

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 DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE VEGETALE

N°...../SNV/2015

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Djelti nadjet et Lassal samira

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité:

GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE ET GÉNOMIQUE DES MICROORGANISMES

*Identifications biomoléculaires et Caractérisation
biotechnologique des levures issues du cépage Cinsault
cultivé dans la commune Ben Abdelmalek
Ramdane(Mostaganem)*

Soutenue publiquement le 28/06/2017

DEVANT LE JURY

<i>Président</i>	<i>Mr. BENAKRICHE. B</i>	Maitre de conférences, U. Mostaganem
<i>Encadreur</i>	<i>Mr. BEKADA. A</i>	Maitre de conférences, U. Mostaganem
<i>Co.Encadreur</i>	<i>Mlle. BERBERN</i>	Maitre-assistant, U. Mostaganem
<i>Examineurs</i>	<i>Mr. CHADLI. R</i>	Maitre de conférences, U. Mostaganem

2016-2017

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions « الله » qui nous a donné la patience, le courage et la volonté pour réaliser ce mémoire

Nous tenons aussi à présenter nos sincères remerciements

à notre encadreur le *Pr. Bekada*. pour la confiance qu'il nous a accordée en

acceptant cet encadrement

Pour sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire, pour son aide,

Ses critiques et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Nous remercions *Pr. Benakrich* d'avoir accepté la présidence du jury de la soutenance.

Nous remercions *Pr. Chadli* qui a accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous voudrions remercier aussi les techniciens du laboratoire de microbiologie *Djillali, Mohamed*, et particulièrement *Hafida* pour sa patience, son aide précieuse et ses valeureux conseils.

Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

Avous tous, un grand Merci

D. Nadjet

L. Samira

Table des matières

Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale.....	1

Partie: Etude bibliographique

Chapitre I : Raisins et levures

I.1. Raisin et vignoble.....	3
1.1. Histoire.....	3
1.2. Définition.....	3
3. Les maladies de la vigne.....	4
3.1. Les maladies virales.....	5
3.2. Les maladies à phytoplasmes.....	5
3.3. Les maladies bactériennes.....	5
3.4. Les maladies à nématodes	6
3.5. Les maladies fongiques.....	6
4. La Physiologie de la vigne.....	6
5. Les organes de la vigne.....	6
5.1. Les racines.....	7
5.2. Les troncs et les bras.....	7
5.3. Les rameaux et les sarments.....	7
5.4. Les feuilles.....	7
5.5. Les bourgeons.....	8
5.6. La fleur.....	8
6. Les Principales maladies et ravageurs de la vigne.....	9
7. Les maladies cryptogamiques de la vigne.....	9
7.1. Le Mildiou.....	9

7.2. Symptômes.....	9
7.2.1. Feuilles.....	9
7.2.2. Tiges.....	10
7.2.3. Baies.....	10
8. L'oidium.....	10
8.1. Symptômes	11
8.1.1 feuilles.....	11
8.1.2 Tiges.....	11
8.1.3 Inflorescences.....	11
8.1.4 Baies.....	11
9. Les maladies à virus.....	12
9.1 Court noue.....	12
10. les ravageurs.....	12
10.1Phylloxéria.....	12
10.2 La Pyrale.....	12
10.3 Cochylis.....	13
10.4 L'atise.....	13
11. Etude de la physiologie.....	13
11.1.1. Étude de la rafle.....	13
12. Baie de raisin.....	14
12.1.1 .Etude de la pellicule de raisin.....	14
12.1.2. Étude de la pulpe.....	14
12.1.3. Étude des pépins.....	15
12.2. Étude des constituants chimique.....	15
12.2.1. L'alcool.....	15
12.2.2. Les acides organiques.....	15
12.2.3. Les polyphénols.....	16
12.2.3.1 Les métiers colorants.....	16
12.2.3.2 Les anthocyanes.....	17
12.2.3.3 Les polyphénols incolores.....	17
13. Substances aromatique.....	18
13.1. Les aromes primaires.....	18
13.2. Les aromes secondaires.....	18
13.3. Les aromes tertiaires.....	18

14. Substances azotées.....	19
15. 1 .Enzyme.....	19
15.2. Vitamines.....	20
15.3. Substances minérales.....	20
15. Influence des facteurs externe.....	20
15.1. Sol de plantation.....	20
15.2. Climat.....	20
15.2.1 Léensoleillement ou la lumière.....	20
15.2.3 La pluvométrie.....	21
15.2.4. Les vents.....	21
16. La flore microbienne du raisin et son origine.....	21
17. Notion de cépage.....	22
16.1. Le cepage.....	22
16.2.1 la diversification entre les cépages.....	22
16.2.1 La couleur de la peau.....	22
16.2.2 L'observation des caractères morphologiques.....	22
17. La viticulture dans le monde.....	23
18. La viticulture en Algérie.....	23

Partie : Etude bibliographique

CHAPITRE II : Etude fondamental des levures

II.1 .Générale.....	25
1.1 .Définition de la levure.....	25
1.2 .Caractéristiques des levures.....	25
3. Historique de levure.....	26
4. Morphologie de la levure.....	26
4.1 .Cytologie et organisation.....	28
4.2 .la paroi.....	28
4.3 .membrane cytoplasmique.....	29
5. caractéristiques et cycle de reproduction.....	30
5.2. Caractéristiques et cycle de reproduction.....	30

5.3. Caractéristiques variables.....	31
5.4. Caractère génétiques.....	31
6. La reproduction de la levure.....	32
6.1. Par bourgeonnement.....	32
6.2. Par fusion des spores.....	32
7. La reproduction.....	32
8. Bourgeonnement dans la levure.....	34
8.1. Reproduction d'une levure.....	35
8.2. La reproduction sexuée.....	36
8.3. La reproduction asexuée.....	37
9. différenciation des levures.....	38
9.1. La levure fraîche.....	38
9.20 La levure biologique déshydratée.....	38
9.3 La levure biologique lyophilisée.....	38
10. les conditions physicochimiques de croissance.....	39
11. Sensibilité aux agents chimiques.....	39
11.1. Acides organiques.....	39
11.2. Éthanol.....	40
11.3. Sulfite.....	40
11.4. Antifongique.....	40
12. Métabolisme et conditions de croissance.....	40

CHAPITRE III : Technique d'étude des levures

III.I .Isolement des levures.....	42
2. Classification et identification des levures.....	42
2.1. Classification.....	42
2.2 Technique d'identification.....	42
2.2.1. Etude des caractères cultureux.....	42
2.2.2. Étude des caractères morphologiques cellulaires.....	43
2.3.1. Aptitude à la Filamentisation.....	43
2.3.2. Morphologie particulières.....	44
2.3.3 .Caractéristiques sexuelles.....	44

4. Caractéristiques biochimiques et physiologiques.....	45
4.1. Fermentation des sucres.....	45
4.2 Assimilation des composés carbonés.....	45
4.3 Assimilation des sources azotées.....	45
5. Méthodes moléculaires d'identification des levures.....	45
6. Les techniques de biologie moléculaires.....	45
6.1 .La structure d'ADN.....	46
6.2. Matériel génétique des levures.....	47
6.2.1. Le génome levurien.....	47
6.2.2. Les chromosomes.....	47
6.2.3. ADN mitochondrie.....	48
6.2.4. Plasmide.....	49
6.2.5. ADN ribosomiques.....	50
6.2.6. La région ITS.....	51
6.3. L'extraction d'ADN.....	52
6.4. Extraction d'ADN génomique de levure.....	52
6.5. Détermination de la concentration d'ADN.....	53
6.6 .Électrophorèse sur gel d'agarose classique.....	53
7. L'amplification d'ADN.....	55
7.1. Définition de PCR.....	56
8. Les différentes méthodes d'identification des levures.....	57
8.1 PCR quantitative.....	57
8.2. Principe de la quantitative.....	58
8.3. PCR delta.....	59
8.4. La reverse transcriptase (RT-PCR).....	59
8.5. Identification des levures entre espèces.....	60
9. Identification des levures au niveau de souche.....	60
10. biotechnologie des levures.....	64
10.1. L'utilisation de la levure en industrie.....	65

Partie II : Etude Expérimental

Chapitre IV : Matériels et méthodes

1. Objectif de l'étude.....	67
2. Présentation de la région de la récolte.....	67

3. Sources de prélèvement des levures.....	67
4. Milieu de pré-culture.....	68
5. Présentation de milieu de culture.....	68
6. Isolement, purification et conservation des isolats.....	69
7. Purification des levures.....	70
8. Conservation des levures.....	71
9. Identification microscopique des levures.....	72
10. Méthode de la coloration avec le bleu de méthylène.....	72
10.1 Test de filamentisation.....	73
10.2 Test de sporulation.....	73
11. Test des caractéristique biochimiques et physiologiques.....	73
11.1. Fermentation des sucres.....	73
11.2. Milieu de culture.....	74
12. Caractérisation biotechnologique.....	74
12.1. Etude de l'activité enzymatique de la biomasse.....	75
13. caractérisation biotechnologique.....	77
13.1. Fermentation alcoolique chez la levure.....	77
14. Identification moléculaire.....	80

Partie II : Résultats et discussion

I. 1. Etudes des Caractéristiques culturaux des souches isolées du cépage cinsault.....	86
2. Etude des caractéristique morphologique et physiologique des souches.....	88
3. Etude des caractères biochimiques des souches.....	93
4. Etude des caractères biotechnologique.....	96
5. Etude moléculaire.....	98
 Conclusion générale.....	 99
Références bibliographiques	100
Annexes.....	101

Dédicace

À ma mère, la lumière qui éclaire ma vie, qui m'a toujours encouragé, aidé, qui m'a guidé Dans le droit chemin, qui m'a appris que rien est impossible, que dieu te garde près de nous, merci
Maman.

À celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études. Merci pour ton amour et ta confiance total. A toi très cher *papa.*

A ma chère et précieuse sœur (*Djelti Rommaissa*) et frère (*Réda*).

A mes camarades, Samira, *Derar Fatima, Bousoir Imad* particulièrement pour tous les bons moments que nous avons prtagés.

Et à mon encadreur *Pr.Bekada* merci pour votre disponibilité et vos précieux conseils.

Ainsi qu'à toute la promotion de *GMGM 2016/2017.*

D.Nadjet

Liste des figures

Figure	Pages
Figure n°1 : Un cep de vigne et ses différents éléments	04
Figure n°2- 3 : Symptômes de Mildiou sur feuille et grappe de vigne.	10
Figure n°4- 5 : Symptômes de L' oïdium surfeuille.	12
Figure n° 6 : Larve et dégâts sur inflorescence	13
Figure n° 7 : Papillon au repos.	13
Figure n°08 : Schéma d'une baie de raisin	14
Figure n°09 : Production mondiale de raisins	23
Figure n°10 : Représentation idéalisée d'une cellule de levure	27
Figure n°11 : Structure membranaire des levures	28
Figure n°12 : Structure de la chitine	29
Figure n°13 : Structure de cellule de levure	30
Figure n°14 : la coloration de levure	30
Figure n°15 : Cycle de la production de la levure	33
Figure n° 16 : Cycle de reproduction de la levure	36
Figure n°18 : Schéma de la reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure	37
Figure n° 19 : Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure	38
Figure n° 20 : Filamentisation des levures	43

Figure n°21 : Les trois principales étapes d'étude de l'écologie microbienne par méthode moléculaire.	45
Figure n°22 : Description de la structure d'un chromosome.	47
Figure n°23 : Schéma représentant une bactérie contenant des plasmides.	48
Figure n°24 : Schéma pour la structure l'ADNr	49
Figure n°25 : Schéma explicatif de la situation de la région ITS	50
Figure n°26 : Visualisation de bandes d'ADN sur gel d'agarose.	52
Figure n°27 : principe d'électrophorèse	53
Figure n°28 : Schéma représentant les cycles PCR.	56
Figure n°29 : Le principe de la RT- PCR	59
Figure n°30 : Principe de méthode de RAPD	61
Figure n°31 : Principe de méthode d'AFLP	62
Figure n° 32 : le cépage Cinsault cultivé de la région Abdelmalek Remdane dans la Wilaya de Mostaganem.	66
Figure n°34 : Schéma récapitulatif de l'étude microscopique des souches isolées.	68

Figure n°35 : Dispositif de mesure du CO ₂ produit permettant la collecte du gaz	77
Figure n°36 : Schéma récapitulatif de notre étude moléculaire à partir des souches isolées.	80
Figure n°37 : organisation des gènes codant les ARN ribosomiques	82
Figure n°38 : photo montrant l'aspect microscopique, bourgeonnement de la souche 19' AMR	87
Figure n°39 : photo montrant l'aspect microscopique, bourgeonnement de la souche 11' AMR.	88
Figure n°40 : photo montrant l'aspect microscopique, bourgeonnement de la souche 25 AMR.	89
Figure n°41 : photo montrant l'aspect microscopique, bourgeonnement de la souche 31 AMR	90
Figure n°42 : photo montrant l'aspect microscopique, bourgeonnement de la souche C AMR	91
Figure n°43 : Observation des milieuxensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures	92
Figure n°44 : Observation des milieuxensemencés par les souches après l'incubation à 30 °C Pendant 72 heures.	92
Figure n° 45 : Observation des milieuxensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.	93

Figure n°46 : Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.	93
Figure n°47 : Observation de milieu d'assimilation de l'urée ensemencé par les souches après l'incubation à 30°C pendant 48 heures.	93
Figure n°48 : Observation de milieux d'assimilation de nitrate ensemencé par les souches après l'incubation à 37°C pendant 48 heures	94
Figure n°49 : Visualisation de la région (ITS-I-ADNr5, 8S-ITSII) amplifiée chez les 05 isolats de Cinsault.	98
Figure n°50 : Visualisation de la région (ITS-I-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la Hinf I chez les 05 isolats de Cinsault.	98
Figure n°51 : Visualisation de la région (ITS-I-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la HaeIII chez les 05 isolats de Cinsault.	99

Liste des tableaux

Tableau	pages
Tableau n° 01 : Quelques levures isolées des raisins et des moûts en fermentation	22
Tableau n°2 : Enzymes de restriction utilisées et conditions d'utilisation	60
Tableau n°3 : Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes	63
Tableau (04) : programme PCR pour l'identification des levures	82
Tableau n°05 : observation macroscopique des souches isolées de Cinsault	86
Tableau n°06 : caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche 19'AMR	87
Tableau n°07 : caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche 11'AMR	88
Tableau n°08 : caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche 25 AMR	89
Tableau n°09 : caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche 31 AMR	90
Tableau n° 10 : Résultats d'études des caractères biochimiques des souches isolées du Cinsault	91
Tableau n°11 : Les résultats du test de la fermentation alcoolique des souches isolées du Cinsault.	94
Tableau n°12 : Les résultats de l'activité enzymatique de l'invertase des souches isolées du Cinsault.	95
Tableau n° 13 : Fréquences des espèces de levures isolées à partir du cépage Cinsault.	96
Tableau n° 14 : Taille en paires de bases des produits de PCR et des fragments de restriction obtenus avec deux endonucléases différentes (Hinf I et HaeIII).	97

Liste des abréviations

A : Adénine
ADN: Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomiaux
AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
ARN: Acide ribonucléique
ARNr : Acide ribonucléique ribosomiques
ARNt : Acide ribonucléique transporteur
ATP : Adénosine Triphosphate
C : Cytosine
Cm : Centimètre
CO₂: Dioxyde de carbone / Carbone dioxyde
°C: Degrés Celsius
DAF : DNA Amplified Fingerprinting
dNTP : Désoxyribonucléotides – tri- phosphates
g : Gramme
G : Guanine
G+C : Guanine + Cytosine
Ha: Hectere
H: Heure
H₂O : Monoxyde de dihydrogène
HCl : Chlorure d'hydrogène
ITS: Internal Transcribed Spacer
IFV: Institut Français de vigne et du vin
Kb : Kilo paires de base
L : Litre
M b : Million de base
Mg /L : Milligramme par litre
Min : Minute
ml : Millilitre
mM : Millimole
M-tube: Molecular tube
NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NTS : Non Transcribed Spacer
NaCl: Chlorure de sodium
OGA : Gélose glucosée à l'oxytétracycline
O₂: Dioxygène
Pb : Paire de base
PCR: Polymerase Chain Reaction
PCR-Q : PCR en temps réel quantitatif
PDA : Potato dextrose agar
PCA: Principal Component Analysis
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis
PH : Potentiel Hydrogène
RAPD: Random Amplified Polymorphic
Rpm: rotation par minute
RE: Réticulum endoplasmique
REF: Repetitive Extragenic palindromic
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms
RT: La reverse transcriptase
Sec: Seconde
T : Taaymine
T° : Tempirature
Taq : DE Thermus aquaticus
UFC : Unité formant colonie
YPG: Yeast extract peptone glucose
µl: Mictrolitre

Introduction

La vigne est une plante très anciennement cultivée par l'homme, si bien que l'histoire de la viticulture et du vin se confond avec l'histoire de l'homme. De nos jours, les vignes couvrent près de 8 millions d'hectares dans le monde et produisent plus de 67 millions de tonnes de raisins (**FAOstat, 2012**). En Algérie, la viticulture a connu un important développement, notamment au cours de la dernière décennie. En effet la superficie du vignoble algérien est passée de 50000 hectares en 2000 à plus de 70000 en 2012.

De même que toutes les autres plantes cultivées la vigne est sujette à de nombreux problèmes sanitaires. Les parasites, les pathogènes ainsi que les conditions climatiques provoquent d'importantes pertes de récoltes au cours des années. Les champignons sont les agents qui causent les plus importants dégâts sur les vignes. Les maladies qu'ils provoquent sont très redoutées car ils peuvent s'attaquer à toutes les parties de la plante en occasionnant la diminution sensible du volume des récoltes ainsi que l'altération considérable de la qualité des produits (**Robert, 2007**).

De ce fait et dans le cadre de notre projet de recherche, nous nous sommes penchés sur les problèmes causés par les bio-agresseurs de la vigne. Notre modèle d'étude.

La deuxième partie expérimentale est basée sur l'isolement, purification, identification classique et moléculaire des levures ainsi que une caractérisation biotechnologique de ces dernières.

Dans notre étude expérimentale, la méthode basée sur l'analyse de différentes région du génome, est utilisée pour évaluée la diversité levuriennes c'est :

LA PCR-RFLP qui est une méthode fiable et rapide d'identification, elle est basée sur l'amplification des régions ITS des ADN ribosomiques, puis on soumet ces régions à une série d'enzymes de restriction, essentiellement des endonucléases tel que la HinfI, la TaqI

L'objectif final tracé a court et long terme, s'installe dans la mise en valeur des levures

Introduction

identifier puis sélectionnées afin de servir surtout les domaines agro alimentaires (boulangerie, vinaigrerie, fromagerie...) et les nouvelles biotechnologies.

I. RAISIN ET VIGNOBLE

1. Histoire

La vigne, c'est l'une des plantes les plus diversifiées qui soient, et certainement celle qui a fait le plus rêver les hommes depuis l'antiquité (Dussert – Gerber, 2013).

En provenance d'Asie Mineure, le raisin était présent à l'état naturel puis diffusé ensuite vers l'Ouest. Lorsque la récolte était amplement suffisante, le raisin était broyé en jus, puis réservé dans de terre alors que 4000 ans avant notre ère débutèrent la maîtrise du processus vinification et de la viticulture.

Dans l'antiquité, les Grecs et les Romains, répandirent la culture de la vigne dans tout l'Empire. A partir de Là, la culture de vigne fut domestiquée et de très nombreuses variétés de raisins le jour uniquement pour la viticulture et peu l'homme a commencé à maîtriser la culture de la vigne (Oswald, 2006 ; Arnaud et Deluc, 2007 ; Baudouin, 2009).

L'Algérie est le plus vaste pays du Maghreb qui a partagé le sort des phéniciens à l'empire Ottoman , en passant par les Romains , la conquête arabe , les temps des barbaresques , l'occupation espagnole , la conquête française (1830) ne trouve qu'environ 2000 hectares de vigne ; ils deviendront 30'000 en 1888 , pour atteindre le maximum de 407'000 hectares en 1951 – 1954 en produisant jusqu'à 19 millions d'hectolitres .

Au moment de l'indépendance de l'Algérie, la vigne couvrait encore 350'000 hectares, avec une production variant de 14 à 18 millions d'hectolitres. Elle représentait, sur le plan économique, 10 % des terres cultivées y faisait vivre directement 32'140 familles d'exploitants.

Par le temps, la plus grande partie de ce vignoble a été arrachée, le vignoble « pied noir » en très bon état général s'est désagrégé par pertes de compétences et volontés politiques. Aujourd'hui, ce vignoble relance souvent freinée par les incertitudes politiques. (Isnard, 1947 ; Isnard, 1949 ; Boudjellal Aouf, 1972 ; Isnard, 1975 ; Berger, 1986 ; Blouin, 2007).

2. Définition

2.1. La Vigne : est un arbrisseau rampant, la famille botanique des **vitacées** essentiellement de l'espèce **Vitis** (Hédalgo et al ., 2005) .

Schématiquement comme toutes les autres plantes comparables, un plant de vigne est formé d'une partie souterraines, les racines et radicelles, et d'une partie aérienne

formant le tronc qui supporte les sarments, les rameaux, les fleurs devenant fruits – raisin (Carbonneau et al., 2007).

2.2. Le raisin : est le fruit de la vigne du genre *Vitis vinifera*. C'est le deuxième fruit le plus cultivé au monde (classement de l'année 2000).

C'est une baie charnue qui a plusieurs formes possibles en fonction des variétés. Il est constitué d'un péricarpe et de graines appelées pépins qui sont au nombre maximum de 4 par baie pour la majorité.

Il sert surtout à la fabrication du vin à partir de son jus fermenté, mais il se consomme également comme un fruit, soit frais, le raisin de table, soit sec, le raisin sec. On extrait aussi l'huile de pépins de raisin (Cadet, 2005).

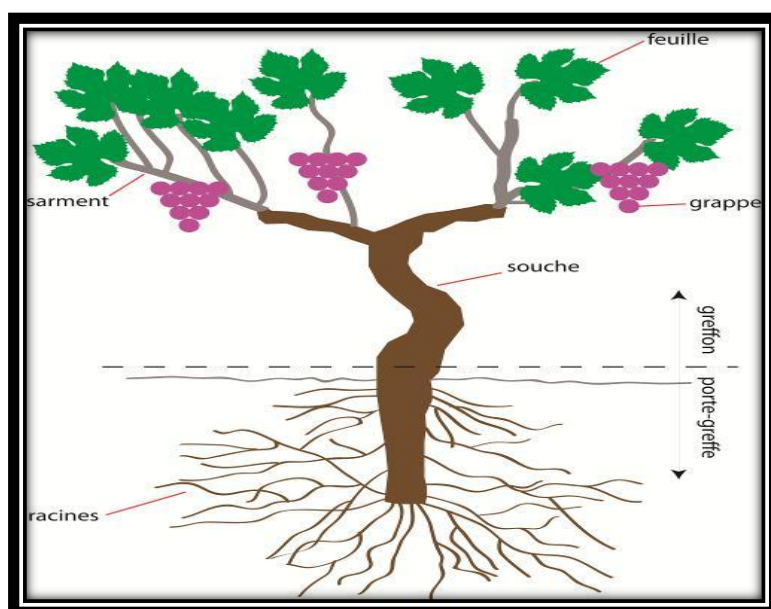


Figure n°1 : Un cep de vigne et ses différents éléments (Cadet, 2005).

3. Les maladies de la vigne

Les maladies de la vigne. En Europe, un large spectre de ravageurs attaquent la Vigne ; leur importance varie avec les zones climatiques. De nombreux insectes (pucerons, acariens,...) ont induit autrefois la perte de vignobles européens, mais l'utilisation de porte-greffes résistants ainsi que de pièges sexuels par les services d'avertissements agricoles ont considérablement réduit ces types de nuisances.

Les nématodes cécidogènes (*Meloidogyne* spp.) engendrent des nodosités sur les racines et transmettent des virus. De nombreux parasites fongiques s'attaquent également aux vignes dont les plus importants sont : le mildiou de la vigne ou rot-brun, l'oïdium, la pourriture grise, l'*esca*, l'*eutypiose*, l'antracnose, l'excoriose et le black-rot. Le mildiou

est d'une grande importance économique. Grâce aux programmes de prévision, les traitements actuels sont mieux maîtrisés. La lutte contre le mildiou de la vigne est aussi entreprise par les sélectionneurs qui préparent l'avenir en créant des cultivars résistants. Cette démarche fastidieuse, peut être facilitée par des critères biochimiques et analytiques de résistance aux maladies.

3.1. Les maladies virales

Ces maladies sont très graves car les vignes infectées ne peuvent être traitées et constituent une source de contamination. Plus d'une soixantaine de virus différents peuvent attaquer la vigne (**Du Preez et al., 2011**), ils provoquent des troubles entraînant la diminution du rendement, l'affaiblissement et le vieillissement prématuré des ceps, ainsi qu'une reprise difficile au greffage et au bouturage (**Reynier, 2000**). En Algérie, plusieurs virus ont été mis en évidence dont les types viraux du GLRaV agent de l'enroulement foliaire (**Lehad et al., 2013**).

3.2. Les maladies à phytoplasmes (jaunisses)

Les jaunisses de la vigne sont dues à la présence de l'agent vecteur et du matériel végétal porteur de la maladie (**Reynier, 2000**). Ce sont des maladies graves qui peuvent entraîner la diminution de la croissance, de la productivité des ceps et de la qualité des produits de la vigne. Chez celle-ci deux maladies importantes sont reportées : la flavescence dorée, une maladie de quarantaine transmise par la cicadelle *Scaphoïde ustitanus*, et le « bois noir », transmis par *Hyalesthes obsoletus* (**Reynier, 2000**).

3.3. Les maladies bactériennes

Bien qu'ayant un développement sporadique et limité, les bactérioses de la vigne ne sont pas négligeables. Six genres bactériens sont signalés sur la vigne : *Agrobacterium*, *Xyllophilus*, *Xylella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et *Enterobacter* (**Boudon-Padieu et al., 2000**) ; toutefois, seulement deux bactéries causent des maladies assez graves : *Xylella fastidiosa* : agent de la maladie de Pierce (**Varela et al., 2001**) et *Xanthomonas ampelina* : qui cause le « Bacterial blight » (**Panagopoulos, 1998**).

3.4. Les maladies à nématodes

Elles sont particulièrement insidieuses et difficiles à diagnostiquer par l'observation car les symptômes induits sont souvent confondus avec des stress hydriques ou minéraux. Elles ne sont connues que depuis un siècle, et ce n'est que vers la moitié des années 1950 que les recherches ont montré qu'un large éventail de nématodes est inféodé la vigne (**Raski, 1998**). Cinq genres de nématodes peuvent s'attaquer à la vigne : *Meloïdogyne* (« *Root-Knot Nematodes* »), *Xyphinema* (« *Dagger Nematodes* »), *Longidorus* (« *Needle Nematodes* »), *Pratylenchus* (« *Lesion Nematodes* ») et *Tylenchulus* (« *Slow Decline Nematodes* »).

3.5. Les maladies fongiques

La vigne est sensible à de nombreux champignons phytopathogènes qui causent des dégâts aux conséquences économiques graves. Certains de ces champignons s'attaquent aux racines et au bois causant des maladies de dépérissement telles que l'*Esca* et l'*eutypiose*; d'autres s'attaquent au feuillage et aux grappes comme le mildiou, l'oïdium et la pourriture grise. Le tableau 2 regroupe les principales maladies fongiques, leurs agents causaux ainsi que les symptômes provoqués.

4. La physiologie de la vigne

Les plantes de vigne cultivées sont constituées d'une structure permanente, formée par le tronc et les racines pérennes, qui durent toute la vie de la plante et qui s'accroît chaque année. La partie aérienne, repousse annuellement, elle est récupérée à la récolte sous forme de grappe ou enlevée lors des interventions de conduite pour se recycler dans le sol (**Attia, 2007**). Concernant la partie souterraine formée par des racines plus ou moins grosse et plus ou moins vieilles, les extrémités plus fines et plus jeune, constituent le chevlu (**Hédalgo et al., 2005 ; Carbonneau et al., 2007**).

5. Les organes de la vigne

Comme toute plante supérieure, la vigne comprend des racines, une tige et des feuilles (organes végétales), les bourgeons sont situés à l'aisselle des feuilles tandis que les vrilles et les inflorescences paraissent être opposées à ces organes. Les fleurs (organes reproducteurs), groupées sur les inflorescences, donneront, après fécondation, les graines de raisin.

5.1. Les racines

Les racines d'une souche de vigne sont des racines adventives nées en majeure partie sur

le nœud inférieur de la bouture ou greffe bouture dont elle est issue. Dans des conditions chaudes et humides on peut observer le développement des racines adventives aériennes **(Huglin, 1986)**.

En examinant l'extrémité d'une radicule au microscope, on observe tous au bout une sorte de capuchon ou de dé à coudre de tissus durs appelé coiffe qui lui permet de s'allonger et de pénétrer dans le sol sans abimer la zone méristématique molle et délicate située à l'intérieur et qui génère cette croissance. **(Hidalgo, 2005)**.

5.2. Les troncs et les bras

Au niveau du couvert ou parties aériennes de la vigne on distingue le tronc, les bras plus ou moins long (qui peuvent être absent sur les vignes taillées) les coursons ou long bois qui constituent les rameaux formés l'année précédente et pampres ou rameaux herbacés de l'année qui, au cours de leurs aoûtement en automne, se transforment en sarments dotés de feuilles, de vrilles et de grappes (de fleurs et plus tard de fruits).

Le tronc et les bras de la vigne font partie du couvert; on les appelle organes vivaces car ils subsistent quasiment toute la durée de vie de la plante.

Leurs fonctions outre la respiration, consistent à soutenir les sarments, les rameaux et leurs bourgeons, les feuilles, les grappes et les vrilles ainsi qu'à acheminer la sève brute vers les organes à travers un système de vaisseaux (ligneux et criblés) et, lorsque celle-ci est transformée en sève élaborée, à nourrir toute la plante. **(Hidalgo, 2005)**.

5.3. Les rameaux et les sarments

Chez la vigne, comme chez d'autres plantes les pousses ici les rameaux, grossissent précisément à l'endroit où s'insèrent les feuilles, les bourgeons, les vrilles et les petites grappes de fleurs qui se transformeront ultérieurement en grappes de fruits (raisins). Ce point où grossissent s'appelle un nœud; les parties comprises entre deux de ces nœuds s'appellent les entre nœuds. **(Hidalgo, 2005)**.

5.4. Les feuilles

Les feuilles sont composées d'une queue ou pétiole et d'une partie élargie et étalée, appelée limbe, sillonnée par des nervures de différents ordres.

