



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم : الميكروبيولوجيا Microbiologie Département :

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Ecologie et environnement

Spécialité : *Ecologie microbienne*

Intitulé :

Caractérisation morphologique de la flore phyllosphérique du tronc de la vigne

Préparé par : *Khebbab Imene*
Ladjabi Sara

Le : 22/09/2021

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Mr. Kitouni Mahmoud	(Professeur- UFM Constantine)
Rapporteur :	Mr. Benhizia Yacine	(Professeur- UFM Constantine).
Co-encadreur :	Mme. Dekkiche Samia	(MCB- U Batna 2)
Examineurs :	Mme. Guergouri Ibtissem	(MAA - UFM Constantine).

Année universitaire
2020- 2021

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions « الله » qui nous a aidé à avoir la patience, le courage, la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail, atteindre notre but et réaliser ainsi notre beau rêve.

Au terme de ce travail, il nous est agréable d'exprimer notre profonde reconnaissance et notre gratitude aux personnes qui ont contribué à faciliter notre tâche et la mener à terme. Par ailleurs je tiens à remercier:

Notre encadreur **Monsieur Benhiza Yacine**, Professeur à l'université des frères Mentouri 1 Constantine, Notre promoteur, qui nous a encadrées tout au long de ce travail en nous faisant bénéficier de ses connaissances scientifiques et de ses conseils. Nous lui exprimons notre profonde gratitude pour l'aide qu'il nous a fournie afin de réaliser ce travail. Merci de la confiance que vous nous avez accordée, de votre soutien, et de votre humanité, espérant avoir été à la hauteur.

Madame Dekkiche Samia Maître de conférences à l'université de Batna 2 pour son long déplacement, son aide, ses critiques et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Monsieur Kjtouni Mahmoud, Professeur à l'université frères Mentouri 1 Constantine, pour avoir bien voulu accepter la présidence de notre jury. Nous avons eu l'honneur d'être parmi vos élèves et de bénéficier de votre riche enseignement. Vos qualités pédagogiques et humaines sont pour nous un modèle. Votre gentillesse, et votre disponibilité permanente ont toujours suscité notre admiration. Qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect.

Madame Guergouri Ibtissem Maître Assistante à l'université des frères Mentouri 1 Constantine de bien vouloir accepter d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier plus particulièrement **Monsieur Nabil** directeur de l'établissement Younes Abdallah de nous avoir reçus à plusieurs reprises et de nous donner toutes les informations dont nous avons eu besoin au sein de son champ de vignoble.

Nous voudrions remercier aussi l'ingénieure **Houda** du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC), Chaab Ersas université des frères Mentouri Constantine pour sa patience et son aide précieux

Tous les enseignants qui nous ont enseigné, depuis le primaire jusqu'au supérieur.

Le corps enseignants et administratifs du département de microbiologie de l'université des frères Mentouri 1 Constantine.

Et enfin à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce modeste travail, qu'ils trouvent à travers ce document l'expression de notre infinie gratitude, puisse Allah les combler de tous ses bienfaits.

Merci

Dédicace

A mes parents pour leurs sacrifices, soutien moral, tendresse, et encouragements tout au long de mes études et durant ce mémoire, ils m'ont offert tout pour que je réussisse, je ne les remercierais jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont fait, j'espère qu'ils sont fiers de moi :

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral, source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir,
Mon père **Khebbab Saleh**.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; Maman que j'adore **Laib Guemra** , je l'a remercie de m'avoir donné tant d'amour et de tendresse.*

*Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers mes frères **Amine et Mohamed** qui m'ont donné l'amour et le courage de surmonter toutes les épreuves.*

*A mes nièces **Kodes Rahef et Cham** qui réussissent à me procurer l'énergie et une parfaite relaxation, joie et harmonie.*

*A toutes ma famille entière (**khebbab et laib**).*

*Madame **Samia Benhamiche** de m'avoir soutenue, aidé et encouragé.*

*A ma copine **Aida** pour ses encouragements permanents, et son soutien moral.*

*A tous mes amies et mes collègues (**Islem, Chiraz, Lina, Aya, Mayssoune, Ikram, Malek Et Rayene**) je les remercie infiniment pour leurs soutiens et leurs encouragements.*

*A ma binôme **Sara** pour son soutien surtout moral.*

Imene

Dédicace

A mes parents, présents tout au long de la réalisation de ce travail.

*A ma chère sœur **Dalila** qui n'a cessé de m'encourager aussi de supporter mes humeurs lors des moments de stress et de fatigue.*

*A mon adorable et cher petit frère **Yahia** de qui je me ressource de courage et d'envie de travail.*

*A ma chère binôme et collaboratrice **Chicha** avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.*

*Ce travail est dédié également à la mémoire de mon défunt grand-père **Benazzouz Mohamed Larbi** homme de culture et savoir, qui est devenu mon maître et mon exemple.*

Sara

Résumé

Cette étude a pour but de caractériser et d'essayer d'identifier la flore phyllosphérique du tronc de la vigne (*Vitis Vinifera*), notamment la population bactérienne se trouvant à ce niveau. Pour réaliser ce but, des troncs de la vigne de la variété « red globe », ont été collectés d'une façon stérile à partir d'un vignoble se trouvant à El-Harrouch, willaya de Skikda. Les techniques de caractérisation et d'identification utilisées sont basées sur une analyse phénotypique. Pour la vérification de la présence bactérienne nous avons utilisé un antifongique et pour réaliser l'analyse microscopique nous avons utilisé une coloration de Gram et une coloration avec le bleu de méthylène. Le résultat montre la présence d'une diversité microbienne en générale et bactérienne en particulier sur la surface du tronc de la vigne. Quatre genres de Gram positif sont soupçonnés être présents: les genres *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* qui ont montré la forme en coque et le genre *Streptobacillus* montrant une forme en bacilles. Ces résultats devraient être confirmés par des techniques plus poussées comme celles s'appuyant sur la biologie moléculaire.

Mots clés: *Vitis Vinifera*, tronc de la vigne, analyse phénotypique, phyllosphère, bactéries épiphytes.

Abstract

The aim of this study is to characterize and try to identify the phyllo spherical flora of the trunk of the vine (*Vitis Vinifera*), in particular the bacterial population found at this level. To achieve this goal, trunks of the vine of the variety "red globe", were collected in a sterile way from a vineyard located at El-Harrouch, willaya of Skikda. The characterization and identification techniques used are based on phenotypic analysis. For the verification of the bacterial presence we used an antifungal agent and for the microscopic analysis we used a Gram stain and a stain with methylene blue. The result shows the presence of microbial diversity in general and bacterial diversity in particular on the surface of the vine trunk. Four Gram-positive genera are suspected to be present: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* which showed the shell form and *Streptobacillus* genus showing a bacillus form. These results should be confirmed by more advanced techniques such as those relying on molecular biology.

Key words: *Vitis Vinifera*, grapevine trunk, phenotypic analysis, phyllo-sphere, epiphytic bacteria.

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو الوصف و محاولة التعرف على البيئة الميكروبية النباتية لجذع الكرمة *Vinifera Vitis* ، و لا سيما البكتيريا الموجودة في هذا المستوى . و لتحقيق هذا الهدف تم جمع جذوع الكرمة من صنف "Globe Red" بطريقة معقمة من كروم الحروش بولاية سكيكدة . تعتمد تقنيات الوصف و التعريف المستخدمة على تحليل النمط الظاهري للتحقق من وجود البكتيريا، استخدمنا عاملا مضادا للفطريات و للتحليل المجهرى كما استخدمنا ايضا تلوين Gram و التلوين باستخدام الميثيلين الازرق . تظهر النتيجة وجود تنوع جرثومي بشكل عام و بكتيري بشكل خاص على سطح جذع الكرمة . يشتهر في وجود اربعة أجناس موجبة Gram : أجناس *Streptococcus* و *phylococcus* و *Micrococcus* التي أظهرت شكل الصدفة و الجنس *Strepto bacillus* الذي يظهر شكل عصيات . يجب تأكيد هذه النتائج من خلال تقنيات أكثر تقدما مثل تلك القائمة على البيولوجيا الجزيئية

الكلمات المفتاحية: *Vinifera Vitis* ، جذع العنب ، تحليل النمط الظاهري ، الغلاف الجوي ، البكتيريا المشاشية

Liste des abréviations

°C : Température en degrés

SAF : Sans antifongique

AF : Antifongique

BN : Bouillon nutritif

GN : Gélose nutritive

Min : Minutes

Rpm : Rotation par minute

SAU : Surface agricole utilisée

µl : Microlitre

Liste des figures

Figure n°1: Morphologie du cep de vigne (Petit,2008).....04

Figure n°2 : Racines de la vigne (Cliché Khebbab ,2021)..... 05

Figure n°3: Tronc de la vigne (Cliché Khebbab, 2021).....05

Figure n°4: Rameaux de la vigne (Cliché Khebbab, 2021).....06

Figure n°5: Feuilles de la vigne (Cliché Khebbab, 2021).....06

Figure n°6 : Organisation des bourgeons de la vigne (Hidalgo, 2008).....07

Figure n°7 : Bourgeons de la vigne (Cliché Khebbab, 2021).....08

Figure n°8 : Fleur de la vigne (Mahboub, 2017).....08

Figure n°9: Grappe de vigne (Cliché Khebbab, 2021).....09

Figure n°10 : Représentation graphique du cycle végétatif, reproducteur et d'aoûtement de la vigne (Hidalgo, 2008).....10

Figure n°11 : L'habitat phyllosphérique : le phylloplan (Vorholt, 2012)16

Figure n°12 : Photo satellite du vignoble de l'établissement Younes Abdallah (a: Google earth, 2021, b: Cliché Khebbab, 2021).....17

Figure n°13 : arbres (a) et Grappes (b) de cépage Red Globe (Cliché Khebbab, 2021).....18

Figure n°14 : Schématisation des points de prélèvement.....18

Figure n°15: prélèvement des troncs (Cliché Khebbab, 2021)19

Figure n°16: Préparation de la solution mère de l'échantillon (Cliché Khebbab, 2021).....20

Figure n°17 : Préparation des dilutions (Cliché Khebbab, 2021).....21

Figure n°18 : Etalement des souches sur GN (Cliché Khebbab, 2021).....21

Figure n°19 : Aspect macroscopique des cultures bactériennes sur gélose nutritive après 48 h d'incubation.....24

Figure n°20 : nombre des trois colonies (jaune, blanche et orange) sur la GN après 48 h ...
.....26

Figure n°21: Aspect macroscopique des cultures bactériennes sur gélose nutritive après 5 jours d'incubation.....28

Figure n°22 : abondance colonies obtenues selon leur couleur et selon les dilutions.....29

Figure n°23 : Aspect macroscopique des cultures bactériennes contenant ou non l'anti fongique sur gélose nutritive après 5 jours d'incubation.....32

Figure n°24 : Observation microscopique a partir des colonies obtenues de la solution mère (SM), après coloration de Gram a: colonie jaune, b: colonie orangé, c: colonie blanche...
.....33

Figure n°25 : Observation microscopique de la dilution (10^{-1}), après coloration de Gram.....34

Figure n°26: Observation microscopique a partir du tapis présent a la dilution 10^{-2}
(1).....35

Figure n°27: Pourcentage de type d'isolats obtenus.....35

Liste des tableaux

Tableau n°1: Position taxonomique de la vigne (Mahboub, 2017).....03

Tableau n°2 : Aspect des colonies trouvées sur gélose nutritive après 2 jours d’incubation
.....25

Tableau n°3 : Caractères morphologiques des colonies trouvées sur gélose nutritive après 5
jours d’incubation.....27

Tableau n°4 : Croissance des cultures bactériennes sur le bouillon nutritif30

Tableau n°5 : Aspect macroscopique des cultures bactériennes sur gélose nutritive avec et
sans l’antifongique après 5 jours d’incubation.....31

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

الملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Partie I. Revue bibliographique

Introduction	01
I. Caractéristiques générales de la vigne	03
1 . Systématique et taxonomie	03
2 .Description botanique	04
2.1 . Système racinaire de la vigne.....	04
2.2. Système aérien de la vigne.....	05
2.2.1 .Le tronc	05
2.2.2 . Les rameaux.....	06
2.2.3. Les feuilles	06
2.2.4. Les bourgeons.....	07

2.2.5. Les fleurs.....	08
2.2.6. Le fruit.....	09
3. Cycles de développement de la vigne.....	09
3.1. Le cycle végétatif.....	10
3.2. Le cycle reproducteur	10
3.3. L'aoutement.....	10
4. La vigne en Algérie	11
II . Microbiologie et écologie de la vigne.....	12
1. Microbiologie de la vigne	12
2 . Les facteurs influençant sur les communautés microbiennes de la vigne.	12
3 . Ecologie de la vigne.....	13
3.1 . Le climat.....	13
a . Température.....	13
b . Ensoleillement.....	13
c . Précipitations.....	13
3.2 . Le sol.....	14
3.3 . Cépages	14
III . Caractérisation de la pyrosphère.....	15
1 . Généralités sur la phyllosphère.....	15
2 . L'écosystème phyllosphérique	15
2.1 . Habitat phyllosphérique	15

2.2 . Microorganisme de la phyllosphère	16
---	----

Partie II. Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I. Site et outils de travail	17
1. Caractérisation du site de prélèvement	17
2. Matériel biologique.....	18
II. Obtention des échantillons et préparation des solutions pour analyse	18
1 .Prélèvement des échantillons.....	18
2. Conservation des échantillons.....	19
3. Préparation des solutions d'échantillons pour analyse	19
3.1 : Préparation de la solution mère d'échantillon.....	19
3.2Préparation des dilutions de l'échantillon	20
III. Isolement de la flore microbienne.....	21
1. Mise en évidence des microorganismes totaux sur milieu gélosé..	21
1.1. Mise en évidence des bactéries.....	21
1.2. Identification des isolats.....	22
a. Analyse macroscopique.....	22
b. Analyse microscopique.....	22

Résultats et discussion

I. Mise en évidence d'une diversité bactérienne à la surface du tronc de la vigne....	23
1. Analyse des isolats obtenus sans l'antifongique (ATF).....	23

1.1. Examen macroscopique après 48h d'incubation.....	23
1.1.1. Caractérisation morphologique des isolats.....	23
1.1.2. Dénombrement des colonies.....	25
1.2. Examen macroscopique après 5 jours d'incubation.....	26
1.2.1. Caractérisation morphologique	26
1.2.2. Dénombrement des colonies	28
2. Examen macroscopique avec un antifongique.....	29
2.1. Croissance sur bouillon.....	29
2.2. Croissance sur milieu gélosé.....	31
II. Caractérisation phénotypique des types bactériens obtenus sur la surface du tronc de vigne	32
1. Examen microscopique.....	32
1.1. Caractérisation des isolats après coloration de Gram.....	33
• Cas de la suspension mère (SM).....	33
• Cas de la dilution (10^{-1}).....	33
1.2. Coloration avec le bleu de méthylène.....	34
2. Abondance des types bactériens obtenus.....	35
3. Affiliation bactérienne estimée en genre	35
Discussion générale	36
Conclusion	39
Références bibliographiques	40

Annexes

Introduction

La vigne est l'une des plus anciennes cultures d'Afrique du Nord et surtout de l'Algérie. Dans ce pays, on compte 97 000 hectares de vignes plantées, représentant 12 % des plantations totales. En superficie, c'est la quatrième culture pérenne et le deuxième poste d'exportation (Mahboub, 2017).

