavoisier, Paris. PP : 217- 240.

***Leblon. C, 1990.** Etude des levures de vinification et des facteurs agissant sur la fermentation alcoolique. PP : 235.

***Leclerc. H, 1975.** Microbiologie générale, Doin éditeurs, Paris. p : 28.

***Leclerc H., Meyer A. et Deiana J. 1995.** Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et techniques. Doin éditeurs, Paris. 73-92.

***Leroi. F, 1993.** Etude des interactions entre levures et bactéries isolées du grain de kéfir sucré. PP : 220.

***Levadoux .L, 1971.** Ampélographie algérienne : cépages de cuve et de table cultivés en Algérie. Ed. SNED. France.

***Leveau. J-Y et Bouix. M, 1993.** Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Tec & Doc Lavoisier. PP : 612.

***Lourens K and Reid G, 2002.** Yeast nutrient management in winemaking. The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker. Annual Technical Issue. PP: 54.

***Ludes. B et Mangin. P, 1992.** Les empreintes génétiques en médecine légale. Ed. France. PP : 21-54.

-M-

***Melloni. G et Swinnen. J, 2013.**The rise and fall of the world's largest wine exporter and its institutional legacy. American Association of Wine Economist.

***Mercier, 1997 .**Champagne Brut Average rating · France. PP: 86.

***Moussa Sassi D., 2011.** Caractérisation moléculaire (PCR-RFLP) des souches de rhizobiums associées à Acacia saligna, mémoire de Magister en biotechnologie. Ed. Université Es-Senia. Oran.

-N-

**Navarre C, 1998.* Œnologie, 4^{ème} édition. Ed. France. PP : 1- 91.

**Neumann N.P. & Lampen J.O, 1967.* Purification and properties of yeast invertase. Biochemistry .PP :468-475.

-O-

**Ostergaard .S, Olsson .L and Nielsen .J, 2000.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. PP: 34-50.

**Oteng-Gyang K. 1984.* Introduction à la microbiologie dans les pays chauds. Ed. Lavoisier. Paris. PP: 43-51.

-P-

**Pagot .E, Fiedler .S, Cloetens .P, Bravin .A, Coan .P, Fezzaa .K, Baruchel .J, Hartwig .J, 1997.* Quantitative comparison between two phase contrast techniques: diffraction enhanced imaging and phase propagation imaging. Phys Med Biol. PP: 709-724.

**Pascal. 2009.* Physiologie de la vigne. Institut Français de la Vigne et du Vin. PP : 25.

**Pasteur. L, 1866.* Etude sur le vin. 1^{ère} édition. Masson. Paris.

**Phaff .H, Miller M.W and Mrak E.K, 1968.* The life of yeasts. In: *Oteng-Gyang K.* Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. 8, PP : 43.

**Phaff. H, William. T, Starmer. H et Kricher .J, 1978.* Evolution and Speciation of host plant specific. Widmer Tanner, F.A. Loewus. PP: 137- 149.

***Pol .D, 1996.** Travaux pratiques de biologie des levures. Pellisepse, édition marketing. 158. PP : 21-151.

***Polomska X., Juszczak P., Cadež N., Raspor P., Robak M. et Wojtatowicz M., 2007.** Comparison of physiological and PCR-RFLP RFLP identification of yeast species commonly found in cheese, revue. PP : **221-226**.

***Puch C. et Laurent B, 2000.** Les phénols de raisin et du vin. Ed. Lavoisier, Paris. PP : 19.

-R-

***Read Donnai, 2009.** Génétique médicale de la biologie à la pratique clinique, édition de Boeck université paris : 95. PP : 55-68.

***Regnault .J-P, 1990.** Microbiologie générale .Vol . Ed. Vigot. PP: 859.

***Renouf .V, 2006.** Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interaction et équilibres relation avec la qualité du vin.

***Reynier A, 1991.** Manuel de viticulture. 6^{ème} édition, Lavoisier, Paris. PP : 360.

***Reynier A, 2007.** Manuel de viticulture, 10^{ème} édition TEC & DOC. Paris. PP : 61, 64, 69, 120.

***Ribéreau. G-P., Doubourdieu D, Donèche B. et Lonvaud A, 1998.** Traité d'œnologie : microbiologie du vin, vinification. Ed. Dunod. Paris. PP: 20.

