



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث 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
Département de Microbiologie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم الميكروبيولوجيا

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 :

**Contribution à la caractérisation de la flore phyllosphérique
des feuilles de la vigne (*Vitis Vinifera*)**

Présenté le : 22-09-2021, par :

- BOUHHROUM Imen
- KELLOU Chiraz
- REDJEM Rayene

Jury d'évaluation:

Président du jury : M. Kitouni Mahmoud - Professeur- UFMC1
Encadreur : M. Benhizia Yacine - Professeur - UFMC1
Co-encadreur : Mme. Dekkiche Samia - MCB- Université Batna 2
Examinatrice : Mme. Guergouri Ibtissem - MAA- UFMC1

Année universitaire

2020 – 2021

Remerciements

On remercie d'abord Allah tout-puissant qui nous a donné la force, courage et surtout la patience et la santé pour accomplir ce travail de fin d'étude.

Nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude, nos remerciements ainsi que notre plus grand respect au Pr. BENHIZIA Yacine pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils et d'avoir accepté de nous encadrer.

Nous désirons aussi remercier Mme. DEKKICHE Samia pour nous avoir orientées, conseillées et pour son aide tout au long de notre travail. Nous avons eu l'honneur et la chance de bénéficier de ses connaissances, ses compétences et de ses précieux conseils.

Nous tenons aussi à remercier sincèrement Mme. HOUDA l'ingénieur de laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, pour toute l'aide qu'elle nous a apportée.

Enfin nos derniers remerciements et qui ne sont pas les moindres, vont aux membres du jury Pr. KITOUNI Mahmoud et Mme. GUERGOURI Ibtiseme, qui accepté de juger notre modeste travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce aux concours et aux conseils de plusieurs personnes, à qui nous voulons témoigner toute notre gratitude.

Dédicace

Ce mémoire de fin d'étude est dédié à nos parents, familles et proches.

C.R.?

Résumé

La flore phyllosphérique des feuilles de vigne (*Vitis Vinifera*), a fait l'estimation de ce présent et modeste travail qui se concentre sur l'isolement, l'identification et l'abondance des micro-organismes en interaction avec cette partie de la plante, notamment la population bactérienne abondante. Des tests morphologiques, microbiologiques et un dénombrement microbien sont appliqués pour cet objectif. Le prélèvement des feuilles est réalisée à partir de la variété « Red Globe » de la vigne cultivée, sur un site situé à El Harrouch (willaya de Skikda), Algérie.

Les résultats de cette caractérisation phénotypique ont pu montrer l'existence sur les feuilles de la vigne, d'une diversité microbienne en générale et bactérienne en particulier. Même si l'analyse phénotypique ne permet qu'une simple orientation dans la classification des isolats au niveau de genre, elle a pu dans cette étude orienter vers la présence et l'abondance de multiples genres bactériens tels que *Staphylococcus* et *Lactobacillus* sur la feuille de vigne.

Ce travail de recherche a donné une idée globale sur la grande diversité de la flore bactérienne des feuilles de la vigne et pourrait être vérifié et complété via les techniques fiables de la biologie moléculaire.

Mots clés : flore phyllosphérique, *Vitis Vinifera*, diversité bactérienne, caractères morphologiques, feuilles de vigne.

Abstract

The phyllospheric flora of the grapevine leaves (*Vitis Vinifera*), has been the estimation of this modest work, which focuses on the isolation, identification, and abundance of microorganisms in interaction with this part of the plant, especially the abundant bacterial population. Morphological, microbiological tests and a microbial count was applied for this purpose. The leaves are taken from the «Red Globe variety» the cultivated vine, at a site located in El Harrouch (willaya de Skikda), Algeria.

The results of this phenotypic characterization were able to show the existence on the leaves of the vine of a microbial diversity in general and bacterial diversity in particular. Although phenotypic analysis allows only a simple orientation in the classification of isolates at the genus level, in this study it was able to direct towards the presence and abundance of multiple bacterial genera such as *Staphylococcus* and *Lactobacillus* on the vine leaf.

This research work gave a global idea on the great diversity of bacterial flora of the grapevine leaves and could be verified and completed through reliable molecular biology techniques.

Keywords: Phyllospheric flora, *Vitis Vinifera*, bacterial diversity, morphological characteristics, grapevine leaves.

ملخص

كانت الفلورا الفيلوسفيرية لأوراق العنب (*Vitis Vinifera*) موضوع هذا العمل المتواضع الذي يركز على عزل الكائنات الدقيقة وتحديدتها ووفرة الكائنات الحية الدقيقة في التفاعل مع هذا الجزء من النبات، لا سيما البكتيريا المتواجدة بكثرة. لهذا الغرض يتم تطبيق الاختبارات المورفولوجية الميكروبيولوجية والتعداد الميكروبي. الأوراق مأخوذة من صنف «ريد غلوب» الكرمة المزروعة في موقع يقع في الحروش (ولاية سكيكدة)، الجزائر.

أظهرت نتائج هذا التوصيف المظهري وجود تنوع جرثومي على أوراق العنب بشكل عام وتنوع بكتيري بشكل خاص. على الرغم من أن تحليل النمط الظاهري يسمح فقط بالتوجه البسيط في تصنيف البكتيريا المعزولة على مستوى الجنس، إلا أنه في هذه الدراسة كان قادرًا على التوجيه نحو وجود ووفرة أجناس بكتيرية متعددة مثل *Lactobacillus* و *Staphylococcus* على ورق العنب.