La viticulture est un peu partout à travers le pays algérien. Au niveau de l'Ouest, Tlemcen, Sidi Bel Abbés et Ain Témouchent sont les principales régions productrices de la vigne. A l'Est, Skikda et Bejaia sont les principales régions, et au centre se sont les collines de Sahel, Blida, Médéa, Mitidja et la Kabylie qui sont riches en cette culture (Mahboub, 2017). Les facteurs climatiques et pédologiques favorables de ce pays expliquent la richesse de l'encépagement de la viticulture algérienne (Mahboub, 2017).

Le tronc de la vigne et ses bras représentent le système d'alimentation en eau et en nutriments des sarments et des feuilles ; ils agissent comme une batterie et une réserve pour la vigne (Guilherme, 2013).

Les plantes constituent un micro-écosystème complexe, qui contient un large éventail de micro-organismes tels que: les bactéries, les champignons, les archées et les protistes, qui peuvent coloniser divers organes et tissus des plantes. Les microorganismes liés aux plantes peuvent affecter positivement ou négativement les cultures. Certains d'entre eux favorisent, la croissance, la protection et la survie des plantes (Guilherme, 2013) et d'autres affectent la santé des cultures car ils peuvent inhiber la croissance des plantes ou stimuler la colonisation des agents pathogènes dans les tissus des plantes (Guilherme, 2013).

Jusqu'à présent, la recherche sur les bactéries liées à la vigne, s'est principalement concentrée sur les agents pathogènes qui causent des maladies des plantes telles que la maladie de Pierce causée par la sous-espèce *Xylella fastidiosa subsp. fastidiosa*, la galle du collet causée par *Agrobacterium tumefaciens* et la brûlure bactérienne causé par *Xylophilus ampelinus*. Le nombre d'études qui s'intéressent aux bactéries endophytes et épiphytes a effet positif et s'associant à la vigne semble être faible par rapport au nombre de celles travaillant sur les pathogènes. Il s'agit des bactéries du sol qui peuvent s'installer à l'intérieur (endophytes) ou sur les parties aériennes des plantes (épiphytes), y compris les feuilles et les fruits (Compant, 2010).

Le peu d'études qui se sont concentré sur les bactéries endophytes de la vigne, ont montré que les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* peuvent être utilisés comme agents de

contrôle biologique des maladies et stimuler la croissance et la santé de la vigne et d'autres plantes. Dans une autre étude récente, s'intéressant aux bactéries épiphytes et utilisant une analyse de séquence à haut débit de l'ARNr 16s, Leveau et Tech (2011), ont signalé la présence d'une variété de bactéries liées aux feuilles et aux raisins, qui appartiennent à des espèces connues et qui ont montré une activité significative contre les agents pathogènes de la vigne et pourraient stimuler des facteurs de croissance pour cette plante. Parmi les composants de la diversité bactériennes sont ceux appartenant aux genres *Streptococcus* et *Micrococcus* (Guilherme, 2013),

Aussi certaines bactéries lactiques et acétiques ont été détectées dans le sol des vignobles (Yanagida, 2008). Ces résultats indiquent que le sol du vignoble peut être la source de l'inoculum primaire, qui peut participer à la structure de la communauté microbienne aérienne de la vigne. Cependant, il n'y a pas eu d'étude comparative antérieure sur la structure des communautés bactériennes dans les parties de la vigne et le sol. Par conséquent, il est difficile d'évaluer le potentiel des communautés microbiennes liées aux plantes et au sol à coloniser les baies de raisin (Guilherme, 2013).

La surface de la baie de raisin représente le réservoir naturel du microbiote bactérien, qui a divers effets sur la qualité hygiénique des raisins (Nisiotou , 2011). Malgré son importance, la diversité des bactéries épiphytes sur les baies de raisin est encore mal connue, de même que le rôle des plantes et d'autres parties du sol du vignoble dans la colonisation bactérienne.

L'objectif de notre travail est la mise en évidence d'une diversité microbienne en générale et bactérienne en particulier, sur la partie aérienne du tronc de la vigne en Algérie et l'identification phénotypique des bactéries épiphytes trouvées à ce niveau.

Ce présent travail est structuré en deux parties principales, la première donne une revue bibliographique sur la vigne en générale ainsi que des informations concernant sa microbiologie, son écologie et la caractérisation de sa phyllosphère. La deuxième partie est expérimentale, elle est articulée en plusieurs points. Le premier décrit les outils et les méthodes utilisés dans ce travail. Le deuxième expose les résultats obtenus avec leur interprétation et discussion et enfin le troisième point donne une synthèse de notre travail sous forme d'une conclusion, terminée par les perspectives qui pourraient être souligné.

partie 01 :

Revue

bibliographique

I. Caractéristiques générales de la vigne

1. Systématique et taxonomie

La vigne est un arbre fruitier appartenant aux Vitaceae qui eux même appartiennent aux lianes représentant d'une grande famille. Les lianes sont des plantes vivaces appartenant aux angiospermes dicotylédones de la famille des Rhamnaceae et Vitaceae. Ce sont des arbustes grimpants, comme les vignes, dont les tiges sont généralement multipétalées mais parfois herbacées avec des vrilles sur la face opposée des feuilles. La famille des raisins compte 19 genres et des milliers d'espèces qui ont été trouvées particulièrement en Amérique, en Asie, en Afrique et en Océanie (Galet, 2000).

Parmi ces genres, seuls les plantes donnant le raisin sont utilisées en agriculture car c'est le seul fruit pouvant être produit pour la consommation humaine. Le genre donnant le raisin auquel appartient la vigne (*Vitis*) est divisé en deux groupes :

- groupe « raisin » appropriée, ou « vraie vigne » ;

-groupe "*Muscadina*", représenté surtout par l'espèce *Vitis ampelopsis* (Chauvet et Reynier, 1979).

L'espèce la plus connue et la plus cultivée de la vigne est représenté par l'espèce *Vitis vinifera* que ce soit au niveau nationale ou internationale, car il est le seul à produire des fruits consommables par l'Homme (Bertrand, 2016)

Selon Mahboub (2017) la vigne cultivée appartient à la classification suivante (tableau 01)

Tableau n °1: Position taxonomique de la vigne (Mahboub, 2017)

Règne	Plantae
Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Archichlamydées
Ordre	Rhamnales
Famille	Vitacées
Genre	Vitis
Espèce	Vitis vinifera

2. Description Botanique

La vigne, est divisée en deux parties: un système aérien et un système racinaire. Ce dernier colonise le sol et le sous sol tout au long de son cycle de vie, il est représenté par des petites et jeunes racines (Attrouz. 2014). La partie aérienne est formée par le tronc, les bras et les branches, ainsi que les feuilles, le fruit et les vrilles (Hidalgo, 2010). Le tronc est divisé en des bras, portant des bois taillés, qui peuvent être longs ou courtes. Ces bois appelés rameaux, portent un ensemble de bourgeons et de feuilles (Figure 1) (Girard, 2007 et Retournard, 2003).

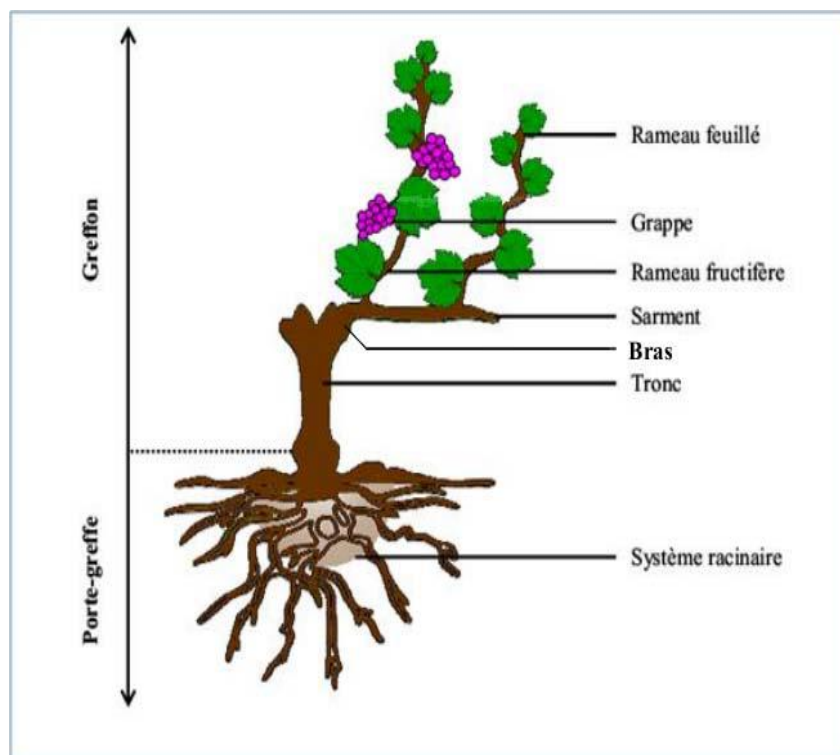


Figure n°1: Morphologie du cep de vigne (Petit, 2008)

2.1 Système racinaire de la vigne

Le système racinaire de la plante de raisin est l'enracinement latéral des racines adventives. La longueur de croissance des racines est généralement comprise entre 10 m, 15 m et 20 m (Mahboub, 2017). la fonction principale du système racinaire est purement mécanique, elle consiste à fixer les plantes au sol. De plus, les racines respirent en absorbant l'oxygène de l'air ou l'oxygène dissous dans l'eau (circulant entre les vides de la terre), libérant ainsi du dioxyde de carbone a fin de fournir l'énergie nécessaire a la plante (Figure 2) (Hidalgo, 2010).



Figure n°2: Racines de la vigne (Cliché Khebbab, 2021)

2.2 Système aérien de la vigne

2.2.1 Le tronc

Le tronc est la partie principale du corps, située entre les racines et les branches principales. Il est plus bas qu'un arbre, il n'est jamais droit, mais il est toujours plus ou moins tordu. Il est couvert d'écorce d'arbre fissurée ou rhytidome. Le tronc est divisé en plusieurs branches ou bras, ces derniers portent les rameaux de l'année. Le tronc et les bras de la vigne font partie de la canopée. Ils sont appelés organes pérennes parce qu'ils sont maintenus presque toute la vie de la plante (Hidalgo, 2010).

En plus de la respiration, la fonction du tronc est de soutenir les sarments, les rameaux, leurs bourgeons et les feuilles. Le tronc leur transporte des nutriments sous forme de sève et de sève brute à travers les vaisseaux du bois (Figure 3) (Hidalgo, 2010).



Figure n°3: Tronc de la vigne (Cliché Khebbab, 2021)

2.2.2 Les rameaux

Dans les vignes, tout au long du tronc, existe des points particuliers appelés les nœuds. A partir de ces derniers poussent des petites branches où les feuilles, des vrilles et des petites grappes de fleurs sont insérées (Figure 4) (Bouard, 1970 et Hidalgo, 2010).



Figure n°4: Rameaux de la vigne (Cliché Khebbab, 2021)

2.2.3 Les feuilles

Les feuilles de la vigne sont attachées aux branches par le pétiole. Plus commun la feuille est ronde ou orbiculaire, mais elle peut aussi être en forme de cœur, en forme réniforme et cunéiforme. La feuille se compose d'une queue ou d'un pétiole et d'une partie élargie et étalée appelée lames qui est charrue par veines à ordres différents (Figure 5) (Hidalgo, 2010).



Figure n°5: Feuilles de la vigne (Cliché Khebbab, 2021)

Les pétioles allongés et les veines des membres forment une forme de corde ; Dans cette structure anatomique on trouve deux systèmes vasculaires qui produisent du liquide (Hidalgo, 2010).