Le pétiole et les nervures du limbe qui le prolongent forment des sortes de cordons; on retrouve dans cette anatomie les deux systèmes de vaisseaux conducteurs de la sève brute et de la sève

élaborée: le premier sert à transformer la sève brute en sève élaborée, le second permet à la sève élaborée d'alimenter les tissus de la feuille et du reste de la plante. **(Hidalgo, 2005).**

5.5. Les bourgeons

Tous les bourgeons de la vigne sont constitués d'écailles externes brunes plus ou moins foncées et d'une bourre blanchâtre abondante (duvet) à l'intérieur. Ces écailles protègent les cônes végétatifs. Véritables pousses miniatures grâce à un méristème terminal qui assure la croissance du rameau et de tous ses organes également minuscules: ébauches de feuilles, de vrilles, d'inflorescences et de bourgeons. **(Huglin, 1986).**

A l'aisselle du pétiole des feuilles on distingue deux types de bourgeons ; prompt bourgeon et l'œil latent. Le prompt bourgeon ainsi que son nom l'indique a la propriété de pousser et se développer l'année même de sa formation. Normalement il ne donne que des pousses réduites désignées sous le nom d'entre cœur.

Le bourgeon latent n'évolue par contre presque jamais en pousse l'année de sa formation. Au cours du cycle végétatif il change uniquement de volume; d'abord plus réduit que les prompts bourgeons, il devient par la suite volumineux que ce dernier.

Alors que le prompt bourgeon est formé d'un seul bourgeon, la structure de l'œil latent est plus complexe. **(Huglin, 1986).**

5.6. La fleur

Dès l'apparition de bourgeons fertiles sur le rameau et dans les cônes végétatifs des bourgeons, des groupes spécifiques de cellules se multiplient rapidement. Le bourgeon et le rameau qui le porte poussent et donnent naissance aux fleurs il n'est pas inutile de rappeler que les inflorescences (ébauches de grappes) sont définitivement formées, en miniature, dans le bourgeon, c'est à dire que leur arborescence est le nombre de fleurs qui verront le jour à la fin de la phase de croissance de la vigne sont déjà établis.

Une fleur complète hermaphrodite (cas le plus courant sur nos vignes) est principalement formée: d'un petit pédoncule ou pétiole, conduit pourvu de systèmes vasculaires par lequel la sève brute circule et, principalement, la sève élaborée, nécessaire au développement et à la maturité des parties persistantes de la fleur qui, après fécondation, donnent naissance à un grain de raisin (fruit) ; d'un calice ; d'une corolle, qui après ouverture revêt habituellement la forme illustrée sur le dessin avant de tomber ; d'étamines au nombre de cinq, composées d'un filet et d'anthères doubles, qui contiennent les grains de pollen et tombent après fécondation ; et d'un pistil, en forme de bouteille, dont la cavité ovarienne est cloisonnée et contient quatre ovules. Le col de la bouteille, ou style se

termine par une sorte d'élargissement, appelé stigmate.

6. Les Principales maladies et ravageurs de la vigne

La vigne est une culture sensible aux maladies. Toutefois, cette sensibilité varie en fonction des cépages. Généralement, lorsqu'aucun moyen de lutte n'est employé, les dégâts peuvent être considérables. Le mildiou, l'oïdium la pourriture grise sont les principales maladies de la vigne

7. Les maladies cryptogamiques de la vigne

7.1. Le Mildiou

Le champignon *Plasmopara viticola* est un parasite obligatoire qui ne peut se développer que sur les tissus vivants. Il est à reproduction sexuée et hiverne sous forme d'oospores (spore sexuée) dans les feuilles mortes. La proportion d'oospores qui sera mature au printemps dépend des conditions de l'automne. Plus l'automne est pluvieux, plus il y aura d'oospores mures le printemps suivant.

Au printemps, la température minimale pour le développement du champignon est de 11 °C. À maturité, les oospores produiront de nouvelles spores (sporange). À ce stade, la pluie (présence d'eau libre) constitue le principal facteur de développement de la maladie. Lors de fortes pluies, les éclaboussures de terre et d'eau transporteront les spores sur les feuilles. *Plasmopara. Viticola* produit alors un autre type de spores (zoospores) qui infectent les tissus en croissance. Le jeune tissu est généralement plus sensible.

Lorsque les feuilles sont complètement étalées, elles sont moins sensibles aux infections. Les baies sont sensibles seulement de la floraison à environ 4 semaines après la floraison. Par contre, puisqu'il y a continuellement du nouveau feuillage, il est important de bien protéger la vigne durant toute.

7.2. Symptômes

7.2.1. Feuilles

Décolorations jaunâtres plus ou moins circulaires, on appelle ces symptômes des taches d'huile. Duvet blanc (fructification du champignon) surtout à la face inférieure des feuilles. Les taches brunissent avec le temps et les feuilles fortement atteintes peuvent tomber.

7.2.2. Tiges

Apex en crochet avec duvet blanc sur la tige (fructification du champignon).

7.2.3. Inflorescences

Les inflorescences sont particulièrement sensibles. Lors de forte infestation, elles peuvent jaunir, brunir, puis sécher complètement.

7.2.4. Baies

Duvet blanc (fructification du champignon). Les baies atteintes tôt en saison deviennent bleues puis brunes et se dessèchent. Les baies des variétés de raisin rouge se colorent prématurément et celles de raisin blanc deviennent tachetées. Les baies infectées restent souvent dures alors que celles non infectées ramollissent durant la véraison.

Les premiers traitements sont effectués lorsque les premières tâches de mildiou sont observées dans le vignoble.

Le dernier traitement se fera avec des produits de contact et appliqué sur le haut du feuillage afin de protéger celui ci contre le mildiou tardif (dit :mosaïque) .



Figure n°2- 3: Symptômes de Mildiou sur feuille et grappe devigne.

(<http://www.vignes.be/ravagreursetmaladies.htm>)

8. L'oïdium

Erysiphe necator est un parasite obligatoire de la vigne; il ne peut se développer que sur les tissus vivants de la vigne. Sous nos conditions climatiques, *Erysiphe necator* hiverne sous forme de cléistothèces, organes contenant les ascospores (spores sexuées). Au printemps, les ascospores mûrissent puis infectent les feuilles situées à proximité de l'écorce. Suite à ces infections, des taches recouvertes de spores asexuées, les conidies, se développent sur les feuilles. Les conidies de *Erysiphe necator* n'ont pas besoin d'eau libre sur la feuille pour l'infecter. Par contre, une

humidité relative élevée favorise la germination des conidies et donc, les infections. Le blanc de la vigne est favorisé par un temps chaud (température optimale 25°C) et sans pluie, l'eau inhibant la germination des conidies.

8.1. Symptômes

8.1.1. Feuilles

Apparition d'un feutre blanc poudreux et peu épais généralement sur la face inférieure de la feuille. Lorsque la maladie progresse, le nombre de taches augmente; elles sont visibles sur les deux faces. Sur les feuilles sévèrement atteintes, il y a crispation du bord du limbe. En fin de saison, on peut observer la présence de petites pustules de couleur orangée à noire (cléistothèces) sur la partie supérieure du limbe.

8.1.2. Tiges

Taches étoilées qui peuvent mesurer jusqu'à quelques centimètres et qui prennent une coloration brune à noire, suite à la dégénérescence progressive du champignon au cours de la saison. Les taches, au pourtour fibreux, demeurent visibles même suite à l'aoûtement des rameaux.

8.1.3. Inflorescences

Le blanc prend habituellement l'aspect d'une poussière grise à blanchâtre. Lors d'infections sévères, les grappes peuvent tomber, particulièrement lors de la récolte mécanique.

8.1.4. Baies

Les baies peuvent être atteintes, de la nouaison à la véraison (environ 4 semaines après la floraison). Elles prennent un coloris gris cendré pour rapidement se recouvrir de spores, leur donnant une apparence farineuse. En fin de saison, des cléistothèces apparaissent aussi sur les baies. Les baies attaquées se dessèchent, peuvent craquer et tombent au sol. Les baies infectées vers la fin de la période de sensibilité sont généralement plus sujettes au craquement, ce qui les rend plus sensibles à la pourriture grise.



Figure n°4- 5: Symptômes de L'oidium surfeuill.
(<http://www.vignes.be/ravagEURS et maladies.htm>)

9. Les maladies à virus

9.1. Court noue

Une vigne atteinte de court noué présente des symptômes caractéristiques : aspect buissonnant de la végétation (les rameaux sont plus petits que la normale), jaunissement, chute des feuilles, les rameaux présentent des entrenœuds courts et parfois des doubles nœuds, les grappes présentent des troubles de la fécondation (millerandage, coulure).

10. Les ravageurs

10.1. Phylloxéra

Les ravages du phylloxéra ont été considérables, car aucun moyen de destruction ne s'est avéré totalement efficace, malgré une étude minutieuse de l'insecte; les insectes mâles et femelles s'accouplent à la fin de l'été. La femelle pond sur les souches œuf unique, appelé œuf d'hiver. Celui-ci éclot au printemps et donne naissance au phylloxéra aptère, ou sans ailes, qui descend sur les racines aux dépens desquelles il vit, d'où son autre nom *phylloxéra radicecole*.

10.2. La Pyrale (*Sparganothis pilleriana*)

Est un papillon dont chenille peut causer de graves dégâts. Le papillon mesure 20 à 25 mm ailes déployées. Ses ailes antérieures, de couleur jaunes paille, présentent trois bandes transversales brun rougeâtre. La chenille qui peut atteindre 30 mm est de couleur grise, vert sal Ou

rougeâtre, avec une tête noire et brillante.

10.3. Cochyliis (*Eupoecilia ambiguella*)

L'adulte est un papillon de 7 à 8mm d'envergure, ses ailes antérieures, sont de couleur jaune ocre, et sont traversées par une large bande transversale brunâtre. La chenille (10 mm de long), de couleur lie de vin avec une tête noire brillante, a des mouvements lents.

10.4. L'altise

Elle se reconnaît facilement par sa façon de sauter qui lui vaut le surnom de puce de la vigne. Ses cuisses sont fortes lui permettant le saut. Son corps ovale, long de 4 à 5mm est bleu vert métallisé.

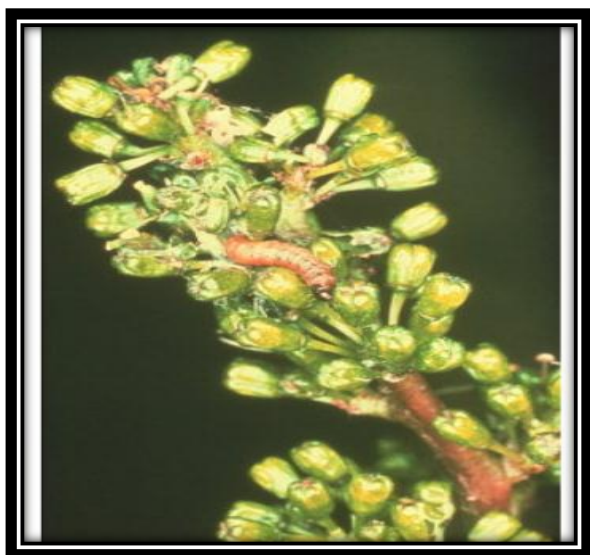


Figure n° 6: Larve et dégâts sur inflorescence

(<http://www.vignes.be/ravagEURS et maladies.htm>).



Figure n° 7: Papillon au repos.

11.1. Etude de la physiologie

11.1.1. Etude de la rafle

Elle sert de support et permet le transport de la sève élaborée jusqu'à la baie. La partie non ramifiée de la rafle qui part du rameau s'appelle le pédoncule, les parties ramifiées qui tiennent les baies portent le nom de pédicelles.

La rafle représente 1 à 7% du poids de la grappe saine, plus si la grappe a souffert d'une mauvaise formation des baies (millerandage) ou d'une surmaturité (vin moelleux et liquoreux).

La rafle contient :

- **des tanins** : constituent 3% du poids de rafle.

• **de l'eau** : représente 78 à 80% du poids de la rafle.

• **des matières minérales** : représentent de 2 à 3 % du poids de la rafle . Elles sont surtout sous forme de sels de potassium. (Navarre, 1998).

Les rafles facilitent le pressurage, mais communiquent des tanins durs aux vins si elles manquent de maturité.

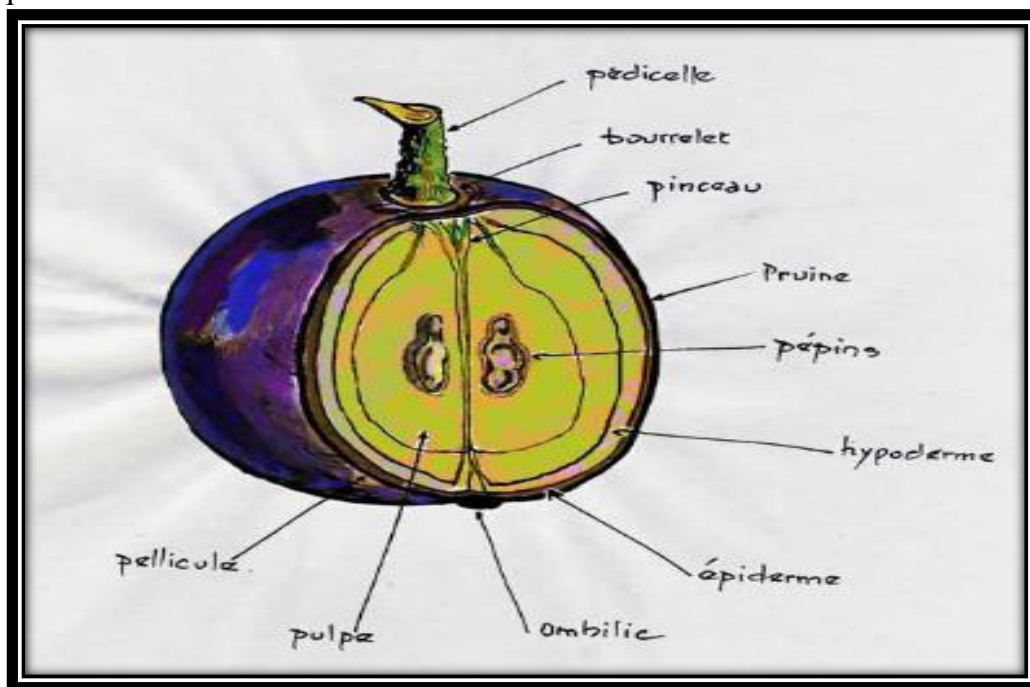


Figure n°08 : Schéma d'une baie de raisin (Dessin Guy Pujols). (Navarre, 1998).

12. Baie de raisin

La baie ou grain est constituée de :

- la pellicule
- la pulpe
- les pépins.

La taille des baies est comprise entre 8 et 24 mm. sa forme est variable selon les espèces.

12.1.1. Etude de la pellicule du raisin

Elle est très importante, car elle contient les arômes, les tanins et la couleur. Elle est composée de plusieurs couches de cellules différenciées. Vers l'extérieur on trouve la cuticule recouverte par la pruine qui est la zone de localisation des levures naturelles.

Les levures transportées par le vent sont piégées par la pruine. En dessous se trouvent l'épiderme (épi = superficielle, dessus) et l'hypoderme (hypo = dessous, plus profond). Les

polyphénols (tanins et anthocyanes) et les arômes sont contenus dans l'hypoderme.

Le foulage et la macération facilitent le passage de ces composés dans le jus. La cellulose contenue dans la pellicule forme la majeure partie du dépôt de débouillage des vins blancs et de pressurage des vins rouges. La cellulose gêne la filtration et le collage. (**Guillaume, 2001**).

12.1.2. Etude de La pulpe : elle représente 85 à 90% du poids de la baie. Elle est composée essentiellement d'eau, de sucres et d'acides organiques. Ce sont les sucres contenus dans la pulpe qui sont transformés en alcool par les levures. Les raisins de cuve contiennent beaucoup moins de pulpe que les raisins de table, ils ont un diamètre plus petit. dessin raisin de cuve cabernet sauvignon (7 à 10 mm) et dessin raisin de table plus gros Italia : (20 à 28 mm) **Arnaud et al, 2007**).

12.1.3. Etude des pépins : Ils devraient être au nombre de 4, mais on en trouve à 3 ou 2 grains très fréquemment. Ils sont situés au centre de la baie, baignée par la pulpe et alimentés par le pinceau, sortent de faisceaux conducteurs.

Les pépins contiennent de l'eau, des tanins, de l'huile et de la cellulose (**Huglin, 1986**).

12.2. Etude des constituants chimiques

12.2.1. L'alcool (sucres)

Ne le nions pas, C'est l'un des composés qui nous intéresse le plus dans le vin. Pour avoir beaucoup d'alcool, il faut beaucoup de sucres. La quantité de sucre est très fortement influencée par :

- Le cépage (variété, âge, adaptation au terroir et au climat).
- les méthodes culturales (taille, rendement).
- le terroir (sol plus ou moins riche en matière organique, plus ou moins drainant).
- l'exposition au rayonnement solaire.
- le climat annuel ayant régné sur la parcelle.
- la date de récolte.

Vous avez dû remarquer qu'en 10 ans le titre alcoolique volumique (TAV) indiqué sur les bouteilles des vins AOC est passé de 12/12,5 à 13,5. Les vins de garde sont de plus en plus alcoolisés, car de nombreux travaux ont été entrepris pour concentrer le raisin en sucre et qu'en plus le climat se réchauffe. Les sucres des raisins sont essentiellement composés d'hexoses (molécule contenant 6 atomes de carbone : $C_6H_{12}O_6$) : le glucose et le fructose.

12.2.2. Les acides organiques

Les principaux acides du raisin sont :

- l'acide tartrique
- l'acide malique
- l'acide citrique

Ils jouent un rôle important dans la fraîcheur (acidité) du vin, l'équilibre général, mais également sur sa conservation. Plus le vin est acide, plus il saura se protéger des attaques bactériennes, mais trop d'acidité déséquilibre le vin. Les acides sont stockés principalement dans la pulpe des baies. On assiste à une baisse importante de l'acidité des vins depuis les années 1975.

- **L'acide tartrique : COOH-CHOH-COOH.**

C'est le principal acide du raisin. On ne le trouve que dans le raisin. Il est synthétisé dans le raisin vert et dans les jeunes feuilles. Il n'est pas utilisé par les besoins énergétiques de la plante, sauf lorsque la température dépasse 35°C. Il donne un goût particulier, que l'on retrouve facilement en mangeant des raisins pas mûrs ou des grappillons. Il précipite dans les cuves et dans les bouteilles avec les variations de température (cristaux blancs dans les vins blancs, cristaux tintés de rouge dans les vins rouges).

- **L'acide malique : COOH-CH₂-CHOH-COOH.**

Il existe dans tous les fruits. (*Malus* = pomme). Il est peu stable, accumulé pendant la croissance herbacée, il sera brûlé pendant la maturation, cela permet l'accumulation des sucres. Durant la maturité, si la température est trop froide, c'est à dire inférieure à 30°C, ce sont les sucres qui seront consommés et la maturation se fera mal. La consommation de l'acide malique, qui varie selon les cépages est utilisée dans la répartition géographique des cépages. Les cépages qui consomment beaucoup d'acide malique sont plantés en région froide (chardonnay, pinot noir), ceux qui consomment peu d'acide malique sont plantés sous climats méditerranéens (grenache noir, mourvèdre). L'acide malique donne un goût acide prononcé, rappelant celui de la pomme verte pas mûre.

- **L'acide citrique : COOH-CH₂-COH-CH₂-COOH**

COOH

On ne le trouve qu'à l'état de traces dans le raisin. C'est l'acide principal des agrumes. Il est très acide, vous le connaissez, c'est celui du citron vert.

12.2.3. Les polyphénols

Les plantes synthétisent des polyphénols à partir de phénols, allant jusqu'à donner de très grosses molécules comme la lignine et les tanins, constituants essentiels des parties solides des plantes.

Les polyphénols se divisent en deux groupes :

- les matières colorantes
- les polyphénols incolores

12.2.3.1. Les matières colorantes

On trouve dans le raisin deux types de matières colorantes : les anthocyanes (rouges) et les flavones (jaunes). Ils sont localisés dans l'hypoderme de la pellicule des raisins. Les raisins jaunes sont dépourvus d'anthocyanes. Tous les raisins possèdent des flavones. Certains cépages, très rares, dits teinturiers possèdent des anthocyanes dans leur pulpe. C'est le cas de l'alicante Bousquet, qui a servi à rehausser la couleur des vins de nombreuses régions.

12.2.3.2. Les anthocyanes

On en trouve dans de très nombreuses plantes. Elles sont solubles dans le moût, dans l'eau, et en milieu alcoolique. Elles sont plus solubles à chaud qu'à froid. Les anthocyanes sont libérés dans le moût dès le foulage. La fermentation alcoolique et la macération favorisent leur diffusion.

Évolution des anthocyanes : Elles apparaissent dans le raisin au moment de la véraison sous une forme simple, puis elles se polymérisent. Lors de l'élevage des vins, les phénomènes de polymérisation vont continuer, donnant avec le temps des couleurs de plus en plus orangées. Plus le milieu est réducteur (manque d'oxygène), plus le vin tend vers les teintes orangées.

Si le vin subit une trop forte oxydation, la couleur devient brune (casse brune des vins). Les anthocyanes peuvent se combiner aux tanins, ce qui permet la stabilisation de la couleur. Dans les vins on trouve des anthocyanes :

- libres (de couleur rouge violacée) qui disparaissent au cours du temps.
- plus ou moins condensées (donnent la couleur tuilée).
- combinées (certaines précipitent au cours du temps au fond des bouteilles).

12.2.3.3. Les polyphénols incolores

Ils correspondent aux :

- phénols volatils (arômes)
- acides phénols
- polyphénols condensés
- tanins

Les phénols volatils : sont très aromatiques, ils sont peu perceptibles dans le raisin et le moût et apparaissent avec le temps dans le vin.

Les polyphénols condensés : sont des corps intermédiaires, constitués par polymérisations successives, ils conduisent à la formation des tanins. Par décomposition, ils redonnent des acides phénols dont ils sont issus.

Les Tanins : Ils résultent de la polymérisation d'acides phénols. Dans le raisin il n'y a que de

tanins condensés. On les trouve dans la pellicule, les rafles et les pépins. Dans la pellicule les tanins sont soit sous forme libre, soit sous forme liée à la structure membranaire des cellules. Dans les pépins, seuls ceux situés le plus vers l'extérieur sont extractibles. Les tanins provenant des pépins et des pellicules sont différents de ceux trouvés dans les fûts de chêne.

Les tanins sont solubles dans l'éthanol, plus le milieu est chaud, plus la solubilité augmente. Ils sont très friands d'oxygène. Les tanins se polymérisent entre eux, et peuvent également se combiner avec des protéines, des sucres, des acides et des anthocyanes (pour résumer, ils n'aiment pas la solitude, et apprécient de se mélanger à des étrangers...).

Dans la pellicule, les tanins s'accumulent jusqu'à la maturité, puis diminuent par dégradation. Dans les pépins, il y a beaucoup plus de tanins, ils sont présents avant la véraison. Plus la maturité est avancée plus les tanins se polymérisent et deviennent moins astringents. Dans les rafles, leur teneur est très élevée au moment de la véraison et ils ne polymérisent pas beaucoup durant la véraison. Les tanins sont durs, proches de ceux des pépins.

Les tanins jouent de nombreux rôles dans le vin sur :

- **le goût** : central pour l'équilibre des vins rouges : astringence, amertume, corps.
- **la couleur** : condensation avec les anthocyanes, stabilisation de la couleur.
- **les micro-organismes** : action antiseptique.
- **la stabilisation du vin** : en s'associant avec les protéines, ils protègent les vins de la casse protéique (genre de long coton flottant dans la bouteille).

La recherche de tanins de qualité est essentielle. Si les tanins sont trop présents, trop absents, de mauvaise qualité, le vin sera déséquilibré. Obtenir des tanins ayant la bonne maturité est compliqué. Cela demande aux viticulteurs de bien les connaître et d'être très vigilant sur les contrôles de maturité et les macérations. Aujourd'hui, on n'observe que la recherche de tanins mûrs entraîne une augmentation du taux d'alcool dans les vins.

Prenez le temps de bien comprendre les tanins, recherchez-les dans les fruits frais et secs et légumes de votre quotidien (noix, amandes, noisettes, thé, artichaut, banane, coing, nèfles).

13. Substances aromatiques

Les substances aromatiques sont localisées dans les cellules hypodermiques de la pellicule des baies. Leur quantité est très faible, mais leur pouvoir aromatique peut-être fort. On peut les répartir

En 3 catégories :

- les arômes primaires
- les arômes secondaires
- les arômes tertiaires

Les arômes primaires sont présents dans le raisin, les secondaires sont formés pendant la

fermentation alcoolique et les tertiaires apparaissent durant le vieillissement du vin.

13.1. Les arômes primaires : leur concentration augmente jusqu'à la maturité, ensuite ils deviennent plus lourds, moins fins.

13.2. Les arômes secondaires : ils sont constitués d'alcools supérieurs, d'aldéhydes, de cétone divers et surtout d'esters éthyliques ou amyliques des acides organiques présents dans la fermentation (acétate d'isoamyle à l'odeur de «bonbons anglais»).

13.3. Les arômes tertiaires : Ils proviennent d'estérifications lentes entre les acides organiques du vin et l'alcool, de condensations et synthèses spontanées entre des fonctions alcooliques, aldéhydiques, cétoniques et phénoliques produisant des arômes complexes. Comme les tanins, les arômes jouent un rôle central dans les vins. Les derniers progrès en oenologie ont permis de conserver plus de fruits dans les vins, mais permettent aussi de mieux les identifier. Lorsqu'ils sont sous forme liée, ils sont appelés précurseurs d'arômes, ils ne sont pas odorants. Ce sont des enzymes spécifiques qui permettent la libération des arômes. Certaines souches de levures permettent la libération d'arômes spécifiques (beaujolais nouveau...).

Les substances aromatiques sont composées par des terpènes, des caroténoïdes, des composés cystéinylés et des pyrazines. Ils peuvent être sous une forme liée ou libre.

14. Substances pectiques

Ces substances entrent dans la constitution des matières de réserve et dans les matériaux structuraux et protecteurs des végétaux. On les appelle les polysaccharides. Ils ne donnent pas de caractères particuliers au vin. Leur excès dans les vins traduit un trituration de la vendange et peut entraîner des difficultés de sédimentation.

15. Substances azotées

L'azote est l'un des 4 composés constitutifs des êtres vivants. Il existe sous 4 formes différentes

Dans les vins :

- Azote minéral
- Acides aminés
- Peptides
- Protéines

L'azote minéral introduit dans le circuit de sève de la vigne y prend la forme ammoniacale (NH_4^+).

À partir de cet état, il est introduit dans le cycle organique sous la forme d'acide aminé. Bien connu par les lycéens scientifiques sous la forme :

15.1. Enzyme

Elles sont essentielles à la synthèse et à la dégradation de nombreuses réactions chimiques. Elles ont des noms qui se terminent par «ase» et qui précisent la transformation qu'elles réalisent :

Les oxydases favorisent les oxydations, les Hydrolases et les Lyases coupent les molécules, les pectinases dégradent les pectines.

La fermentation alcoolique est effectuée par des enzymes, il en faut une douzaine pour dégrader le sucre en alcool. Les enzymes nécessitent des conditions de température, de pH, d'oxygène particulières qu'il faut connaître pour mieux réaliser naturellement les vinifications.

15.2. Vitamines

Les vitamines sont indispensables au bon fonctionnement des réactions chimiques.

- La vitamine C (ou acide ascorbique) est un protecteur contre l'oxydation des moûts et des vins
- La vitamine B agit sur le bon fonctionnement de la fermentation alcoolique.

15.3. Substances minérales

Les végétaux puisent les substances minérales dans le sol par l'intermédiaire des racines. Plus le sol sera aéré, riche en êtres vivants et en micorhyzes plus la plante pourra prélever facilement Les minéraux du sol. Un excès d'apport d'engrais minéraux, fréquemment réalisé en agriculture Traditionnelle tend à diminuer la qualité des vins, car les vignes sont plus productrices. Les éléments prélevés sont du potassium (K), du magnésium (Mg), du calcium (Ca) et du sodium (Na), Qui se retrouvent dans le raisin sous forme phosphates, sulfates et sels organiques. L'apport en Substances minérales le plus important est stocké dans les pellicules des baies.

15. Influence des facteurs externes

15.1. Sol de plantation

Le sol est un facteur naturel du terroir prépondérant pour la qualité. Les choix viticoles les plus lourds en termes d'impact sur la qualité des raisins doivent être raisonnés en fonction des propriétés de chaque Sol (Arnaud et Deluc, 2007).

La vigne est peu exigeante. Elle aime les sols caillouteux, car les cailloux facilitent l'écoulement des eaux, accumulent la chaleur de la journée pour la restituer la nuit et permettent la réverbération du soleil sur la raisin (Crespy, 1997 ; Comprade ; 2000 ; Mouillet,2001 ; Boudouin et Petronio,2009).

15.2. Climat

La culture de la vigne, compte tenu de ses exigences climatiques ; ne peut se pratiquer que dans des zones tempérées et intertropicales. Le climat du pourtour méditerranéen est idéal à son

développement (**Carbonneau et al, 2007 ; Baudouin, 2009**).

La pluviométrie, l'ensoleillement, les températures et les vents conditionnent le développement de la vigne, et la maturation du raisin. Les cépages réagissent différemment aux conditions climatiques subies : certains sont plus résistants au gel, d'autres plus sensibles à l'humidité (**Feilhes et Mandroux, 2002**).

15.2.1. L'ensoleillement ou la lumière

La nécessité d'un bon ensoleillement favorisant la photosynthèse, donc l'accumulation des sucres dans le raisin. Les besoins de la vigne, exprimés en heures d'insolation pendant la période végétative, vont de 1200 heures pour les tardifs, ce qui représente une durée d'environ 30 jours de beau temps en fin d'été. (**Moonen et al., 2002 ; Jones et al., 2005**).

15.2.2. La température

La vigne nécessite pour son développement une température qui ne descend pas en dessous de 9°C sinon sa croissance sera difficile. Les années de grande chaleur donnent des raisins sucrés, peu acides, mais un excès de chaleur nuit à la qualité des produits en donnant des raisins insuffisamment acides (**Crespy, 1997**).

15.2.3. La pluviométrie

La vigne nécessite une pluviométrie minimale naturelle ou provoquée (irrigation) d'environ 200 - 500 mm d'eau par an. Il faut à la vigne une forte proportion de pluies d'automne et d'hiver, qui, seules, lui assurent les réserves souterraines nécessaires à son entretien pendant l'été (Larnaude, 1948). Les pluies de printemps conditionnent la vitesse de croissance et l'élongation finale des rameaux, par contre la pluie d'automne peut provoquer un développement de la pourriture grise et un éclatement de la baie. Un excès d'eau surtout en été rend le climat impropre à la viticulture (**Isnard, 1947 ; Blouin, 2007**).