أعطى هذا العمل البحثي فكرة عامة عن التنوع الكبير للسلاسل البكتيرية لأوراق الكرمة ويمكن التحقق منها وإكمالها من خلال تقنيات البيولوجيا الجزيئية الموثوقة.

الكلمات المفتاحية: الفلورا الفلوسفيرية، *Vitis Vinifera*، التنوع البكتيري، الصفات المورفولوجية، أوراق العنب.

Liste des figures

Figure 1 : Évolution de la surface du vignoble mondial (Mioha).	P : 03
Figure 2 : Illustration descriptive de la plante de vigne.	P : 06
Figure 3 : Schématisation de phyllosphère et rhizosphère	P : 08
Figure 4 : Genres bactériens présents dans le phyllosphère foliaire de cinq espèces de raisin.	P : 14
Figure 5 : Interactions et relations entre les plantes et les microorganismes	P : 15
Figure 6 : Localisation géographique de site.	P : 16
Figure 7 : Localisation du limbe et pétiole sur la plante de la vigne.	P : 17
Figure 8 : Préparations des dilutions décimales à partir de la solution mère (SM).	P : 19
Figure 9 : Etapes d'ensemencement à partir des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-3}).	P : 20
Figure 10 : Méthode d'ensemencement de trois cadrans.	P : 20
Figure 11 : Les étapes et résultats explicatif de la coloration de gram.	P : 22
Figure 12 : Séries d'ensemencement de BN à partir des dilutions décimale et après utilisation d'ATF.	P : 23
Figure 13 : Trouble montré par les dilutions décimales après 24h d'incubation.	P : 24
Figure 14 : Colonies observés sur GN après 24h d'incubation.	P : 26
Figure 15 : Colonies observés sur GN après 4jours d'incubation.	P : 27
Figure 16 : Colonies bactériennes observées sur GN.	P : 28
Figure 17 : Forme cellulaire des colonies de la boite 1 (10^{-2}), après coloration par le bleu de méthylène (observation au microscope optique $\times 100$).	P : 30
Figure 18 : Observation de quelques isolats après colorations de Gram au microscope optique $\times 100$.	P : 31
Figure 19 : Trouble observé dans les tubes de BN (a : présence d'ATF, b : absence d'ATF).	P : 32
Figure 20 : Colonies bactériennes observées sur GN avec et sans utilisation d'ATF.	P : 33

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification taxonomique de la vigne (<i>Vitis Vinifera</i>).	P : 04
Tableau 2 : Croissance microbienne dans les dilutions décimales après 24h d'incubation.	P : 24
Tableau 3 : Nombre de colonies microscopique dans chaque boite pétrie en UFC (unité forment colonie).	P : 26
Tableau 4 : Dénombrements des boites après 4jours.	P : 27
Tableau 5 : Aspect macroscopique des colonies isolées.	P : 29
Tableau 6 : Croissance microbienne sur BN.	P : 31
Tableau 7 : Nombre de colonies sur les boites GN avec et sans ATF.	P : 32

Liste des abréviations

Mioha : Million d'hectares

Ha : Hectares

ATF : Antifongique

UFC : Unité forment colonie

ARNr16S : Acide ribonucléique ribosomique 16S

ARNr 23S : Acide ribonucléique ribosomique 23S

Table des matières

Introduction.....	1
Partie 1 : Revue bibliographique	
1 La plante de vigne	3
1.1 Généralités	3
1.2 Evolution et distribution géographique	3
1.3 Taxonomie	4
1.4 Ecologie de la vigne	4
1.4.1 Température :.....	5
1.4.1 Ensoleillement :.....	5
1.4.1 Pluviométrie :.....	5
1.4.1 Vent :.....	5
1.5 Description de la plante de vigne	5
2 La flore phyllosphérique de la plante de vigne	6
2.1 Introduction au phyllosphère et la flore phyllosphérique	6
2.2 Source des microorganismes colonisant le phyllosphère	8
2.3 Facteurs contrôlant l'établissement et l'interaction flore phyllosphérique-plante.....	8
2.4 Installation et première étape d'interaction microbes-surface des feuilles.....	9
2.5 Stratégies d'adaptation microbienne dans l'habitat phyllosphérique.....	10
2.5.1 Production de différents polymères.....	10
2.5.2 Engagement des facteurs de virulence	10
2.5.3 Production des hormones.....	11
2.5.4 Production des pigments.....	11
2.5.5 Libération des tensioactifs	11
2.5.6 Production des toxines.....	11
2.5.7 Sporulation.....	12
2.6 Changements et interactions dans l'association feuilles de plantes et bactéries phyllosphériques	12
2.6.1 Echange nutritionnel et promotion de croissance	12
2.6.2 Inhibition et effet pathogène	13
2.7 Les principaux colonisateurs microbiens dans le phyllosphère et l'assemblage de communauté chez la vigne	13
2.8 Intérêt écologique des compartiments plante-microorganismes et services écosystémiques émergeant de l'interaction	14
Partie II : Partie expérimentale	