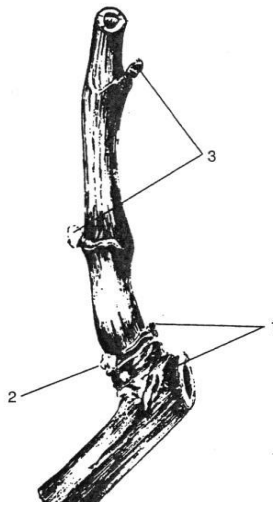
2.2.4 Les bourgeons

Les bourgeons sont des branches de feuilles vertes embryonnaires miniatures essentiellement. Chaque bourgeon est composé d'un petit arbre très court, équipé d'ébauches de lame et de méristème (Figure 6) (Ribereau et al, 1971).

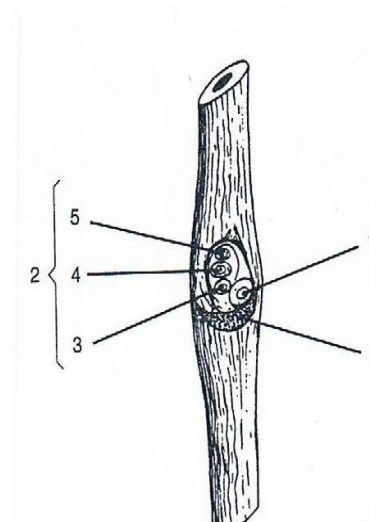
Tous les bourgeons de la vigne sont composés d'écaillés externes brunes plus ou moins foncés et de riches bourgeons blancs à l'intérieur (Figure 7) (Hidalgo, 2010).

Plusieurs types de bourgeons sont observés sur les branches en croissance

- Bourgeon supérieur terminal.
- Bourgeons potentiels.
- Le bourgeon de la couronne.
- Les bourgeons du vieux bois.



a- Le bourgeon
1- bourgeons basilaires, 2- bourillon
3- bourgeons latents



a- bourgeon latent
1-prompt-bourgeon, 2- bourgeon latent,
3- premier cône secondaire, 4- cône
primordial, 5- deuxième cône secondaire,
6- insertion du pétiole

Figure n°6 : Organisation des bourgeons de la vigne (Hidalgo, 2008)



Figure n°7 : Bourgeons de la vigne (Cliché Khebbab, 2021)

2.2.5 Les fleurs

Les fleurs sont le lieu de pollinisation et de fertilisation à la fin du printemps (Figure 8).



Figure n° 8 : Fleur de la vigne (Mahboub, 2017)

Elles sont très petites, allant de 2 à 7 mm et l'hermaphrodite se compose de cinq parties (Mahboub, 2017):

1- Le calice se compose de 5 sépales immatures, fusionnés ensemble. D'habitude le calice est vert, mais il peut être rose ou marron.

2- La corolle se compose de 5 pétales alternant avec des sépales. Les pétales sont soudés, cela donne à la fleur de la vigne, la forme d'un capuchon.

3- Les fleurs des étamines se composent de 5 étamines opposées aux pétales. Leurs filets sont longs et portent l'anthère avec deux cellules.

4- Le disque est composé de 5 nectaires jaunes.

5- Le pistil est composé d'un ovaire et de deux carpelles, chaque carpelle contient 2 œufs. Chacune de ces innombrables fleurs produira un raisin (Mahboub, 2017).

2.2.6 Le fruit

La fleur fécondée produira de petits pépins de raisin avec des baies, qui pousseront rapidement (Figure 09). Ils sont formés par la membrane externe, l'épiderme, la pulpe qui remplit presque tout le grain, les graines et les prolongements de courts pétioles (appelés brosses) à travers lesquels la sève s'écoule dans tout le grain (Hidalgo, 2010).



Figure n° 9: Grappe de vigne (Cliché Khebbab, 2021)

3. Cycles de développement de la vigne

Le processus de développement de la vigne est intercalé de deux périodes : une période de végétation active et une période de repos hivernal. Un cycle annuel est l'accumulation du cycle végétatif et du cycle reproducteur (Lebon, 2005). La croissance annuelle de la vigne démarre au printemps après la germination (Attia, 2007). Afin de permettre à la végétation de repartir la deuxième année, les vignes doivent réaliser l'étape de stockage du matériel de réserve dans les tissus des racines, du tronc, des bras et des branches, ce processus est appelé phénomène d'aoûtement circulaire ou bien accumulation de réserves (Figure 10) (Galet, 1993).

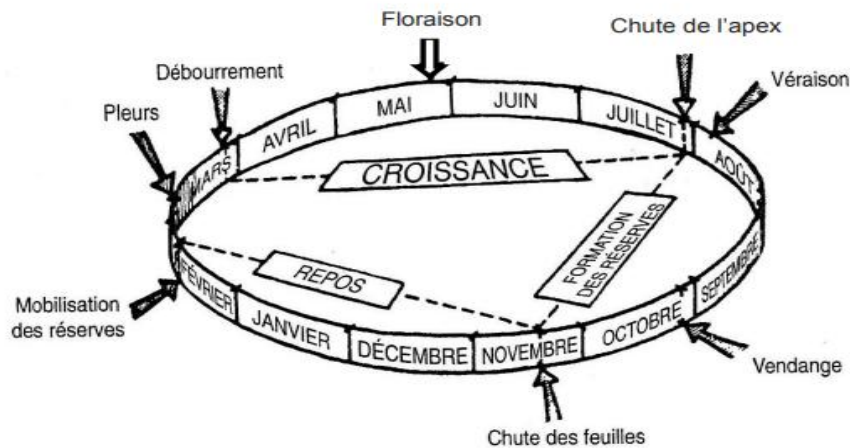


Figure n° 10 : Représentation graphique du cycle végétatif, reproducteur et d'aoûtement de la vigne (Hidalgo, 2008)

3.1. Le cycle végétatif

Chaque saison, les vignes forment leur végétation herbacée. Cette dernière est composée de rameaux et de la croissance des feuilles, des racines et des tiges : c'est alors le cycle de la plante, portant les pleurs, avant que les bourgeons de la plante éclatent ou partent à la fois, les branches et les feuilles. La croissance s'arrête en automne en commençant par la chute des feuilles ou défeuillaison, cela marque la fin de la vie active. En cette étape, le ralentissement de la vigne est déclenché, car il n'y a plus de performances extérieures visibles, c'est le repos hivernal (Gomez, 2007).

3.2. Le cycle reproducteur

Le développement des organes reproducteur commence dès l'année précédente. Les inflorescences dans les bourgeons latents débutent et sont poursuivies avec la différenciation des fleurs au printemps ; puis la floraison, la nouaison, la croissance et la maturation des baies de raisin (Reynier, 2007).

3.3. L'aoûtement

Il s'agit du cycle d'accumulation de réserves qui s'accompagne de changements de morphologie, d'anatomie et de biochimie des branches. Après le stationnement, au fur et à mesure que la plante grandit, la structure anatomique des branches change, les tissus vivants

ont des réserves abondantes (en particulier en amidon), il y aura changement de ramification et de couleur (verte, vire au brun) (Hidalgo, 2008).

4. La vigne en Algérie

Sous le règne des empires phénicien et romain, nous avons trouvé les premières traces de la culture du raisin algérien dans l'Antiquité. En 1830, dans la régence d'Alger, seules de petites parcelles de vignes étaient disséminées sur tout le territoire, avec une superficie totale évaluée à environ 2000 hectares (Galet, 2000).

Pendant la période coloniale (1830-1962), la viticulture était pratiquée dans la plupart des régions d'Algérie et dominait dans l'Ouest (Mostaganem, Oran, Aïn Témouchent et Tlemcen). Les plaines fertiles de la Mitidja et d'Annaba conviennent à toutes les cultures. Ce sont déjà les principaux centres agricoles de l'Algérie (Verrière et Olivier, 1957).

Après l'indépendance en 1962, l'Algérie a hérité d'une colonie de vignobles viticoles d'une superficie de plus de 350000 hectares (maximum en 1936, près de 400000 hectares), avec un rendement de 16 à 18 millions m³ (Birebent, 2013). Les vignes ont été déracinées à grande échelle et le rendement a diminué (Tayeb, 1990). Le vignoble algérien est passé à 75000 hectares en 2017, il ne se classe actuellement au 22^{ème} rang mondial (Ovi, 2018).

II. Microbiologie et écologie de la vigne

1. Microbiologie de la vigne

Jusqu'à présent, la recherche sur les bactéries liée à la vigne s'est principalement concentrée sur les agents pathogènes qui causent des maladies des plantes, telles que la maladie de Pierce causée par la sous-espèce *Trichoderma Fastidiosa*, la galle du collet causée par *Agrobacterium tumefaciens* et le flétrissement bactérien, causé par *Xylophilus ampelinus* (Guilherme, 2013).

Des études récentes réalisées sur la diversité des bactéries endophytes dans la vigne ont montré que les genres *Pseudomonas* et *Bacillus*, peuvent être utilisés comme des agents de contrôle biologique des maladies et peuvent stimuler la croissance et la santé des plantes. Par conséquent, les bactéries présentes sur la vigne jouent non seulement un rôle clé dans la santé des plantes, mais jouent également un rôle dans la qualité et le rendement (Guilherme, 2013).

Le sol et l'écorce de l'entourage de la vigne possèdent une plus grande diversité en espèces bactériennes que les raisins et les feuilles. Le sol fournit une variété de sources de carbone, notamment des acides aminés, des acides organiques et des glucides, qui sont utilisés par les micro-organismes comme énergie. L'écorce contient de l'amidon, des sucres, et d'autres nutriments exsudés par la sève du xylème. Ces deux écosystèmes riches en nutriments sont propices à des bactéries de plus en plus diversifiées (Guilherme, 2013).

Des études ont montré que la population bactérienne de la vigne est beaucoup plus diversifiée qu'on ne le pensait auparavant (Guilherme, 2013). En effet une importante diversité peut être expliquée par la migration des microorganismes du sol vers les parties aériennes de la plante (le tronc est le plus proche du sol) par les éclaboussures de pluie, les vents violents, les insectes, etc (Guilherme, 2013).

2. Les facteurs influençant sur les communautés microbiennes de la vigne

De nombreux facteurs peuvent être impliqués dans la composition en espèces bactérienne de la vigne, comme : la disponibilité de l'inoculum immigrant, la phénologie de la plante hôte, les conditions environnementales physiques et chimiques, les caractéristiques nutritionnelles des différentes parties de la plante ou du sol (Guilherme, 2013).

La variabilité de l'approvisionnement en nutriments entre ces niches peut expliquer, en partie les différences observées dans la structure des communautés bactériennes, ainsi que la diversité des genres cultivables dans différentes parties des plantes et du sol (Guilherme, 2013).

3. Ecologie de la vigne

3.1. Le climat

Vu ses exigences climatiques, la viticulture ne peut être pratiquée que dans les régions tempérées et tropicales (Crespy, 1987). Le littoral méditerranéen est le point de départ de son extension (Reynier, 1986). Plusieurs facteurs contribuent dans le typage du climat et chacun d'eux peut influencer sur la plante et sur sa phyllo sphère microbologique:

a. Température

La culture de la vigne est une culture qui demande de la chaleur ; elle ne supporte pas des hivers rigoureux. Selon (Crespy, 1987), la température critique pour la culture de la vigne est résumée comme suit :

***période hivernante :** la vigne se montre assez résistante aux gelées d'hiver.

***période végétative :** la résistance, à partir du débourrement, est très faible (-2,5°C).

***période reproductive :** la chaleur est nécessaire à la fécondation et à la maturation.

b. Ensoleillement

Les vignes ont besoin d'un bon ensoleillement pour favoriser la photosynthèse, ce qui est particulièrement évident. Les cépages de table nécessitent un ensoleillement pendant la période végétative allant de 1 000 heures pour les cépages précoces à 2 000 heures pour les cépages tardifs, soit un écart de deux mois et demi (Crespy, 1987).

c. Précipitations

Les besoins en eau de la vigne varient entre 300 mm et 600 mm pendant la phase végétative (Crespy, 1987). La sécheresse limite la capacité de production très marquée, elle nuit au rendement et à la qualité (Reynier, 1986).

3.2. Le sol

Les vignes sont peu sévères dans le choix des sols, elles peuvent s'adapter à des sols variés des plus pauvres aux plus fertiles, des plus acides aux plus calcaires. Cependant, il a été remarqué que les sols calcaires donnent aux raisins le meilleur goût (Bretaudeau, 1988).

3.3. Cépages

Chaque cépage a des caractéristiques spécifiques, et ses performances peuvent être ajustées par d'autres facteurs naturels (climat et sol) ainsi que des techniques de conduite de développement et d'entretien (Reynier, 1986).

III. Caractérisation de la phyllosphère

1. Généralités sur la phyllosphère

Le terme phyllosphère fait référence à la communauté microbienne associée avec les plantes, en particulier celle présente au niveau des parties aériennes des plantes comme les feuilles, les tiges, les bourgeons et les fleurs. Ces micro-organismes vivent à la surface des organes végétaux (généralement appelés feuillage) et à l'intérieur des tissus végétaux (endosphère). Cette communauté est composée de divers microorganismes tels que : bactéries, virus, champignons, algues et archées (Vorholt, 2012).