15.2.4. Les vents

La vigne redoute les vents au début de la végétation, lorsque les jeunes pousses sont encore trop faibles et risquent d'être cassées (**Chancrin, 1966 ; Arnaud et Deluc, 2007**).

16. 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 hibernantes (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 de la maturation, le sol, les pratiques

culturelles, la localisation géographique du vignoble, l'âge de la vigne (**Filoftea, 2010**).

Au moment des vendanges, les populations dénombrées sont comprises entre 10^3 - 10^5 UFC/baie pour les levures et 10^2 - 10^3 UFC/baie pour les bactéries (**Renouf, 2006**).

Les levures sont irrégulièrement réparties à la vigne ; peu nombreuses sur les feuilles, les rafles et les raisins verts, elles colonisent sur la pellicule des baies en maturation, elles se multiplient préférentiellement sur les exsudats libérés des microlésions dans les zones situées autour des stomates. Le secret de la répartition des populations levuriennes à la surface de raisin, c'est la situation chaude de vignoble et la concentration élevée de sucre de raisin.

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*

	Majoritaires	Autres
Raisin	<i>Aureobasidium 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> ...)	
Moût en fermentation	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Kloeckera apiculata, javanica, apis</i>
	<i>Saccharomyces uvarum</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
		<i>Torulasporea delbrueckii</i>
		<i>Saccharomyces sp.</i>
		<i>Schizosaccharomyces sp.</i>
	<i>Candida famata</i>	

Tableau n° 01 : Quelques levures isolées des raisins et des moûts en fermentation (d'après Cuinier et Poulard, 2003).

17. Notion de cépage

16.1. Le cépage

Désigne le type et le qualificatif « variétal », alors une variété cultivée d'un ensemble d'individus ayant les caractères morphologiques et technologique assez proches pour les désigner sous le même nom (**Reynier, 2007**).

16.2. La diversification entre les cépages

Elle est basée sur :

16.2.1. La couleur de la peau du raisin

- **Cépages rouges (noir) :** Carignon, grenache noir, cinsault, aramon, mourvèdre, merlot.... (Reynier., 2007).

- **Cépages blancs :** grenache blanc clairette, muscat blanc à petits grains.

16.2.2. L'observation des caractères morphologiques

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

17. La viticulture dans le monde

Production mondiale de raisins

La production mondiale de raisins de l'année 2008 s'inscrirait, avec près de 677,9 millions de quintaux, en légère hausse par rapport à celle de 2007(+11,6 millions de quintaux /2007).

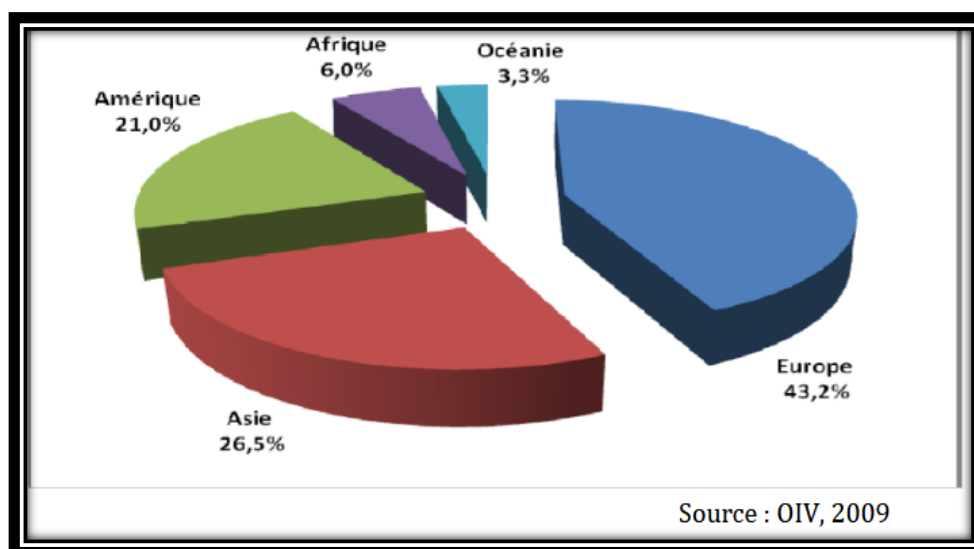


Figure n°09 : Production mondiale de raisins (OIV, 2009)

- production mondiale est près de 677,9 millions de quintaux de raisins, la production Européenne est très important avec 43%, l'Afrique se trouve en quatrième place avec production de 6%.

18. La viticulture en Algérie

La viticulture en Algérie est le plus souvent associée à l'agriculture coloniale et aux tentatives de reconversion menées depuis 1962.

La viticulture est cependant plus ancienne car plusieurs vestiges témoignent de la présence de la vigne et de ses produits avant l'antiquité.

De nombreuses influences (phéniciennes, romaines et autres) ont contribué à l'introduction des cépages et à l'évolution de la culture.

L'évolution de la viticulture est le résultat des politiques agricoles successives menées. La viticulture occupait durant la période coloniale l'ensemble des terroirs au niveau national mais localisé surtout dans la zone ouest où les sols sont pauvres et la pluviométrie n'excède pas 450 mm par an.

Au lendemain de l'indépendance, les vignobles algériens qui étaient essentiellement composés de cépages de cuves se sont trouvés confrontés à des problèmes liés à une intégration dans l'économie nationale et mondiale, ainsi qu'aux nouvelles orientations politiques viticoles provoquant ainsi un désintéressement chez les viticulteurs.

Devant cette situation, il était nécessaire de reconverter l'importante assiette viticole héritée de la colonisation.

La politique d'arrachage adoptée dans les années 1970 avait comme objectif d'arracher 100.000 ha de vignes de cuves et de conserver un niveau de production de 10 millions d'hectolitres de vins.

L'arrachage de la vigne de cuve devait se faire au bénéfice de la vigne de table, mais les besoins en céréales ont conduit à la rapide extension de cette culture à la place de la vigne, notamment dans les zones marginales comme celles des plaines sèches de l'ouest et sur les coteaux du centre et de l'ouest.

L'arrachage a indifféremment concerné les cépages ordinaires de consommation courant et les cépages de qualité installés par les vigneron français. **(ABDEL GUERFI, 2003).**

II.1 Générale

La levure est un élément prépondérant dans les itinéraires techniques d'élaboration des vins. Le changement de comportement des consommateurs à l'égard du vin conduit aujourd'hui la profession à intégrer leur part d'exigences dans les schémas d'élaboration des vins. Le choix des levures, puis leur maîtrise au cours de la fermentation alcoolique sont des étapes cruciales dans l'articulation des process mis en œuvre. 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...). Cependant, une frange grandissante de professionnels - pour des raisons culturelles ou médiatiques - fait le choix de fermentations spontanées.

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).

1.1. Définition de la levure

Une levure est un champignon unicellulaire apte à provoquer la fermentation des matières organiques animales ou végétales. Les levures sont employées pour la fabrication du vin, de la bière, des alcools industriels, des pâtes levées et d'antibiotiques.

La levure désigne originellement des champignons unicellulaires capables de provoquer la fermentation des matières animales ou végétales. Ce nom provient de l'aptitude de la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* à faire lever la pâte à pain. Elle n'a rien à voir avec la levure chimique, ou levain, qui ne correspond qu'à une poudre chimique, principalement composée de bicarbonate de sodium et d'acide tartrique, elle aussi utilisée en boulangerie dans le même but.

2. Caractéristiques des levures

Les levures possèdent toutes une membrane plasmique protégée des agressions extérieures par une paroi cellulaire. En tant qu'eucaryotes, elles possèdent un noyau clairement délimité et différents chromosomes. On y trouve aussi des mitochondries, organites cellulaires capables de fournir de l'énergie à partir du dioxygène. Les levures réalisent la reproduction sexuée ou asexuée en fonction du contexte.

La fermentation consiste en une réaction chimique d'oxydoréduction sur une structure carbonée dans un milieu dépourvu de dioxygène. Ainsi, les levures comme certaines bactéries peuvent survivre dans un environnement anaérobie à partir de

molécules carbonées comme des sucres. Dans ce contexte, les levures parviennent à survivre en décomposant cette molécule en une autre plus petite, avec émission de dioxyde de carbone.

C'est ce dioxyde de carbone qui va permettre à la levure de boulanger de faire lever la pâte à pain. Le gaz cherche à s'échapper, ce qui gonfle l'ensemble de la structure (Guiraud,2003).

3. Historique de levure

La levure est un micro-organisme qui se trouve dans le sol, sur les plantes, et dans l'air. La levure a été cultivée depuis des millénaires. Elle sert de catalyseur dans le processus de la fermentation, qui est nécessaire pour faire du pain.

Il existe plusieurs variétés de levure qui servent à la fermentation de pâtes, de bières, de vins, et autres. La variété utilisée par Fleischmann pour la fermentation du pain est le *saccharomyce cerevisiae*.

La boulangerie a commencé en Égypte il y a plus de 4,000 ans. On ajoutait parfois des épices, du miel, et des oeufs au pain pour changer leur saveur. Les archéologues constatent que les Égyptiens fabriquaient leurs pains en forme d'oiseaux, de poissons, et de vaches. Certains pains étaient utilisés pour des cérémonies.

L'art de la boulangerie existe depuis longtemps, mais la science de la fermentation n'a vu le jour qu'en 1676, lorsqu'Anton Leeuwenhoek a inventé le microscope. Les chercheurs pouvaient désormais observer les micro-organismes comme la levure. En 1859, Louis Pasteur a réussi à expliquer comment fonctionne la fermentation :

La levure absorbe les féculents dans la farine, et produit du dioxyde de carbone.

· Le dioxyde de carbone fait gonfler le gluten dans la farine, et ceci fait gonfler la pâte.

En 1868, l'arrivée de la compagnie Fleischmann a donné naissance à l'ère moderne de la boulangerie.

4. Morphologie de la levure

Les Levures, bien qu'utilisées inconsciemment par l'homme depuis plus de 5 000 ans pour la préparation de boissons alcoolisées, ne sont en fait considérées comme les êtres vivants unicellulaires responsables de la fermentation que depuis le XIX^e siècle. F. J. F. Meyen, en 1837, propose le nom de *Saccharomyces* pour la levure de bière, organisme incolore de petite taille, qui se reproduit par bourgeonnement : une petite

hernie apparaît en un point de la surface d'une cellule mère, grossit et s'étrangle ; le bourgeon ou cellule fille peut alors se détacher, grossir encore, bourgeonner à son tour. L'état unicellulaire est facile à réaliser en milieu liquide agité, mais en milieu solide le bourgeonnement donne naissance à des thalles buissonnants, formés de cellules levures bout à bout qui, par accumulation, forment des colonies visibles à l'œil. Chez d'autres Levures (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*...), le bourgeonnement n'a lieu qu'aux deux pôles de la cellule, qui prend fréquemment un aspect biapiculé ou en citron. Cependant, certaines Levures de distillerie ne bourgeonnent pas et se multiplient par fission (+98)

D'autre part, d'authentiques Levures bourgeonnantes sont pourvues d'un thalle plus organisé autour d'axes filamenteux à cloisons transversales, comme dans un *vrai* mycélium de champignon supérieur ; plus souvent, les cellules axiales ne sont que des cellules levures très allongées, sans cloisons vraies les séparant (*pseudomycélium*).

Tous les intermédiaires existent entre des thalles cohérents à structures mycéliennes et l'état unicellulaire : la définition des Levures ne peut être basée ni sur la vie unicellulaire, ni sur le bourgeonnement, ni sur le pouvoir fermentaire, bien que les représentants les plus typiques cumulent ces trois caractères.

À côté de la multiplication végétative, des spores internes ont été observées, pour la première fois, par T (**Larpent, 1991**).

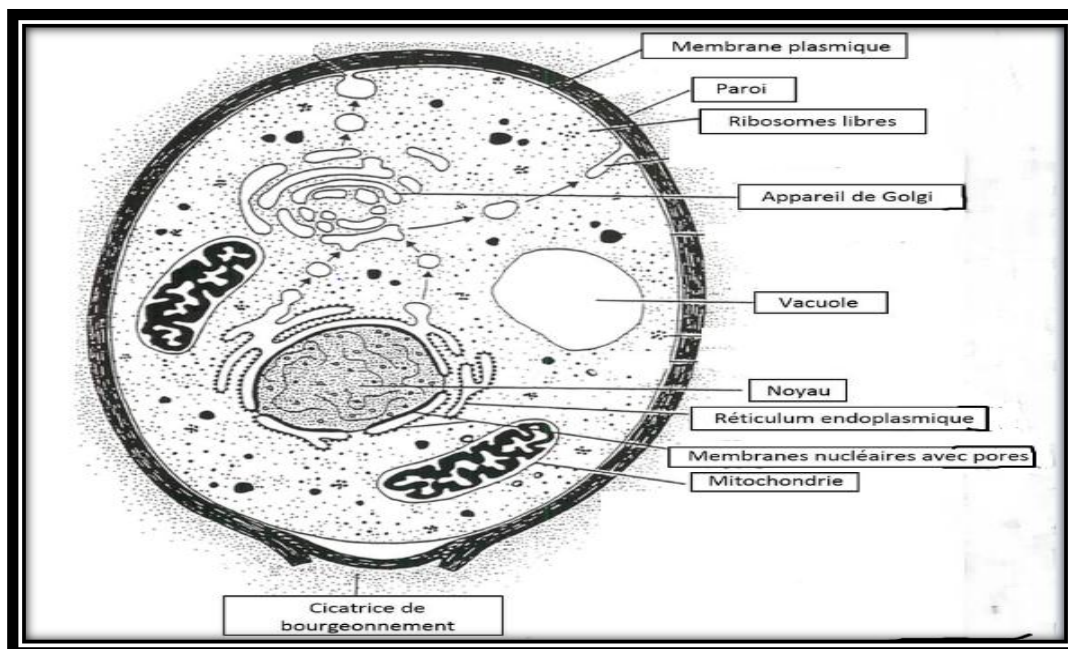


Figure n°10 : Représentation idéalisée d'une cellule de levure (**Thuriaux, 2004**).

4.1. Cytologie et organisation

La cytologie (du grec cytos + logos : étude des cellules) est l'étude des cellules isolées. Elle se différencie de l'histologie, qui est l'étude morphologique des tissus.

Il s'agit de l'étude des cellules normales ou pathologiques (cytopathologie), ainsi que de leurs aspects morphologiques ou biochimiques.

Après culture, frottis ou biopsie, étalement ou apposition sur une lame, puis coloration, l'observation se fait au microscope optique plus rarement au microscope électronique en transmission ou au microscope électronique à balayage.

Le cytologiste est le biologiste clinique ou l'anatomo-pathologiste spécialisé dans l'étude morphologique des cellules (**Bouix et Leveau ; 1991**).

4.2. La paroi

Une paroi cellulaire est une paroi assez rigide entourant certaines cellules, située à l'extérieur de la membrane cellulaire, qui apporte à la cellule un soutien structurel, une protection, et agit comme un mécanisme de filtrage. La paroi cellulaire fait aussi obstacle à l'expansion lorsque l'eau pénètre dans la cellule. Tous les organismes vivant en possèdent sauf les animaux et les protozoaires (**Larpen, 1991**).

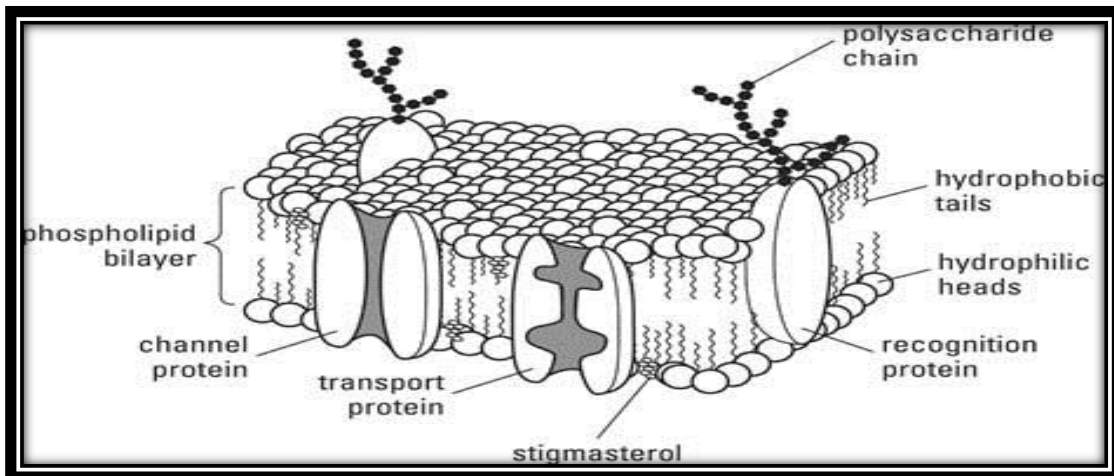


Figure n°11 : Structure membranaire des levures (Veron, 2008).

- La couche interne, de β (1-3) – glucane, insoluble en milieu alcalin, de structure fibrillaire, assure le maintien et la rigidité de la paroi ;

La couche moyenne, de β (1-3) – glucane soluble ramifié qui confère une certaine élasticité à la paroi, est aussi le lieu d'ancrage des mannoprotéines ;

- La couche externe, de mannanes phosphorylés ;

Du β (1-6) – glucane assure le lien entre les différentes couches.

- La chitine est localisée au niveau de la zone de cicatrisation lors du bourgeonnement (**Bulawa et al., 1986**). Elle est séparée de la membrane cytoplasmique par un espace périplasmique où sont localisées des enzymes : invertase, phosphatase acide, β – glucosidase, β – glucanases de type β (1-3) et (1-6) (ce dernier étant impliqué dans le renouvellement de la paroi au cours de la croissance et du bourgeonnement), de protéases, β (1-3) et 1-6) (ce dernier étant impliqué dans le renouvellement de la paroi au cours de la croissance et du bourgeonnement), de protéases, etc. (**5Kollar et al., 1997**).
- La chitine est un long polymère fibreux de β 1,4 – N- acétylglucosamine (Figure4) (**Voet, eristalline, et Voet, 2005**). Sous forme cristalline, ce polysaccharide est extrêmement robuste et possède une résistance à la tension supérieure à plusieurs matériaux artificiels. Cette résistance est le résultat des nombreuses liaisons hydrogènes formées entre les chaînes linéaires de chitine (**Roncero, 2002**). Elle compte seulement pour un faible pourcentage (1-2%) du poid sec de la paroi cellulaire mais est indispensable pour son intégrité (**Osmond et al., 1999 ; Meyer et al., 2004**).

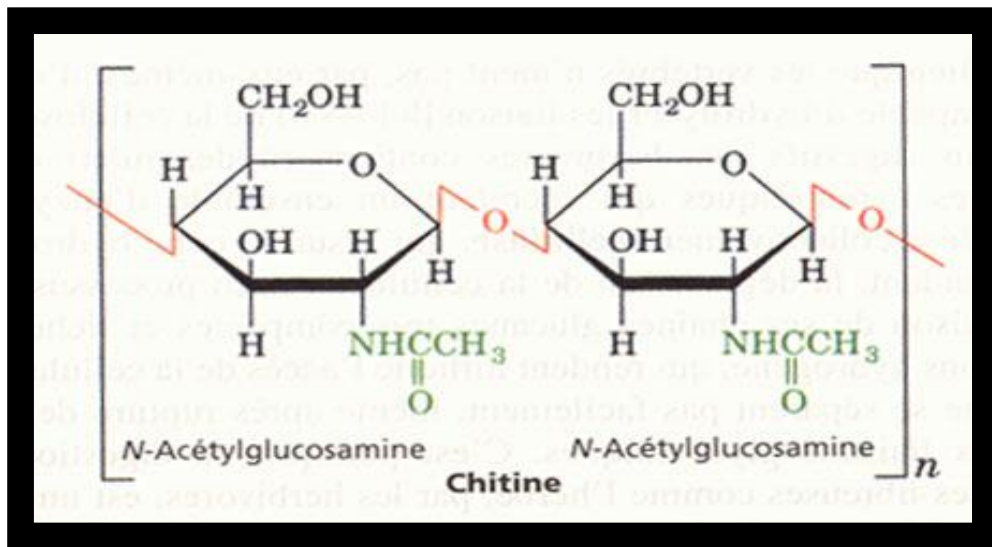


Figure n°12 : Structure de la chitine (**Karp et Masson, 2010**).

4.3. Membrane cytoplasmique : composée principalement de phospholipides double couche (partie hydrophile à l'extérieur et partie lipophile à l'intérieur). Elle contient aussi de nombreux complexes protéiques intrinsèques et extrinsèques dont les rôles sont variés, par exemple des enzymes appelées protéases mènent les transports de

substances du milieu extérieur vers le milieu intracellulaire et/ou inversement avec ou non transformation du substrat durant le passage (**Larpent, 1991**).

5. Caractéristiques et cycle de reproduction

5.1. Caractéristiques structurales

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes, ainsi possèdent-elles caractéristiques structurales propres à ce type cellulaire et d'autres plus spécifiques aux levures elles-mêmes :

5.2. Caractéristiques constantes

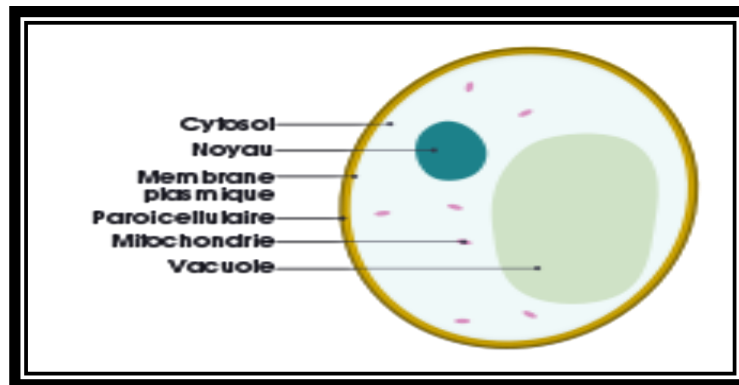


Figure n°13 : Structure de cellule de levure (**James Watson (1928)**).

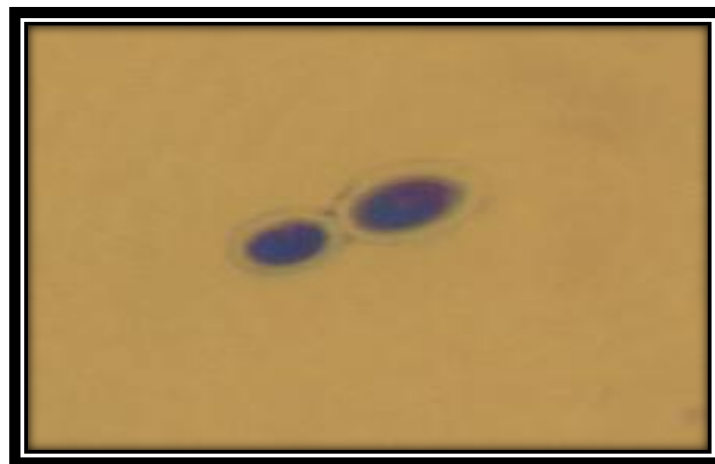


Figure n°14 : la coloration de levure (**Maurice Wilkins (1916-2004)**)

Aspect de levures à la coloration de Gram, on peut visualiser les parois (translucides) qui entourent les cellules.

Une paroi cellulaire entourant la membrane plasmique et protégeant la levure des agressions physico-chimiques du milieu extérieur. Elle est constituée d'une couche externe de mannoprotéines, associés à des glucanes et une couche interne de glucanes associés à une petite quantité de chitine.

Un noyau : contenant l'information génétique du génome chromosomique de la levure. (voir le chapitre sur les caractéristiques génétiques pour en savoir plus).

De mitochondries qui jouent un rôle important dans la respiration aérobie de la levure et la production d'ATP(www.web).

5.3. Caractéristiques variables

Une ou plusieurs vacuoles, organites à l'aspect homogène, qui servent d'espaces de stockage pour diverses substances.

5.4. Caractéristiques génétiques

5.4.1. Chromosomes : les levures sont des organismes eucaryotes et possèdent un noyau avec des chromosomes linéaires. Chez les *Saccharomyces*, les chromosomes sont au nombre de 16 simples ou 16 paires selon la forme haploïde ou diploïde de la cellule. Il existe des gènes de structure à information continue comme chez les bactéries, et des gènes à information discontinue (introns et exons) comme chez les organismes supérieurs. Par ailleurs, les gènes de régulation sont spécifiques des levures.

5.4.2. Plasmides : à côté des chromosomes, il existe dans le noyau des petites molécules d'ADN circulaire d'environ 6 000 paires de bases, les plasmides, présents entre 50 et 100 exemplaires par cellule. Ces plasmides sont autorépliquables et autotransférables sans affecter la viabilité de la cellule. Ils portent l'information génétique de quelques caractères non essentiels à la viabilité de la levure. Ils ont un rôle considérable dans toutes les opérations de génie génétique.

5.4.3. ADN mitochondrial : chaque mitochondrie renferme plusieurs molécules circulaires d'ADN qui portent l'information de certaines enzymes de la chaîne respiratoire.

Levures « tueuses » : certaines souches de *Saccharomyces* renferment dans leur cytoplasme deux virus à ARN. Le matériel génétique du « petit virus » code une toxine exocellulaire capable de tuer d'autres levures et une protéine de résistance à cette même toxine pour empêcher les levures « tueuses » de se tuer entre elles. Le « grand virus » est nécessaire à la multiplication et au maintien du « petit virus » dans le cytoplasme.

Les gènes codant pour d'autres toxines produites par des "levures tueuses" sont directement inclus dans l'ADN chromosomique (Larpent, 1991).

6. La reproduction de la levure

6.1. Par bourgeonnement

Dans les cuves de fermentation, la multiplication de la levure se fait par bourgeonnement (reproduction asexuée). Une maîtrise totale de la production de cellules à l'échelon microscopique et une pratique de l'hygiène absolue sont indispensables.

Les constituants de la cellule se dédoublent pour former un bourgeon qui augmente progressivement de volume. Le noyau se divise et le noyau fils migre dans l'excroissance (bourgeon). Le bourgeon arrivé à maturité se détache.

6.2. Par fusion des spores

Dans d'autres conditions, la cellule de levure forme des spores qui peuvent être utilisées pour la multiplication dans certains cas particuliers. Les spores sont très résistantes et peuvent être considérées comme des formes de survie de la levure (on a découvert des spores intactes, dans la banquise polaire, dont l'origine pourrait remonter au-delà de 100.000 années). Lorsque les conditions du milieu redeviennent favorables, les spores fusionnent et reconstituent la cellule. Les levuriers mettent à profit ces deux modes de reproduction pour la fabrication de la levure et la création de nouvelles souches plus élaborées.

7. La reproduction

Tous les êtres vivants produisent leur propre genre à travers le processus appelé la reproduction. La reproduction a lieu sexuellement et asexuellement.

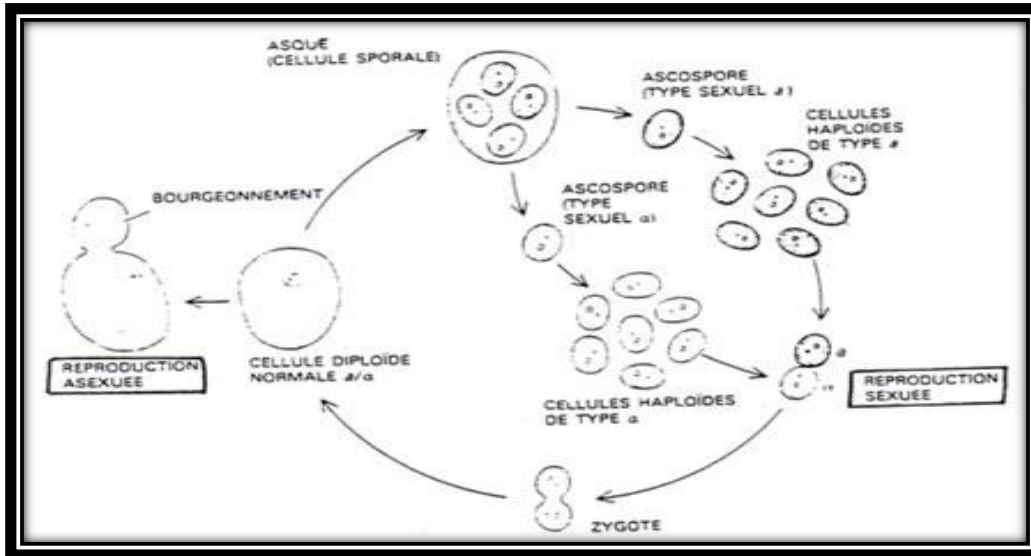


Figure n°15 : Cycle de la production de la levure (Leclerc et *al.*,1995).

7.1. La reproduction sexuée

La reproduction sexuée est la principale méthode de reproduction pour la grande majorité des organismes macroscopiques, y compris presque tous les animaux et les plantes. Voici deux processus principaux au cours de la reproduction sexuée chez les eucaryotes: méiose, impliquant la réduction de moitié du nombre de chromosomes et la fécondation, impliquant la fusion de deux gamètes et la restauration du nombre initial de chromosomes. Au cours de la méiose, les chromosomes de chaque paire se croisent généralement plus pour atteindre la recombinaison homologe qui permet de produire la diversité génétique lorsque les cellules se divisent dans la méiose.

7.2. Fission binaire dans l'amibe

Amibe est un organisme unicellulaire minuscule et amorphe qui a une membrane cellulaire poreuse qui entoure les organites cellulaires et le cytoplasme. L'amibe se reproduit par la méthode de reproduction asexuée ordinaire appelée fission binaire. Après la réplication de son matériel génétique par la division mitotique, la cellule se divise en deux cellules filles de taille égale. Le matériel génétique est tout aussi divisé, par conséquent les cellules filles sont génétiquement identiques les unes aux autres et à la cellule mère. Dans ce procédé, le noyau de la première amibe se divise pour former deux noyaux fils par le procédé de caryocinèse. Après que le noyau a été divisé en deux, le processus de cytokinèse dans laquelle a lieu dans le cytoplasme de la cellule mère se divise en deux cellules filles. Cela conduit à la formation de deux cellules filles d'amibe ayant un noyau et leurs propres organites cellulaires.

La caryocinèse est le processus de la division du noyau. Elle correspond à la séparation des chromosomes filles en deux noyaux fils. La caryocinèse est généralement suivie par la cytocinèse.

La cytocinèse est le processus de la division du cytoplasme. Elle correspond à la séparation des noyaux fils en deux cellules filles. La cytocinèse se produit immédiatement après la mitose.