I : Matériel et méthodes

1	Echantillonnage, prélèvement et stockage des feuilles de vigne	16
1.1	Présentation du site d'échantillonnage	16
1.2	Localisation géographique	16
1.3	Matériel et produits utilisés pour le prélèvement	17
1.4	Stratégie de prélèvement des feuilles de vigne	17
1.5	Conservation des feuilles	18
2	Préparation des milieux et des solutions pour l'isolement	18
2.1	Milieux de culture utilisés.....	18
2.2	Préparation de la solution mère contenant les feuilles	18
2.3	Préparation des dilutions.....	19
3	Isolement des bactéries à partir des feuilles.....	19
3.1	Isolement des bactéries sans l'utilisation d'un antifongique	19
3.1.1	Ensemencement	19
3.1.2	Incubation	21
3.2	Caractérisation morphologique des isolats	21
3.2.1	Observation macroscopique des colonies bactériennes.....	21
3.2.2	Observation microscopique	21
3.3	Isolement avec utilisation d'un antifongique	22
3.3.1	Ensemencement sur bouillon nutritif (BN).....	22
3.3.2	Ensemencement sur gélose nutritive (GN)	23

II : Résultats et discussion

1	Isolement des microorganismes sans utilisation d'un antifongique (ATF)	24
1.1	Mise en évidence des microorganismes présents sur les feuilles de vigne	24
1.2	Analyse des microorganismes présents sur les feuilles de vigne	25
1.2.1	Analyse macroscopique après 24h d'incubation.....	25
1.2.2	Analyse des isolats après 4jours.....	27
2-3	Caractérisation morphologique des colonies obtenues.....	28
2-3-1	Caractères macroscopiques	28
2-3-2	caractérisation microscopique	30
a-	Observation après coloration par le bleu de méthylène.....	30
b-	Observation après coloration de Gram	30
2	Isolement des microorganismes des feuilles de vigne avec utilisation d'un antifongique (ATF)	31
2.1	Croissance sur le bouillon nutritif (BN)	31

2.2	Dénombrement sur gélose nutritive (GN)	32
	Discussion générale	34
	Conclusion et perspectives	36
	Références bibliographiques	34

Introduction

Introduction

Parmi les sujets de recherche d'actualité, sont ceux qui se concentrent sur la mise en évidence et l'identification des microorganismes se trouvant en interaction transitoire ou permanente avec des plantes de grand intérêt économique. Ce type de recherche représente un des domaines les plus importants de l'écologie microbienne de la phyllosphère, qui consiste à caractériser la biodiversité microbienne dans l'écosystème, caractériser les interactions entre les microorganismes de l'écosystème et à déterminer leur rôles dans les parties aériennes des plantes (interaction hôte-microorganisme colonisateurs) (Deveau et Martin, 2016).

L'interaction plante-micro-organisme peut avoir des effets profonds sur la nutrition, la santé globale de la plante et ses caractéristiques de performance recherchées par le consommateur (Deveau et Martin, 2016). Comprendre le microbiote de la plante consiste à déterminer la composition, la distribution spatiale et la diversité des micro-organismes qui se trouvent en interaction avec elle. La caractérisation du microsymbiote d'une plante pourrait aider à développer des nouveaux modes de culture plus adaptés et plus respectueux de cette plante ainsi que l'amélioration de la qualité des sols pour les plantes modèles (Deveau et Martin, 2016).

La plante de la vigne est l'une des plantes fruitières les plus cultivées dans le monde notamment en Algérie. En plus du fruit frais, la vigne sert à la production de multiples produits recherchés industriellement tels que : le vin, vinaigre, les fruits secs et les jus (Meng *et al*, 2017). L'importance économique nationale et internationale de cette plante nous a incités à prendre la vigne comme model dans cette présente étude.

La plante de vigne comme tous les écosystèmes terrestres, héberge une large diversité des microorganismes tels que les bactéries, champignons, virus...etc, pouvant être bénéfiques ou délétères. Ces microorganismes peuvent se localiser à la surface, dans les tissus de la plante et au voisinage de son système racinaire dans la rhizosphère. La plante est toujours en interaction avec ce microbiote, cependant la majorité des études effectuées dans ce domaine, a été concentrée sur les feuilles de la plante qui représente la structure aériennes la plus dominante sur terre. Sur les feuilles, les bactéries sont le groupe taxonomique le plus dominant et ainsi le plus étudié (Lu, 2020).

Cette présente étude a pour objectif de décrire et à déterminer la diversité et l'abondance des populations bactériennes se trouvant sur les feuilles de la vigne. « Quels sont les

genres bactériens les plus abondants sur les feuilles des plantes de vigne ? », est la question à laquelle on souhaite répondre dans ce modeste travail. Pour répondre à cette interrogation, ce travail suit une articulation de plusieurs chapitres regroupés en deux principales parties :

- La première partie représente une synthèse bibliographique concernant des généralités de la vigne, des notions sur la flore phyllosphérique des feuilles de vigne, origine, établissement adaptation et composition.
- La deuxième partie présente une expérimentation qui a été menée sur terrain sur un champ de vigne dans la région d'El Harouche. elle expose plusieurs points importants dont le premier cite le matériel, méthodes et le protocole expérimental utilisé. Le deuxième point concerne les résultats obtenus, leur interprétation et enfin le troisième point représentera une conclusion et les perspectives soulignées.