La surface foliaire constitue la plus grande concentration de micro-organismes sur terre juste derrière les habitats du sol, car la surface foliaire des plantes terrestres est estimée à plus de $6,4 \times 10^8$ kilomètres carrés dans le monde. Si on considère que la densité cellulaire bactérienne à la surface des feuilles atteint 10^6 - 10^7 cellules par centimètre carré, le nombre total de bactéries peut dépasser 10^{26} cellules, ce qui n'inclut pas les autres taxons qui partagent le même habitat (Lindow & Brandl, 2003).

2. L'écosystème phyllosphérique

2.1 Habitat phyllosphérique

La phyllosphère est considérée comme un ensemble de parties de l'habitat des microorganismes au dessus du sol. Les microorganismes appartenant à la phyllosphère peuvent vivre à l'extérieur (épiphyte) ou à l'intérieur (endophytes) de la partie aérienne de la plante. Ces organismes ont différents rôles par exemple, dans l'écosystème forestier, la phyllosphère abrite une série d'habitats oligotrophe et les microorganismes qui vivent sont adaptés pour limiter les teneurs en carbone et en azote (Durand, 2017).

L'attention des microbiologistes a tendance à se concentrer sur le système foliaire (phylloplan) de la plante ou sur la face du fruit (carposphère) et rarement sur la tige (caulosphère) ou la fleur (anthosphère) et d'autres organes (bractées, bourgeons, écorces) (Durand, 2017). D'après des recherches récentes, les champignons filamenteux sont relativement rares et peuvent être détectés sous forme de spores transitoires, tandis que les levures sont plus abondantes (Lindow & Brandl, 2003).

De manière générale les phylloplan et phyllosphère ne sont pas aussi faciles à obtenir que la rhizosphère parce que la plante a une cuticule lipidique et cireuse, elle restreint le flux à

l'interface entre la plante et l'atmosphère et agit comme une barrière contre les microorganismes. Par conséquent, la contribution des plantes aux microorganismes épiphytes est liée aux mécanismes de l'exsudation, les entailles, l'infiltration et même le lessivage. Ainsi les microorganismes ont un accès limité aux métabolites végétaux, tels que les sucres solubles, les polyols, les acides aminés et les composés organique volatiles (isoprénoides, composés halogénés, ou alcools), ainsi qu'au sel et à l'eau des plantes (Figure 11) (Bringel & Couée, 2015).

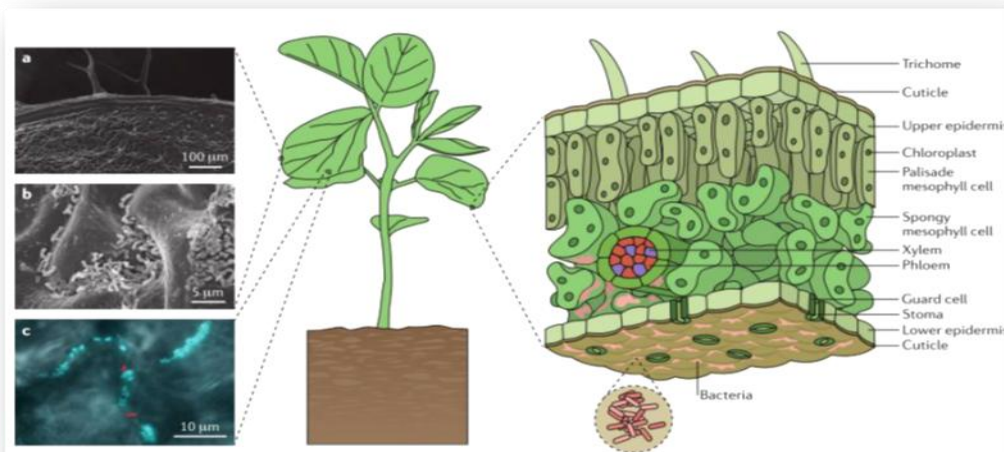


Figure n° 11 : L'habitat phyllosphérique : le phylloplan (Vorholt, 2012)

2.2 Microorganismes de la phyllosphère

Les recherches préliminaires sur les micro-organismes foliaires se sont principalement concentrées sur les agents pathogènes des plantes, mais comme le cas de la plupart des micro-organismes coexistants avec leurs plantes hôtes, des recherches plus étendues et plus approfondies ont commencé concernant les microorganismes de la phyllosphère. Les nouvelles technologies basées sur le séquençage à grande échelle permettent une analyse indépendante des cultures sont lancées. Ceci offre une énorme opportunité de caractériser la diversité des différentes parties de la plante et de déterminer les caractéristiques écologiques, la physiologie, le métabolisme et les résultats bénéfiques de cette plante. Les nouvelles technologies ouvrent de nouveaux champs de recherche, intégrant non seulement les relations entre les plantes et les micro-organismes, mais aussi les facteurs environnementaux qui contrôlent cette interaction tels que l'humidité, la température et le rayonnement (Lindow & Brandl, 2003).

partie 02 :

Partie

expérimentale

Matériel
et
méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC), Chaab Ersas université des frères Mentouri Constantine. Les échantillons du tronc de la vigne, ont été collectés au niveau d'un vignoble situé au niveau l'établissement Younes Abdallah El Harouche, wilaya de Skikda, Algérie.

I. Site et outils de travail

1. Caractérisation du site de prélèvement

Le vignoble de l'établissement Younes Abdallah (Figure 12) est une parcelle expérimentale qui s'étend sur une superficie de 2 hectares, c'est un jeune vignoble planté en avril 2017, il est constitué de deux cépages de table : Red globe et Vectoria. La moyenne de la production annuelle entre les deux cépages est de 150 quintaux par hectare (selon le propriétaire).



Figure n°12 : Photo satellite du vignoble de l'établissement Younes Abdallah (a: Google earth, 2021, b: Cliché Khebbab, 2021)

Le vignoble se situe dans la commune d'El Harouche Wilaya de Skikda (latitude $36^{\circ} 39' 29''$, longitude : $6^{\circ} 50' 55''$), limité au Nord par la route national n° 3, de Oued Safsaf, au sud, une construction habitable à l'est et d'une ferme agricole à l'ouest.

Cette parcelle compte 850 piqués repartis sur 52 lignes et 16 rangés, l'écartement entre eux est 3 mètre. Chaque piqué contient 3 arbres avec un total de 2550 arbres entre les 2 cépages.

L'établissement emploi 20 collaborateurs (fellahs) dont 3 permanents et 12 personnes saisonniers, pour la récolte.

2. Matériel biologique

Nous avons choisie pour notre recherche la variété « red Globe », qui est selon Galet (2001), une variété rouge obtenue par croisement (hunisa x emperor) x (hunisa x emperor x nocera) à germination précoce, vigoureuse, à rendement moyen et à grosses grappes pesant 1 kg (Figure 13).



Figure n°13 : arbres (a) et Grappes (b) de cépage Red Globe (Cliché Khebbab, 2021)

II. Obtention des échantillons et préparation des solutions pour analyse

1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons examinés dans ce présent travail sont des troncs de vignobles. Ils ont été collectés le même jour (19 juin 2021) au niveau du même site, cité précédemment. A partir de chaque parcelle ont été prélevés arbitrairement 3 points de troncs d'arbres, reparties le nord, le centre, et le sud du vignoble (Figure 14).

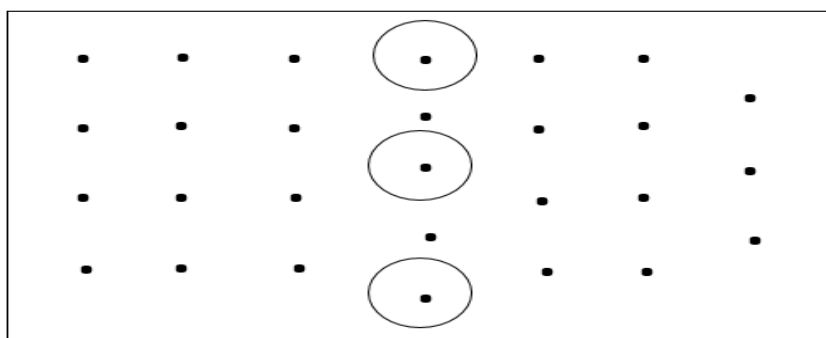


Figure n° 14 : Schématisation des points de prélèvement.

Les parties des troncs (qui portent les feuilles et les fruits) ont été prélevés a une hauteur de 50 cm, soit environ la moitié de la taille de l'arbre (Figure 15). Le protocole de prélèvement est bien détaillé dans la partie annexe de ce document (annexe 1).



Figure n°15: prélèvement des troncs (Cliché Khebbab, 2021)

2. Conservation des échantillons

Les échantillons sont amenés dans des sacs stériles (annexe 1, figure 16a) directement au laboratoire dans une glacière stérile et sont mises au Réfrigérateur (4°C), du laboratoire Chaab Erssas Université Mentouri Constantine.

3. Préparation des solutions d'échantillons pour analyse

3.1.Préparation de la solution mère d'échantillon

L'échantillon choisi pour l'étude est celui du nord, conservé dans un sac stérile (Figure 16a). L'échantillon est découpé en petit morceaux d'environ 5 cm, puis une quantité 0,5 g de ces fragments est mise dans 150 ml de bouillon nutritif (BN) préalablement préparé (annexe 2), (Figure 16b). Le tout est mis à agiter pendant 1h à 200 rpm (Figure 16c) afin de découvrir les bactéries qui se développent sur les tissus, (appelés bactéries épiphytes) et maximiser le nombre de bactéries potentiellement cultivables.

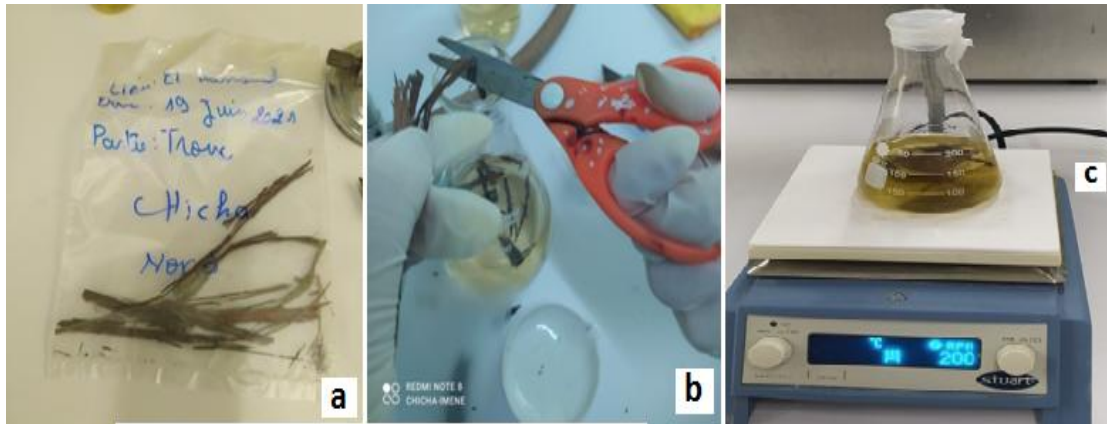


Figure n°16: Préparation de la solution mère de l'échantillon

(a) : fragments de tronc, (b) : mise dans la BN et (c) : agitation (Cliché Khebbab, 2021)

3.2. Préparation des dilutions de l'échantillon

Les dilutions de l'échantillon sont préparées à partir de la solution mère préalablement préparée et sont aussi préparées dans le BN. Les solutions de BN sont diluées au 1/10 en cascade de 10^{-1} à 10^{-3} (Figure 17a). Le protocole de préparation est réalisé en plusieurs étapes:

Tout d'abord commencer par l'homogénéisation de la suspension microbienne mère, puis on fait prélever 1mL de cette dernière à l'aide d'une micropipette (ne pas introduire la micropipette dans la suspension de plus de 1cm). A chaque fois on fait flamber l'ouverture du tube ou du flacon, ensuite ouvrir le tube de 9 ml de BN, flamber l'ouverture y introduire le volume prélevé (éviter tout contact entre micropipette et le BN stérile) (Figure 17b). enfin Homogénéiser le tube à l'aide d'un vortex (Figure 17c). la solution obtenue correspond à la première dilution (10^{-1}).

- 1ml de la dilution 10^{-1} est ajouté à un autre tube de 9ml de BN pour obtenir la dilution suivante (10^{-2}) en répétant les mêmes étapes de la dilution précédente. Le même protocole est suivi pour obtenir la troisième dilution de l'échantillon (10^{-3}).

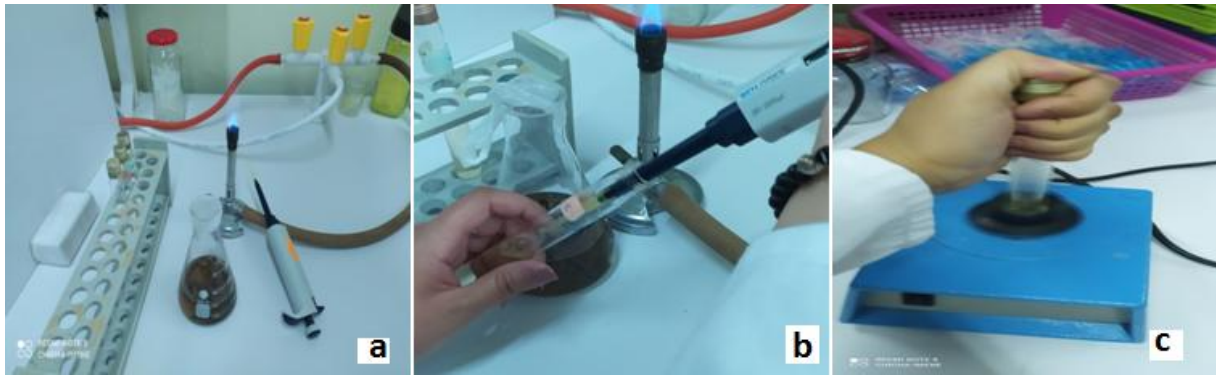


Figure n°17 : Préparation des dilutions (Cliché Khebbab, 2021)

III. Isolement de la flore microbienne

1- Mise en évidence des microorganismes totaux sur milieu gélosé

Une quantité de 100 µl de chaque dilution, est étalée sur les boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive (GN). Pour chaque dilution 3 répétitions sont réalisées (Figure 18). Les boîtes sont mises à incuber à l'étuve pendant 2 à 3 jours à 28 °C puis sont inspectées pour la présence des colonies.