8. Bourgeoisement dans la levure

Les levures sont unicellulaires (certaines sont multicellulaires) comme les micro-organismes eucaryotes appartenant aux champignons royaume. La taille d'une levure peut varier considérablement selon les espèces, mesurant généralement 3-4 μm de diamètre. La plupart des levures se reproduisent de façon asexuée par un processus de division asymétrique appelé bourgeoisement. D'abord, il produit une petite protubérance sur la cellule parente qui grossit d'une très grande taille et forme un bourgeois. Le noyau de la cellule-mère se divise en un noyau fils et migre dans la cellule fille. Le bourgeois se détache du corps de la mère en formant un étranglement à la base. Le bourgeoisement se répète pour former une chaîne de cellules de bourgeois. La cellule fille produite pendant le processus de bourgeoisement est généralement plus petite que la cellule mère.

Les levures appartiennent à l'ensemble des thallophytes qui regroupe les champignons et les végétaux qui ne possèdent ni racines, ni tiges, ni feuilles (algues, lichens).

Les levures ont un appareil végétatif réduit à une seule cellule. Dans certaines conditions de culture, ces cellules s'arrangent en files, mimant le mycélium des champignons.

Les levures sont des organismes non chlorophylliens. Elles n'utilisent donc pas la lumière comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone. Elles tirent leur énergie de la décomposition des matières organiques mortes. La plupart des levures sont saprophytes. Quelques-unes sont parasites.

On rencontre des levures sur tous les milieux riches en sucres qu'elles transforment en éthanol ou en glycérol. Cette transformation s'accompagne d'une forte production de gaz carbonique. Cette fermentation se fait à l'abri de l'oxygène de l'air. Les levures aiment plutôt les milieux acides. Beaucoup d'entre elles utilisent les acides organiques comme source de carbone et d'énergie.

Les levures se multiplient par bourgeonnement (reproduction asexuée). La reproduction sexuée n'existe que lorsque les levures se retrouvent dans des conditions très défavorables de milieu. Selon le mode de reproduction sexuée, on distingue les levures ascomycètes ou levures vraies (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*), les levures basidiomycètes (*Sporobolomyces*) et les levures imparfaites ou fungi imperfectif (*Candida*, *Kloekera*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*).

Saccharomyces cerevisiae, agent de transformation des sucres en alcool, est à l'origine des vins, des bières, cidres et autres boissons fermentées. C'est aussi cette levure qui, en dégageant du gaz carbonique, assure la levée de la pâte à pain. Cette levure possède un plasmide, petit filament d'ADN circulaire (nommé "plasmide deux microns") dans lequel il est assez facile d'introduire des gènes étrangers à la levure, l'obligeant à synthétiser le programme du gène introduit. C'est ainsi, par exemple, que l'on a introduit le gène producteur de la capsid du virus de l'hépatite B et que cette levure peut être utilisée pour la production du vaccin contre cette maladie.

Candida albicans est une levure normale des muqueuses (bouche, vagin). Dans certaines conditions, particulièrement quand l'hôte connaît une dépression passagère de ses défenses immunitaires ou est atteint de certaines maladies (diabète), cette levure devient pathogène et provoque des candidoses (muguet ou candidose blanche des muqueuses). *Candida* est ce que l'on appelle un pathogène opportuniste.

De très nombreuses espèces de levures sont responsables de mycoses humaines ou animales, souvent bénignes, quelquefois très graves, voire mortelles (*coccidioïdomycoses*).

8.1. Reproduction d'une levure

Les levures sont des champignons unicellulaires, qui peuvent se reproduire de manière sexuée ou asexuée. Leur mode de reproduction asexuée peut se faire soit par fission binaire, soit par bourgeonnement. Il leur permet de se multiplier très rapidement dans des conditions favorables. Par exemple, une seule cellule de levure de boulanger peut produire par bourgeonnement jusqu'à 40 cellules filles en moins de deux heures.

© Larousse 2006.

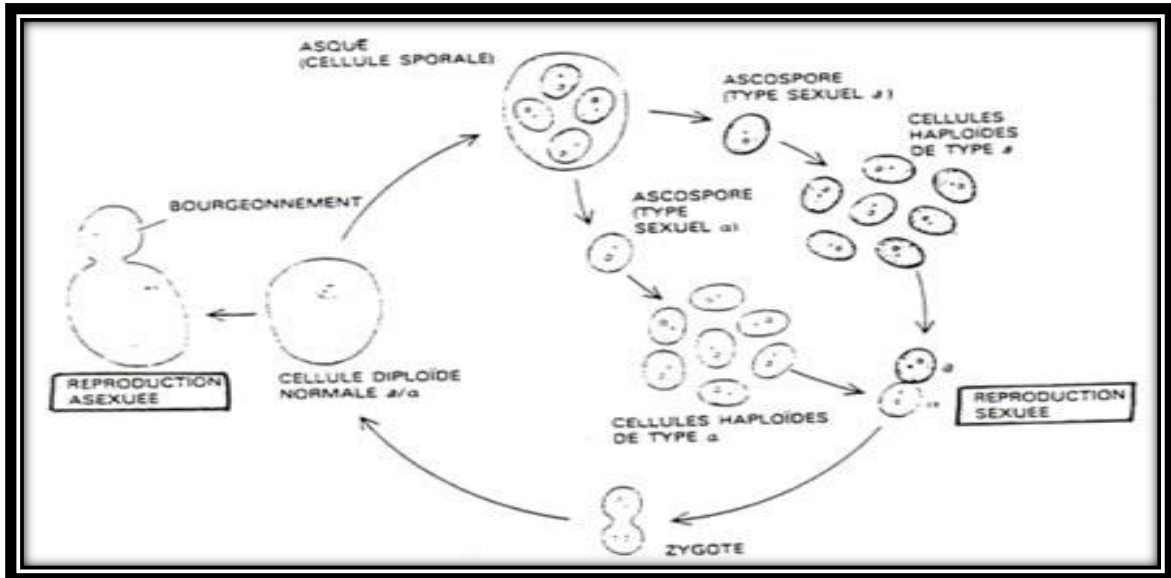


Figure n° 16 : Cycle de reproduction de la levure (Leclerc *et al.*, 1995).

8.2. La reproduction sexuée

La reproduction sexuée est la principale méthode de reproduction pour la grande majorité des organismes macroscopiques, y compris presque tous les animaux et les plantes. Voici deux processus principaux au cours de la reproduction sexuée chez les eucaryotes: méiose, impliquant la réduction de moitié du nombre de chromosomes et la fécondation, impliquant la fusion de deux gamètes et la restauration du nombre initial de chromosomes. Au cours de la méiose, les chromosomes de chaque paire se croisent généralement plus pour atteindre la recombinaison homologe qui permet de produire la diversité génétique lorsque les cellules se divisent dans la méiose.

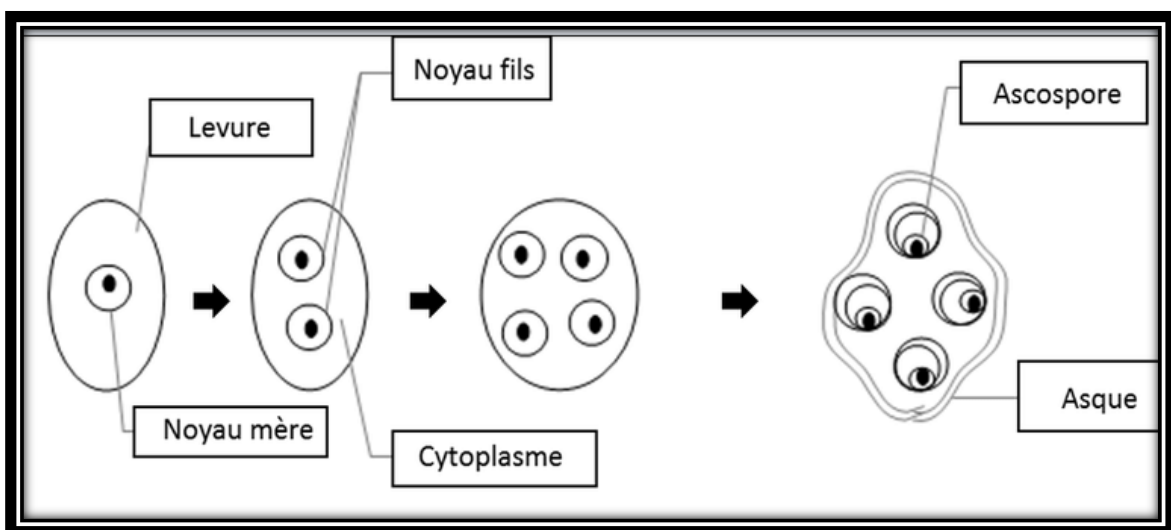


Figure n° 17 : Schéma de la reproduction sexuée d'une levure (Thuriaux, 2004).

8.3. La reproduction asexuée

La reproduction asexuée est la principale forme de reproduction des organismes unicellulaires comme les archées, les bactéries et les protistes. Beaucoup de plantes et champignons se reproduisent ainsi de façon asexuée. La reproduction asexuée est un mode de reproduction par lequel la descendance se pose à partir d'un seul parent, et héritent des gènes de ce parent seulement. La descendance sera les copies génétiques exactes de ce parent.

Les nouveaux organismes sont produits dans une multiplication rapide par le processus de divisions amitotique ou mitose. L'ameitose est le processus par lequel une cellule se sépare directement, comme le noyau et le cytoplasme sont directement coupés en deux. La mitose est le processus par lequel une cellule, qui a déjà répliqué chacun de ses chromosomes, sépare les chromosomes dans son noyau de cellule en deux ensembles identiques de chromosomes, chaque jeu aura son propre nouveau noyau. C'est une forme de division nucléaire.

La fission binaire et le bourgeonnement sont deux méthodes ordinaires de reproduction asexuée. La fission binaire se trouve dans les organismes unicellulaires comme l'amibe, *Paramecium* et *Euglena*, pour n'en nommer que quelques-uns, et le bourgeonnement se trouve dans la levure et l'Hydre.

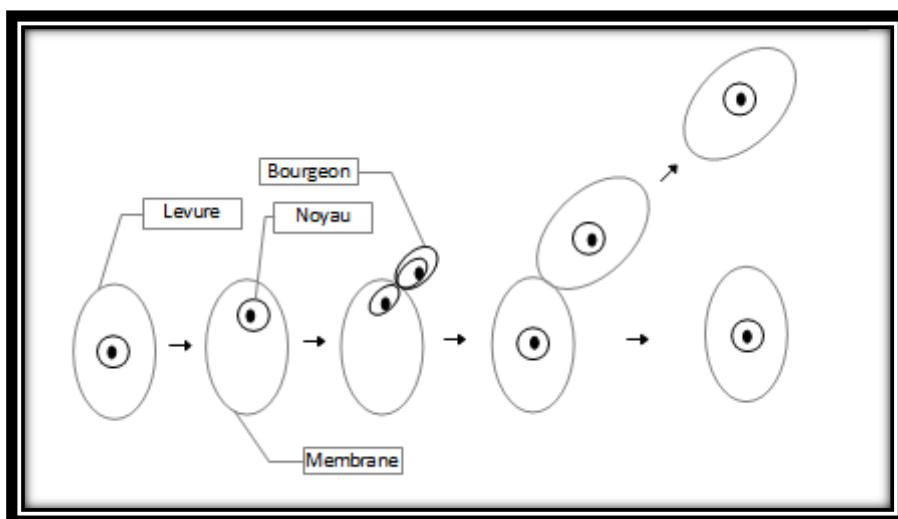


Figure n°18 : Schéma de la reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure
(Thuriaux, 2004).

***Reproduction asexuée, par scission - Scissiparité**

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

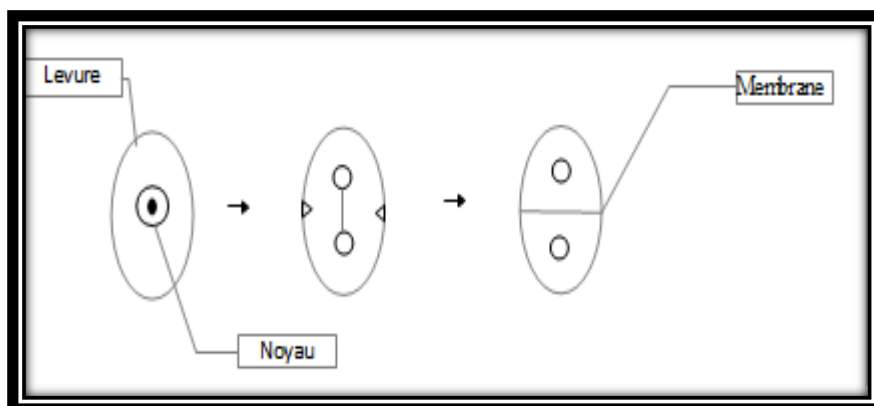


Figure n° 19 : Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure (Thuriaux, 2004).

9. Différenciation des levures

La levure biologique et la levure chimique : bien les connaître pour bien les utiliser.

Pour répondre à la question la plus couramment posée : qu'elle soit fraîche, déshydratée ou lyophilisée, j'utilise toujours la même quantité de levure. Ma préférée étant la lyophilisée pour sa facilité d'usage.

9.1. La levure fraîche : se présente généralement sous forme pressée. Très friable, elle s'incorpore facilement dans le pétrin après avoir été délayée dans un liquide tiède (25° C pas plus). Elle conserve ses propriétés stockée au froid entre 0 et 10°C. La température optimale étant située aux alentours de 4°C. On ne met jamais en contact la levure fraîche avec le sel (le sel "tue" la levure).

9.2. La levure biologique déshydratée : se présente sous forme de petites billes et doit **absolument** être délayée dans un liquide à 25 °C maxi comme pour la levure fraîche avant utilisation. Elle est aussi appelée levure sèche active.

9.3. La levure biologique lyophilisée : est aussi appelée levure sèche instantanée. Elle se présente sous forme de petites paillettes et à l'avantage de pouvoir être utilisée telle qu'elle, à sec, comme pour les croissants. Elle a un pouvoir

fermentaire de 30 à 40 % supérieur à la précédente (levure sèche active). Elle permet une répartition rapide et homogène dans la pâte. L'incorporation au pétrin s'effectue directement en la mélangeant à sec dans la farine ou en la saupoudrant au-dessus de la pâte au début du pétrissage.

10. Les Conditions physicochimiques de croissance

10.1. Température : la température optimale de culture des levures se situe en général entre 25 °C et 30 °C, mais comme les autres micro-organismes, les levures peuvent être classées en levures psychrophiles, mésophiles et thermophiles. D'une façon générale, les levures ne sont pas thermorésistantes. La destruction cellulaire commence dès 52 °C (contre 120 °C pour les bactéries thermophiles hors archées). Les levures sont aussi sensibles à la congélation et à la lyophilisation avec une grande variabilité selon les genres et espèces, et selon la phase de croissance (les cellules en phase exponentielle résistent moins que les cellules en phase stationnaire).

10.2. Activité de l'eau : la plupart des souches ne peuvent se développer pour une activité de l'eau inférieure à 0,90 ; mais certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées, correspondant à une activité de l'ordre de 0.60, en ralentissant leur métabolisme ; ces levures sont dites xérotolérantes.

10.3. Oxygène : toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène : il n'y a pas de levure anaérobie stricte. Certaines levures sont aérobies strictes (comme les *Rhodotorula*). Les autres sont aéro-anaérobies facultatives avec parmi elles : des levures préférant un métabolisme soit fermentaire soit respiratoire même en présence d'oxygène.

10.4. pH : les enveloppes cellulaires sont imperméables aux ions H_3O^+ et OH^- . Les levures tolèrent donc des gammes de pH très larges, théoriquement de 2,4 à 8,6.

11. Sensibilité aux agents chimiques

11.1. Acides organiques : ils ont un effet inhibiteur sous leur forme non dissociée car ils peuvent pénétrer dans la cellule et la sensibilité de la levure dépend de sa capacité à les métaboliser. C'est pour cette raison que les acides sorbiques et propioniques sont plus inhibiteurs que les acides acétique, citrique et lactique.

11.2. Éthanol : les plus résistantes sont les *Saccharomyces bayanus* que l'on utilise dans les procédés de fermentation alcoolique pour l'élaboration des boissons ou d'éthanol industriel.

11.3. Sulfite : le SO_2 a un effet inhibiteur plus prononcé sur les bactéries que sur les levures, même si parmi les levures des sensibilités existent.

11.4. Antifongiques : la sensibilité à la *cycloheximide (actidione)* est variable et on peut distinguer 3 groupes de levures :

- Levures inhibées dès 1 $\mu\text{g/mL}$ (ex : *Saccharomyces*)
- Levures inhibées à 25 $\mu\text{g/mL}$ (ex: *Schizosaccharomyces*)
- Levures tolérantes à 1 mg/mL (ex: *Zygosaccharomyces*)

Le chloramphénicol inhibe la synthèse de protéines mitochondriales mais pas celle des protéines cytoplasmiques. Seules les levures capables de fermenter peuvent alors être cultivées en présence de chloramphénicol.

12. Métabolisme et conditions de croissance

12.1. Processus énergétiques

Les deux principaux processus énergétiques connus chez les hétérotrophes sont la respiration et les fermentations. Pour leur développement ces levures ont besoin :

- De composés carbonés source de carbone et d'énergie.
- De composés azotés réduits sous forme d'ammonium ; quelques levures peuvent cependant utiliser des composés oxydés (comme les nitrates) ou organiques pour la biosynthèse des protéines et d'acides nucléiques.
- D'éléments minéraux variés, vitamines et facteurs de croissance qui varient selon les levures.

Toutes les levures sont capables de dégrader le glucose, le fructose et le mannose en présence d'oxygène, par un métabolisme oxydatif, conduisant à la formation de CO_2 et H_2O .

12.2. Respiration aérobie : $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (glucose) + $6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + \text{ATP}$

(Adénosine Tri-Phosphate)

Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux cellules de subir une multiplication avec un rendement cellulaire élevé (le rendement étant défini par le quotient de la quantité de cellules fabriquées par le substrat sucré consommé). En plus des sucres simples, certaines levures peuvent utiliser d'autres glucides (mono, di ou trisaccharides, voire des polysaccharides comme l'amidon) mais aussi des alcools, des

acides ou des alcanes. D'une manière plus générale, elles ont une capacité hydrolytique bien moindre que les moisissures.

En plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO₂ suivant la réaction :

12.3. Fermentation alcoolique : $C_6H_{12}O_6$ (glucose) \rightarrow $2CO_2$ + 2 (éthanol) + $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ (Adénosine Tri-Phosphate, ATP).

En plus de ces composés majoritaires, des alcools supérieurs, des aldéhydes, des esters, des acides... sont formés en plus petites quantités et participent qualitativement de façon importante et complexe à la formation des saveurs des boissons fermentées. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif, et le rendement de la multiplication cellulaire en est affecté bien que la vitesse de croissance puisse être nettement plus rapide que dans le processus oxydatif. Ce processus fermentaire peut fonctionner en présence ou en absence partielle ou totale d'oxygène c'est-à-dire en anaérobiose. On évoquera, dans le paragraphe suivant, l'apparition d'un processus fermentaire en présence d'oxygène en excès, décrit comme **l'effet Crabtree** et très important dans l'industrie de production des levures de boulangerie.

III.1. Isolement des levures Les levures

Sont sujets à la concurrence sur les milieux d'isolement par une reproduction rapide des populations bactériennes, et à l'inhibition par des produits du métabolisme bactérien (**Allen et al., 1987**). Leur étude demande l'emploi de milieux sélectifs dotés de propriétés antibactériennes et si possible antimoisissures (**Guiraud, 1998**). Pour l'isolement des levures, la plupart des investigateurs ont employé des milieux organiques complexes, contenant des ingrédients comme l'extrait de malt, l'extrait de levure et le peptone, en combinaison avec le glucose (**Hagler et Mendonca, 1981**).

2. Classification et identification des levures

2.1. Classification

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. Classification des levures (**Kreger-Van., 1984**).

2.2. Techniques d'identification

Les levures se distinguent des autres champignons par une taxonomie basée à la fois sur des caractères cultureux, morphologiques, sexuels et physiologiques. En effet, les critères d'identification n'ont pas tous la même importance, ils doivent être utilisés dans un ordre bien déterminé (**Bouix et Leveau, 1991**).

2.2.1. Etude des caractères cultureux

Cette étude est effectuée à partir d'ensemencement sur milieux liquides et solides. Le but est d'examiner l'aspect, la forme, la couleur et la consistance des cultures (**Guiraud, 1998**). Les caractères cultureux ainsi étudiés sont :

- La forme des colonies.
- La coupe des colonies.
- L'aspect de la culture sur gélose inclinée.
- L'aspect de la culture sur milieu liquide.
- La couleur,....

2.2.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires

Les critères utilisés dans la description des levures sont ceux décrits par; **Wickerham, (1951), Van der Walt, (1970), Van der Walt et Yarrow, (1984).**

2.2.3. Morphologie cellulaire normale et mode de reproduction végétative

Ces caractères sont étudiés par des examens microscopiques, permettant de définir la forme, l'arrangement et le mode de division des cellules, ainsi que de mesurer leur taille en utilisant un oculaire micrométrique.

Les cellules de levures ont des formes variées, caractéristiques du genre mais la forme peut se modifier assez largement selon les étapes du cycle biologique et en fonction des conditions de milieu (**Larpent, 1991 ; Bouix et Leveau, 1993 ; Pol, 1997**).

Elle se fait, soit par une du thalle, soit par la production de spores asexuées.

Chez les levures elle se fait la plupart du temps par bourgeonnement (*saccharomyces*) ou éventuellement par scissiparité (*Schizosaccharomyces*) (**Richer et Branger 2007**).

2.3.1. Aptitude à la Filamentation

Certaines espèces peuvent former des filaments de type mycélien. Ces filaments sont parfois mis en évidence par l'examen microscopique précédant. La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation d'une souche, doit cependant s'effectuer après une culture sur un milieu spécifique.

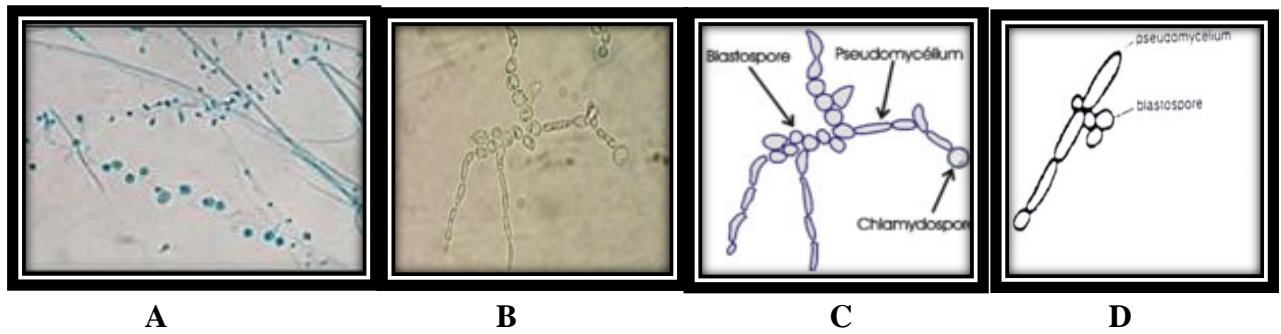


Figure n° 20 : *Filamentation des levures (A : mycelium à arthrospore ; B : pseudomycelium à blastospore et à chlamydospore ; C : pseudomycelium à blastospore) (Guirad, 2003).*

2.3.2. Morphologies particulières

Dans des milieux pauvres et sous tension d'oxygène réduite, la formation de *chlamydospores* et de *blastospores* est observée. Leur recherche s'effectue à partir de milieux spécifiques.

Levures bourgeonnantes + *pseudomycélium* + *blastospores* + *chlamydospores* (spores de 6 à 12 µm, rondes ou ovales, à double contour, très réfringentes) : *Candida albicans* / *Candida dubliniensis*.

Levures bourgeonnantes + *pseudomycélium* + *blastospores* : levures du genre *Candida*, orientation vers une espèce autre que *Candida albicans* / *Candida dubliniensis* (**Larpen., 1991**).

Candida albicans et *Candida dubliniensis* sont les seules espèces qui produisent des tubes germinatifs en **3 heures à 37°C**, dans un milieu pour *blastèse* ou dans du sérum. Au-delà de **4 heures**, la germination n'est plus spécifique de *Candida albicans* / *Candida dubliniensis*. F 2% des souches de *Candida.albicans* / *Candida dubliniensis* ne produisent pas de tubes germinatifs.

2.3.3. Caractéristiques sexuelles

La formation d'ascospores est un critère taxonomique très important. Différents milieux de sporulation sont utilisés, pour mettre en évidence les asques, leur forme, la couleur et le nombre de spores par asque, par sa reproduction sexuée (**Bourgeois et leveau, 1991**).

4. Caractéristiques biochimiques et physiologiques

Les principaux critères physiologiques utilisés dans la classification des levures, sont la fermentation et l'assimilation de différents substrats (**Kreger-van Rij, 1984 et Lodder, 1970**).

4.1. 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**).

4.2. 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**).

4.3 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**).

5. Méthodes Moléculaires d'identification des levures

L'apparition de la biologie moléculaire a permis de comprendre que les méthodes d'identification des micro-organismes fondées sur les phénotypes des différents individus n'étaient pas toujours fiables, car les résultats pouvaient varier dans le temps.

Plusieurs techniques ont donc été développées pour discriminer et /ou identifier les micro-organismes par l'analyse de l'ADN ou d'une partie de celui-ci (**Turner., 2000**).

6. Les techniques de biologie moléculaires

Les méthodes d'étude de l'écologie microbienne suivent un schéma commun qui peut être divisé en trois étapes. Chacune doit être la plus performante possible pour assurer le

meilleur seuil de détection de la méthode prise dans sa globalité. Toutes ces méthodes débutent par une extraction de l'ADN. Cette étape est essentielle car la quantité et la qualité de l'ADN microbien récupéré conditionne les deux étapes qui constituent la suite de l'analyse.

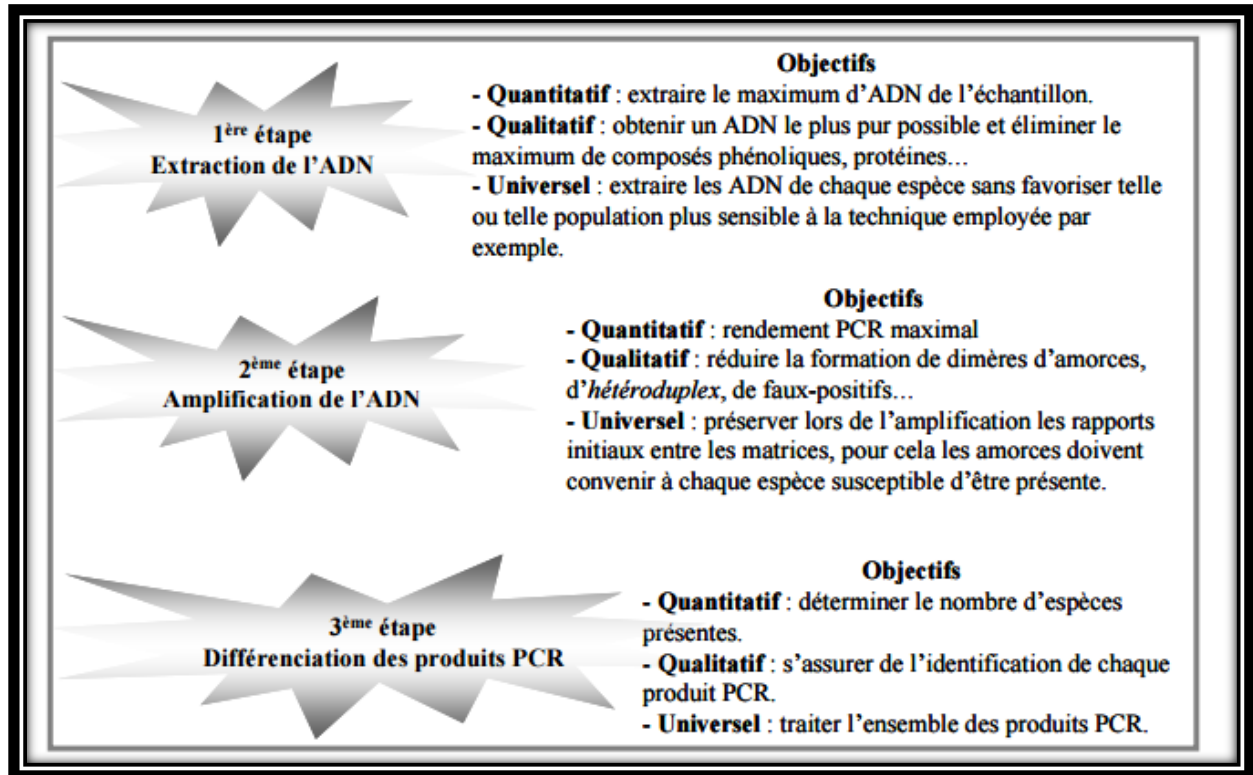


Figure n°21 : Les trois principales étapes d'étude de l'écologie microbienne par méthode moléculaire.

6.1. La structure de l'ADN

L'ADN est une molécule très longue, composée d'une succession de nucléotides accrochés les uns aux autres par des liaisons phosphodiester. Il existe quatre nucléotides différents : l'adénosine, la cytidine, la guanosine et la thymidine, dont l'ordre d'enchaînement est très précis et correspond à l'information génétique (Divol, 2004).

L'ADN est formé de deux brins complémentaires enroulés en hélice (double hélice). S'il peut prendre plusieurs formes (type Z et type A), l'ADN prend le plus souvent la forme B, où la double hélice possède les caractéristiques suivantes :

- 10,5 paires de bases par tour ;
- un pas de l'hélice (hauteur entre deux tours) de 0,34 nanomètres.

La règle d'appariement est stricte : l'adénine ne peut s'associer qu'à la thymine (dans l'ADN) tandis que la cytosine s'associe nécessairement à la guanine. On dit des bases qui s'apparient qu'elles sont complémentaires (**Raven, 2011**).

6.2. Matériel génétique des levures

Les levures depuis longtemps ont été un système modèle pour les recherches en génétique.

Ce sont les premiers eucaryotes à avoir été manipulés à grande échelle par les techniques du génie génétique et elles jouent encore un rôle primordial comme modèle dans les recherches sur les cellules eucaryotes. En 1996, on a terminé le séquençage du génome de *saccharomyces.cerevisisiae* premier eucaryote à être complètement séquencé. (**Raven, 2011**).

6.2.1. Le génome levurien

Le génome levurien est le plus petit de tous les génomes eucaryotes connus, *saccharomyces. cerevisisiae* possède 6000 gènes, 12 millions pb, et 16 chromosomes dont le nombre est très variable entre les espèces. Ce matériel génétique est distribué sur les chromosomes, l'ADN mitochondrial et un petit nombre d'éléments extra chromosomiques (**Goffeau et al.,1996**).

La quasi- totalité (70%) du génome chromosomique levurien correspond à une information génétique directe, contrairement à l'ADN des animaux ou des plantes dont une fraction importante est formée de *pseudogènes* ou de séquences répétitives non transcrites (**Thuriaux et Mosrin, 1991 ;Goffeau et al., 1996**).