Partie 1 : Revue
bibliographique

1 La plante de vigne

1.1 Généralités

La plante de la vigne est l'une des plantes fruitières les plus cultivées dans le monde. En plus du fruit frais, la vigne sert à la production de multiples produits tels que : le vin, vinaigre, les fruits secs et les jus (Meng *et al.*, 2017).

Cet arbrisseau grimpant est besoin de sol meuble et bien drainé sous le sol pour le développement de ces racines. Bien que l'azote et le potassium soient considérés comme des éléments majeurs de la structure du sol pour prospérer, la vigne a besoin de quantités adéquates de magnésium et de zinc car le magnésium est vital pour un feuillage sain, qui à son tour affecte la production de fruits et la croissance de la vigne (Douglas, 2019).

Les vignes poussent mieux dans un sol avec un pH de 5,0 à 6,0 (Douglas, 2019). Elles sont aussi plantées souvent dans une pente pour permettre à l'eau de s'évacuer rapidement lors du l'arrosage.

1.2 Evolution et distribution géographique

Un assez grand nombre d'espèces de *Vitis* a évolué dans le monde. L'Asie de l'est, le proche Orient et l'Amérique de nord, sont considérés comme un centre d'origine majeure de nombreuses espèces de *Vitis*, mais à partir de l'année 2016, l'espèce *V. Vinifera* semble être la plus répandue dans le monde. L'estimation de la production mondiale est de 7.5 mioha (million d'hectares) avec 74 million de tonnes. Pendant l'année 2020, la superficie mondiale du vignoble est estimée à 7.3 mioha (**Figure 1**), (Meng *et al.*, 2017 ; OIV, 2020).

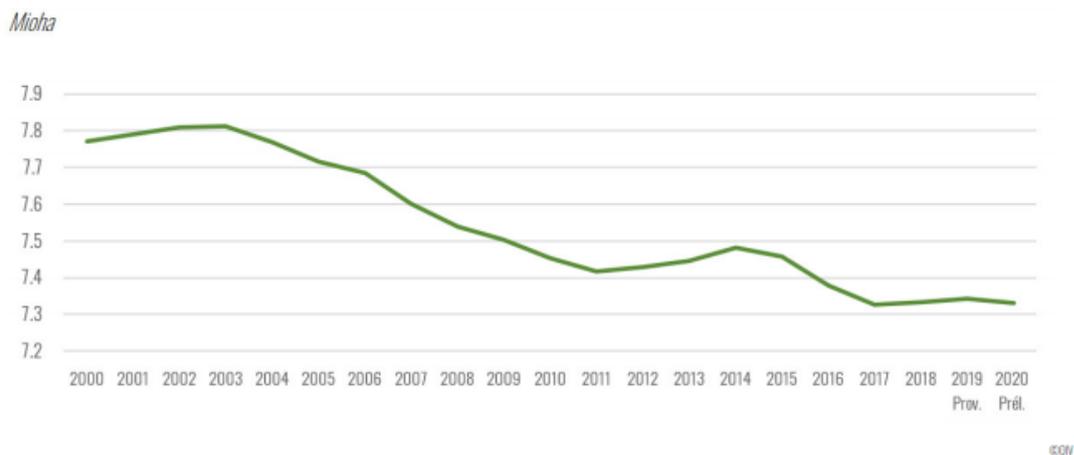


Figure 1 : Évolution de la surface du vignoble mondial (Mioha) (OIV, 2020).

Cinq pays représentent actuellement 50% de surface de vignoble du monde. L'Espagne occupe la première place (13.1%) suivie par la France (10,9%), la chine (10.7%), l'Italie (9.8%) et en dernier lieu la Turquie (5.9%) (OIV, 2020). En Algérie, la vigne de table est cultivée sur une superficie de 66 hectares (OIV, 2020).

1.3 Taxonomie

La vigne appartient à la famille des Vitacées qui comprend 12 genres et plus de 700 espèces. La plupart des Vitacées sont des vignes grimpantes comprenant des genres tels que : *Ampélocissus*, *Parthenocissus*, *Tétrastigma*, *Vitis*... Etc. Au sein du genre *Vitis*, *Vitis Vinifera* est la principale espèce utilisée dans l'industrie mondiale. Cette espèce, à son tour se divise en deux sous espèces : *Vitis Vinifera subsp. Sylvestris*, qui représente la population sauvage de la vigne et *Vitis Vinifera subsp. Sativa Vinifera*, (**Tableau 1**), qui représente la population cultivable de la vigne (Meng et al, 2017 ; Riaz et al, 2018).

Tableau1 : Classification taxonomique de la vigne (*Vitis Vinifera*) (INPN, 2021)

Règne	<i>Plantae</i>
Class	<i>Equisetopsida</i>
Sous Class	<i>Magnoliidae</i>
Ordre	<i>Vitales</i>
Famille	<i>Vitaceae</i>
Genre	<i>Vitis</i>
Espèce	<i>Vitis Vinifera</i>
Sous Espèce	<i>Vitis Vinifera subsp Sylvestis</i>
Sous Espèce	<i>Vitis Vinifera subsp Sativa</i>

1.4 Ecologie de la vigne

Les ceps de la vigne ont des exigences climatiques très concrètes et sont cultivées sous divers climats. Le climat méditerranéen est particulièrement favorable, mais les climats tempérés lui conviennent également. La vigne présente une certaine sensibilité pour les variabilités en température, l'ensoleillement, la pluviométrie et le vent (Pépinières, 2019 ; Parker, 2021).