Figure n°18 : Etalement des souches sur GN (Cliché Khebbab, 2021)

2.1. Mise en évidence des bactéries

Après incubation, les colonies microbiennes soupçonnées être bactériennes sont de nouveau mises en suspension sur BN contenant un antifongique (fungizone) (annexe 03) et ceci afin de ne sélectionner que les bactéries. Une observation microscopique avec coloration de Gram (annexe 4) est réalisée pour chaque type de colonie isolée.

2.2. Identification des isolats

a. Analyse macroscopique

L'analyse macroscopique correspond à l'observation visuelle des colonies sur la surface de milieu gélose nutritive. Cette observation permet de déterminer certains caractères morphologiques des microorganismes présents tels que: leurs formes, leurs tailles, leurs contours et leurs couleurs.

b. Analyse microscopique

L'aspect microscopique est révélé par la coloration de Gram qui a pour but de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif et d'observer la forme et le mode de regroupement (annexe 4).

Pour l'observation microscopique (grossissement X 100), on ajoute une goutte d'huile d'immersion (Mami, 2007).

Résultats et discussion

I- Mise en évidence d'une diversité bactérienne à la surface du tronc de la vigne

La compilation de toutes les colonies obtenues lors de l'analyse directe (après -isolement) de tous les échantillons (solution mère et dilutions) de tronc d'arbre a montré diverses colonies reflétant une importante diversité de la flore microbienne en surface. Les boîtes de GN sont contrôlées après 48h et après 5jours et certaines colonies se rapprochant de l'aspect bactérien, sont caractérisées pour leur aspect macroscopique et microscopique.

1. Analyse des isolats obtenus sans l'antifongique (ATF)

Sur les boîtes de GN, correspondantes aux séries ne contenant pas l'antifongique (ATF), non diluées et diluées, une diversité en colonies est obtenue, cependant l'étude macroscopique ne concerne que certaines colonies ayant un aspect bactérien que ce soit après 48h ou après 5jours.

1.1. Examen macroscopique après 48h d'incubation

1.1.1. Caractérisation morphologique des isolats

Que ce soit pour la suspension mère ou les séries diluées, après une période d'incubation à 37°C pendant 48h sur GN, les résultats montrent plusieurs colonies microbiennes ce qui prouve la grande diversité microbienne sur la surface du tronc de la vigne (figure19).

Après 48h d'incubation, trois colonies dont les aspects se rapprochent de celui bactérien, de couleurs différentes (jaune, orange et blanc), sont les plus visibles et les plus abondantes ce qui nous a permis de les choisir pour une analyse phénotypique.

En plus des couleurs différentes, les trois colonies sensées être des bactéries, présentent d'autres caractères morphologiques différents (tableau 2).

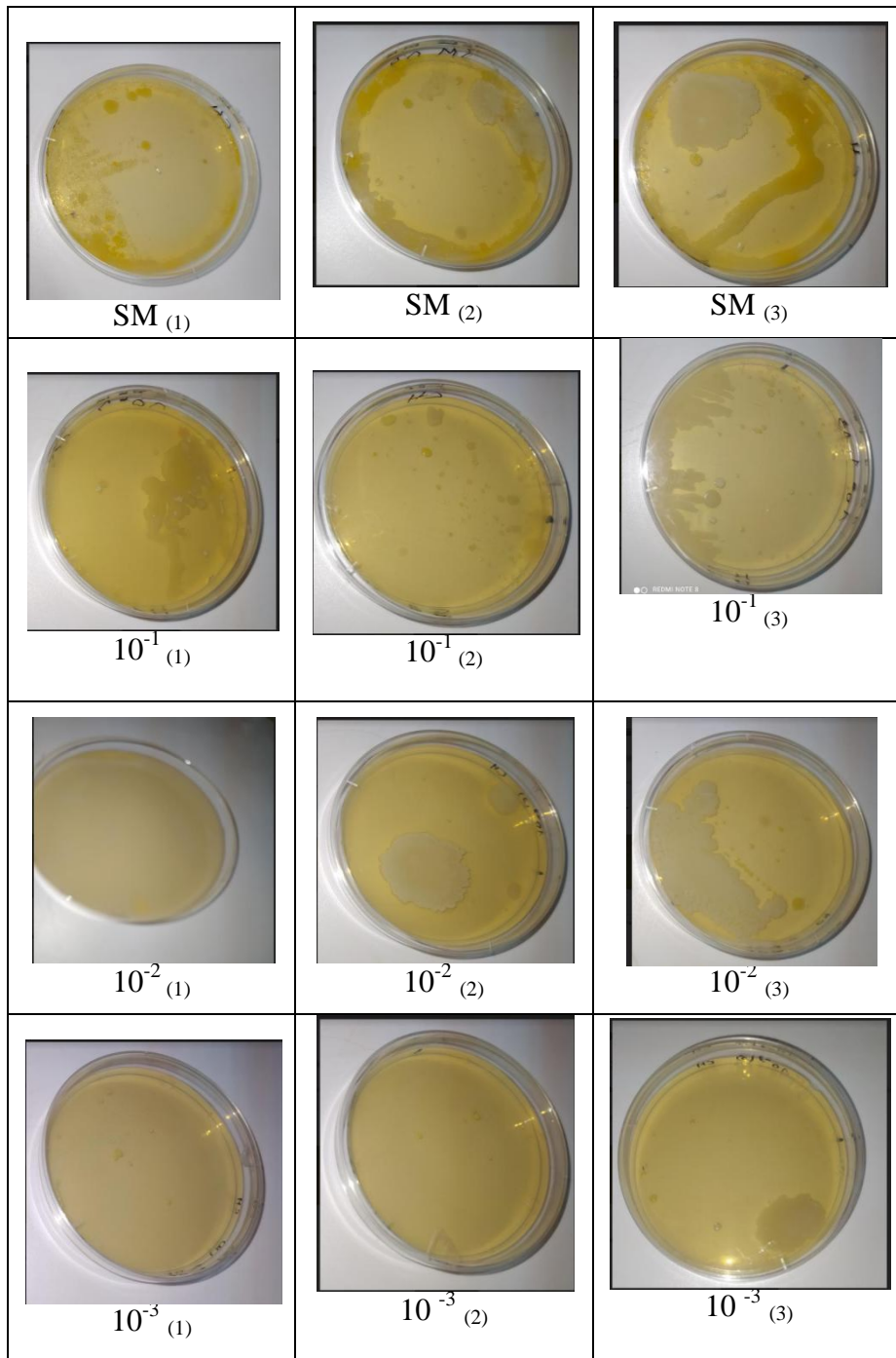


Figure n°19 : Aspect macroscopique des cultures bactériennes sur gélose nutritive après 48 h d'incubation

Tableau n°2 : Aspect des colonies, trouvées sur gélose nutritive après 2 jours d'incubation

	Couleur	Nombre	Forme	Relief	contour	Consistance	Transparence	Taille
SM ⁽¹⁾	Jaune	11	Ronde	Bombé	Irrégulier	Crémeuse	Opaque	Moyenne
	Orange	1						
	Blanc	22						
SM ⁽²⁾	Jaune	12	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
	Orange	2						
	Blanc	13						
SM ⁽³⁾	Jaune	5	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
	Blanc	11						
	Tapis							
10 ⁻¹ ⁽¹⁾	Jaune	6	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
	Blanc	3						
10 ⁻¹ ⁽²⁾	Jaune	19	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petit
	Blanc	12	Ondulé					
	Orange	2	Ronde					
10 ⁻¹ ⁽³⁾	Blanc	25	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Moyenne
	Jaune	10						
	Orange	1						
10 ⁻² ⁽¹⁾	Tapis							
	2 Petit tapis							
10 ⁻² ⁽²⁾	Jaune	4	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
	Orange	1						
	Blanc	12						
10 ⁻² ⁽³⁾	Jaune	2	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
	Blanc	14						
10 ⁻³ ⁽¹⁾	Jaune	31	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
10 ⁻³ ⁽²⁾	Jaune	6	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
	Blanc	9						
10 ⁻³ ⁽³⁾	Jaune	3	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
	Blanc	3						

1.1.2. Dénombrement des colonies

Pour chacune de la suspension mère et des suspensions diluées, la moyenne du nombre de chacune des colonies (jaune, orangé et blanche) est calculée sur 3 répétitions (figure 20).

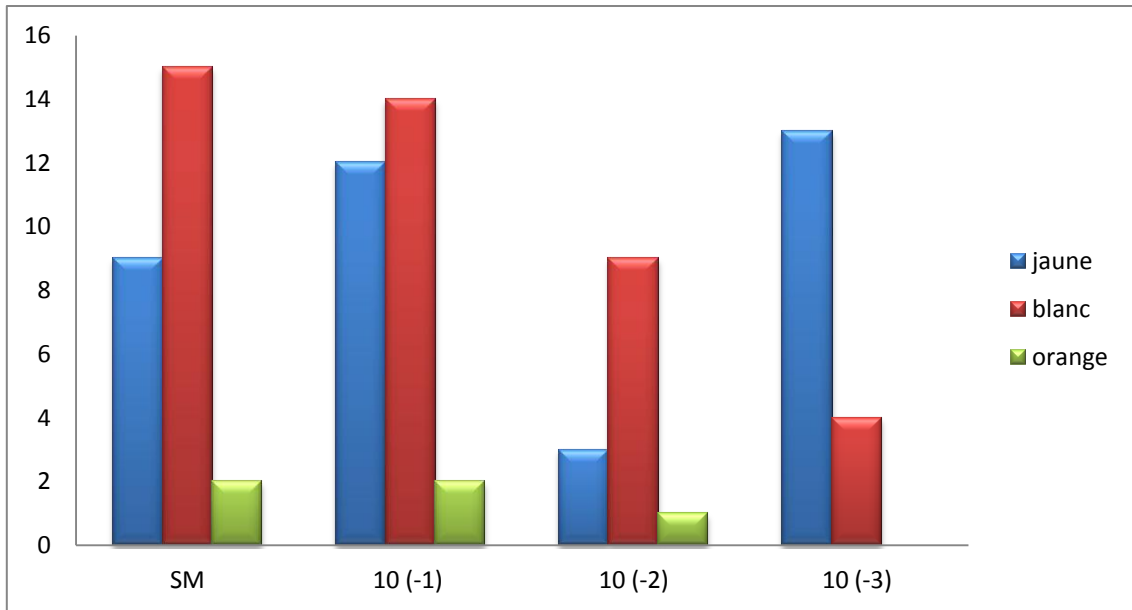


Figure n° 20 : nombre des trois colonies (jaune, blanche et orange) sur la GN après 48 h.

1.2. Examen macroscopique après 5 jours d'incubation

1.2.1. Caractérisation morphologique

Après 5 jours d'incubation, (tableau 3), les colonies obtenus sont majoritairement rondes, avec un contour régulier, d'une taille petite et d'une couleur qui varie du blanc au jaune et orange (tableau 3 et figure 21).

Tableau n° 3 : caractères morphologiques des colonies trouvées sur gélose nutritive après 5 jours d'incubation.