6.2.2. Les chromosomes

Un chromosome est une structure constituée d'ADN. Chacun des chromosomes a une forme différente. Nous en avons 23 paires dans le noyau de chacune de nos cellules, 22 sont communes aux deux sexes. Les deux chromosomes restants sont les chromosomes sexuels. Chez la femme, ils forment une paire. On les appelle les chromosomes X. Chez l'homme, ils sont différents, l'un est un chromosome X et l'autre, beaucoup plus court est appelé chromosome Y. Ces chromosomes contiennent le répertoire complet des histones eucaryotiques, parmi les quelles l'histone H1 long temps supposée absente (**Goffeau et al., 1996**).

Les chromosomes sont particulièrement visibles au moment de la division cellulaire et ils sont en nombre différent selon les espèces. Le nombre de chromosomes varie dans certains types de cellules malades, en particulier dans les cellules cancéreuses, où en général, il augmente.

De nombreuses homologues de séquences géniques et de leurs fonctions avec des gènes humains ont été mises en évidence (Goffeau *et al.*, 1996 ; Paret *et al.*, 1999 ; Auclair *et al.*, 2003 ; Gomes *et al.*, 2005).

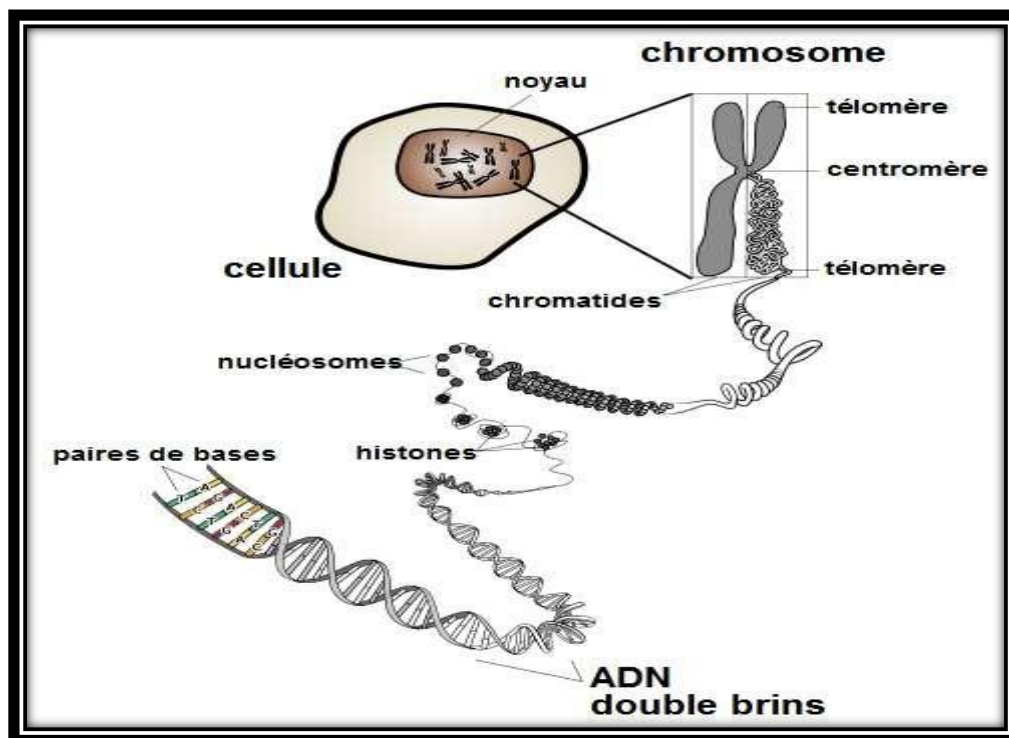


Figure n°22 : Description de la structure d'un chromosome.

(<https://fr.wikipedia.org/wiki/Chromosome>).

6.2.3. L'ADN mitochondrial

Une mitochondrie contient plusieurs copies d'ADN circulaire. L'ADN mitochondrial représente moins de 1% de l'ADN total de la cellule.

L'ADN mitochondrial est compacté en agrégats appelés nucléoïdes ou mitochromosomes. Le composant le plus abondant des nucléoïdes est le facteur de transcription A qui contribue de manière significative à la compaction de l'ADN, de manière similaire à

l'action des histones.

Le génome mitochondrial chez les animaux (hérité de la mère) est une molécule d'ADN double brin de de 16,569 paires de base (beaucoup plus petit que celui des plantes) avec 435 ilots CpG et 4747 cytosines dans des sites non-CpG.

C'est le cas de l'ADN plastidial et mitochondrial, qui du fait de similitudes de région avec l'ADN bactérien, permet l'hybridation de certaines amorces universelles et par conséquent un résultat positif à l'amplification. Pour éviter ce problème, il est nécessaire de choisir des régions spécifiques à la communauté en question ou dans le cas où sa présence est inévitable, il faut donc repérer les pics ou bandes liés à cette amplification aspécifique et les supprimer des profils obtenus (Jawich,2006).

6.2.4. Plasmide

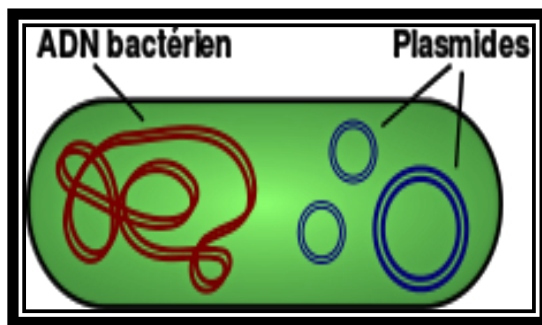


Figure n°23 : Schéma représentant une bactérie contenant des plasmides.
<https://fr.wikipedia.org/wiki/Plasmide>

En microbiologie et en biologie moléculaire, un plasmide désigne une molécule d'ADN distincte de l'ADN chromosomique, capable de réplication autonome et non essentielle à la survie de la cellule. Le terme plasmide fut introduit par le biologiste moléculaire américain Joshua Lederberg en 1952. Les plasmides portent un ensemble de gènes permettant sa propre réplication et fréquemment des gènes de résistance à des antibiotiques qui apportent un avantage aux bactéries qui les contiennent.

Les plasmides sont bicaténaire (constitués de deux brins complémentaires) et généralement circulaires. On les trouve presque exclusivement dans les bactéries et parfois dans d'autres micro-organismes comme par exemple le plasmide 2Mu que l'on trouve dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie), un eucaryote unicellulaire.

Les plasmides peuvent être présents en nombre de copies variable. Les grands plasmides naturels (>50 kb) sont souvent présent à une ou deux copies par cellule, comme le chromosome. Les plasmides construits par génie génétique pour des utilisations biotechnologiques (expression de protéine recombinante, clonage de gène, séquençage de l'ADN) ont souvent été modifiés pour être présents à un nombre de copies beaucoup plus élevé, de l'ordre quelques dizaines à quelques centaines, ce qui permet une amplification de la production d'ADN et/ou de protéines.

Plusieurs plasmides différents peuvent coexister dans une même cellule sous condition de leur compatibilité mutuelle. Certains plasmides sont capables de s'intégrer aux chromosomes ; on appelle ces plasmides des épisomes.

Les plasmides participent aux transferts horizontaux de gènes entre les populations bactériennes, et donc à la dissémination des gènes conférant des avantages sélectifs (par exemple des résistances aux antibiotiques ou des facteurs de virulence). La mobilité des plasmides (par conjugaison) au sein des populations bactériennes accroît le spectre d'hôte des gènes impliqués dans la virulence. Ces gènes offrent en contrepartie un avantage sélectif pour le plasmide et les bactéries hôtes. On conçoit donc la nature quasi ubiquitaire et persistante des plasmides chez les bactéries pathogènes (**Thuriaux et Mosrin, 1991**).

6.2.5. ADN ribosomique

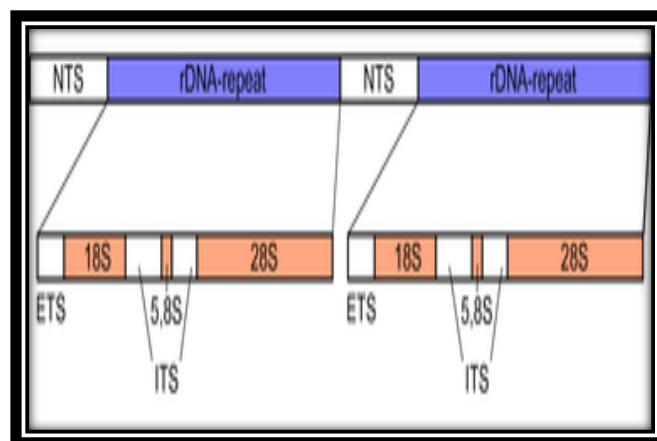


Figure n°24 : Schéma pour la structure l'ADNr (**Higgins, 2012**).

(en) Structure générique d'un opéron d'ADN ribosomique d'eucaryote indiquant la répétition en tandem des domaines NTS, ETS, 18S, ITS1 (en), 5,8S, ITS2 (en) et 28S.

L'ADN ribosomique (ADNr) est l'ensemble des séquences d'ADN transcrites en ARN ribosomiques (ARNr). Les ribosomes sont des complexes de protéines et d'ARNr au sein desquels se déroule la traduction des ARN messagers au cours de la biosynthèse des protéines.

L'ADN ribosomique des eucaryotes est un opéron formé d'une répétition en tandem de domaines NTS, ETS, ARNr 18S, ITS1 (en), ARNr 5,8S, ITS2 (en) et ARNr 28S. Il possède également un autre gène transcrit en ARNr 5S dans le génome de la plupart des eucaryotes. L'ARNr 5S est également présent dans les tandems répétés par exemple chez la drosophile. Dans le noyau, la région du chromosome portant l'ADN ribosomique apparaît sous la forme d'un nucléole, qui forme de grandes boucles d'ADNr. Ces régions d'ADNr sont également appelées organisateur nucléolaire dans la mesure où elles forment la base structurale du nucléole. Le génome humain compte cinq chromosomes portant de telles régions : les chromosomes acrocentriques 13, 14, 15, 21 et 22. (Hoshino, 2012).

6.2.6. La région ITS

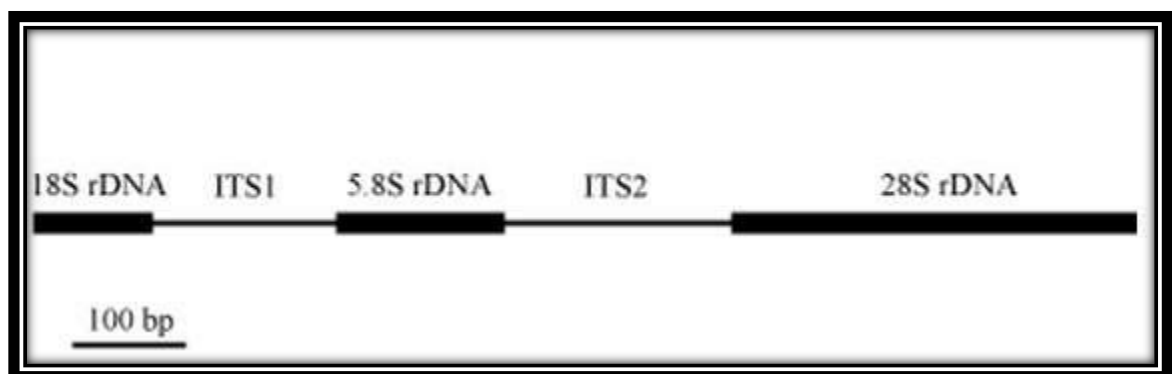


Figure n°25 : Schéma explicatif de la situation de la région ITS (Higgins, 2012).

L'ITS (pour Internal Transcribed Spacer) est une région de l'ADN ribosomique. C'est une région non codante et hautement polymorphe. Pour cette raison, elle est très fréquemment utilisée en biologie cellulaire pour mettre en évidence une différence génétique entre deux espèces, par exemple, particulièrement chez les champignons.

Une telle variation intra génomique peut être détectée par les deux séquençages direct et le séquençage après clonage amplifié par PCR de sa région ; évidemment, cette dernière méthode va révéler plus de variation, en fonction du nombre de clones produits PCR

séquencés (Guillamon et al., 1998 ; Esteve – Zarzoso et al., 1999 ; Nisiotou et Gibson, 2005).

6.3. L'extraction de l'ADN

Plusieurs techniques d'extraction d'ADN sont possibles. Certaines permettent une extraction rapide et directe de l'ADN à partir des cellules. D'autres indirectes nécessitent de recourir à un protocole en plusieurs étapes. Le choix de ces méthodes dépend de la nature de l'ADN ciblé (ADN chromosomique des bactéries, ADN génomique des levures), de l'origine

1ère étape Extraction de l'ADN 2ème étape Amplification de l'ADN 3ème étape Différenciation des produits PCR (Moulessehou, 2006).

6.4. Extraction d'ADN génomique de levure

L'ADN obtenu à l'aide de cette méthode n'est pas d'une pureté élevée, mais elle est néanmoins suffisante pour les analyses par hybridation ADN/ADN ainsi que pour les amplifications PCR. Les cellules sont mises en culture dans 10 ml de milieu complet (YPG) liquide, à 30 °C sous agitation, jusqu'en début de phase stationnaire. Elles sont ensuite récoltées par centrifugation (5min à 3000rpm). Le culot est alors remis en suspension dans 1 ml d'eau distillée puis transféré dans un tube Eppendorf et centrifugé pendant 2 min à 12000 rpm. Les cellules sont ensuite reprises dans 250 µl de tampon de broyage (TrisHCl pH 8 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100mM, Triton 2%, SDS 1%) et on ajoute des billes de verre (de diamètre 0,5 mm) de manière à laisser environ 1 mm de milieu audessus des billes. On ajoute alors 250µl de phénol-chloroforme et le milieu est vortexé pendant 3 min, puis centrifugé pendant 5 min à 12000 rpm. La phase aqueuse supérieure, transférée dans un nouveau tube Eppendorf, est additionnée d'un volume de p h éno l-chloroforme. Ce mélange est vortexé pendant 30 sec puis centrifugé à 12000 rpm pendant 2 min. La phase aqueuse supérieure est à nouveau transférée dans un nouveau tube Eppendorf et additionnée de 600 µl d'éthanol absolu froid et de 20 µl d'acétate d'ammonium 3 M. Cette solution est maintenue dans la glace pendant 15 min environ puis centrifugée pendant 5 min à 12000 rpm. Après séchage, le culot est repris dans 400 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). On ajoute 30 µg de RNase A au milieu qu'on incube pendant 15 min à 37 °C. 1 ml d'éthanol absolu froid est alors mélangé à la solution qui est ensuite placée 15 min dans la glace, puis centrifugée pendant 10 min à 12000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot rincé avec 1 m l d'éthanol 70%. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 50 µl de TE. (Hoffman and Winston, 1987).

6.5. Détermination de la concentration d'ADN

La concentration d'une solution d'ADN peut être estimée par la mesure de l'absorbance à 260 nm, une unité d'absorbance correspondant à 50 µg/ml d'ADN bicaténaire. Le calcul du rapport des absorbances à 260 nm et 280 nm permet d'estimer la pureté de la solution (absence de protéines), ce rapport devant être compris entre 1,8 et 2 (Sambrook *et al.*, 1989).

6.6. Électrophorèse sur gel d'agarose classique

Les fragments d'ADN de taille inférieure à 50 kb sont séparés selon leur taille par migration sur gel d'agarose 1%. Ces fragments sont visibles aux UV à 300 nm grâce au BET contenu dans le gel qui s'insère entre les plateaux de base de l'ADN. On peut en estimer la taille et la concentration en comparaison avec la comigration d'un marqueur de taille tel que de l'ADN de phage λ digéré par EcoRI et HindIII. La migration s'effectue sous une tension pouvant varier de 20 à 100V dans un tampon d'électrophorèse, le TAE (Tris-Base 4,84 g ; acétate de sodium 0,68 g ; EDTA 0,336 g ; acide acétique 1,35 ml ; eau qsp 1l).

Le BET est un agent d'intercalation utilisé comme marqueur des acides nucléiques ; il doit être fluorescent quand il est exposé aux rayonnements ultraviolets ; c'est un produit dangereux, qui possède un effet mutagène et peut être cancérigène, il doit donc être manipulé avec des gants sous une hotte aspirante (Bâ *et al.*, 2011).

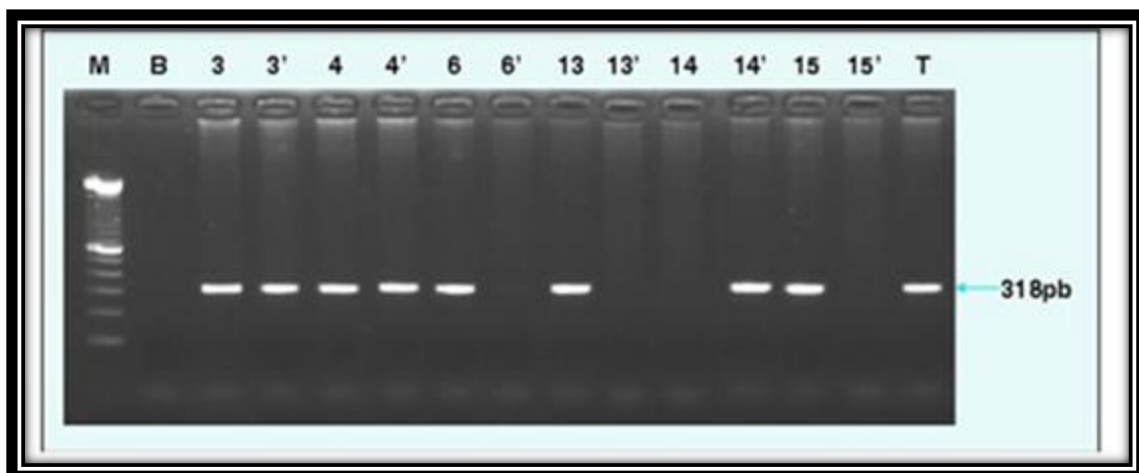


Figure n°26 : Visualisation de bandes d'ADN sur gel d'agarose.

(https://wiki.aurea.eu/index.php/La_technique_PCR).

6.7. Gel polyacrylamide

Sur gel polyacrylamide : Les gels de polyacrylamide [Pol- Acrylamide Gel Electrophoresis ou PAGE] sont utilisés pour des fragments plus petits que les gels d'agarose, en général inférieurs à 1 kb. A nouveau, les échantillons déposés sur le gel sont séparés en fonction de leur taille. Tous comme pour les gels d'agarose, une concentration plus élevée permet une séparation plus nette des fragments de très petites tailles. Ils sont utilisés pour séparer les PCR d'ITS, les fragments de RFLP (Huybens *et al.*, 2009 ; Nolan *et al.*, 2003).

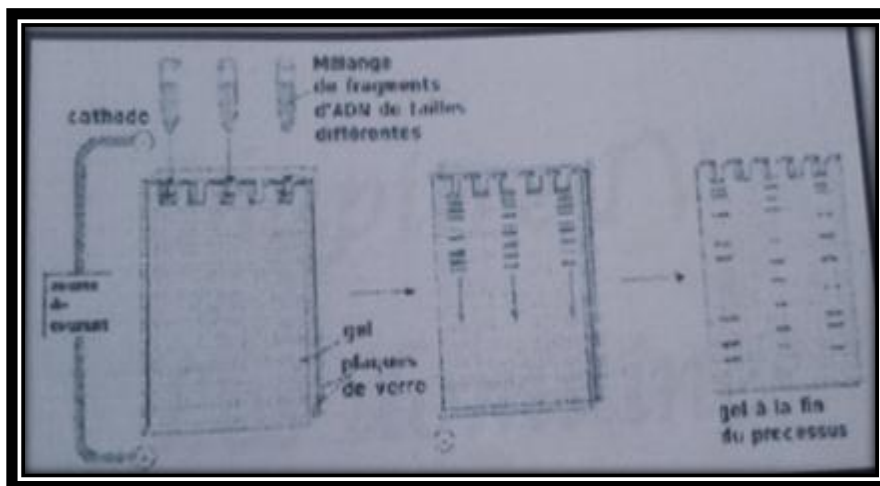


Figure n°27 : principe d'électrophorèse (Lionnet et Croquette, 2005).

6.8. Purification de l'ADN par chromatographie

Cette méthode de purification, très rapide, a été utilisée pour séparer l'ADN double brin amplifié par PCR des autres substances présentes dans le milieu réactionnel après amplification (amorces en excès, dNTP, sels). L'ADN purifié peut ensuite être utilisé pour d'autres réactions : PCR, digestion par un enzyme de restriction, ligation, séquençage... Cette méthode de chromatographie d'exclusion (gel-filtration) est basée sur la séparation des molécules selon leur taille dans une résine de Séphacryl sous l'action d'une force centrifuge. Les impuretés (dNTP, sels) et les petits fragments d'ADN (amorces de taille inférieure à 25-mer) sont retenus par la résine, alors que les grands fragments d'ADN (500-mer et davantage) passent rapidement à travers. Les colonnes utilisées (MicroSpin™ S-400 HR), préalablement équilibrées dans du tampon TE, sont commercialisées par Pharmacia. La colonne est d'abord remise en suspension, placée dans un microtube Eppendorf et centrifugée à 2300 rpm pendant 1 minute pour éliminer l'excès de tampon. Après avoir placé la colonne dans un nouveau microtube Eppendorf, 25 à 50 µl d'échantillon sont déposés délicatement à la surface de la

résine, puis centrifugés à 2300 rpm pendant 2 minutes. La solution d'ADN purifiée est récupérée dans le microtube.

7. L'amplification de l'ADN

Afin de comparer ou d'étudier l'ADN extrait, celui-ci doit donc être amplifié par la réaction de polymérisation en chaîne PCR.

La révolution suivante en biologie moléculaire a été la mise au point de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR, pour Polymerase Chain Reaction). Karu Mullis a mis au point la PCR en 1983, Alors qu'il était chimiste à la Cetus Corporation ; en 1993, sa découverte lui a valu le prix Nobel de chimie (**Huybens et al., 2009 ; Raven et al., 2011 ; Hoshino, 2012**).

7.1. Définition de la PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique dont le but est de copier « in vitro » de façon exponentielle un fragment d'ADN (ou parfois d'ARN) cible de longueur définie. Son principal objectif est alors de faire un grand nombre de copies d'un fragment ou d'un gène cible pour avoir assez d'ADN matrice pour d'autres études (**Thiao,2005 dans Moussa Sassi ,2011**).

Face à la méthode microbiologique traditionnelle, et aux méthodes non spécifiques, la biologie moléculaire (PCR) apporte des solutions de détection de hauts niveaux de rapidité (réponse entre 24 à 48 heures), de sensibilité (1 à 5 germes.ml⁻¹), et de spécificité. Mais elle reste relativement chère et nécessite un personnel qualifié pour les opérations d'extraction, et de fragmentation (Gerland, 2010) Aussi, comme inconvénients, cette technique ne fournit aucune information sur le niveau de contamination (**Delaherche et al., 2004**) et peut souvent générer des faux positifs car la réaction amplifie indifféremment l'ADN des cellules vivantes et /ou mortes.

La technique PCR est utilisée pour amplifier différentes parties du génome en ayant pour cibles l'ADN total, l'ADNr nucléaire ou l'ADNr mitochondrial. L'ADN total est analysé par des techniques comme la RFLP (pour Random Fragments Length Polymorphism ou Polymorphisme de longueur des fragments de restriction), l'AFLP (pour Amplified Fragment- Length Polymorphism), la RAPD (pour Random Amplified Polymorphic DNA ou Amplification aléatoire d'ADN Polymorphe) et les microsatellites pour accéder au polymorphisme de larges portions d'ADN (**Bà et al .,2011 ; Chikere, 2013**).

7.2. Principe

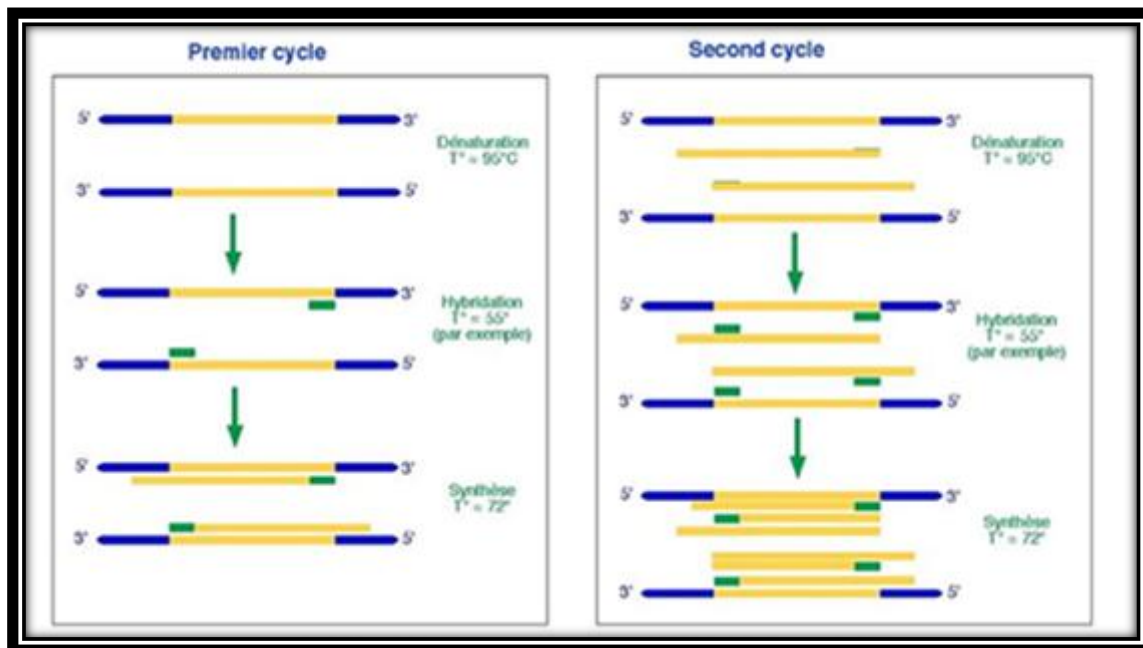
La PCR est une technique permettant l'amplification exponentielle et spécifique d'un fragment d'ADN *in vitro* par l'utilisation d'une polymérase thermostable, d'oligonucléotides amorces et des quatre dNTP, que l'on soumet à une série de cycles de température. Plusieurs cycles alternant une dénaturation de l'ADN, l'hybridation des oligonucléotides et la polymérisation de l'ADN sont ainsi effectués. La durée et la température des différentes étapes sont des paramètres essentiels qui sont définis pour chaque expérience.

Quand on répète ce mécanisme, on obtient une grande quantité de séquences correspondant à l'ADN situé entre les deux amorces (**Raven et al., 2011 ; Bâ et al., 2011**).

La PCR est basée sur le mécanisme de réplication de l'ADN (1) *in vivo* : l'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, puis dupliqué et ré-enroulé, selon des cycles répétitifs comprenant les trois étapes suivantes :

- **7.2.1. Dénaturation** : de l'ADN par fusion à haute température pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire. Cette étape est réalisée à une température comprise entre 93 et 96°C.
- **7.2.2. Hybridation** : à l'ADN cible de deux oligonucléotides utilisés comme amorces. Cette hybridation a lieu à une température comprise entre 55 et 65°C.
- **7.2.3. Extension** : de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase (2) comme catalyseur en présence d'ions Mg^{2+} . La

température optimale de travail de l'ADN polymérase est de 72°C.



L'ADN génomique est représenté en bleu. La région de l'ADN génomique que l'on souhaite amplifier est représentée en jaune. Les amorces de PCR (oligonucléotides) sont représentées en vert.

Figure n°28 : Schéma représentant les cycles PCR.

(https://wiki.aurea.eu/index.php/La_technique_PCR).

8. Les différentes méthodes d'identification des levures

La PCR fournit, une estimation qualitative (nature des espèces) et quantitative (nombre d'espèces) de la diversité microbienne. Pour cela, l'amplification est basée sur l'utilisation de courtes séquences consensus présentes chez toutes les espèces qui assurent l'amplification d'une séquence divergente selon l'espèce. Cette divergence peut s'exprimer en termes de taille, de séquence nucléotidique, ou bien une combinaison de ces deux paramètres (Ness., 1993).

8.1. PCR quantitative

La PCR quantitative (ou QPCR), ou PCR en temps réel, est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN. En

réalité, la PCR quantitative mesure le nombre d'amplicon (portion d'ADN définie par un couple d'amorces).

Il existe diverses techniques permettant de quantifier l'ADN en biologie moléculaire. On peut utiliser la spectrométrie à 260 nm qui permet de connaître avec précision la concentration d'ADN total dans un échantillon par dosage optique. Cette méthode ne peut cependant pas permettre de connaître avec précision la quantité d'un ADN particulier (défini par une séquence précise de nucléotides). Il existe heureusement plusieurs techniques fiables permettant la quantification de l'expression d'un gène particulier comme le Southern blot, le Northern blot et bien sûr la PCR quantitative. (https://fr.wikipedia.org/wiki/PCR_quantitative)

8.2. Principe de la quantitative

L'amplification au cours de la se fait selon la formule :

$$X = X_0 (1 + \text{Eff})^n$$

X : Nombre de molécules.

X₀ : Quantité initiale à amplifier.

n : Le nombre de cycles.

Eff : Efficacité de l'amplification, c'est-à-dire la proportion moyenne de molécules se dupliquant au cours d'un cycle. En général, l'efficacité est entre 80 et 90%, au cours des premiers de la PCR.

Cependant l'amplification n'est pas exponentielle sur toute la durée de la PCR. En effet, la PCR peut être décomposée en deux phases exponentielle et la phase de plateau, où les produits nécessaires à l'amplification (notamment les d'NTPs et les amorces) deviennent limitant (**Berrih-Aknin ; 2002**).

Cette technique est très puissante, relativement simple à mettre en œuvre et applicable à n'importe quel gène à partir du moment où la séquence est connue.

C'est une technique fiable et reproductible mais elle nécessite des mises au point préalables. Son utilisation dans des situations physiologiques (au cours du développement ou activation) et physiopathologiques est très informative, surtout quand les outils spécifiques des protéines correspondants ne sont pas disponibles (**Berrih- Aknin ; 2000**).