1.4.1 Température :

La vigne doit cumuler suffisamment de chaleur pour que son cycle végétatif et la maturation de ses raisins se déroulent dans les meilleures conditions (Crivellaro, 2021).

Cette plante est sensible aux fortes gelées hivernales (supérieures à -15), qui peuvent endommager les ceps, ainsi qu'aux gelées de printemps qui peuvent détruire les bourgeons et les premières feuilles. De même, en été, des températures trop élevées accompagnées de longues périodes de sécheresse provoquant un ralentissement et un arrêt de la croissance des feuilles et des raisins (Parker, 2021).

1.4.1 Ensoleillement :

Les rayonnements solaires représentent un élément important de la photosynthèse qui permet à la vigne d'accumuler des réserves (sucres) dans ses fruits (Parker, 2021).

Les besoins de lumière de la vigne sont très élevés, puisqu'il s'agit d'une plante de jour long dont les besoins basiques vont de 1200 à 1800 heures (Pépinières, 2019).

Les pentes et la couleur de sol jouent un rôle très important pour l'ensoleillement des grappes et les heures de chaleur. Les pentes orientées vers le sud et l'est ont un ensoleillement identique à celui des pentes plus accentuées (Pépinières, 2019).

1.4.1 Pluviométrie :

Même si la vigne supporte très bien la sécheresse, particulièrement si elle est progressive, elle nécessite, pour couvrir ses besoins, de 500 à 600 ml d'eaux par an (Pépinières, 2019). La pluviométrie élevée, l'humidité et les sols engorgés de manière plus ou moins permanente, favorisent les attaques des champignons comme le mildiou et le botrytis (Pépinières, 2019), ainsi, la vigne a besoin d'un apport d'eaux modéré mais régulier (Parker, 2021).

1.4.1 Vent :

Le vent est un élément régulateur et protecteur de certaines maladies de la vigne, il permet de sécher et ventiler la vigne (Parker, 2021).

1.5 Description de la plante de vigne

La vigne développe un système racinaire qui occupe une partie de sol et du sous-sol et qui s'enfonce généralement à une profondeur de 2 à 5 mètres. On observe le développement des racines adventives aériennes dans des conditions chaudes et humides (Huglin et Schneider, 1998).

La partie aérienne de la plante est constituée d'un tronc portant des rameaux feuillés appelés pampres, qui se lignifient en sarments et qui se composent de plusieurs maritales séparées par des nœuds d'où poussent les vrilles. Ces dernières sont des fourches essentielles permettant à la vigne de grimper ou de s'accrocher sur les supports lors de la croissance. Les fleurs qui sont très petites, verdâtres à blanches et regroupées en inflorescence, permettent de donner des couleurs variées entre blanc, jaunâtre, violet ou noir et des formes variables selon les sous espèces mais généralement en grappes. Les feuilles sont à nervure palmée avec un rabat entier ou divisées en 3 ou 5 lobes principaux et généralement une base cordiformes, elles sont de 3 à 5 pouces de long et grossièrement dentées avec une surface lisse (**Figure2**), (Huglin et Schneider, 1998).

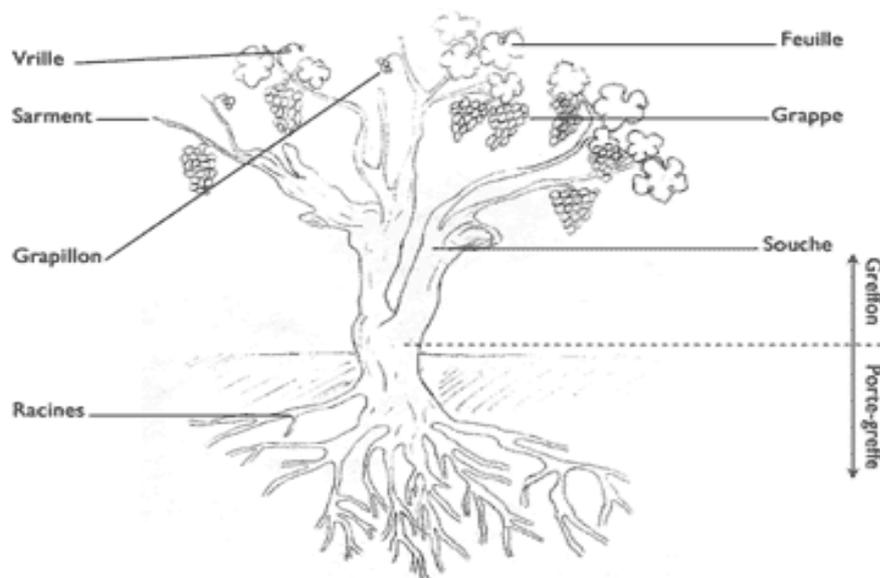


Figure 2 : Illustration descriptive de la plante de vigne (Gout et vin, 2021).