	Couleur	Nombre	Forme	Relief	contour	Consistance	Transparence	Taille
SM (1)	Jaune Orange Blanc	08 13 08	fusiforme Ronde Ronde	plate Bombé Bombé	Irrégulier Irrégulier Régulier	sèche Crémeuse Crémeuse	Opaque	Moyenne Petite Petite
SM (2)	Jaune Orange Blanc	4 2 9	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite.
SM (3)	Jaune Blanc Orange	3 7 2	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
10 ⁻¹ (1)	Jaune Blanc orange	6 3 6	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
10 ⁻¹ (2)	Jaune Blanc Orange	12 12 7	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
10 ⁻¹ (3)	Blanc Jaune Orange	7 4 4	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
10 ⁻² (1)	Tapis							
10 ⁻² (2)	3 Petit tapis							
10 ⁻² (3)	Jaune Orange Blanc	5 3 1	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
10 ⁻² (3)	Jaune Blanc Orange	4 4 3	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
10 ⁻³ (1)	Jaune Blanc orange	15 2 2	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
10 ⁻³ (2)	Jaune Blanc	8 5	Fusifforme Rond	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
10 ⁻³ (3)	Jaune Blanc orange	5 4 3	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petit

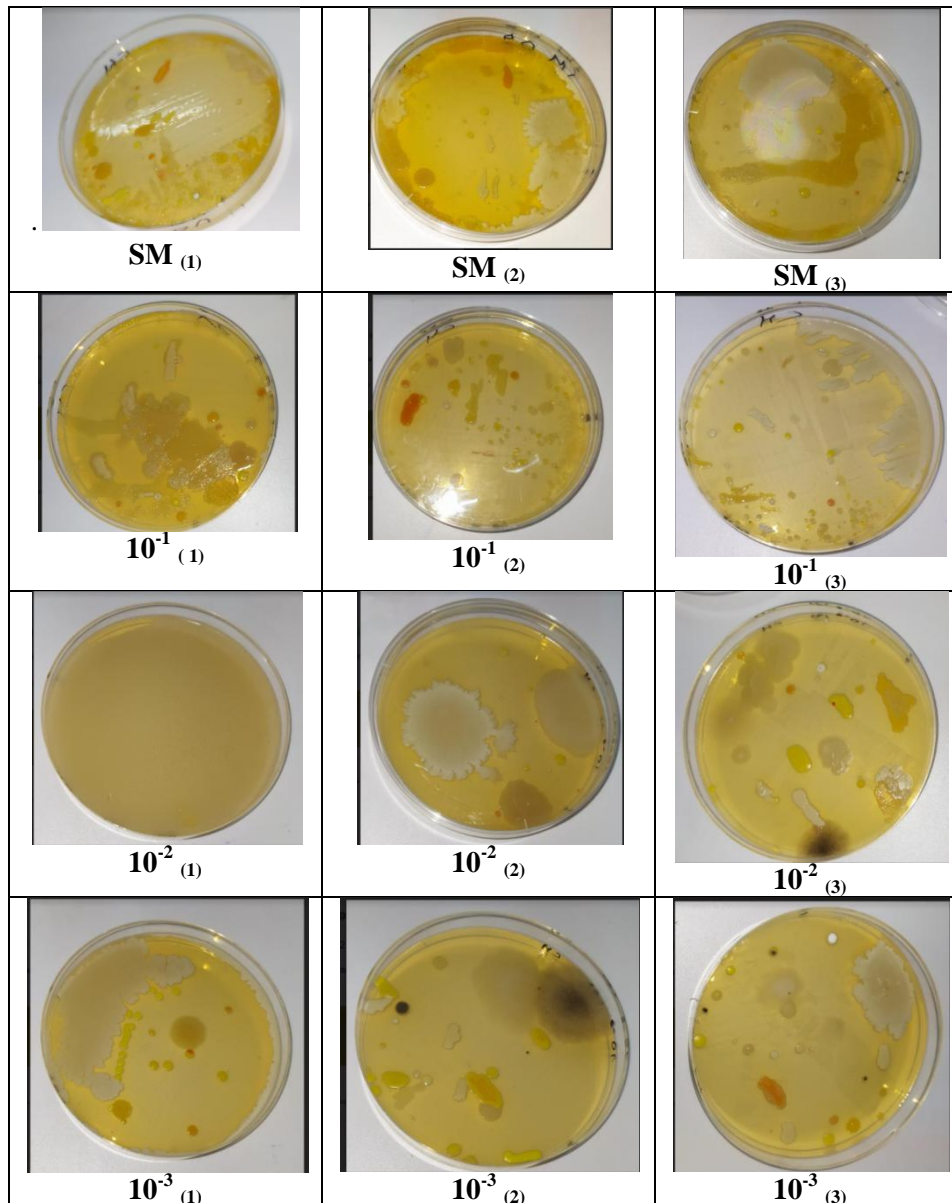


Figure n° 21: Aspect macroscopique des cultures bactériennes sur gélose nutritive après 5 jours d'incubation.

1.2.2. Dénombrement des colonies

Pour déterminer l'abondance de chaque type de colonies, un dénombrement des colonies est réalisé, l'abondance des colonies de couleur blanche est remarquée pour le cas de la solution mère alors qu'une importante présence des colonies jaune est détectée pour la dilution 10^{-3} , (figure22).

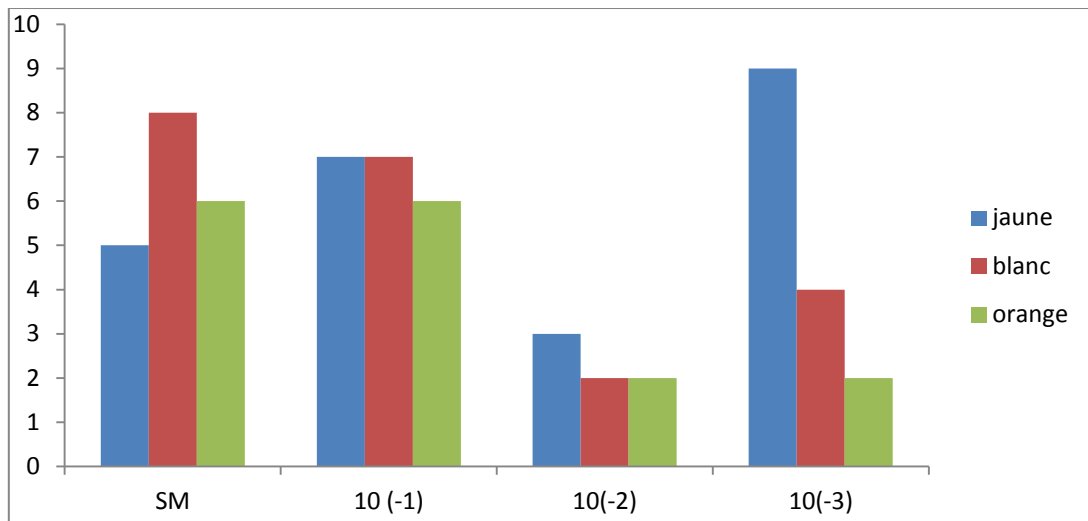


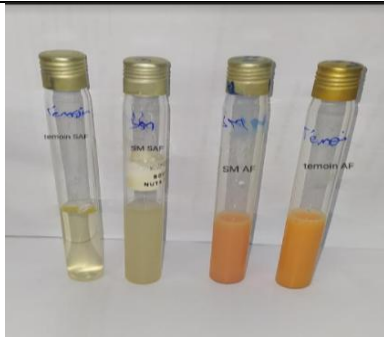



Figure n° 22 : abondance colonies obtenues selon leur couleur et selon les dilutions..

2. Examen macroscopique avec antifongique

2.1. Croissance sur bouillon

Que ce soit sans ou avec l'antifongique, sur le milieu liquide (bouillon nutritif), un trouble est remarqué sur les différents tubes, ceux de la solution mère et ceux des dilutions (tableau 04).

Tableau n° 4 : croissance des cultures bactériennes sur le bouillon nutritif

Tube	SAF	AF	Croissance
SM	Trouble	Trouble	
10 ⁻¹	Trouble	Trouble	
10 ⁻²	Trouble	Trouble	
10 ⁻³	Trouble	Trouble	

La présence de trouble indique une croissance de différents types de microorganismes dans le cas d'absence d'antifongique et une croissance de bactéries dans le cas de présence d'antifongique.

2.2. Croissance sur milieu gélosé

Les tubes présentant un virage de couleur sont ensuite mise sur gélose nutritive avec une incubation de 5 jours a 37 ° C, les aspects macroscopiques des colonies sont observées. Une diversité de phénotype touchant plusieurs paramètres morphologique est enregistrée (tableau 5 et figure 23).

Tableau n° 5 : Aspect macroscopique des cultures bactériennes sur gélose nutritive avec et sans l'antifongique après 5 jours d'incubation

	Couleur	Nombre	Forme	Relief	Le contour	Consistant	Opacité	Taille
SM	Jaunâtre	+	Ronde	Demiplate	Irrégulier	sèche	Opaque	Petite
SAF	Blanchâtre	1	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse		Moyenne
SM	Jaunâtre	2	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite.
AF	Blanchâtre	1						
10 ⁻²	Jaunâtre	+	Ronde	Bombé	Régulier	Crémeuse	Opaque	Petite
AF	Tapis							
10 ⁻³	Blanc	+	Ronde	plat	Irrégulier	Crémeuse	Opaque	Moyenne
AF								

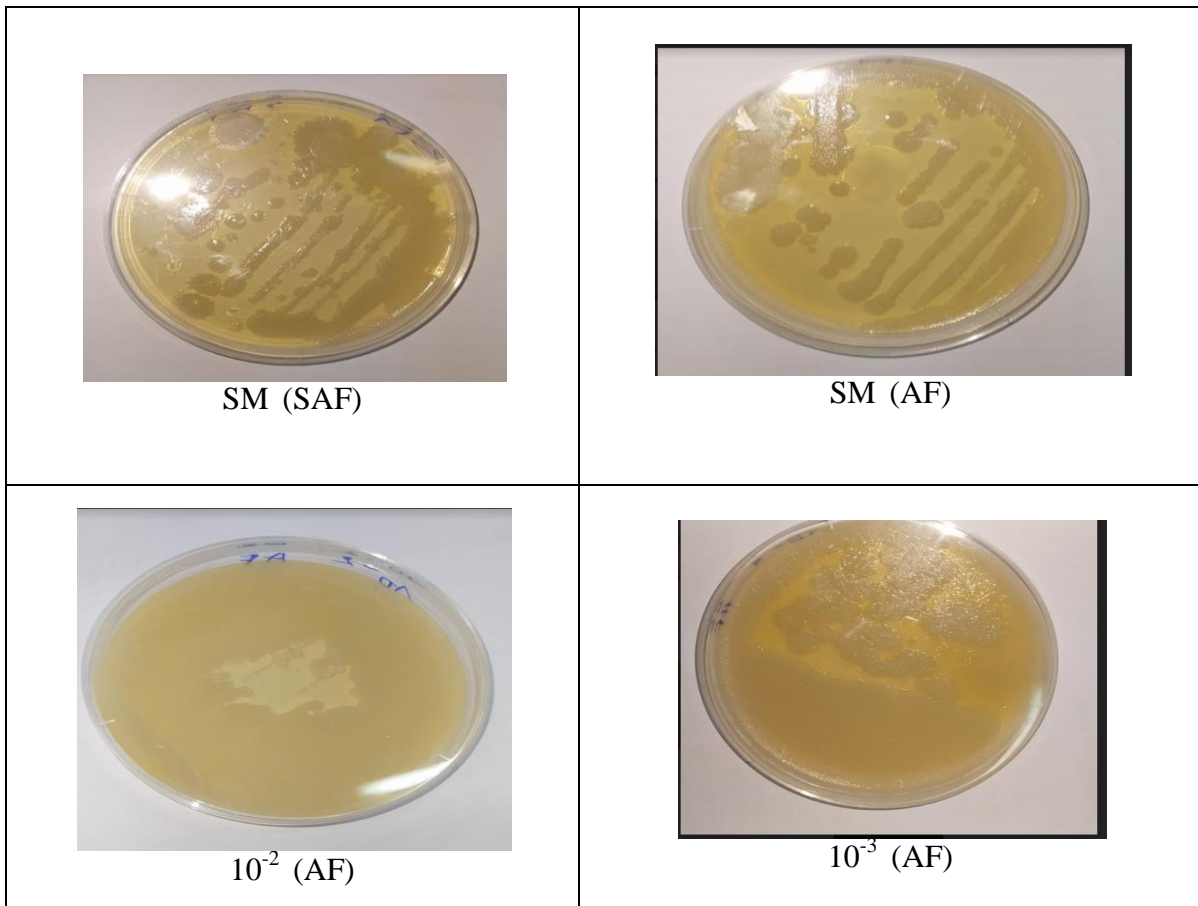


Figure n°23 : Aspect macroscopique des cultures bactériennes contenant ou non l'anti fongique sur gélose nutritive après 5 jours d'incubation

II- Caractérisation phénotypique des types bactériens obtenus sur la surface du tronc de la vigne

1. Examen microscopique

Afin d'identifier les isolats présents dans différents échantillons, les isolats purifiés et conservés préalablement sur le milieu GN, ont été revérifiés puis analysés. Comme il a été impossible d'analyser tous les isolats obtenus dans ce travail, on s'est contenté de choisir 3 types de colonies montrant trois couleurs différentes (jaune, orangé et blanc). En plus de la différence en couleur, ces colonies montrent différents types morphologiques bactériens existants. A partir de ces colonies nous avons examiné 7 isolats et une analyse microscopique est appliquée suite à l'utilisation de deux types de colorations (coloration de Gram et coloration au bleu de méthylène).

1.1. Caractérisation des isolats après coloration de Gram

L'examen microscopique des isolats est réalisé pour les colonies obtenues à partir de la solution mère et pour celles obtenues à partir de la première dilution (10^{-1}).

•Cas de la suspension mère (SM)

Les isolats pris des colonies jaunes se présentent après coloration de Gram, sous forme de bacilles colorés en rose foncé ou violet clair ce qui indique qu'ils peuvent être de Gram (-) ou Gram (+). Ces bacilles sont surtout regroupés en paire (diplobacilles).

Les isolats pris à partir des colonies orangées ont montré après coloration de Gram, une couleur violette ce qui permet de dire qu'ils sont de Gram (+). Ces isolats se présentent sous forme de chaînettes. Les colonies blanches aussi ont donné des isolats colorés en violet donc de Gram (+). Ces isolats se présentent sous forme de bacilles regroupés en amas, de taille variable (figure 24)



Figure n °24 : Observation microscopique à partir des colonies obtenues de la solution mère (SM), après coloration de Gram

a: à partir colonie jaune, b: à partir colonie orangé, c: à partir colonie blanche

•Cas de la dilution (10^{-1})

Les isolats obtenus à partir de la dilution 10^{-1} et de la colonie jaune paraissent sous forme de des coques regroupés en amas coloré en violet, ce qui permet de confirmer qu'ils sont de Gram (+). Ce résultat permet d'éliminer le confus de couleur obtenu dans l'observation à partir de la solution mère concernant la colonie de couleur jaune, ce qui confirme que les isolats correspondants sont de Gram (+).