***Rose. A-H et Harrison. J-S, 1993.** The yeasts .2nd edition - Vol. 5
Ed. Academie Press: Harcourt Brace & Company, Publishers. PP: 620.

***Roland Marquet, 2008.** PCR (Polymérase Chain Réaction). PP : 20.

-S-

***Scurr A. & yagile Y, 1971.** Regulation and characterization of alkaline phosphate in yeast. J Gen Microbiol. PP:291-303.

***Scriban. R, 1988.** Les Industries Agricoles Alimentaires .Ed. Tec & Doc. PP: 382.

***Scriban, R et Arnaud. A, 1984 .**Biotechnologie. Edition LCDA .Land Réville, France. PP : 150.

***Simon. P et Meunier .R, 1970.**Microbiologie Industrielle et Génie Biochimique. Paris. PP : 88- 188.

***Simpson. A-C, 1977.** Alcoholic beverages. . Rose A. H. Ac. Press. London.

***Stewart, G-G et Russell. I, 1981.** Yeast flocculation in brewing Science, voll. 2. J.R.A. Pollock .Ed. Academic Press, London. PP: 61-92.

-T-

***Tamaki N and Hama T, 1982.** In “Methods in enzymology” (W. A. Wood, ed.), Academic Press, London. 89. PP: 285-306.

***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 sepium* (jacq.)Steud.Thèse de Doctorat.Université Cheikh Anta Diop (UCAD)..Sénégal.pp : 116.

***Thuriaux P., 2004.** Les organismes modèles la levure. Ed. Belin. Paris. PP: 15-44.

-V-

***Verscheure. M, Lognay .G et Marlier .M, 2002.** Les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons, revue. Ed. Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Belgique.

***Vishniac .H-S and Hempfling .W-P, 1979.** Journal of General Microbiology .PP: 112:301.

***Vrignaud. Y, 1991.** Les levures-aliment: matière première et actions biologiques
RAA. PP : 71-73, 444.

-W-

Walker G, 2000. The role of metal ions in optimising yeast fermentation performance. *In: Nutritional aspects II. Synergy between yeasts and bacteria.* Lallemand Technical Meeting. PP: 27-30.

• **Walker G.M., Wiley J. and Chihster S. 1997.** Yeast physiology and biotechnology.







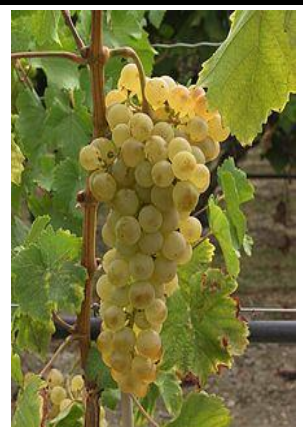





***White, T.J., Bruns. T, Lee .S et J.Taylor.1990.** Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes tiré de PCR Protocols :A guide to Methods and Applications. M.A. Innis, D.H.PP :12-33.













-Z-

***Zott K., 2009.** Les levures non-Saccharomyces : dynamique, caractérisation et interaction avec Saccharomyces durant les étapes de pré-fermentaires et la fermentation alcoolique. Paris.

Annexes

Annexe n°01 : Quelques cépages du raisin.