2 La flore phyllosphérique de la plante de vigne

2.1 Introduction au phyllosphère et la flore phyllosphérique

Le terme phyllosphère désigne l'ensemble des organes aériens de la plante (feuilles, tiges, bourgeons, fleurs...etc.). La flore phyllosphérique est l'ensemble dynamique complexe d'organismes vivants qui interagissent entre eux et avec les organes d'une plante.

La dynamique microbienne est beaucoup moins connue par rapport aux parties rhizosphériques en termes de relations et des associations symbiotiques entre les différentes communautés microbiennes dans le phyllosphère. L'habitat phyllosphérique fourni par les

parties aériennes est soutenue à la fois par des microorganismes phylloplanes (des épiphytes qui vivent à la surface de ces organes) et des endosphères (les endophytes vivant à l'intérieur des tissus). Cet habitat est composé des différentes communautés bactériennes, virus, champignons, archées... etc (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008).

Les principaux groupes colonisateurs des surfaces foliaires sont les bactéries en termes de quantité et en diversité et comme exemple la diversité des bactéries dans un phyllosphère de 20000 plantes vasculaires a été estimée de 2 à 13 millions espèces (Whipps *et al*, 2008).

La surface foliaire est constituée de la plus grande concentration microbienne sur terre après le sol rhizosphérique. Sur terre le nombre microbien global est estimé à plus de $4,6 \cdot 10^8$ microorganismes dans le monde, alors que la densité bactérienne dans cette surface peut atteindre $10^6 - 10^7$ cellules par centimètre carré de feuille. De plus ces clones dominent l'habitat avec un nombre cultivable compris entre 10^2 et 10^{12} cellules par gramme de feuille via une quantité totale qui peut atteindre 10^{26} cellules par rapport aux autres groupes taxonomiques partageant le même habitat (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008).

Les deux organisations (végétale et microbienne), partagent le même environnement (**Figure 3**) et leurs interactions possèdent une grande importance agricole et environnemental ainsi leurs évolutions sont liées (Whipps *et al*, 2008).

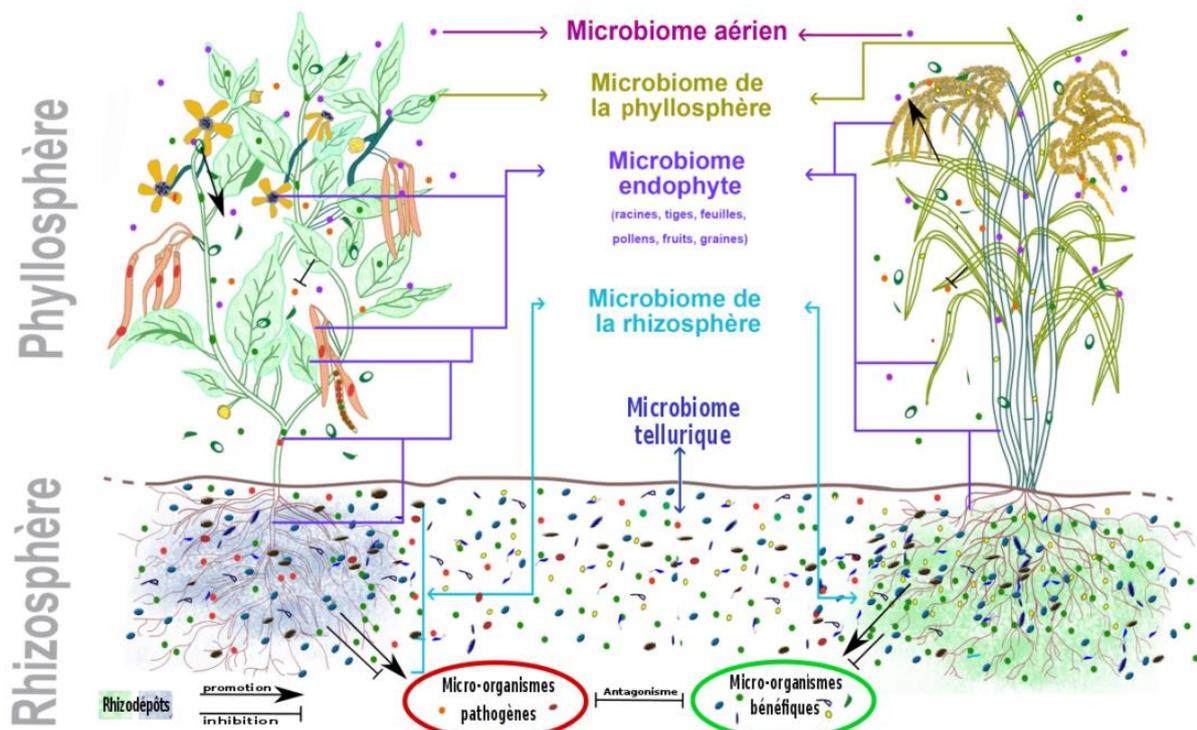


Figure 3 : Schématisation de phyllosphère et de rhizosphère (Lu, 2020).

2.2 Source des microorganismes colonisant le phyllosphère

L'habitat phyllosphérique est un système ouvert, les microbes peuvent arriver à la surface des feuilles des nouvelles plantes avec différentes sources. Les insectes ou l'atmosphère sont parmi ces sources, mais les plus importantes sources sont les graines des plantes annuelles et les débris des cultures précédentes, car ils sont à l'origine des majeures bactéries déjà adaptées à la phyllosphère (Whipps *et al*, 2008).