Les isolats pris de la colonie orangé se présentent sous forme de chaînette colorée en violet (Gram (+)). Un échec dans l'observation des colonies de couleur blanche est signalé, ceci pourrait être à la faible présence bactérienne de ce type de bactérie dans la dilution 10^{-1} (figure 25).

Ainsi l'observation microscopique des isolats a partir de la dilution 10^{-1} , confirme celle réalisée a partir de la solution mère.

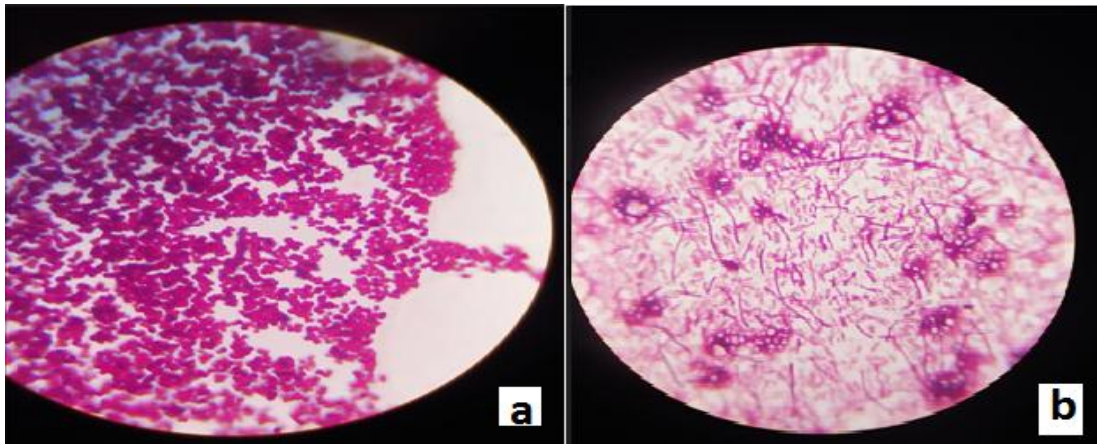


Figure n °25 : Observation microscopique a partir de la dilution (10^{-1}), après coloration de Gram

a: colonie jaune, b: colonie orangé

1.2. Coloration avec le bleu de méthylène

La coloration avec le bleu de méthylène a concerné dans ce présent travail, le tapis obtenu après incubation de la dilution 10^{-2} . Parmi les trois boites de répétition, nous avons utilisé deux boites (boite1 et boite3).

Dans les deux cas (boite 1 et boite 2), L'échantillon prie de la plage obtenue, montre après coloration avec le bleu de méthylène, des bacilles regroupés en amas avec des filaments (figure 26).

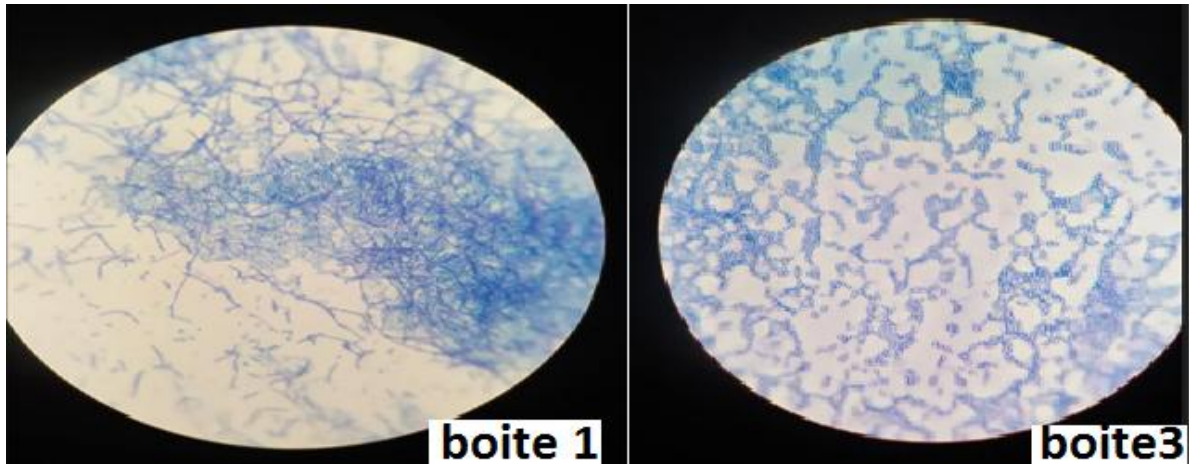


Figure n°26: Observation microscopique a partir du tapis présent a la dilution 10^{-2} (1)

2. Abondance des types bactériens obtenus

L'analyse microscopique réalisée à partir de 7 isolats, montre que la plupart des isolats se présentent sous forme des bacilles (57%) alors que le reste des isolats (43%) se présente sous forme de cocci (figure27).

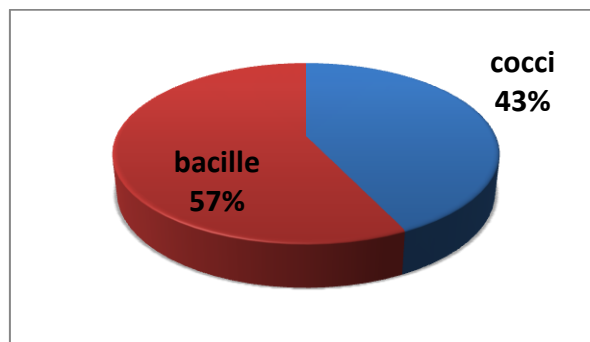


Figure n°27: Pourcentage de type d'isolats obtenus

3. Affiliation bactérienne estimée en genre

L'identification des bactéries par approche phénotypique permet de penser que

- Les coques Gram positive peuvent être : *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*.
- Les bacilles Gram positive peuvent être : *Streptobacillus*.

Ces résultats devraient être confirmés par des techniques plus poussées comme celles de la biologie moléculaire.

Discussion générale

Les bactéries de la vigne jouent non seulement un rôle clé dans la santé des plantes mais aussi dans leur rendement. Le tronc de la vigne contient des sucres, d'amidon et d'autres nutriments issus de la sève de xylème, cet écosystème riche en nutriments est propice à un plus grand nombre et variétés de bactéries (Guilherme, 2013). La connaissance des caractères des bactéries se trouvant sur le tronc serait une parmi les études intéressantes visant l'amélioration de la culture de la vigne.

L'objectif de cette présente étude est de caractériser la microflore, notamment la population bactérienne de la surface du tronc de la vigne, et essayer de l'identifier. La vigne choisie pour cette étude est la variété « red globe », cultivée dans une région algérienne située à El-Harrouch, willaya de Skikda.

Après obtention des isolats à partir de tous les échantillons (suspension mère et dilutions) du tronc d'arbre, les boîtes de GNensemencées et incubées, ont montré diverses colonies reflétant une importante diversité de la flore microbienne en surface du tronc. Ce résultat était bien attendu puisque plusieurs études s'intéressant à la flore du tronc ont enregistré une grande diversité quelque soit la plante (Martins, 2012) et notamment au niveau de la surface du tronc de la vigne (Leveau et Tech, 2011).

Bien que les colonies bactériennes étaient bien remarquables sur les boîtes et bien distinguées des autres colonies appartenant à d'autres types de microorganismes comme les champignons, nous avons pensé à bien vérifier ces colonies bactériennes en utilisant un antifongique (ATF). Ceci pour bien arriver à notre principal objectif se résumant en la mise en évidence de la présence des bactéries sur le tronc. Ainsi en parallèle à l'ensemencement des isolats sur la GN sans antifongique, est lancé un autre ensemencement avec un antifongique. Même si les boîtes sans antifongique contiennent plus de colonies, dans les deux cas avec l'antifongique ou non, plusieurs types de colonies bactériennes se sont montrés après incubation que ce soit après 48h ou après 5 jours. Ce résultat permet de confirmer d'une part la présence des bactéries sur le tronc de la vigne et d'une autre part permet de penser à une diversité bactérienne à ce niveau. Plusieurs études portant sur les troncs des arbres ont montré l'existence d'une diversité bactérienne sur la surface (Leveau et Tech, 2011). et des résultats de recherches concernant la vigne, ont montré aussi cette diversité bactérienne sur la surface du tronc de cette plante (Guilherme, 2013).

Une fois que la mise en évidence de la présence d'une diversité bactérienne est réalisée, il était très intéressant d'essayer d'identifier la composition bactérienne présente. Selon la disponibilité des moyens et du temps, nous n'avons pu utiliser qu'un examen macroscopique pour distinguer les différences morphologiques des colonies et les caractériser et un examen microscopique pour se rapprocher de leur forme cellulaire. Ces deux caractérisations macroscopiques et microscopiques permettent de se rapprocher de l'affiliation bactérienne notamment au niveau du genre. Ces observations macroscopiques et microscopiques sont la base d'analyse dans le cas de l'identification microbiologique (Juzan, 2012).

L'analyse macroscopique a indiqué que les colonies bactériennes présentes sur le tronc de la vigne présentent des différences en plusieurs caractères comme la taille, la forme et la couleur, cependant ce qui est bien attirant c'est la présence de trois couleurs différentes, bien visibles et abondantes. En effets trois types de colonies (jaune, orange et blanche), ont attiré notre attention. Les colonies blanches sont abondantes dans la majorité des solutions (mère, dilution 10^{-1} , 10^{-2}) après 48h d'incubation et dans la solution mère, et la dilution (10^{-1}) après 5 jours d'incubation.

Pour se rapprocher de l'identification de ces trois types de cellules, nous sommes allés faire une observation microscopique en se basant sur sept isolats. Pour améliorer l'analyse nous avons appliqué deux types de colorations (coloration de Gram et coloration avec le bleu de méthylène). Ces deux colorations sont souvent des outils appliqués en microbiologie pour estimer l'identification d'une bactérie (delarras, 2007)

La coloration de Gram nous a permis une orientation vers le Gram positif des bactéries présentes quel que soit leur différence en couleurs et en d'autres critères. Cette coloration a montré la présence d'une forme de coque et une forme de bacilles regroupés en amas avec des filaments. La présence de ces formes est confirmée par la coloration avec le bleu de méthylène.

En rassemblant toutes ces informations, l'affiliation en genres bactériens présents sur la surface du tronc de vigne, est estimée. Nous estimons que parmi les composants de la diversité bactérienne sont les genres: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, connus par leur forme en coque et leur Gram positif et les bactéries du genre *Streptobacillus* qui sont de forme en bacilles et de Gram positif.

Malgré que la présence de ces genres a été déjà mentionnée dans d'autres études travaillant sur le tronc des arbres (Leveau et Tech, 2011) et notamment sur le tronc de la vigne (Guilherme, 2013), les résultats trouvés dans ce présent travail nécessite une confirmation par des techniques plus poussées comme celles qui appliquent la biologie moléculaire.

Conclusion

Conclusion

Une étude portant sur la microbiologie du tronc de la vigne de la variété « red rose », est réalisée dans ce présent travail. Pour aboutir à l'objectif souligné consistant à la mise en évidence de la diversité microbienne en générale et bactérienne en particulier ainsi qu'à la caractérisation et l'identification des bactéries présentes sur le tronc de la vigne, une analyse morphologique classique est utilisée.

Les observations macroscopiques et microscopiques ainsi que l'utilisation de la coloration de Gram et du bleu de méthylène ont permis d'enregistrer plusieurs points dont les plus importants sont:

- présence d'une grande diversité microbienne sur le tronc de la vigne.
- présence d'une grande diversité bactérienne sur le tronc de la vigne.
- la majorité des bactéries présentes sont de Gram positif
- les bactéries présentent deux formes majoritaires, en coq et en bacilles
- parmi les genres bactériens majoritaires, estimés être présents sur la surface du tronc sont: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Streptobacillus*.

L'analyse phénotypique classique appliquée dans ce présent travail a pu donner des résultats acceptables en ce qui concerne la caractérisation et l'identification des bactéries présentes, cependant malgré qu'un rapprochement en affiliation en genres a pu être donné, les résultats doivent être vérifiés et complétés par des techniques plus fiables comme celles de la biologie moléculaire.