			
<i>Adari</i>	<i>Ahmar Bou Amar</i>	<i>Alphonse Lavallée</i>	<i>Aspirant noir</i>
			
<i>Cabernet franc</i>	<i>Cardinal</i>	<i>Chasselas</i>	<i>Cinsault</i>
			
<i>Clairette</i>	<i>Dattier de Beyrouth</i>	<i>Exalta</i>	<i>Grenache</i>

			
<i>Hambourg</i>	<i>Italia</i>	<i>King's Ruby</i>	<i>La perle de csaba</i>
			
<i>La reine des vignes</i>	<i>Seibel</i>	<i>Sultanine Blanche</i>	<i>Tressot</i>
			
<i>Trousseau</i>	<i>Ugni blanc</i>	<i>Valensi</i>	<i>La vigne de cornithe</i>

Annexe n°02. *Caractéristiques des cépages de cuve en Algérie (I.T.A.F, 2000).*

Cépages	Couleur	Utilisation	Caractéristiques culturales	Mode conduite	Zone culture
<i>Carignon</i>	Noir	Cuve	Peu exigeant, très sensible à l'oïdium, régulièrement productif	Taille courte	Montagnes et coteaux
<i>Cinsault</i>	Noir	Cuve et Table	Productif, résiste au sirocco, assez sensible au mildiou et l'oïdium	Gobelet ou palissé	Plaines coteaux et montagnes
<i>Grenache</i>	Noir	Cuve	Sensible à la coulure	Taille courte	Coteaux et montagnes
<i>Alicante Bouchet</i>	Blanc	Cuve	Productif, sensible à la sécheresse, résistant à l'oïdium, sujet à la coulure	Gobelet	Plaines sèches et coteaux maigres
<i>Clairette</i>	Blanc	Cuve et Table	Sensible à la coulure, à l'eudémis et au mildiou	Palissé	Coteaux et montagnes
<i>Ugni blanc</i>	Blanc	Cuve	Rustique et résistant à l'oïdium, mais sensible au mildiou, très vigoureux	Palissé	Coteaux et montagnes
<i>Merseguera</i>	Blanc	Cuve	Résiste très bien au sirocco et aux maladies cryptogamiques	Taille courte	Plaines sèches et coteaux maigres
<i>Farrana</i>	Blanc	Cuve et Table	Très productif	Palissé	Coteaux et montagnes

Annexe n°03. Caractéristiques des cépages de table en Algérie (I.T.A.F, 2000).

<i>Cépage</i>	<i>Couleur</i>	<i>Maturité</i>	<i>Aptitudes Culturales</i>	<i>Mode conduite</i>	<i>Zone de culture</i>
<i>Chasselas</i>	Jaune ambré	mi-juin début juillet	Sols maigres de coteaux. Sols riches, sensible au mildiou, oïdium, sirocco, vents chargés de sable : bonne transportabilité	Gobelet taille longue	Zones littorales, hivers doux et étés tempérés
<i>Cardinal</i>	Rose	1ère semaine de juillet	Terres riches sensibles au mildiou, oïdium et gelée d'hiver	Taille longue	Zones chaudes et littorales exposées au soleil
<i>Alphonse Lavallée « gros noir »</i>		Fin juillet début août	Terrain frais et fertile, sensible à oïdium, mildiou, bonne transportabilité	Taille longue	Plaines Sub- littorales vallées intérieures
<i>Italia</i>	Blanc doré	Zone littorale fin juillet début septembre zones de montagnes mi-octobre	Sols riches et frais sensible au mildiou et oïdium, à la pourriture grise et aux gelées d'hiver	Taille longue	Plaines littorales et zone de montagne
<i>Muscat d'Alexandrie</i>	Jaune vert	mi-août mi- septembre	Redoute le sirocco, préfère la proximité à la mer	Gobelet et taille longue	Zones littorales
<i>Sultanine</i>	Jaune doré	Début août	Terres riches et irriguées, sensible au mildiou, facile à sécher	Taille longue	Zones à étés chauds et secs
<i>King's Ruby</i>	Rouge	Début août	Très productif sur terrain profond et riche et irrigué	Taille longue	Zones à étés chauds et secs
<i>Ahmar Bou- Amar</i>	Rose ou rouge vif	mi- septembre à mi- novembre	Sols riches, a besoin de nuits froides pour colorer ses grains	Taille longue	Zones de montagnes

Annexe n° 04 : les milieux de culture et les réactifs utilisés.

✓ **Milieux de culture**

❖ Milieu YPG (Yeast Peptone Glucose)

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

PH=4,8 à 25°C pendant 20 min

❖ Milieu Fowell (de sporulation)

- Eau distillée..... ;.....	1000ml
- Agar.....	20g
- Acétate de sodium.....	5g

❖ Milieu Wickerham

- Eau distillée.....	300ml
- Peptone pancréatique.....	3 g
- Extrait de levure.....	3 g
- Rouge de phénol.....	0.015 g
- Gentamicine80mg(Antibiotique).....	0,06g

Remarque : On ajoute les différents sucres à une concentration de 6% dans chaque milieu.