8.3. PCR delta

Il s'agit d'une technique basée sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) des régions du génome situées entre les éléments delta, portions d'ADN dispersées en nombre variable selon la souche de levure. Seul *Saccharomyces cerevisiae* possède ces éléments delta, aussi cette technique n'est elle appliquée qu'à cette espèce. On estime que 20 % des souches différentes par ECP ont le même profil PCR. Plus rapide et moins coûteuse que l'ECP – les résultats peuvent être obtenus en 24 / 48 heures – cette méthode est utilisée notamment pour les contrôles de production et d'implantation, la sélection de souches et les études écologiques. Legras et Karst (2003) ont optimisé cette technique en concevant deux nouvelles amorces : $\delta 12$ et $\delta 21$ situées près de $\delta 1$ et δ . L'utilisation de $\delta 12$ et $\delta 21$ ou de $\delta 1$ avec $\delta 2$ met en lumière un plus grand polymorphisme se traduisant par un grand nombre de bandes sur le gel d'électrophorèse (Castellucci, 2011, Outil de la biologie moléculaire pour l'identification de la levure de la vinification *Saccharomyces cerevisiae* et d'autre espèce liées à la vinification).

8.4. La reverse transcriptase (RT- PCR)

L'ADN est très stable dans la milieu contrairement à l'ARN. L'étude de ce dernier est donc plus intéressante si la viabilité d'une population microbienne est l'objet de recherche. La reverse transcriptase (RT) permet la création à partir de l'ARN d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) qui peut ensuite être amplifié par une PCR classique.

La RT- PCR permet donc la comparaison de la composition, de la viabilité ou de l'activité de populations microbiennes (**Sharkey et al., 2004 dans Huybens et al., 2009**).

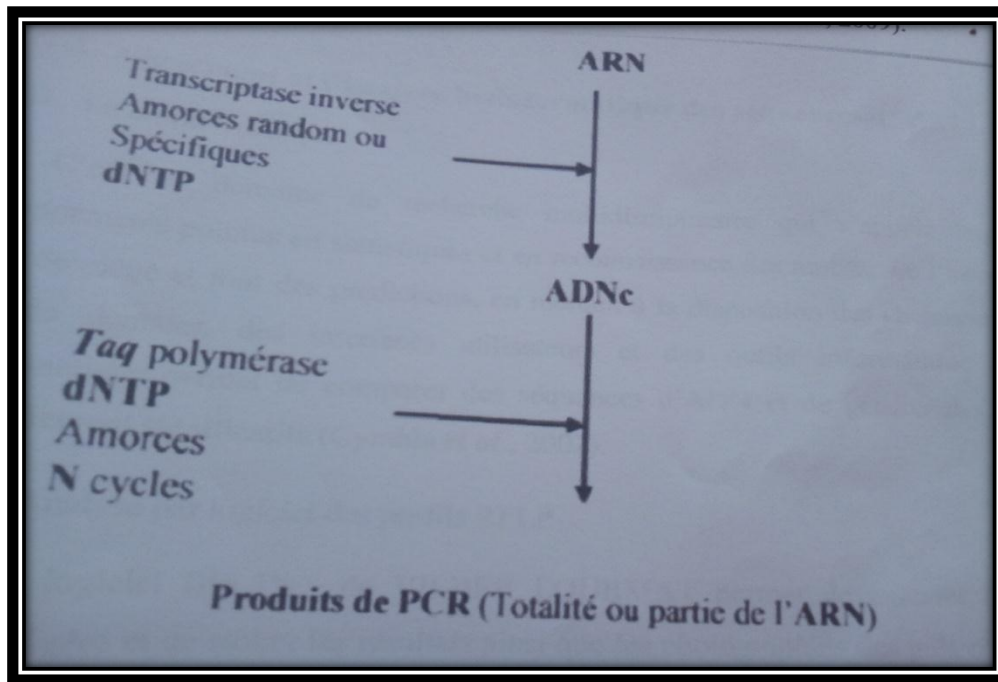


Figure n°29 : Le principe de la RT- PCR (Beldjord, 2009).

8.5. Identification des levures entre espèces

8.5.1. PCR ITS (Internal Transcribed Spacer)

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 donnée, mais différente d'une espèce à l'autre, elle est la base de nombreuses études taxonomiques. Dans le cas des bactéries, on lui préfère parfois la PCR 16S qui vise une autre région de l'ADN ribosomique.

L'amplification de la région ITS par la PCR se réalise dans un thermocycleur suivant un régime cyclique, chaque cycle est caractérisé par une succession de trois étapes principales de la PCR. (White et al., 1990 ; Guillamon et al., 1998 ; Egli et Henick-kling, 2001).

9. Identification des levures au niveau de souche

9.1. PCR- RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism)

Pour certaines identifications de levures, la technique de PCR-RFLP a été utilisée comme signalé plus haut. Les conditions de réalisation de la PCR ont déjà été mentionnées. Les amplicons sont révélés par électrophorèse dans un gel d'agarose 1,5 % (p/v). La RFLP

consiste en une digestion enzymatique des amplicons obtenus lors de la PCR. Les enzymes utilisées sont les suivantes : HhaI, HaeIII et HinfI. Les mélanges réactionnels sont explicités dans le tableau. Après 2 heures à 37°C, les fragments de restriction sont séparés selon leur taille par électrophorèse dans un gel d'agarose 3% (p/v).

(file:///C:/Users/safa/Downloads/divol.pdf)

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 Mangin, 1992**).

enzyme	<i>HhaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
amplicon	10	10	10
volume d'enzyme	1 (20U)	1 (20 U)	1 (20U)
tampon 10X (N° et volume)	n°4 2	n°2 2	n°2 2
BSA 10X	2	0	0
eau mQ	5	7	7

Tableau n°2 : Enzymes de restriction utilisées et conditions d'utilisation (données en µL).

9.2. La technique Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe est une technique qui a été développée par **Williams** (1990) afin de construire des cartes génétiques.

Le principe consiste à utiliser des amorces d'environ 10 paires de bases avec des températures d'appariement basses, 36°C à 45°C. Des appariements plus ou moins spécifiques ou des mésappariements permettent l'amplification d'une série de fragments de tailles différentes.

Les fragments obtenus dépendent de l'appariement des amorces et de la distance entre ces appariements en utilisant peu de matériel (**Huybens et al., 2009**).

Afin de contrôler les résultats obtenus, il convient de multiplier les essais en variant la quantité d'ADN de départ (**Huybens et al., 2009**). En utilisant une concentration d'ADN suffisante sans être trop élevée entre 10 et 100 ng) et en standardisant au maximum le matériel comme la méthode (même polymérase, même cycleur, même manipulateur.....), la reproductibilité de la manipulation peut être fortement améliorée.

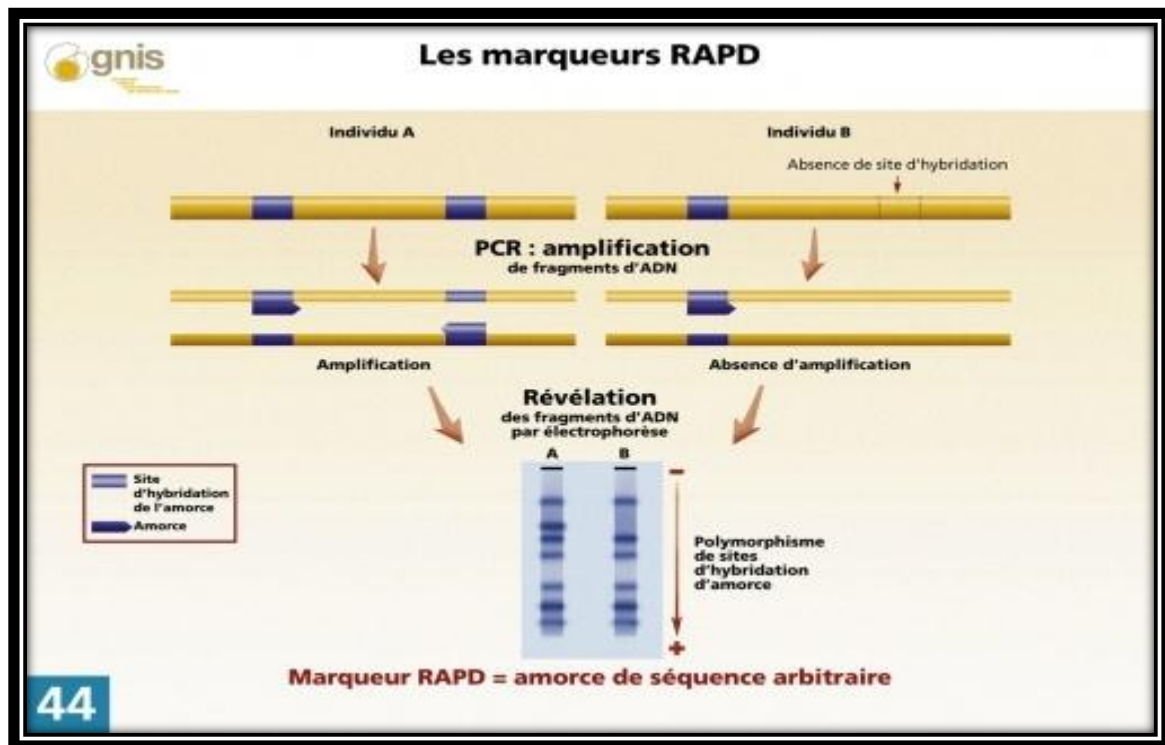


Figure n°30: Principe de méthode de RAPD (Filofteia, 2010).

9.3. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

L'analyse AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a été utilisée pour la caractérisation des souches de levures isolées des établissements viticoles australiens (**Curtin et al., 2007**). Ainsi, la technique a permis l'identification de 8 génotypes provenant d'un total de 244 isolats originaires de 31 régions viticoles. Cette technique, décrite pour la première fois par vos et al. (1995), est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. Cette technique utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification par PCR (**Filofteia, 2010 ; Abdulmalk, 2013**).

En 2009, de nouveaux protocoles sont apparus avec différentes compositions pour le mélange utilisé pour l'analyse par PCR (Tessonniere *et al.*, 2009).

C'est une combinaison de deux techniques PCR et RFLP après digestion par deux endonucléases. L'ADN génomique subit une ligation d'adaptateurs spécifiques compatibles avec les extrémités générées par les digestions enzymatiques. Ces adaptateurs permettent ensuite l'hybridation d'amorce spécifique. On obtient ainsi des profils constitués de plusieurs dizaines de bandes distinctes. Analysé par exemple sur gel de polyacrylamide (Filofteia, 2010).

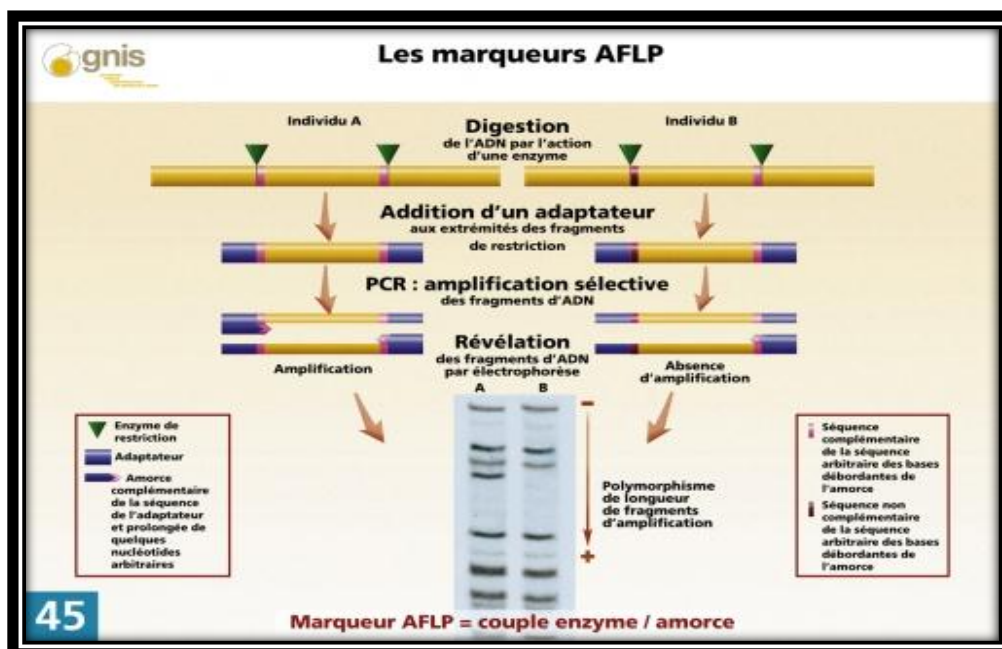


Figure n°31: Principe de méthode d'AFLP (Huybens *et al.*, 2009).

10. Biotechnologie des levures

Par un métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie) et dans la production des métabolites mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles et industriels, et la production protéines (**Scriban, 1984 et 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**).

Types d'enzymes	Levures utilisées	Utilisations
Amylases	<i>Lipomyces starkey</i> <i>Sachwanniomycetes castellit</i>	Saccharification de l'amidon, Boulangerie, Textile, Papeterie
Invertases	<i>Saccharomyces carlbergensie</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Confiserie
Lipases	<i>Condida lipolytica</i>	Fromagerie, laiterie
Lactases	<i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	Crèmes glacées

Tableau n°3 : Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes (Simon et Meunier, 1970 et Sicard, 1982)

10.1. L'utilisation des levures en industrie

10.1.1. Panification

Une autre utilisation, connue depuis l'antiquité, est la fabrication du pain : Le dégagement de gaz carbonique, qui accompagne la fermentation, permet de faire lever la pâte en lui conférant une texture légère. On utilise également *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie) (Simon et Meunier, 1970 et Cofalec, 2006).

10.1.2. Production de protéines

Les levures constituent une source précieuse de protéines car elles sont le siège d'une biosynthèse protéique très active. Elles sont utilisées à la production de protéines d'organismes unicellulaires (POU) ou « Single Cell Proteins » (SCP), qui sont souvent incorporées à l'alimentation animale et humaine. Cette production peut s'effectuer sur des substrats considérés comme des déchets tels que le lactosérum et les résidus de pâte à papier. (Pol, 1996).

10.2. La levure probiotique *Saccharomyce cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae est un champignon levuriforme (unicellulaire) appartenant au genre des ascomycètes (Moller et al., 2001 ; et visser et al., 1990).

La croissance optimale de cette levure se situe à des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 5,0 mais elle tolère parfaitement des valeurs de pH comprises entre 2,5 et 8,0. *Saccharomyces cerevisiae* est une espèce mésophile avec un optimum de température entre 25 et 30°C (Rose and Harrisson, 1971) qui peut s'adapter et croître dans un large spectre de température, Toute fois elle est généralement incapable développer de se à des températures supérieures à 40°C.

Les différentes souches sont ubiquistes, c'est-à-dire capable de se développer en milieu aérobie et en milieu anaérobie (Rose, 1987). Sous certaines conditions, notamment l'adjonction d'ergostérol au milieu de culture (Moller et al., 2001 ; visser et al., 1990). Cette propriété lui permet d'accroître sa biomasse en présence ou en absence d'oxygène mais à des rythmes différents ; la production en aérobiose autorise un accroissement de sa biomasse presque 20 fois supérieur à celui de la fermentation.

Cette levure est, depuis des temps très anciens, à la base de la panification et de la fabrication des boissons alcoolisées et aujourd'hui, elle continue à être indispensable à ces activités industrielles (Harrison and (Rose, 1970) auxquelles on peut ajouter la production des biocarburants (éthanol). Depuis un demi-siècle, la levure s'installe et progresse en qualité d'additif alimentaire, puis de probiotique en élevage intensif de ruminant ou les éleveurs ont commencé à l'apprécier lors de tentative de valorisation des résidus de fermentation (Carter and Phillips, 1944).

1. Objectif de l'étude

Les levures se trouvent naturellement sur le raisin (habitat principal) de table ou de cuve par exemple les gènes : *Kluyveromyces*, *Pichia*...etc, participant à de nombreuses fermentations qui contribuent à la production des différents produits.

Cette étude consiste à isoler, purifier, caractériser microscopiquement et identifier génétiquement les levures souvent trouvées dans le cépage dénommé le cépage Cinsault cultivé de la région Abdelmalek Ramdane dans la Wilaya de Mostaganem, en cherchant à valoriser et exprimer la diversité du patrimoine phylogénétique en se basant sur l'étude moléculaire (PCR – ITS – RFLP).

2. Présentation de la région de la récolte

Les vignobles sont situés dans le cépage Cinsault cultivé de la région Abdelmalek Ramdane dans la Wilaya de Mostaganem, Selon le recensement général de la population et de l'habitat de 2008, la population de la commune de Abdelmalek Ramdane est évaluée à 13 607 habitants contre 12 577 en 1998.



Figure n° 32 : le cépage Cinsault cultivé de la région Abdelmalek Ramdane dans la Wilaya de Mostaganem.

3. Sources de prélèvement des levures

Les échantillons sont prélevés au mois de Septembre 2012 dans les vignobles sélectionnés à Cinsault cultivé de la région Abdelmalek Ramdane dans la Mostaganem. Le cépage soumis à l'étude est :

Le cinsault est un vieux cépage noir à jus blanc, probablement originaire de la Provence. 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 très juteuse. 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° 33 : le Cinsault

4. Milieux de culture

4.1. Milieu de pré culture YPG

Les baies, recueillies des vignobles, sont mises en culture dans un milieu riche YPG (Yeast Peptone Glucose) additionné de Gentamicine et /ou Chloramphénicol dont la composition est la suivante

Remarque : Chloramphénicol est un antibiotique de la famille des phénicolés, il est utilisé en association avec la gentamicine dans des milieux de culture en mycologie pour empêcher la croissance des bactéries et favoriser ainsi celle des champignons. (Organisme québécois responsable de la Sécurité et de la Santé au Travail, 2013).

4.2. Milieu de pré culture OGA

La gélose glucosée à l'oxytétracycline est utilisée pour la recherche et le dénombrement des levures et des moisissures. Ce pendant, en 1965, Buttiaux et Catsaras ont recommandé l'emploi de ce milieu pour la recherche des levures et moisissures dans les bières.

5. Préparation du milieu de culture

- Mettre en suspension les éléments constituant le milieu dans 1 litre d'eau distillée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacons, à raison de 200 ml par flacon à peu près.
- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

6. Isolement, purification et conservation des isolats

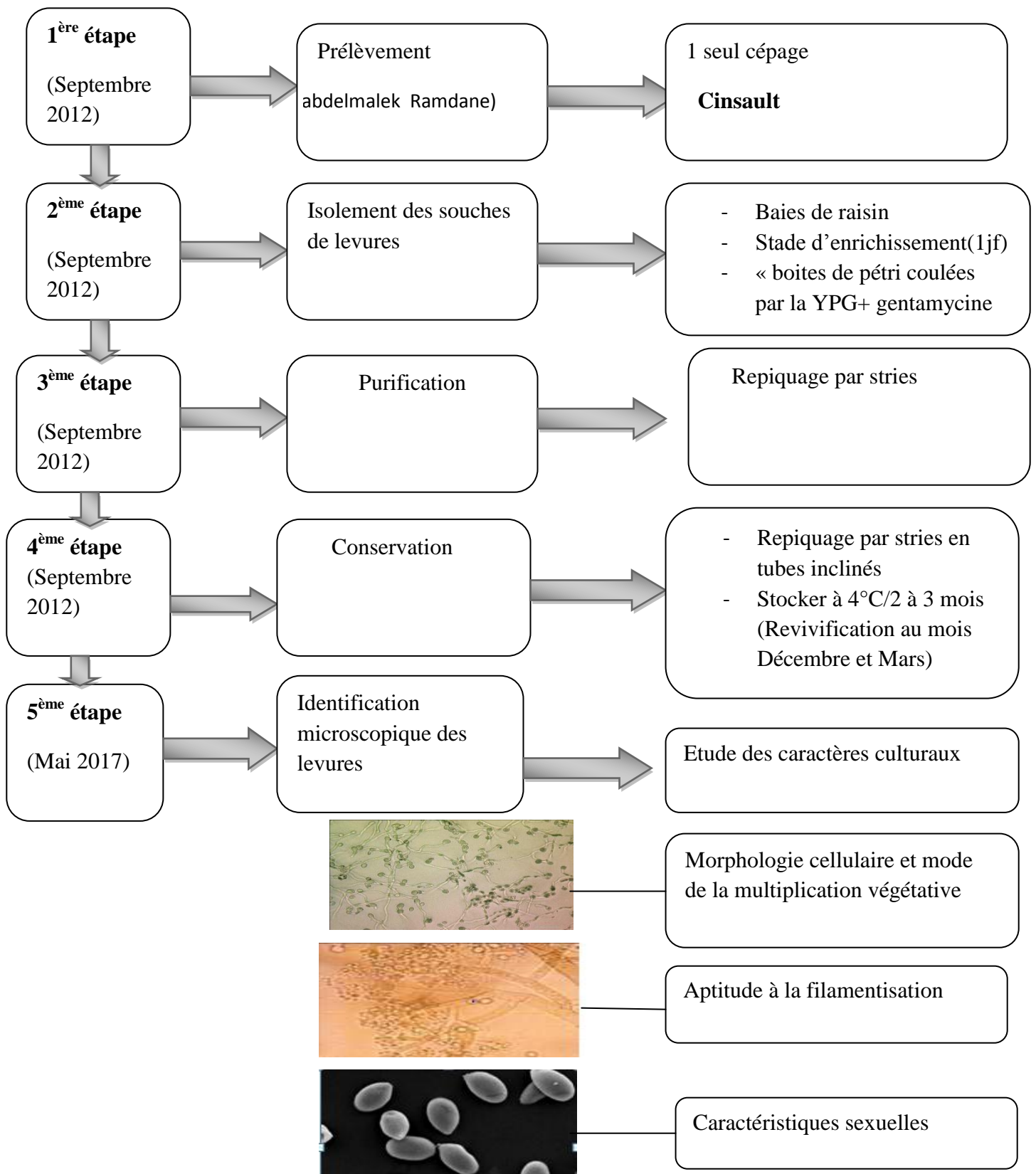


Figure n°34 : Schéma récapitulatif de l'étude microscopique des souches isolées.

6.1. Technique de prélèvement des levures

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

6.2. Préparation de l'extrait de raisin

Des grappes de raisins sont éraflées et écrasées a fin d'obtenir un mout qu'on laisse fermenter pendant une journée a 25° C dans le but d'augmenter la viabilité et la quantité des levures.

6.3. Isolement des levures

Cette étape consiste à isolats les levures présentent dans le jus ou le mout de raisin sur un milieu spécifique (YPG+ Gentamycine).

A l'aide d'une pipette pasteur flambée, on ensemence des boites contenant des milieux de cultures par la méthode de strie avec le jus obtenu ou le mout recueilli à partir de cépage de la 1^{ere} journée.

6.4. Méthode

- Tracer sur le fond extérieur de la boite de pétri de diamètre perpendiculaires, la boite et ainsi séparée en quatre secteurs équivalents.
- Prélever à l'anse le jus de raisin ou le mout de premier jour de la fermentation en respectant les règle des stérilités.
- Etaler l'inoculum en une zone périphérique sur une surface de 1 cm².
- Flamber l'anse, laisser refroidir, disséminer l'inoculum précédemment déposé en l'étalent en stériles très serrées sur une moitié de la boite.
- Faire pivoter la boite d'un quart de tour. Flamber à nouveau l'anse, laisser refroidir. Tracer à nouveau des stries dans la moitié de la boite ressemblant les autres quadrants.
- Répéter l'opération afin de disséminer la semence du troisième quadrant dans le quatrième.
- Placer dans la position renversée les boites stériles dans l'étuve.
- Et avant d'être mise à l'incubation (25°C/1 j-5j), les boites doivent être soigneusement codées arrangées.

7. Purification des levures

Générer, la purification a pour objectif d'éliminer les contaminants qui accompagnent le prélèvement initial et de contrôler la pureté de l'échantillon (**Bent Mohamed et Sidi Baba, 2008**).

7.1. Technique

- Effectuer une série d'ensemencements par la méthode des stries sur des boites contenant le milieu YPG + Gentamicine.
- Renouveler l'opération en prenant à chaque fois au hasard une colonie isolée
- Etiqueter les boites de pétrie
- Incuber à 25 ou 27° C pendant 24 à 48h

Noter : cette technique conduits à obtenir une culture dont la pureté est estimée par observation microscopique.

8. 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, les cultures sont incubées pendant 3 à 5 jours, pour permettre une croissance maximale, puis elles sont stockées à 4° C afin de favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations, les levures se conservent très bien au réfrigérateur pendant 3 à 6 mois. L'opération est reconduite deux fois depuis le mois de septembre 2012 (**UI-Haq et al., 2002 Guiraud, 2003**)

8.1. Technique

- Dans des tubes à vis stériles, verser le milieu YPG préalablement fondu additionné de gentamicine à raison de 0.15 ml
- Laisser solidifier le milieu incliné sur surface froide
- Etiqueter les tubes
- repiqués les souches en tubes par des stries
- incubé à 25 ou à 27° C pendant une durée allant jusqu'à 3 à 5 jours
- conserver les tubes ensemencés au frais à 4° C pendant un mois ou plus

Remarque : la conservation des souches de levure nécessite un repiquage sur milieu neuf chaque deux à trois mois pour une meilleure revivification, pour cela le 1^{er} repiquage a été réalisé le 19-12-16 ; le 2^{ème} repiquage a été effectué le 04-03-17 ; voir jusqu' à plusieurs repiquages.

*Les repiquages étaient dans des boites coulées avec le milieu YPG + gentamycine.

9. Identification microscopique des levures

9.1. Tests morphologiques

9.1.1. Etude des caractères cultureux

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...).

9.1.2. Les caractéristiques cellulaires

9.1.2.1. Morphologie cellulaire et mode de multiplication végétative

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 la jusque 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

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

10. Méthode de la coloration avec le bleu de méthylène

- Déposer une goutte de bleu de méthylène sur la lame identifiée.
- Prendre une colonie à l'aide de la spatule.
- Mélanger l'échantillon à la goutte de bleu de méthylène.
- Recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulles d'air.
- Observer rapidement la préparation au microscope, à l'objectif ×40.

10.1. Test de filamentisation

La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation, est observée à partir d'une culture sur lame microscopique (Objectifs ×40 puis × 100). Pour cela, le milieu YPG 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 distillé stérile pour éviter la dessiccation du milieu. L'observation se fait après 3 à 5 jours d'incubation. La Bordure de la culture est examinée, si la levure filament, la nature de mycélium (pseudo ou vrai mycélium), son abondance, sa ramification sont notées.

La différenciation entre mycélium et pseudo mycélium 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 pseudo mycélium présentent des constriction au niveau de deux cellules consécutives. On peut notes dans certains cas, la présence de blastopores et de chlamydospores (**Guiraud, 2003**).

10.2. Test de sporulation (caractéristique sexuelles)

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 autoclave 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.

➤ Coloration des spores sur frottis

Protocole

- 1- Réaliser un frottis épais et le laisser sécher à l'air.
- 2- Recouvrir de solution de vert-malachite.
- 3- Chauffer légèrement sur la veilleuse d'un bec bensen 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 secondes.
- 6- Rincer sous un filet d'eau et laisser sécher.
- 7- Observer au microscope directement (sans lamelle).

***Résultat**

Les levures et la paroi des asques sont colorées en rose tandis que les ascospores sont colorées en vert.

11. Tests des caractéristiques biochimiques et physiologiques**11.1. Fermentation des sucres**

Bien que les tests biochimiques (la capacité à fermenter différents glucides) constituent une approche classique pour l'identification des levures, il n'en demeure pas moins qu'ils sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines espèces et sous-espèces de levures. Grâce à ces tests, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des levures isolées.

Les tests d'information sont effectués avec des sucres très purs à des concentrations de 6%.

Les souches ont été testées pour leur capacité à fermentation le glucose, fructose, lactose, saccharose selon la méthode de Durham avec un virement de la couleur du rouge au jaune du fait de l'oxydation du milieu.

Le milieu utilisé est celui proposé par Wickerham (1951) qui contient un indicateur coloré, 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, 20 min.

Après refroidissement, les milieux sontensemencés 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 (Aissam, 2003).

11.2. Milieu de culture

Le milieu choisi pour ces tests est le milieu YPG liquide additionné d'un indicateur coloré avec une cloche de Durham, sa composition varie selon le sucre à tester.

- Extrait de levure.....10,0 g
- Peptone pancréatique.....10,0 g
- Gentamicine (à la place du Chloramphénicol).....0,15 ml
- Sucre.....20,0 g
- Rouge de phénol.....24,0 ml
- Eau distillée.....1000 ml
- PH = 5,8

11.3. Préparation du milieu

- Penser la masse nécessaire de chaque constituant pour 1L d'eau distillée.
- Ajouter la source de carbone (glucide à tester).
- Dissoudre les composants du milieu dans le diluant à l'aide de l'agitateur
- Porter à ébullition sur une plaque chauffante.
- Laisser refroidir légèrement sur la pailasse.
- Répartir en flacons, à raison de 200 ml par flacon à peu près.
- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Remarque : La préparation du milieu est répétée pour chaque sucre à testé.

11.4. Technique d'identification

- Répartir le milieu dans des tubes à essai, à raison de 9 ml par tube.
- Conditionner les tubes avec une cloche de Durham.
- Ensemencer le milieu avec une culture levurienne.
- Etiqueter chaque tube selon la souche correspondante.
- Porter les tubes à l'incubation à 30°C pendant 3 à 5 jours.
- Examiner les tubes chaque jour pour voir le pourcentage de gaz dégagé dans la cloche
(Audigie et al, 1983).

12. Caractérisation biotechnologique

12.1. Etude de l'activité enzymatique de la biomasse

La cinétique enzymatique de l'invertase est établie en utilisant des bandelettes de détection de glucose avec un lecteur approprié.

12.2. Préparation de l'enzyme

- Mettre en suspension 10 g de chaque souche dans 30 ml d'une solution d'hydrogencarbonate de sodium à 0,1 mol/l.
- Incuber 24 h à 40°C.
- Centrifuger, récupérer le surnageant et le diluer au 1/10 avec du tampon.

* Mesures

- Prépare une solution de saccharose 0,75 g/ 100 ml.
- Mettre 5 ml de tampon acétate pH = 4.6 dans les tubes à essai.
- Ajouter 1 ml de la solution de saccharose dans le premier tube. Dans les autres tubes placer 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0 ml de la solution de saccharose complété 1 ml avec le tampon.
- Faire de même pour les dilutions des autres substrats.
- Construire la courbe $V_i = (\text{Saccharose})$. La vitesse étant estimée ici comme la quantité de glucose.

- Pérée au cours de la phase stationnaire (**Didier ; 1997**).

12.3. Etude de la croissance des microorganismes par turbidimétrie

12.3.1. Protocole

- Passer l'ose à la flamme et ouvrir les boites contenant la colonie à prélever à proximité de la flamme.
- Laisser refroidir, l'ensemencer ou l'appliquer à l'intérieur de couvercle pour le refroidir plus vite puis prélever la colonie désirée. Refermer la boite, puis prendre le flacon contenant le milieu de culture liquide préalablement stérilisé.
- Enlever le bouchon, passer le goulot à la flamme. Déposer la colonie dans le liquide en imprimant un mouvement de rotation à l'anse entre les doigts.
- Repasser le goulot à la flamme et mettre un bouchon stérile.
- Agiter le flacon sur un vortex pour dissocier la colonie et mettre à incuber.