Références

bibliographiques

- **Atrouz K(2014)**. Aptitude à la rhizogénèse de quelques variétés porte-greffes de vigne (*Vitis vinifera* L.) en conditions de laboratoire (semi-contrôlées). Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de magister. Algérie : université Constantine, p83
- **Attia F(2007)**. Effet du stress hydrique sur le comportement éco physiologique et la maturité phénolique de la vigne. Thèse Doctorat, INP, Toulouse, 160 p.
- **Bertrand L (2016)** .Approche éco-anatomique du bois de vigne (*Vitis vinifera* L.) pour une meilleure connaissance de l'histoire de la viticulture en Méditerranée nord occidentale. Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études. France : ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
- **Birebent P, (2013)**. Les régions viticoles d'Algérie. Édit. Le cercle Algérieniste.
- **Bouard J(1970)**. Observation nouvelles sur les vrilles de la *Vitis vinifera* L. et sur les différentes parties qui les constituent. C. R. Acad. Sc., Paris, t. 271 : 191-195 p.
- **Bretaudefau. (1988)**. *Atlas d'arboriculture fruitière*. Paris: J-B. Baillière.
- **Bringel F, Couée I (2015)**. Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. *Front Microbiol* 6:1–14. doi: 10.3389/fmicb.2015.00486Our Sponsors
- **Delarras C (2007)**. Microbiologie pratique pour le laboratoire. Tec et Doc. France.
- **Cátia Pinto, Diogo Pinho, Susana Sousa, Miguel Pinheiro, Conceição Egas, Ana C. Gomes . (2014)**. Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *Plos one*. en ligne(15/09/2021).
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0085622#s4>
- **Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010)**. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42: 669–678.
- **Crespy (1987)**. *Viticulture d'aujourd'hui*. Paris: J-B Baillière Lavoisier.
- **Durand A (2017)**. Diversité et caractérisation fonctionnelle des communautés microbiennes inféodées au peuplier et issues d'une friche industrielle enrichie en mercure. Thèse de Doctorat, publique à Montbéliard le 11 décembre 2017.
- **El maghili k (2017)**. Etude des différentes tailles viticole sur les paramètres physiologiques de la variété Sultanine dans des conditions arides (Coopérative agricole : Tamanrasset). Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de master en science agronomique. Algérie : Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- **Galet P (1993)**. Précis de viticulture. 6eme Edit. DEHAN, 582 p.
- **Galet P (2001)**. Dictionnaire encyclopédique des cépages. Edit. Hachette, 18-40 p.
- **Galet P (2000)**. Précis de viticulture. Édit Broché, 7ème édition, Paris, 602 p.
- **Galet, P (2000)**. Dictionnaire encyclopédique des cépages. Paris : Hachette.
- **Girard G (2007)**. Bases scientifiques et technologiques de la viticulture. Edit. Tec. et Doc., 3-89 p.
- **Gomez H (2007)**. Relation entre état de croissance de la vigne et maladies cryptogamiques sous différentes modalités d'entretien du sol en région méditerranéenne. Thèse Doctorat, Montpellier, 96 p.

- **Guilherme Martins ,Béatrice Lauga, Miot-Sertier, Anne Mercier, Aline Lonvaud, Marie-Louise Soulas, Guy Soulas, Isabelle Masneuf-Pomarède (2013).** Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations. Plos one (en ligne), (page consulté le 01/09/2021) (<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0073013>)
- **Hennine.Y et Serière.H. (2017).** Isolement et caractérisation des bactéries lactiques dans le smen traditionnel algérien. Mémoire pour l’obtention du diplôme de Master. Spécialité : Analyses Biologiques et Biochimiques. Page31.
- **Hidalgo L (2008).** Taille de la vigne. Edit. Dunod, 256 p.
- **Hidalgo L (2010).** Taille de la vigne. Mundi-prensa. Madrid
- **Juzan L, Pernelle JJ, Dabert P(2012).** Les outils de la biologie moléculaire pour l’analyse microbiologique des boues activées. Sciences Eaux & Territoires.
- **Lebon G (2005).** Importance des glucides lors de la floraison chez la vigne (exemple de cépages présentant une sensibilité différente à la coulure). Thèse Doctorat, Univ. Reims, 158 p.
- **Lery (1982).** L’agriculture au Maghreb G.P. Ed. Maisonneuve et Larose.
- **Leveau JHJ, Tech JJ (2011)** Grapevine microbiomics: Bacterial diversity on grape leaves and berries revealed by high-throughput sequence analysis of 16S rRNA amplicons. Acta Hort (ISHS) 905: 31–42.
- **Lindow S.E et Brandl M.T(2003).** MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere. Appl Environ Microbiol. doi: 10.1128/AEM.69.4.1875
- **Mahboub, S (2017).** Contribution à l’étude des maladies de quelque variétés de la vigne dans la région de Tlemcen. Mémoire de fin de cycle en vue de l’obtention du diplôme de master en agronomie. Algérie : Université de Tlemcen., p91.
- **Mami.A. (2007).** Recherche des bactéries lactiques productrice de bactériocines à large spectre d’action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de DOCTORAT. Université d’Oran AHMED BEN BELLA.161
- **Martins G, Miot-Sertier C, Lauga B, Claisse O, Lonvaud-Funel A, et al. (2012).** Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. Int J Food Microbiol 158: 93–100.
- **Nisiotou AA, Rantsiou K, Iliopoulos V, Cocolin L, Nychas G-JE (2011).** Bacterial species associated with sound and *Botrytis*-infected grapes from a Greek vineyard. Int J Food Microbiol 145: 432–436.
- **Ovi (2018).** World vitiviniculture situation. OVNI statistical report on world vitiviniculture. Édité. International Organisation of Vine and Wine, Paris, 25 p.
- **Petit A-N (2008)** .Effets de fongicides anti-botrytis sur les organes végétatifs et reproducteurs de la vigne. Thèse Doctorat, Univ., Reims, 129 p.
- **Retournard D (2003) :** La vigne, le choix des cépages, la taille, les soins. Edit. Rustica, 9-86 p.
- **Reynier A(2007)** . Manuel de viticulture. Edit. Lavoisier, Tec. et Doc., 529 p.
- **REYNIER A (1986).** Manuel de viticulture. Paris: Bailliere.

- **Ribereau-Gayon J et Peynaud E (1971).** a - Sciences et techniques de la vigne Tome 1 et 2. Edit. Dunod, Paris, 1443 p.
- **Singh P (2018).** Microbial assemblage ingrape vine's phyllosphère : who is the driver? Thèse de Doctorat, INRA-SUPAGRO, Montpellier 2018.
- **Tayeb B.M (1990).** - Le secteur viticole et vinicole en Algérie : marché interne et commerce international. New Médit, vol. 1, n° 1, p. 33-36.
- **Verrière L. et Olivier R. (1957).** L'économie algérienne. Sa structure, son évolution de 1950 à 1955. Études et Conjoncture, vol. 12, n° 2, p. 204-280.
- **Vorholt J.A (2012).** Microbial life in the phyllosphere. Nature Reviews Microbiology 10:828- 840.
- **Yanagida F, Srionnual S, Chen Y-S (2008)** Isolation and characteristics of lactic acid bacteria from koshu vineyards in Japan. Lett Appl Microbiol 47: 134–139

Annexes

Annexe 01 : Technique de prélèvement des échantillons du tronc de la vigne

1- Liste du matériel requis pour le terrain

Tout l'équipement pour l'échantillonnage et le matériel devrait être dans un petit sac à dos prêt pour le départ sur le terrain.

1- Sacs stérile	7- Coton
2- Des gants de travail	8- Ciseau
3- Une pince	9- Glacière
4- Briquet	10- Scotch
5- Couteau	11- Crayon et carnet de note
6- Boussole	12- Rouleau de papier hygiénique

Plus quelques articles pour la sortie :

- Appareil a photo.
- Carte topographique de la région.
- Nourriture et autre effets personnel.

2- Stratégie de prélèvement

- 1/ Déposer le sac de plastique en dessous de la zone ;
- 2/ Couper à l'aide d'un couteau un morceau de 10 cm du tronc ;
- 3/ Prélever le morceau à l'aide d'une pince et le déposer dans le sac stérile, en prenant soin de bien le fermer avec du scotch ;
- 3/ A la suite du prélèvement le morceau doit être conservé dans une glacière ;
- 4/ Faire parvenir l'échantillon par une livraison garantissant l'acheminement des colis en de ça de 24 heures.

3- Précaution générales :

- L'échantillonnage influence directement la qualité des résultats analytiques obtenus. Des précautions élémentaires doivent être prises pour obtenir un échantillon représentatif afin de minimiser les risques associés à la contamination de l'échantillon par le préleveur et de permettre le maintien de l'intégrité des échantillons.
- Tous les échantillons destinés aux analyses microbiologiques doivent toujours être prélevés dans les contenants stériles.

- Les conditions d'asepsie nécessaires doivent être respectées lors de la prise de l'échantillon entreposer le matériel d'échantillonnage dans un endroit propre et bien aéré;
- Emballer soigneusement les échantillons pour éviter les bris ou déversements et utiliser des contenants d'expédition identifiés et adéquats pour le transport des échantillons.
- Entre la récolte des échantillons et le moment de l'expédition, il est préférable de conserver les spécimens à la fraîcheur en utilisant une glacière.

Annexe 02 : Préparation du bouillon nutritif

Le bouillon nutritif est un milieu largement utilisé pour cultiver des micro-organismes indésirables. Il est recommandé pour de nombreuses méthodes d'analyse normalisées pour les aliments, les produits laitiers, l'eau et d'autres produits.

Composition de bouillon nutritif en poudre

Pour 1 litre de milieu :

- Peptones 10,0 g
- Hydrolysate de caséine 5,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g

Matériel utilisé

- 13-15 g de bouillon nutritif en poudre.
- 1 litre d'eau distillée.
- Une balance.
- Un vortex.
- Autoclave.

Méthode de préparation

- dans une balance, peser 13 à 15 g de bouillon nutritif.
- Mettre dans une fiole qui contient 700 ml d'eau distillée.
- Mélanger et dissoudre complètement à l'aide d'un vortex.
- Compléter le mélange avec l'eau distillée jusqu'à 1L.
- Stériliser à l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes.



Figure : BN en poudre et vortex (Cliché Khebbab, 2021).

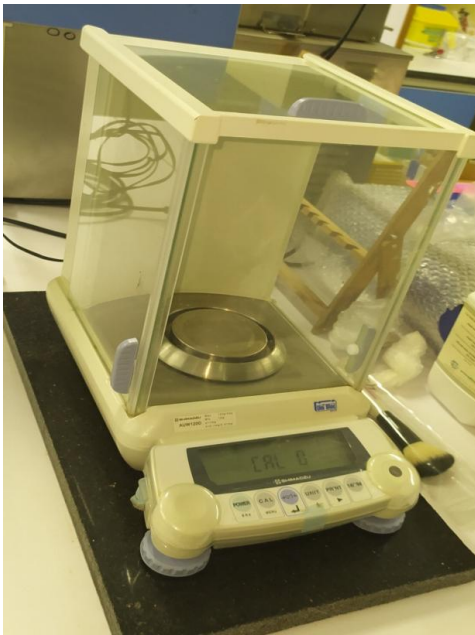


Figure : photographie d'une
Balance (Cliché Khebbab, 2021)



Figure : Bouillon nutritif sur vortex
(Cliché Khebbab, 2021)

Annexe 3 : Antifongique utilisé (fungizone)



Annexe 04 : Coloration de Gram

La méthode de coloration de Gram peut être utilisée pour diviser les bactéries en deux catégories. Ce en 1884, le bactériologiste danois Hans Christian Gram a développé cette technique.

A la fin du processus de coloration, les bactéries dites "Gram-négatives" sont roses, tandis que les bactéries dites "Gram-positives" sont bleu foncé/violet.

La répartition des bactéries en Gram+ ou Gram- est un critère systématique important pour la Classification des bactéries.

De plus, la coloration de Gram reste une étape essentielle de l'analyse pour la détermination des agents pathogènes. elle peut facilement permettre d'observer les bactéries et donner une indication de leur forme et de leur taille.

1) Faire un frottis

- Nettoyer une lame à l'alcool.
- Déposer une goutte d' H_2O sur la lame
- Toucher une colonie à l'aide d'une anse de platine stérile pour prélever des bactéries
- Frotter la pointe dans la goutte d'eau. Laisser sécher à l'air.
- Passé 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

2) Coloration

1- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis fixé.

- Laisser agir 1 minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.
- Jeter l'excès de colorant dans un bûcher.
- Rincer très brièvement en faisant couler de l' H_2O sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).

2- Déposer quelques gouttes de Lugol sur le frottis. Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries.

- Laisser agir 1 minute.
- Jeter la solution de Lugol dans un bûcher et rincer brièvement à l' H_2O comme précédemment décrit.

3- Décolorer en faisant couler la solution de décoloration (d'alcool et d'acétone) sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes).

- Rincer à l' H_2O .

- 4- Contre-colorer en déposant la solution de fushine (rose) pendant 1 minute. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+.
 - Rincer à l'H₂O.
 - Laisser sécher à l'air.
- 5- Observer au microscope (grossissement 400x ou, avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 1000x).

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Ecologie et environnements

Spécialité : Ecologie microbienne.

Caractérisation de la flore phyllosphérique du tronc de la vigne

Résumé

Cette étude a pour but de caractériser et d'essayer d'identifier la flore phyllo sphérique du tronc de la vigne (*Vitis Vinifera*), notamment la population bactérienne se trouvant à ce niveau. Pour réaliser ce but, des troncs de la vigne de la variété « red globe », ont été collectés d'une façon stérile à partir d'un vignoble se trouvant à El-Harrouch, willaya de Skikda. Les techniques de caractérisation et d'identification utilisées sont basées sur une analyse phénotypique. Pour la vérification de la présence bactérienne nous avons utilisé un antifongique et pour réaliser l'analyse microscopique nous avons utilisé une coloration de Gram et une coloration avec le bleu de méthylène. Le résultat montre la présence d'une diversité microbienne en générale et bactérienne en particulier sur la surface du tronc de la vigne. Quatre genres de Gram positif sont soupçonnés être présents: les genres *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* qui ont montré la forme en coque et le genre *Streptobacillus* montrant une forme en bacilles. Ces résultats devraient être confirmés par des techniques plus poussées comme celles s'appuyant sur la biologie moléculaire.

Mots clés : *Vitis Vinifera*, tronc de la vigne, analyse phénotypique, phyllo-sphère, bactéries épiphytes.

Membre du jury :

Président du jury :	Mr. Kitouni Mahmoud	(Professeur- UFM Constantine)
Rapporteur :	Mr. Benhizia Yacine	(Professeur- UFM Constantine).
Co-encadreur :	Mme. Dekkiche Samia	(MCB- U Batana 2)
Examineurs :	Mme. Guergouri Ibtissem	(MAA - UFM Constantine).

Présentée par : Khebbab Imene & Ladjabi Sara

Année universitaire : 2020-2021