La sédimentation aussi est l'éclaboussure de la microflore atmosphérique. Au cours des périodes saisonnières, en réponse aux événements environnementaux, la sédimentation mène à l'établissement et la colonisation des feuilles et la migration des microorganismes entre les plantes voisines. Aussi, principalement le vent et la précipitation de pluie en surface des feuilles constituent une dispersante efficace pour le passage et la contamination par le sol, qui peut contenir différentes compositions et concentrations microbiennes pouvant provenir même à partir des sources animales (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008).

Les microorganismes présents sur les graines ou les racines peuvent pénétrer dans le système vasculaire comme des endophytes puis être transférés à l'intérieur des parties aériennes (Whipps *et al*, 2008).

2.3 Facteurs contrôlant l'établissement et l'interaction flore phyllosphérique-plante

Les caractéristiques phénotypiques présentées par la plante est contrôlées par la constitution génétique, jouent un rôle important dans la détermination, la sélection de la communauté et la structure de la diversité microbienne au sein des espèces végétales (Whipps *et al*, 2008).

Il existe des points chauds pour la croissance microbienne sur la feuille. Il s'agit de sites spécifiques qui ont la capacité de soutenir des populations épiphytes indigènes spécifiques et qui sont similaires sur les feuilles d'individus de la même espèce. Les épiphytes qui varient entre les cultivars, peuvent varier aussi considérablement en taille et en composition à la fois spatialement et temporellement sur la même plante (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008).

Parmi les critères les plus importants, assurant la présence et la croissance de la population microbienne sur feuilles, on peut citer la position, l'âge et la structure des feuilles. Le plus grand nombre des bactéries, se trouve dans la surface inférieure de la feuille, lieu de

présence de la plus grande densité de stomate de trichomes ou une couche cuticulaire mince (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008).

L'âge des feuilles est lié principalement aux ressources nutritives que fournissent le métabolisme, le développement de la feuille, la nature des exsudats foliaires et l'eau libérée par la feuille au cours de la saison de croissance. Ceci explique la présence d'une petite quantité de bactéries épiphytes sur les feuilles, peu de temps après l'émergence des bourgeons ou des graines, mais cette quantité augmente par la suite (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008).

Le positionnement de la feuille sur la plante, son hauteur, l'exposition à la lumière solaire et la température, sont parmi les facteurs impliqués dans la distribution et la quantité de la flore phyllosphérique. La survie de cette flore dépend aussi des caractéristiques environnementales dans lesquelles la plante se trouve. Tous les facteurs physicochimiques, principalement la température, le rayonnement la dessiccation, l'humidité et la disponibilité d'eau et des nutriments, interagissent pour contrôler les l'habitat de la phyllosphère (Lu, 2020; Whipps *et al*, 2008).

La reconnaissance entre plante et microorganismes conduise à l'établissement des interactions très important qui sont reliés au plan évolutif tout cas fait intervenir des signaux microbiens, la compréhension des mécanismes de signalisations aidé à améliorer l'utilisation des signaux symbiotiques bénéfiques pour une agriculture durable (Cullimore et Gough, 2011)

2.4 Installation et première étape d'interaction microbes-surface des feuilles

L'installation des micro-organismes notamment les bactéries sur la surface des organes dépend généralement de l'organe qui exerce une forte sélection pour la composition des communautés au 1er stade de colonisation dans le cas des feuilles (Lu, 2020; Whipps *et al*, 2008).

Le premier point de contact de cellules microbiennes avec la phyllosphère est souvent favorisé par la nature de la surface d'organe. La nature microcristalline favorise la survie des épiphytes par un degré d'humidité importante. Aussi la présence des exopolysaccharides sur la surface, joue le rôle d'une barrière de diffusion, réduisant à la fois les pertes d'eau et de solutés et l'entré des populations aqueuses, conférant ainsi une imperméabilité de l'eau, ce qui permet de fournir une protection des agents pathogènes (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008).

L'installation des microorganismes sur la surface des organes n'active pas généralement les défenses immunitaires de la plante. Parmi ces microorganismes il y'a ceux qui présentent une multiplication nulle ou limitée, ils sont considérés comme des épiphytes transitoires tandis que les épiphytes résiduelles ont la capacité de s'établir et de coloniser les jonctions de la paroi des cellules épidermiques. Après colonisation, certains épiphytes résiduelles peuvent engager des relations fondamentales selon les propriétés des clones et leur capacité de survie dans l'habitat alors que d'autres sont capables de modifier l'environnement pour améliorer les niveaux de stress auxquels ils sont exposés, grâce à leurs mécanismes d'adaptation développés (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008).

2.5 Stratégies d'adaptation microbienne dans l'habitat phyllosphérique

Les espèces microbiennes qui colonisent la phyllosphère ont pu développer des différents mécanismes d'adaptation aux différentes conditions de vie difficiles.