On les met dans des tubes + la cloche de durham.

❖ Milieu d'assimilation de nitrate

- Glucose.....	25g
- Nitrate de potassium.....	0,004g
- Phosphate de sodium.....	0,1g
- Sulfate de potassium.....	0,1g
- Bleu de bromothymol.....	0,038g
- Cyanocobalamine (vit B 12).....	$2,5 \times 10^{-4}$ g

- Eau distillée.....1L

❖ **Milieu d'assimilation de l'urée**

- Glucose.....20g

- Urée.....0,45g

- Phosphate de sodium.....0,4g

- Sulfate de potassium.....0,4g

- Bleu de bromothymol.....0,15g

- Cyanocobalamine (vit B 12)..... 10^{-4} g

- Eau distillée.....500ml

✓ **Les équipements et matériels pour l'expérimentation biotechnologique**

• **Pour le dosage de CO₂ et de l'éthanol**

Equipements :

- Agitateur
- Balance de précision
- Statif
- pince à burette

Matériels :

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

• **Pour l'étude de l'activité enzymatique**

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

◆ Solution de Glucose 2,5 mM (Millimole)

◆ Solution de Fructose 2,5 mM

◆ Solution de DNS (Acide 3,5- Dinitrosalicylique).

- 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 NaK 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.

✓ **Réactifs pour l'identification des levures (test de sporulation).**

➤ **Préparation de vert de malachite.**

- Dissoudre 1g de phénol dans 100 ml d'eau distillée.

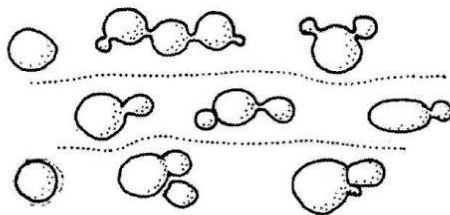
- Dissoudre de 1g de vert de malachite dans la solution de phénol.

➤ **Préparation de safranine**

- Dissoudre 500mg de safranine dans 100 ml d'eau distillée.

Annexe n° 05 : Aspects morphologiques des levures (Larpent, 1991).