12.3.2. Application suivi de la croissance par turbidimétrie

Lorsqu'une population des microorganismes se développe en milieu liquide, le trouble du milieu est proportionnel à la concentration en cellules, un spectrophotomètre permet de mesurer l'absorption de lumière par suspension de cellules. Après avoir construit une courbe d'étalonnage donnant l'absorbance en fonction de la concentration en cellules. Avec une longueur d'onde de 640 nm (**Didier ; 1997**).

12.3.3. Etalonnage

- Faire une suspension de levures (1 g dans 100 ml du milieu qui sera utilisé pour la croissance des levures) et réaliser une numération sur lame pour connaître la concentration exacte.
- Faire une série de dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/10, 1/20) avec le milieu de culture dans des cuves standard.
- Mesure de l'absorbance de chacune de dilutions avec spectrophotomètre sans oublier d'agiter la cuve avant chaque mesure.

12.3.4. Suivi de la croissance

A intervalles réguliers, toutes les deux ou les trois heures, faire un prélèvement de 3 ml après avoir soigneusement agité le flacon de mesure de culture. Mesurer l'absorbance de chaque échantillon et déterminer la concentration en cellules graphiquement à partir de droite d'étalonnage pour chaque prélèvement. Construire la courbe exprimant la concentration en cellules en fonction du temps.

13. Caractérisation biotechnologique

13.1. 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 les produits de fermentation (dioxyde de carbone et d'éthanol). Cette réaction se déroule en milieu anaérobie (sans O₂):



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

*Remarque

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

13.2. Matériel biologique

- Peser 1 g de chaque souche levurienne sélectionnée après formation du tapis cellulaire sur la gélose dans les boîtes pétries.
- Dissoudre les levures dans un volume de 20 ml d'eau distillée.

13.3. Préparation d'une solution glucosée à 20%

- Peser précisément 20 g de glucose anhydre.
- Ajouter le glucose à 80 ml d'eau distillée dans un ballon jaugé de 100 ml.
- Chauffer la solution sur la plaque chauffante jusqu'à dissolution complète du glucose.
- Laisser refroidir à la température ambiante.
- Compléter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Transférer la solution dans un récipient de plus grand volume.
- Chauffer sur plaque chauffante jusqu'à ébullition.
- Laisser bouillir quelques minutes puis refroidir à la température ambiante.

13.4. Méthode

13.4.1. Préparation du montage

Le montage à été effectué selon le schéma suivant :

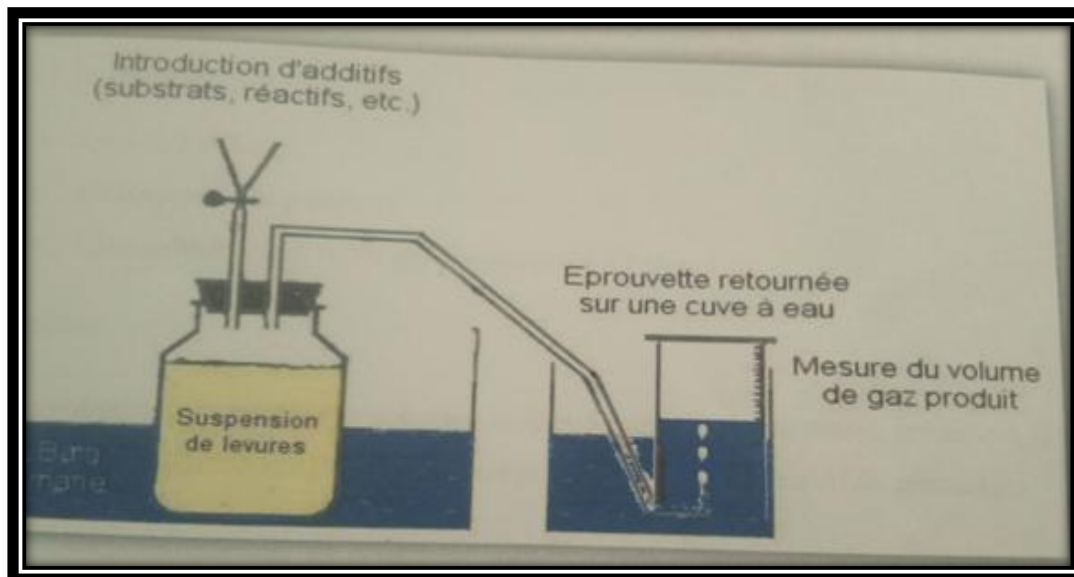


Figure n°35 : Dispositif de mesure du CO₂ produit permettant la collecte du gaz (Pol, 1996).

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

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

Etape 3 : Renverser l'éprouvette en immergeant son ouverture dans le cristallisateur, 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.

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

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

***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.

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

Etape 6 : Mettre en suspension 1 g de levures dans 20 ml d'eau distillée dans le ballon en verre.

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

Etape 8 : Verser 0,8 g de glucose dans le ballon et agiter jusqu'à dissolution complète de sucre.

Etape 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.

Etape 10 : Placer l'ampoule à décanter dans le 2^{ème} trou du bouchon et laisser le robinet ouvert pendant 15 min.

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

Etape 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

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**

Etape 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.

Etape 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 mole de gaz qui ont été produites.

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

Selon l'équation suivante : $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$, la fermentation alcoolique génère autant de moles de gaz que de moles d'éthanol. On en déduit donc que la fermentation produit : y' mole d'éthanol.

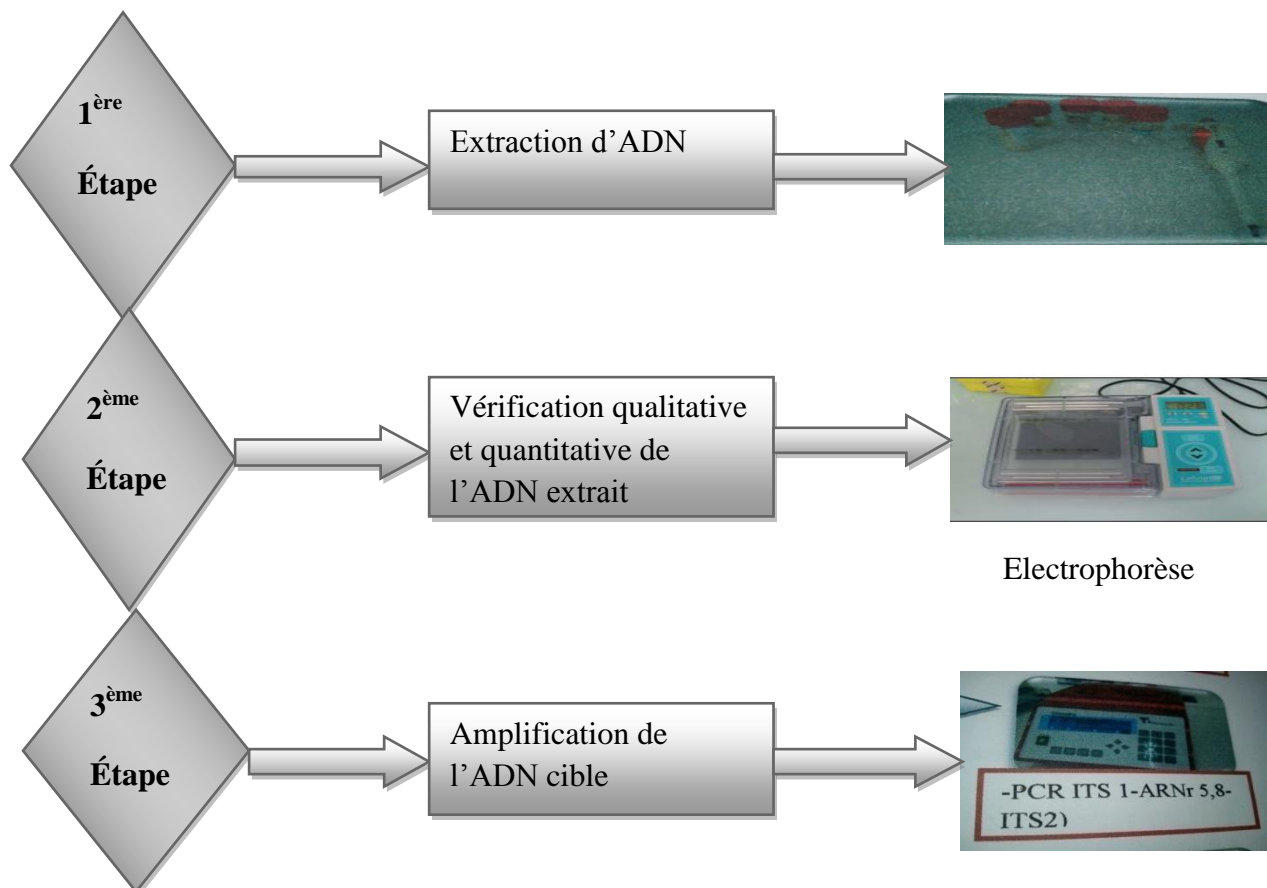
$y = y'$ Le même nombre de mole.

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

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

14. Identification moléculaire

Toutes les méthodes moléculaires débutent par l'extraction de l'ADN, cette étape est essentielle car la quantité de l'ADN microbien récupéré conditionne les deux étapes qui constituent la suite de l'analyse



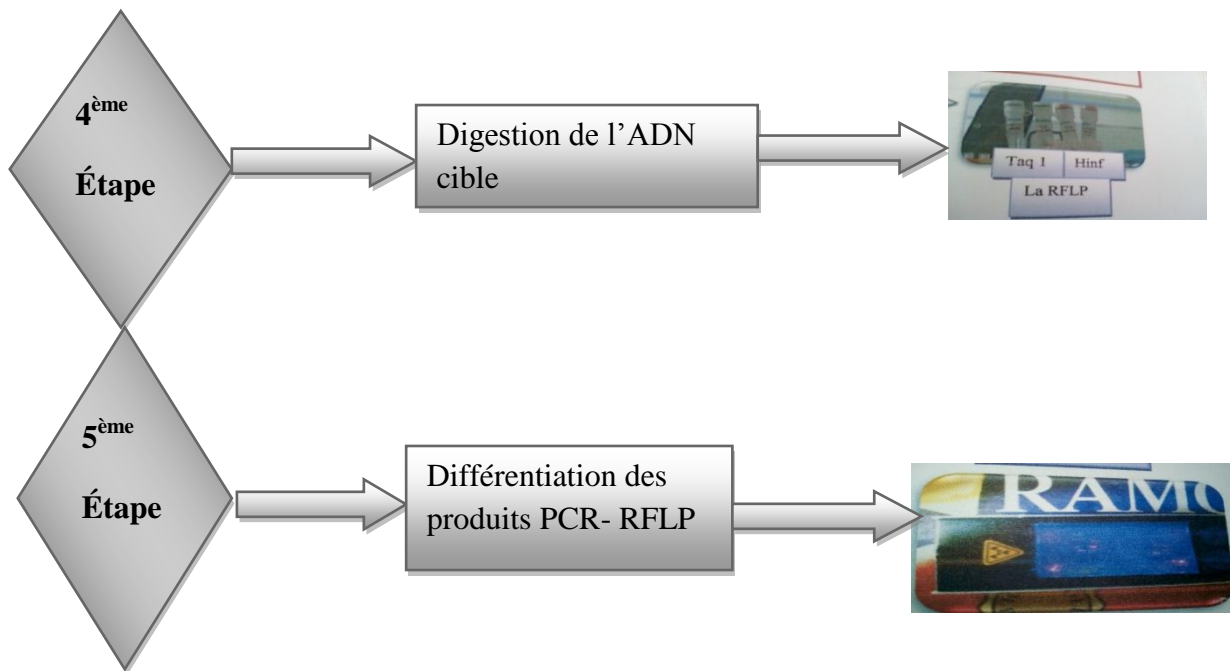


Figure n°36 : Schéma récapitulatif de notre étude moléculaire à partir des souches isolées.

14.1. Extraction d'ADN

L'extraction des acides nucléique est la première étape dans la plupart des études de biologie moléculaire. L'objectif des méthode d'extraction des acides nucléiques dans le cas présent est d'obtenir des acides nucléique non fragmentées tirés des souches levurienne dans le cas des cultures liquides afin de pouvoir mener une analyse précise en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (**Lipp, et al ; 2001**).. La quantité des acides nucléique compte parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR.

14.2. Méthode (protocole d'extraction de l'ADN Génomique des levures (selon l'IFV de Nantes)

- Inoculer une quantité des souches colonies isolées des boites à partir de la biomasse présente à la surface de la gélose YPG gélosé dans un volume de 1,5 ml de bouillon (YPG + chloramphénicol).
- Incuber à 25°C pendant 24 h.
- Centrifuger 10 minutes à 13 000 rpm.
- Récupérer le culot et éliminer le surnageant.
- Mélanger le culot obtenu avec 660 µl de mélange 50 TE/SDS/1 (tampon de lyse).
- Vortexer.
- Incuber à 65°C/5 min.
- Ajouter 340 µl d'acétate de potassium pour chaque microtube, (bien mélanger en inversant le microtube).

- Mettre au réfrigérateur (arrêté la réaction : acétate de potassium- tampon de lyse) jusqu'à ce que la suspension devienne semi- solide (30 minutes).
- Centrifugation 10 minutes à 13 000 rpm.
- Prendre 750 μ l de surnageant et mélanger avec 750 μ l d'isopropanol.
- Centrifuger à 13 000 rpm / 10 minutes.
- Eliminer le surnageant et rincer délicatement le culot d'ADN avec 120 μ l de l'éthanol 95%.
- Suspendre le culot dans 300 μ l de TE 1 X et placer 5 minutes à 65°C.
- Conserver au réfrigérateur (4°C).

14.3. Vérification qualitative et quantitative de l'ADN extrait

Le contrôle qualitatif et quantitatif des ADN extraits est réalisé avant chaque utilisation par plusieurs méthodes tel que :

La qualité et la quantité des ADN extraits est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (migration 30 minutes à 130 Volts). (**Filofteia, 2010**).

13.3. Amplification de l'ADN par la PCR

Le principe de la PCR repose sur la variation des températures afin d'amplifier l'ADN durant les cycles, après chaque cycle le nombre de copies de départ est doublé.

L'ADN extrait est mis en suspension dans un mélange réactionnel et transférer vers l'amplification (les étapes sont détaillées dans le tableau 03 :

Tableau (04) : programme PCR pour l'identification des levures

Amorces utilisées	Etape 1 Dénaturation initial		Cycle d'amplification			Etape 5 Elongation finale		Etape 6 refroidissement	
	Temps	T°C	Nombre De cycle	Temps	T°C	Temps	T°C	Temps	T°C
ITS1 Et ITS2	5 minutes	95°C	35	Etape2 Dénaturation 30 Sec	90°C	10 min	72°C	20H	4°C
				Etape 3 Hybridation 30 Sec	50°C				
				Etape 4 Elongation 1 min	72°C				

14.4.1. PCR-ITS-RFLP

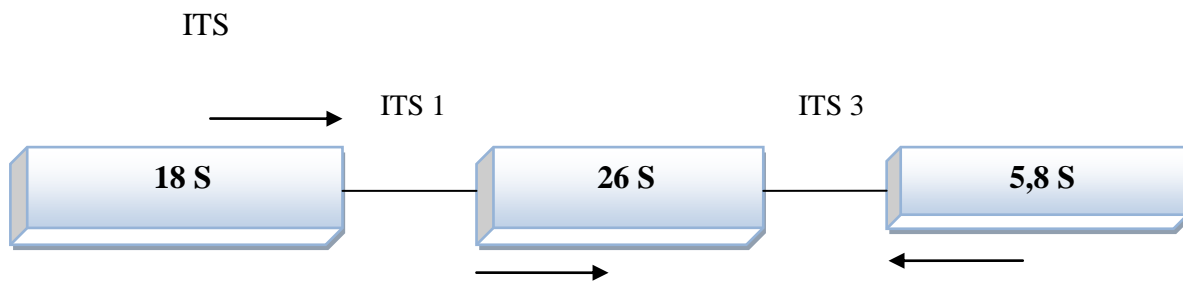


Figure n°37 : organisation des gènes codant les ARN ribosomiques.

14.4.2. Amplification de la région ITS

Préparation du mix ITS pour 30 échantillons :

- H2o destillé.....1120µl
- Tampon 10 X.....180µl
- DNTP.....70µl
- IST 1.....12, 8µl

ITS 4.....	12, 8μl
mgCl ₂	100μl
DMSO.....	3%
Taq AND polymerase.....	24μl
AND amplifié.....	3μ

D'après les constituent cites ci-dessus, la PCR-ITS nécessite deux amorces dont les séquences sont les suivantes selon **Polomska et al. 2007** :

-ITS 1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

-ITR 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3').

➤ Digestion enzymatique

Dans le but d'identifier les différentes espèces de levures. Les produits PCR-ITS sont traités par les enzymes de restriction qui reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques ou des motifs (le site de restriction). (**Renouf et al., 2006**). Deux enzymes ont été utilisées dans cette étude HinfI et TaqI.

La digestion enzymatique consiste à couper un double brin d'ADN en un point précis.

On parle d'endonucléases car elle coupe à l'intérieur au lieu de dégrader l'ADN à partir des extrémités libre (**Chantal ; 1996**). L'emploi de 3 enzymes de restriction (**HaeIII, Taq 1 et Hinf I**) sur les produits d'amplification de la région (**ITSI-ADNr5, 8S-ITSII**) a permis d'obtenir les profils RFLP selon le schéma.

14.4.3. Préparation du gel d'agarose 1,5%

L'électrophorèse a été effectuée sur gel d'agarose à 1,5%, qui est préparé de 3g de resorbor plus agar sous une agitation sur une plaque chauffante jusqu'à ce que sa couleur devient transparente. L'agarose est dissout dans du TBE 1X (TBE 10X DILU2 AU 1/10 ; Tris 107,8g /L, acide borique 55g /l et 7,44g/l d'EDTA) (**Perron, 2004**).

Dés le déclenchement de l'ébullition, l'agitation est arrêtée. 10μl du bromure d'éthidium est ajouté à l'agarose juste avant sa solidification afin de visualiser l'ADN sur un rayonnement ultra-violet (256nm).

14.4.4. Migration de l'ADN

14.4.4.1. Principe de la migration

L'ADN est déposé sur un gel d'agarose en présence d'un marqueur qui devient fluorescent lorsqu'il s'intercale dans l'ADN. L'ADN chargé négativement est attiré vers l'électrode +les mailles du gel d'agarose permettent de séparer les molécules en fonction de leurs tailles (**Lionnet et al, 2005**). Plus le réseau est moins dense, mieux les molécules de petites tailles seront séparées (**Ausubel.et al., 1989**).

14.4.4.2. Déroulement de la migration

La migration se déroule comme suit :

Après l'amplification de l'ADN extrait, il est additionné du bleu de bromophénol. Ensuite les échantillons ont été mis dans les puits du gel solide (précédemment préparé). A cette étape, le gel est placé dans la cuve à électrophorèse contenant la solution de TBE.

En outre, l'utilisation d'un standard interne (marqueur 100pb) dans chaque échantillon permet la comparaison d'échantillon issue de migrations différentes (**Janvier, 2007**).

Un voltage de 100volt est appliqué durant 55min jusqu'à ce que les bandes soient bien séparées les unes des autres. Les résultats sont observés sous l'**UV**.

*Remarque

1. pour la manipulation de l'électrophorèse avec du BET :

Une haute d'aspiration est obligatoire.

Pendant la manipulation le port des gants spéciaux est obligatoire avec accès interdit à toute personne étrangère non protégée.

2. pour la préparation du gel de migration et lors de l'électrophorèse, la manipulation sous hôte, aspirante est très recommandée.

Les levures isolées en septembre 2016 à partir de cépage de raisin de la variété Cinsault implanté dans les plaines de **Abdelmalek Ramdane** ont été purifiées par repiquages successifs. Cela a permis d'obtenir une collection de 5 souches de levures désignées comme suit :

- Ct (1j) Cinsault 19'
- Ct (2j) Cinsault 11'
- Ct (3j) Cinsault 25
- Ct (4j) Cinsault 31
- Ct (5j) Cinsault C

1. Etude effectuées sur les souches isolées du cépage Cinsault

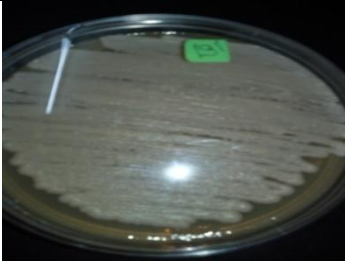
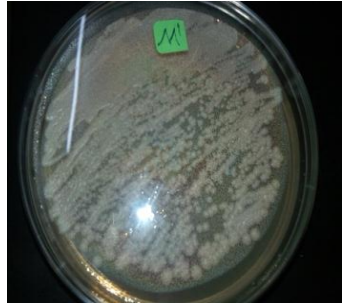



1.1. étude macroscopique

L'étude macroscopique effectuée sur les colonies de souches préalablement isolées nous a permis de faire une présélection basée essentiellement sur leurs 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 (tableau N°04).

1.2. Etude microscopique

L'observation au microscopique des lames effectuée sur les colonies des souches nous a permis de définir les formes : Sphérique, Ovoïdes, Allongées, Cylindriques, et le mode de reproduction : Monopolaire, Bipolaires par bourgeonnement.

Tableau n°05 : observation macroscopique des souches isolées de Cinsault

Souche	Forme	Aspect	Couleur	Odeur	Photos
Ct (1j) Cinsault 19'	arrondie	convexe	beige	Levure	
Ct (2j) Cinsault 11'	arrondie	Convexe	rougeâtre	Levure de boulangerie	
Ct (3j) Cinsault 25	ovoïde	lisse	rougeâtre	Levure de boulangerie intense	
Ct (4j) Cinsault 31	ovoïde	convexe	blanchâtre	Levure de boulangerie intense	
Ct (5j) Cinsault C	ovoïde	convexe	blanchâtre	Alcool	

2. Etude des caractéristiques morphologiques et physiologiques des souches isolées de cépage de cinsault

2.1. La souche 19' AMR

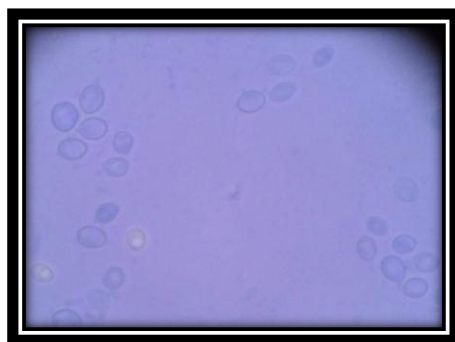
Les testes effectués sue cette souche peuvent être résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°06 : caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche 19' AMR

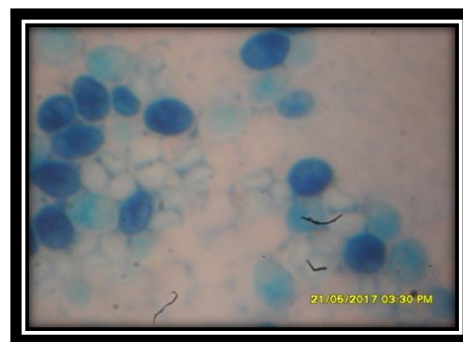
Caractères morphologiques	Forme végétative	Apicule
	Mode de reproduction	Bipolaire
	Filamentisation	-
	Sporulation	-
Test biochimique	Glucose	+
	Fructose	+
	Saccharose	-
	Lactose	-

La souche 19' à un aspect apiculé, ne forme pas de spores après le test de sporulation mais elle est apte à bourgeonner.

Elle a la capacité de fermenter le glucose et le fructose, par contre, elle ne fermente ni le saccharose ni le lactose.



(Sans coloration)



(Avec coloration)

Figure n °38 : photo montrant l'aspect microscopique, bourgeonnement de la souche 19' AMR

2.2. La souche 11' AMR

Les tests effectués sur cette souche peuvent être résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°07: caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche 11' AMR

Caractères morphologiques	Forme végétative	Cylindrique
	Mode de reproduction	Monopolaire
	Filamentisation	Pseudomycélium
	Sporulation	-
Test biochimique	Glucose	+
	Fructose	+
	Saccharose	-
	Lactose	-

La souche 11' AMR est de forme cylindrique, apte à bourgeonner et possède un pseudo mycélium.

Elle est capable de fermenter le glucose et le fructose, contrairement au saccharose et au lactose.

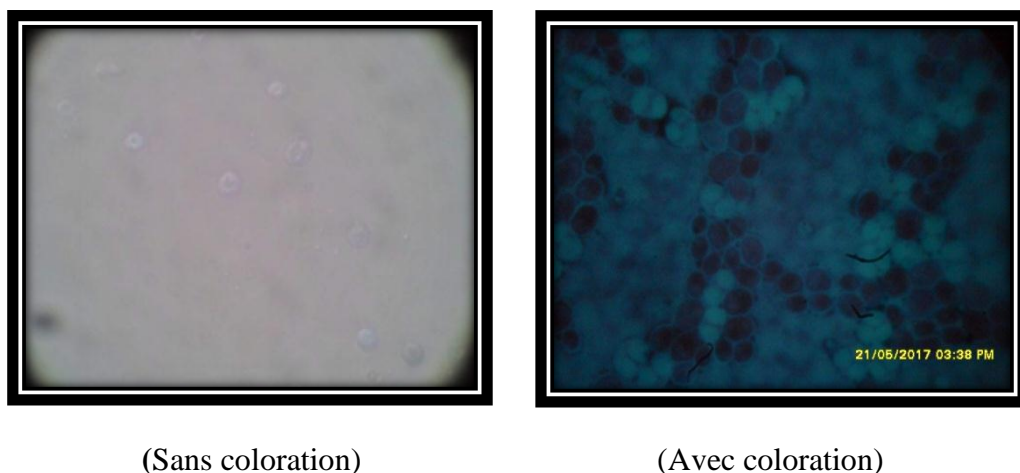


Figure n °39 : photo montrant l'aspect microscopique, bourgeonnement de la souche 11' AMR.

2.3. La souche 25 AMR

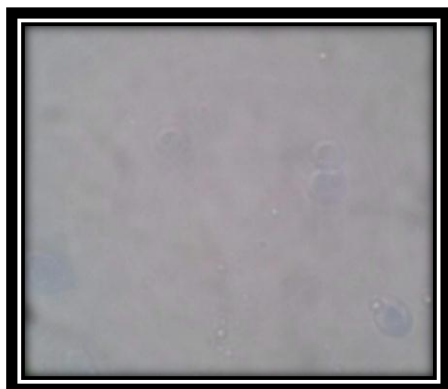
Les testes effectués sue cette souche peuvent être résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°08 : caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche **25 AMR**

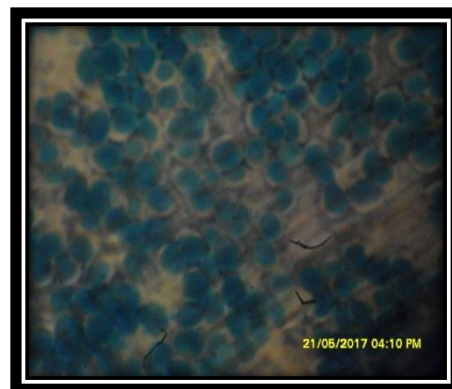
Caractères morphologiques	Forme végétative	Cylindrique
	Mode de reproduction	Monopolaire
	Filamentisation	Pseudo mycélium
	Sporulation	–
Test biochimique	Glucose	+
	Fructose	+
	Saccharose	–
	Lactose	–

La souche 25 AMR a une forme cylindrique, possède un mode de bourgeonnement monopolaire, elle est également dotée d'un pseudo mycélium.

Elle a la capacité de fermenter le glucose et le fructose mais pas le saccharose ni le lactose.



Sans coloration



avec coloration

Figure n °40: photo montrant l'aspect microscopique, bourgeonnement de la souche 25 AMR.

2.4. La souche 31 AMR

Les testes effectués sue cette souche peuvent être résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°09 : caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche **31 AMR**

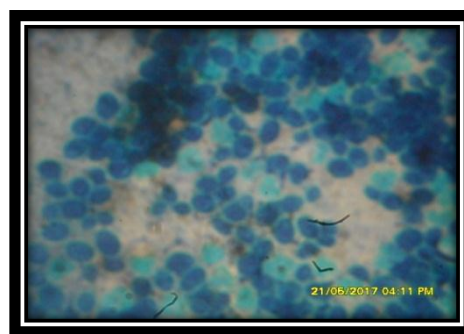
Caractères morphologiques	Forme végétative	Ovoïde
	Mode de reproduction	bipolaire
	Filamentisation	-
	Sporulation	-
Test biochimique	Glucose	+
	Fructose	+
	Saccharose	-
	Lactose	-

La souche 31 AMR est caractérisée par une forme Ovoïde. Les résultats des tests de filamentisation et de sporulation ce sont avérés négatifs.

Cette souche peut fermenter le glucose et le fructose, alors qu'elle ne fermente ni le saccharose ni le lactose.



(Sans coloration)



(Avec coloration)

Figure n °41 : photo montrant l'aspect microscopique, bourgeonnement de la souche 31 AMR

2.5. La souche C AMR

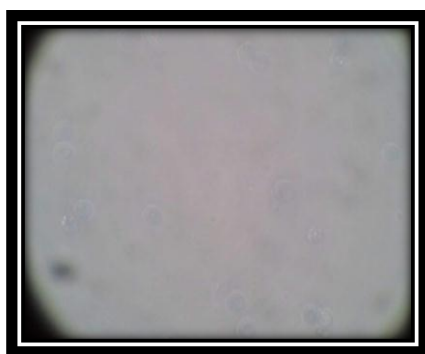
Les testes effectués sue cette souche peuvent être résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°10: caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche C AMR

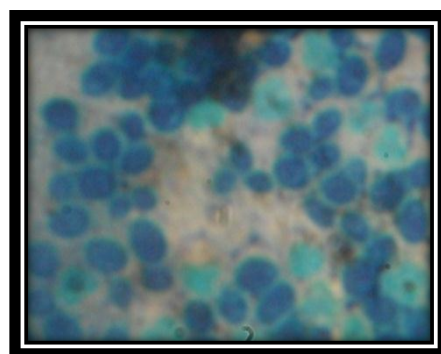
Caractères morphologiques	Forme végétative	Sphérique
	Mode de reproduction	–
	Filamentisation	–
	Sporulation	–
Test biochimique	Glucose	+
	Fructose	+
	Saccharose	–
	Lactose	–

La souche C AMR est caractérisée par une forme sphérique. les tests de filamentisation et de sporulation on donné des résultats négatifs.

Contrairement au saccharose et au lactose, cette souche n'a fermenté que le glucose et le fructose.



(Sans coloration)



(Avec coloration)

Figure n °42 : photo montrant l'aspect microscopique, bourgeonnement de la souche C AMR

3. Etude des caractères biochimiques des souches

3.1. Test de la fermentation des sucres

3.1.1. Glucose



Figure n°43 : Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures

3.1.2. Saccharose

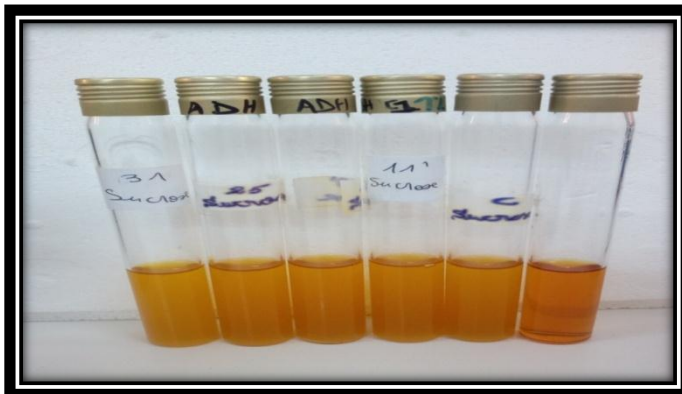


Figure n°44 : Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30 °C pendant 72 heures.

3.1.3. Fructose

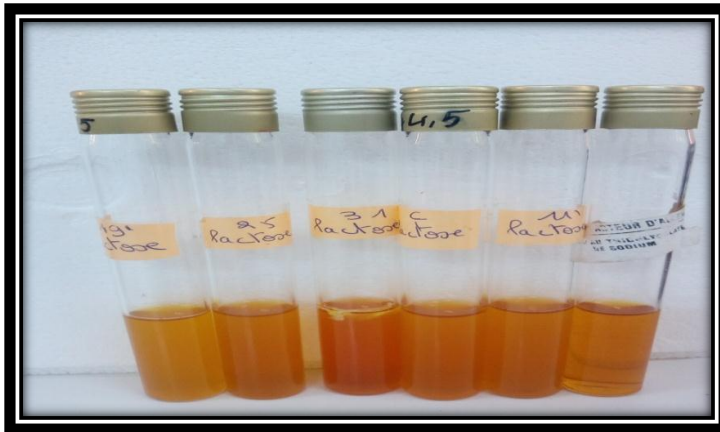


Figure n° 45: Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.

3.1.4. Sucrose

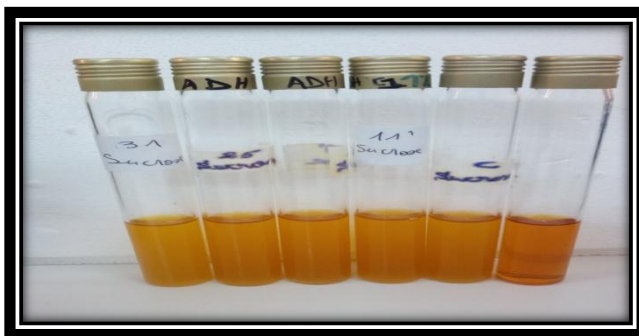


Figure n°46 : Observation des milieux ensemencés par les souches après l'incubation à 30°C pendant 72 heures.

3.2. Test d'assimilation des composées azotées

3.2.1. Assimilation de l'urée

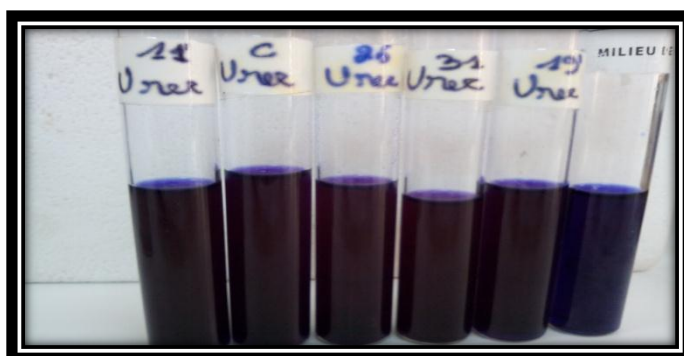


Figure n°47 : Observation de milieu d'assimilation de l'urée ensemencé par les souches après l'incubation à 30°C pendant 48 heures.

3.2.2. Assimilation de nitrate

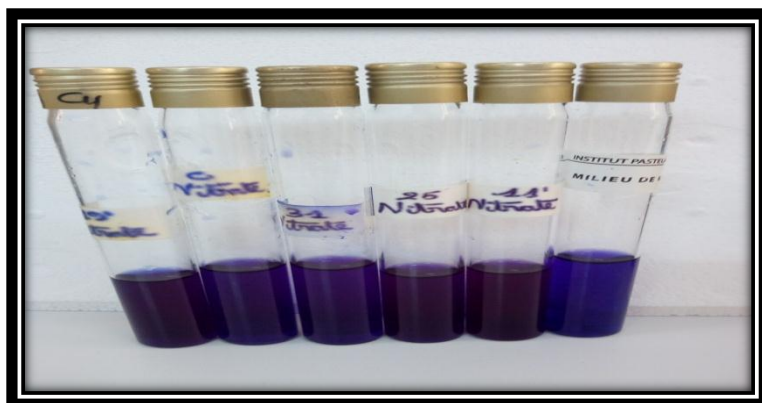


Figure n°48 : Observation de milieux d'assimilation de nitrate ensemencé par les souches après l'incubation à 37°C pendant 48 heures

Tableau n° 11: Résultats d'études des caractères biochimiques des souches isolées du Cinsault

La souche	19'	11'	25	31	C
Le sucre					
Glucose	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
L'urée	+	+	+	+	+
Nitrate	+	+	+	+	+

En observant les résultats 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, les 5 souches levuriennes assimilent les deux composés (nitrate et urée). Et cela veut dire qu'elle n'appartient pas à la catégorie se Saccharomycetaceae.

4. Etude des Caractères biotechnologique

4.1. Les résultats du test de la fermentation alcoolique

Les résultats de testes biotechnologique sur les cépages cinsault sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°12: 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 19'	16	$7,14.10^{-4}$	$7,14.10^{-4}$	29.9
Cinsault 11'	15	$6.69.10^{-4}$	$6.69.10^{-4}$	28.09
Cinsault 25	12.5	$5.58.10^{-4}$	$5.58.10^{-4}$	23.43
Cinsault 31	10	$4.46.10^{-4}$	$4.46.10^{-4}$	18.73
Cinsault C	18	$8.03.10^{-4}$	$8.03.10^{-4}$	33.72

Le test de fermentation alcoolique va nous permettre d'observer un pouvoir de fermentation remarquable chez la souche C en le comparant avec les autres souches.

Tableau n°13 : Les résultats 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 (μmol/l/min)
Souche 19'	0.033	0.071	71
Souche 11'	0,028	0.060	60
Souche 25	0,019	0.041	41
Souche 31	0.009	0.019	19
Souche C	0,71	1.536	1536

En se basant de la courbe d'étalonnage nous avons pu déterminer la concentration de sucre inverti (glucoses et fructose) libéré lors de la réaction enzymatique par les 5 souches de levures (Tableau n°13).

Chez la souche C on observe que le nombre de micromoles de saccharose hydrolysé par minute est très important, par rapport aux autres souches. Il est de l'ordre de 1536 μmol/l/min. donc on peut conclure qu'il existe une seule enzyme qui peut provoquer la dégradation de saccharose en glucose et fructose (invertase).

L'invertase est produite par une large variété des microorganismes parmi lesquels, on peut citer les levures appartenant aux genres (*candida*, *Saccaromyces*...), pour la dégradation de saccharose en glucose et fructose (Carlson. M et Botstein, 1982, Trumbly, 1986 ; Costagholi et al., 1985).

5. Etude moléculaire

5.1. Résultats de PCR-ITS-RFLP des isolats de levures isolés à partir de cépage Cinsault

Les espèces de levures isolées à partir du raisin Cinsault

05 isolats de levures ont été identifiés comme appartenant à 2 genres et 2 espèces) différents : *Pichia fermentans* (04 isolats) et *Torulasporea delbrueckii* (01 isolat) (**Tableau n°14**).

Tableau n°14 : Fréquences des espèces de levures isolées à partir du cépage Cinsault.

Source d'isolement	Espèces	Fréquences d'isolement (Nombre des isolats)
Cépage Cinsault	<i>Pichia fermentans</i>	04
	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	01

L'examen des résultats obtenus indique que 4 isolats de levures sélectionnées (**Cn₁**, **Cn₂**, **Cn₃**, **Cn₄**) appartiennent à l'espèce *Pichia fermentans* (tableau 14), selon le guide de détermination de l'IFV (2012). Le profil moléculaire de l'isolat (**Cn₅**), indique qu'il ressemble à l'espèce *Torulasporea delbrueckii*, selon le guide de détermination de l'IFV (2012).

Tableau n°15 : Taille en paires de bases des produits de PCR et des fragments de restriction obtenus avec deux endonucléases différentes (Hinf I et HaeIII).

Espèces	ITS total (pb)	Fragments de restriction (pb)	
		Hinf I	HaeIII
<i>Pichia fermentans</i> (Cn₁ , Cn₂ , Cn₃ , Cn₄)	450	250/200	340/90
<i>Torulasporea delbrueckii</i> (Cn₅)	800	410/380	800

L'étude macroscopique de cet isolat renferme des colonies rougeâtres, de petite taille, lisse. Et parallèlement, l'examen microscopique indique que cette levure est de forme ovale, (simple pseudomycélium peut être formé).

L'amplification de la région cible (ITS1 – ADNr 5,8 S – ITS2) est bien menée, malheureusement la restriction enzymatique est insuffisante avec une seule enzyme (Hinf).

Le catalogue officiel de comparaison de l'IFV exige au minimum deux enzymes, c'est pour cela que la confirmation d'appartenance de cet isolat à telle ou telle espèce reste ambiguë.

Par ailleurs, la combinaison des deux résultats (études morphologiques et moléculaires) indique que l'isolat (Cn₁, Cn₂, Cn₃, Cn₄) Appartiendrait approximativement l'espèce suivante *Pichia fermentas* et l'isolat (Cn₅) appartient à l'espèce *Torulaspota delbrueckii*.

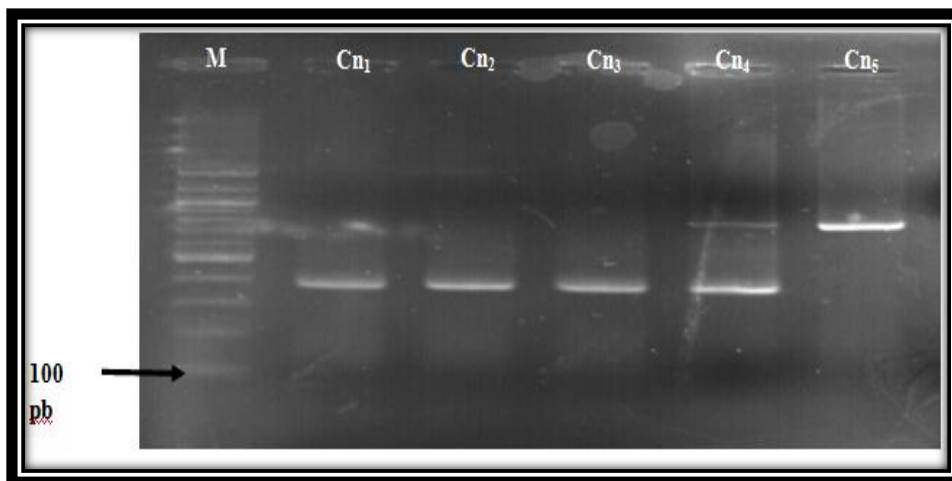


Figure n°49: Visualisation de la région (ITS-I-ADNr5, 8S-ITSII) amplifiée chez les 05 isolats de Cinsault.

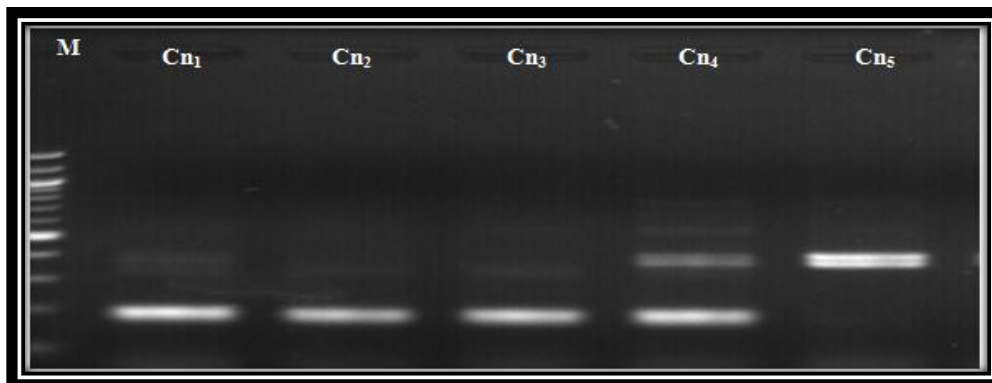


Figure n°50 : Visualisation de la région (ITS-I-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la Hinf I chez les 05 isolats de Cinsault.

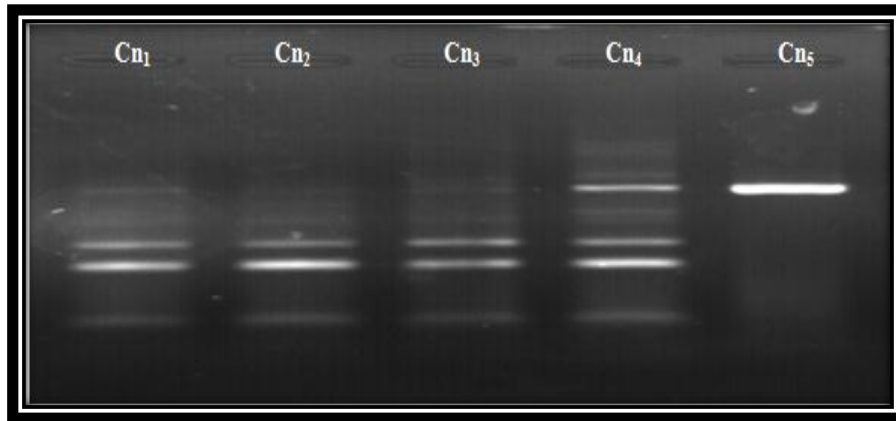


Figure n°51 : Visualisation de la région (ITS1-ADNr5, 8S-ITSII) digérée par la **HaeIII** chez les 05 isolats de Cinsault.

La discussion

Selon les caractères macroscopique et microscopique les levures sont caractériser par des forme « Cylindrique, sphérique, ovoïde ».

L'isolement des levures est effectué a partir du jus de raisin fermenté, une goutte du jus a été étalée sur les boites de pétrie contenant YPG.

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

Après l'incubation, la couleur blanche est observer chez toutes les souches, la forme des colonies ce varie d'une forme cylindrique sphérique et ovoïde un mode de reproduction monopolaire et bipolaire est observé chez les levures.

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

Conclusion

Les levures sont unicellulaires (certaines sont multicellulaires) comme les micro-organismes eucaryotes appartenant au royaume des champignons. La taille d'une levure peut varier considérablement selon les espèces, mesurant généralement 3-4 μm de diamètre. La plupart des levures se reproduisent de façon asexuée par un processus de division asymétrique appelé bourgeonnement. D'abord, il produit une petite protubérance sur la cellule parente qui grossit d'une très grande taille et forme un bourgeon. Le noyau de la cellule-mère se divise en un noyau fils et migre dans la cellule fille. Le bourgeon se détache du corps de la mère en formant un étranglement à la base.

Le bourgeonnement se répète pour former une chaîne de cellules de bourgeon. La cellule fille produite pendant le processus de bourgeonnement est généralement plus petite que la cellule mère..

Grâce à ces travaux personnels encadrés, une approche génétique a été développée pour un essai d'identification des souches isolées à partir des baies de raisin des cépages de la région d'Abdelmalek Remdane dans la wilaya de Mostaganem.

Une étude macroscopique et microscopique des souches de levures isolées nous a facilité la sélection des souches suivant leurs critères morphologiques.

L'identification des levures se fait avec la technique (PCR-RFLP) avec l'utilisation des enzymes de restrictions (Hae III, Hha I ou Cfo, Alu I, etc.) est indispensable avec un séquençage approprié pour diversifier l'analyse spécifique.

Au début de notre travail, on a mené avec réussite une méthode d'isolement et de conservation des levures extraites du raisin.

Afin de détecter les microorganismes pour étudier leur évolution des méthodes de biologie moléculaires plus rapides et efficaces, ce fait est ciblé directement les molécules d'ADN.

Suite à ces méthodes, d'autres méthodes ont été faites telles que les méthodes biochimiques ; fermentation des sucres, et biotechnologiques ; la fermentation des glucides et la production du gaz carbonique et l'alcool qui nous ont facilité la sélection des souches désirées, les plus productrices et qui ont le plus grand rendement parmi les souches étudiées.

Plusieurs techniques d'analyse très développées microbiologiques peuvent être faites pour l'identification des levures de raisin.

Conclusion

C'est dernière technique peuvent être automatisé a fin de traiter un grand nombre d'échantillons. Cependant, la mycologie des levures reste un domaine ou' de grandes inconnues subsistent, à cause de la diversité de la population levurienne, tant au niveau des processus biologiques que des microorganismes impliqués. Aujourd'hui, le couplage systématique des méthodes de microbiologie moléculaire à celles du génie des procédés permet toute fois de milieux comprendre et optimiser les procédés de traitement des levures.

Références bibliographiques

-A-

- **Aïae, 2009.** Outils enzymatiques du génie génétique.
- **Arnaud C. et Deluc J.M., 2007.** Le vin essence de vie. Ed. DIE. Paris. PP : 3.
- **Ayoub M.J., 2006.** Molecular and phenotypical diversities of autochthonous oenological *Saccharomyces cerevisiae* strains from Lebanon, thèse de doctorat en Microbiologie et Génétique Moléculaire. Ed. Institut National Agronomique Paris-Grignon.

-B-

- **Barbin P., 2006.** Contrôle et éléments de maîtrise de la contamination par la levure *Brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge, thèse de doctorat en Génie des Procédés et de l'Environnement. Ed. Institut National Polytechnique. Toulouse.
- **Beldjord, 2008-2009.** Cours de Biochimie et biologie moléculaire. Ed. Université Descartes. Paris.
- **Berrih-Aknin S., 2000.** PCR quantitative. Ed. Insem. PP : 10-12.
- **Bettane M., 2010.** Vin et vigne. Ed. Insem. PP : 15-20.
- **Blouin J., 2007.** Dictionnaire de la vigne et du vin. Ed. DUNOD. Paris.
- **Bouchet P., Guignard J.L. et Pouchus Y.F. 2005.** Les champignons mycologie fondamentale et appliquée. 2ème édition. Masson.
- **Boulouis H.J., Nadia Haddad et R. Maillard, 2001.** Techniques d'étude moléculaire des isolats : principe et fiabilité de, épidémiol, et santé anim., revue. PP : 39, 21-29.
- **Bourgeois C.M et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2. Ed. France. PP : 35-130.
- **Bouix M., Leveau J.Y. 1991.** Les levures *Ds* : Bourgeois C.M., Leveau J.Y. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 21 Lavoisier-Tec&Doc. PP : 206-2229.
- **Bouix M., Leveau J.Y. 1999.** Production des enzymes. In : Scriban R. (Ed) : Biotechnologie. Ed. Lavoisier. PP : 344.
- **Branas J., 2000.** Viticulture, Montpellier. Ed. DIE. Paris. PP : 15.

-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.
- **Chancrin J. 1996.** La viticulture moderne. PP : 425.
- **Carbonneau A., Deloire A. et Jaillard B., 2007.** La vigne : physiologie, terroir, culture. Ed. DUNOD. Paris. PP : 9-42.
- **Carlotti A., 2001.** Diagnostic Et Typage Moléculaire Des Micro-organismes d'Importance Industrielle. Ed. Nice.
- **Castellucci F., 2011.** Outils de la biologie moléculaire pour l'identification de la levure de la vinification *Saccharomyces cerevisiae* et d'autres espèces liées à la vinification.
- **Cézard F. 2009.** La biotechnologie en 28 fichiers. Paris.
- **Claude J., Kaplan M. et Delpech. 2007.** Biologie moléculaire et médecine, 3^{ème} édition. Paris.
- **Combacal C., 1982.** Comment vinifier pour que le consommateur puisse dire du vin. PP : 18-20.
- **Cornuel J.F., 2000.** Complexation d'un fragment de brin télomérique en C par des protéines de *Saccharomyces cerevisiae*. L'identification génomique aux **IMPDH**. Possible repliement en motifs de l'ADN complexé, thèse de doctorat en Biophysique. Paris

-D-

- **De Vroey C., 2002.** Extraction d'ADN, cours. Ed. Université Libre de Bruxelles.
- **Divol B., 2004.** Caractéristiques des souches de *Saccharomyces cerevisiae* responsables de refermentations, thèse de doctorat. Ed. Institut National de Polytechnique. Toulouse.

-F-

- **Filofteia C. 2010.** Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de bourgogne discipline : sciences de l'alimentation université de Bourgogne, institut universitaire de la vigne et du vin (institut jules guyot) 193. PP : 1-58.
- **Frédéric T., 2001.** Le grain de raisin. Article.
- **Frédéric T., 2001.** La fermentation alcoolique. Article.

-G-

- **Ghost L., 2008.** Electrophorèse sur gel d'agarose.
- **Guillaume G., 2001.** Bases scientifiques et technologiques de l'œnologie. Ed. Lavoisier. Paris. PP : 4-67.
- **Guiraud J.P., 2003.** Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD. Paris. PP : 651-655.
- **Guiraud J.P et Rose J.P. 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire AFNOR. PP : 228-235.

-H-

- **Hainque Bernard, Bruno B. et Philippe L. 2008.** Appareil et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, édition Lavoisier. Paris.
- **Hédalgo L., Jack B. et Jeane C. 2005.** Taille de la vigne, Paris. PP : 1.
- **Huglin P., 1986.** Biologie et écologie de la vigne. Ed. Payot Lausanne. Paris. PP : 11-36.
- **Huybens N., Mainil J. et Marlier D., 2009.** Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. Ed. Université de Liège. Belgique.

-I-

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

-J-

- **Janvier C., 2007.** Recherche d'indicateurs de la santé des sols, thèse de doctorat. Ed. Institut National Agronomique. Paris-Grignon.
- **Jacques K. et Simpore. 1999.** Cours de génie génétique. Science Vol. 286 .PP : 147.

-K-

- **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.

-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 (M. Sc.). Ed. Université Laval.
- **Larpent J.P., 1991.** Biotechnologie des levures. Ed. Masson. Paris. PP : 266-373.
- **Larpent J.P et Larpent-Gourgaud M. 1997.** Mémento technique de microbiologie. 3^{ème} édition, Lavoisier-Ted&Doc, Paris. PP : 217-240.
- **Larpent-Gourgaud M. et Sanglier J-J. 1992.** Biotechnologie. Principes et méthodes. Editions. Doin. Deren et Cie. PP : 569.
- **Le Folch V.B., 2002.** Remodelage de la chromatine et transcription : Étude d'un mutant du complexe RSC chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, thèse de doctorat. Paris.
- **Leclerc H., Meyer A. et Deiana J. 1995.** Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et techniques. Doin éditeurs, Paris. 73-92.
- **Levadoux L., 1971.** Ampélographie algérienne : cépages de cuve et de table cultivés en Algérie. Ed. SNED. France.
- **Lionnet T. et Croquette V., 2005.** Introduction à la biologie moléculaire.
- **Ludes B. et Mangin P., 1992.** Les empreintes génétiques en médecine légale. Ed. France. PP : 21-54.

-M-

- **Maftah A. et Julien R., 1999.** Biologie moléculaire, 2^{ème} édition. PP : 1-121.
- **Marlène COT. 2006.** Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol. Thèse en vue de l'obtention du DOCTORAT. De Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries. Spécialité : Microbiologie et Biocatalyse industrielle. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. France.
- **Moulessehoul S., 2006.** Biologie moléculaire. Ed. Alger. PP : 8-42.
- **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.
- **Navaree C., 2010.** Œnologie, 7^{ème} édition. Ed. France.

• **Ness., 1993.** Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. J ; Sci. Food Agric. PP : 89-94.

-O-

• **Oteng-Gyang K. 1984.** Introduction à la microbiologie dans les pays chauds. Ed. Lavoisier. Paris. PP : 43-46.

-P-

• **Pierre T. 2004.** Les organismes modernes. La levure, édition belin, Paris.

• **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.

• **Pol D. 1996.** Travaux pratiques de biologie des levures. Cellipse, édition marketing. 158. PP : 21-56.

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

• **Puch C. et Laurent B. 2000.** Les phénols de raisin et du vin.

-R-

• **Regnault J.P., 1990.** Microbiologie générale. Ed. Paris. PP : 271.

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

• **Renod J. 1950.** Biologie de vin 1^{ère} édition, 3^{ème} trimestre, universitaire de France.

• **Retoumard D., 2005.** Lavigne. Ed. Rustica. Paris. PP : 5.

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

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

• **Roland Marquet. 2008.** PCR (Polymerase Chain Reaction).

-T-

- Tchobanov L., David V., Bambalov G., Alexandre H. et Bénatier M.G., 2009. Diversité clonale de la flore de *Saccharomyces cerevisiae* de deux caves de la région de Plovdiv en Bulgarie : rôle dans la notion de terroir, revue des œnologues, n° 130. Ed. Université des techniques alimentaires de Plovdiv. Bulgarie.
- Tortora G.J., Funke B.R. et Case C.L. 2003. Introduction à la microbiologie. Edition du renouveau pédagogique. Canada. PP : 945.
- Turner P.C., Mc Lennan A.G., Bates A.D. et White M.R.H., 2000. L'essentiel en biologie moléculaire. Ed. Paris. PP : 174.
- Thuriaux P., 2004. Les organismes modèles la levure. Ed. Belin. Paris. PP : 15, 17, 23, 24, 27, 42 et 44.
- Tse C. et Capeau J. 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. Annales de biologie Clinique. PP : 279-293.

-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.

-W-

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

-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.

- Tchobanov L., David V., Bambalov G., Alexandre H. et Bénatier M.G., 2009. Diversité clonale de la flore de *Saccharomyces cerevisiae* de deux caves de la région de Plovdiv en Bulgarie : rôle dans la notion de terroir, revue des œnologie, n° 130. Ed. Université des techniques alimentaires de Plovdiv. Bulgarie.
- Tortora G.J., Funke B.R. et Case C.L. 2003. Introduction à la microbiologie. Edition du renouveau pédagogique. Canada. PP : 945.
- Turner P.C., Mc Lennan A.G., Bates A.D. et White M.R.H., 2000. L'essentiel en biologie moléculaire. Ed. Paris. PP : 174.
- Thuriaux P., 2004. Les organismes modèles la levure. Ed. Belin. Paris. PP : 15, 17, 23, 24, 27, 42 et 44.
- Tse C. et Capeau J. 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. Annales de biologie Clinique. PP : 279-293.

-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.

-W-

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

-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

Les produits utilisée durant le travail

Les milieux de cultures utilisés

✓ Préparation de la gélose YPG (Yeast Peptone Glucose)

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

PH= 6.8 à 25C° pendant 20min

✓ Composition de milieu Fowell

- Eau distillée **1000ml**
- Agar **20g**
- Acétate de sodium trihydraté **5g**

✓ Composition de milieu WICKERHAM

- Eau distillée **300 ml**
- Peptone pancréatique **3 g**
- Extrait de levure **3 g**
- Rouge de phénol **0,015g**
- Gentamicine 80 mg (Antibiotique) **0,06 g**

Remarque : On ajoute les différents sucres à une concentration de 6% dans chaque milieu. On les met dans tubes + la cloche de durham.

➤ Les réactifs utilisés pour l'identification moléculaire

Gel d'agarose

- Agarose + résorphor **1,5 g**
- TBE **100 ml**
- BET **10µl**

Annexes

➤ Réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN

✓ Préparation du 50 TE (tampon pour le ECP et la préparation du mélange 50 TE/SDS 10% à PH= 7,5

- EDTA 3,73 g
- Tris 3,03 g
- Eau bi-distillée 1000 ml

✓ Préparation du SDS

- SDS à 10% 2 g
- Eau bi-distillée 20 ml

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

- Tampon 50 TE
- 10% solution SDS

✓ Préparation de l'acétate de potassium 5 moi par litre (tampon pour l'extraction d'ADN)

- Acétate 98,14 g
- Eau bi-distillée 100 ml

• Réactifs utilisés pour l'électrophorèse

✓ Préparation du TBE 10 × à pH 8 (tampon pour préparer la TBE 1 ×)

TBE 1× = TBE 10× dilué au 1/10²

- Tris 107,80 g
- Borate 55 g
- EDTA 7,44 g
- Eau bi-distillée 1000 ml

✓ Composition du marqueur 100 pb

Dans le micro tube contenant 100 pb DNA Ladder, ajouter

- 100 µl du colorant bleu de bromophénole
- 900 µl de TE/ 1X

Annexes

➤ 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**

- 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
 - Pipette graduées
 - Support de tubes essai
 - Spectromètre
 - Solution de Glucose 2,5 mM (Mllimole)
 - Solution de fructose 2,5 m M
 - Solution de DNS (Acide 3,5 – Dinitrosalicylique).
 - Préparation de réactif à l'acide 3,5 Dinitrosalicylique (DNS).
 - Dissoudre 1 g de DNS dans 20 ml de soude (NAOH) 2 N
 - Ajouter doucement une solution de 30 g 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'arbi 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

Annexes

- Dissoudre de 1g de vert de malachite dans la solution de phénol.
- **Préparation de safranine**
- Dissoudre 500 mg de safranine dans 100 ml d'eau distillée.

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 caractérise des espèces de levures issues du cépage Cinsault récolté de la Ben Abdelmalek Ramdane wilaya de Mostaganem.

Nous avons effectué des tests microscopiques et macroscopiques, ainsi que d'autres tests de sporulation, aptitude à la filamentisation, 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.

Un protocole d'extraction d'ADN de même qu'une PCR-ITS-RFLP a été mise au point pour la région ITS 1-ADNr 5,8S- ITS2. Elle est assez sensible pour détecter la biodiversité des différentes espèces de levures isolées.

Mots clés : Levures indigènes, Raisin, Cinsault, Régions de Abdelmalek Ramdane (Mostaganem), ITS- PCR- RFLP.

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 Abdelmalak Ramdane wilaya of Mostaganem.

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

A DNA restriction en protocol as well as PCR- ITS-RFLP was developed for the rDNA ITS 1- 5,8S- ITS 2 region. It is sensitive enough to detect the biodiversity of different species of yeasts isolated.

Keywords: indigenous yeasts, grape, Cinsault, Regions and Abdelmalek Ramdane (Mostaganem), ITS- PCR- RFLP.