Sphérique

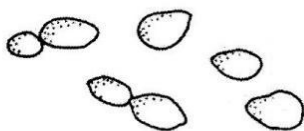


ex. Saccharomyces cerevisiae

Hansenula anomala

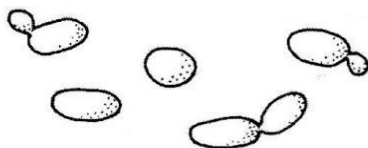
Cryptococcus neoformans

Ovoïde



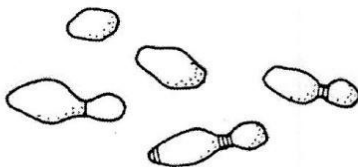
ex. Dekkera bruxellensis

Cylindrique



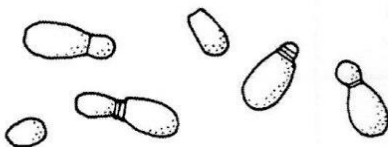
ex. Pichia membranaefaciens

Apiculé



ex. Kloeckera apiculata

Bouteille



ex. Pityrosporium ovale

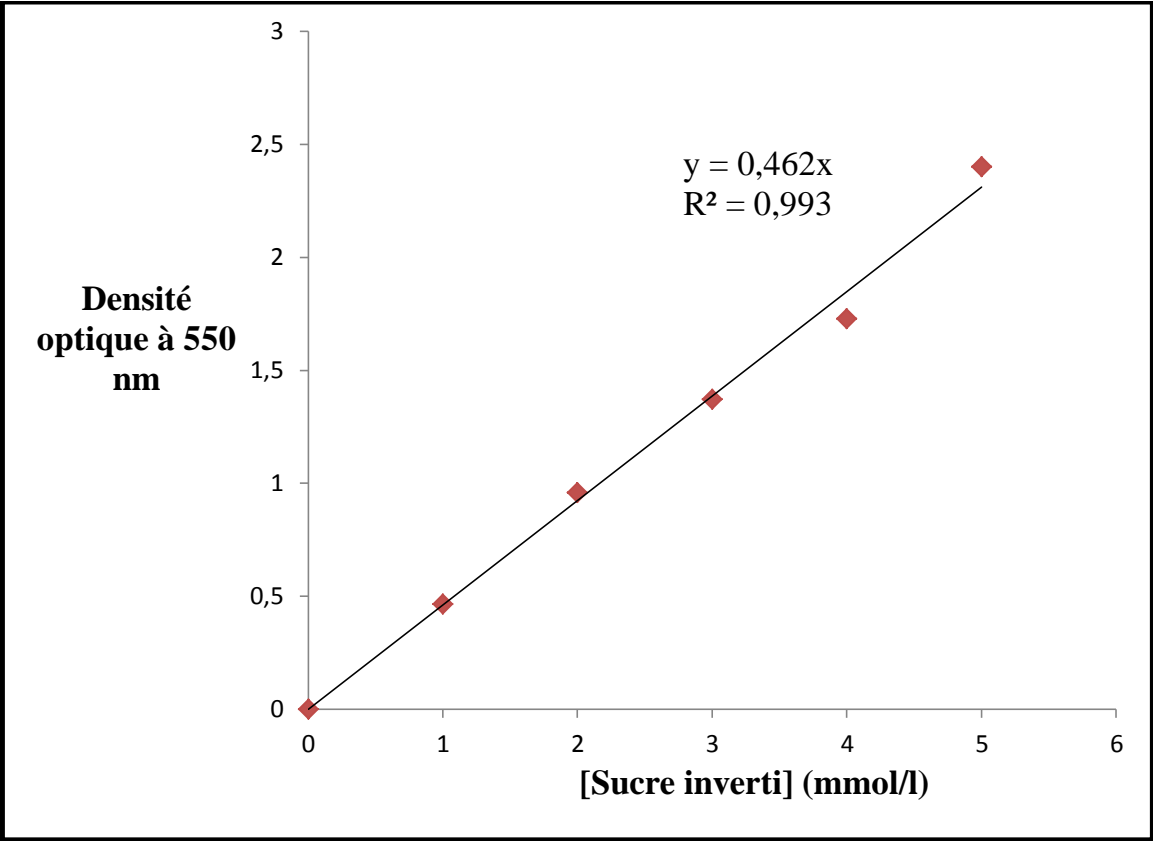
Triangulaire ou
pyramidal



ex. Trigonopsis variable

A l'état levure les observations au microscope révèlent des cellules libres indépendantes ou associées deux à deux.

Annexe n 06 : Droite d'étalonnage pour la méthode de DNSA.



Résumé

Le raisin défini comme le fruit de la vigne, le plus cultivé dans le monde. Il est considéré comme un habitat principal d'un grand nombre des espèces levuriennes. Donc notre étude visait à isoler, purifier et caractériser des espèces de levures issues du cépage Cinsault récolté de la commune Ben Abdelmalek Ramdane wilaya de Mostaganem.

Nous avons effectué des tests microscopiques et macroscopiques, ainsi que d'autres tests de sporulation, aptitude à la filamentation, tests biochimiques et biotechnologiques, qui ont montré la présence de 5 souches levuriennes. Ces 5 souches levuriennes sont caractérisées par des performances importantes de production de CO₂ et d'éthanol, ainsi que la présence de l'enzyme l'invertase.

Mots clés : raisin, levures, Cinsault, CO₂, Ethanol, Invertase.

Abstract

Defined as the fruit of the vine, the most widely grown grapes in the world. It is considered to be a core of a large number of levuriennes species habitats. So our study aimed to isolate, purify and characterize species of yeasts from the grape Cinsault harvested of the commune Ben Abdelmalek Ramdane wilaya of Mostaganem.

We performed microscopic and macroscopic, tests and other tests of sporulation, ability to the filamentation, biochemical and biotechnological testing, which showed the presence of 5 strains levuriennes. These 5 strains of levuriennes are characterized by significant performance of CO₂ and ethanol production, as well as the presence of the enzyme invertase.

Key words: grape, yeasts, Cinsault, CO₂, Ethanol, Invertase.