2.5.1 Production de différents polymères

Pour s'attacher à la surface foliaire, les micro-organismes forment fréquemment des formes d'agrégats ou bien des biofilms. Les micro-organismes se développent sur la surface, matrice protectrice de la feuille en produisant des polymères qui leur permettent une agrégation et une adhérence sur les surfaces. Cette structure protectrice contient 10-15 % de cellules bactériennes provenant d'une seule bactérie ou d'une communauté bien définie et elle contient environ 75-90 gangue polymère (Jouenne, 2008).

Le quorum sensing est un mode de communication et perception utilisé par les bactéries se trouvant sur la surface foliaire. Il s'agit d'une production commune des petites molécules appelées les auto-inducteurs (AI), qui peuvent diffuser à travers la membrane ou être transportées à l'extérieur de la cellule (Mion *et al*, 2019). Ce système permet une densité cellulaire importante mettant en place des phénotypes particuliers comme la production des exopolysaccharides, des antibiotiques et la formation des biofilms (Whipps *et al*, 2008; Mion *et al*, 2019). En plus de leur rôle dans l'adhérence, les exopolysaccharides protègent les communautés bactériennes de la dessiccation (Lu, 2020; Whipps *et al*, 2008).

2.5.2 Engagement des facteurs de virulence

Les pilis et les flagelles sont des facteurs de virulence que possèdent certaines bactéries et qui peuvent également être importants pour la fixation bactérienne. Ces facteurs protègent les bactéries du stress hydrique modéré, du pH du milieu, assurent les échanges

gazeux même les échanges génétiques horizontaux entre les souches bactériennes (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008).

2.5.3 Production des hormones

Certaines bactéries épiphytes produisent des phytohormones comme l'acide indole-3-acétique, pour faciliter le rapprochement des nutriments par attachement de la paroi végétale. D'autres utilisent des biocapteurs bactériens pour attirer les sucres présents et ne sont localisés que dans des sites discrets sur la feuille (Lu, 2020; Whipps *et al*, 2008).

2.5.4 Production des pigments

Alors que les certaines bactéries colonisent des zones riches en nutriments qui soutiennent la croissance, la plupart des bactéries qui colonisent les surfaces des plantes sont capables de résister à des niveaux élevés des rayonnements U.V et les plus tolérants sont celles qui produisent des pigments roses ou rouges (Whipps *et al*, 2008).

2.5.5 Libération des tensioactifs

La disponibilité d'eau et des nutriments est un facteur limitant majeur pour la croissance des épiphytes. Certaines espèces bactériennes comme *Pseudomonas.spp*, peuvent libérer des tensioactifs qui augmentent la mouillabilité des surfaces foliaires, ce qui permet la diffusion des nutriments et la disponibilité des substrats. D'autres touchent la perméabilité de la cuticule en la disponibilité d'eau et de nutriments (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008).

2.5.6 Production des toxines

Il existe des bactéries qui produisent des toxines affectant le transport des ions à travers les membranes plasmidiques des cellules végétales ou bien des toxines de lyse pour la libération des nutriments comme les toxines syringomycines en faible quantité par des souches non pathogènes tel que le cas de *Pseudomonas Syringae* (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008).

Dans certains cas, les bactéries utilisent des mécanismes délicats pour transmettre leurs toxines à l'intérieure de la cellule végétale, ces systèmes sont actuellement appliqués en thérapeutique. Par exemple le système de sécrétion type 3 est " une nano machine qui injecte les toxines dans la cellule eucaryote au moyen d'une seringue moléculaire appelé l'aiguille du T3SS " (Loquet *et al*, 2012). Ce système est d'origine utilisé par les bactéries de la phyllosphère pour infecter les cellules végétales après la formation d'un port de translocation. Ceci permet d'injecter les protéines bactériennes vers le cytoplasme de la cellule (Whipps *et al*, 2008).

2.5.7 Sporulation

Certaines bactéries sont capables de sporuler dans des conditions défavorables. La spore est une structure de protection au cours du temps, lorsque les conditions deviennent meilleures, les spores germent pour redevenir des cellules végétatives actives (Whipps *et al*, 2008).

2.6 Changements et interactions dans l'association feuilles de plantes et bactéries phyllosphériques

L'interaction entre les microorganismes et la surface foliaire, se traduit par plusieurs échanges biologiques, se manifestant par différents processus. Les résultats de cette interaction peuvent être positifs ou néfastes pour l'un ou pour les deux partenaires.

2.6.1 Echange nutritionnel et promotion de croissance

Les bactéries bénéficient généralement des différents nutriments de la plante libérés par les feuilles. Ces nutriments sont représentés par une large gamme des substances des composés organiques volatiles de petit poids moléculaire comme le CO₂ et l'acétone, des molécules de taille moyenne comme les aldéhydes les alcools et des molécules de haut poids moléculaire comme les hydrocarbures à long chaîne, les sulfures et des composés azotés. En général, les bactéries profitent des molécules riches en carbone se trouvant sur la surface des feuilles. Parmi ces molécules, se trouvent celles qui pourraient être comme source nutritives, d'autres molécules inhibent le développement de certaines bactéries ou certains champignons jouant le rôle d'agents pathogènes (Lu, 2020).

De leur côté, les habitants microbiens de la phyllosphère favorisent la valeur adaptative des populations végétales naturelles, la qualité et la productivité agricole de la plante. Le rôle fonctionnel de la communauté bactérienne de phyllosphère le mieux étudié est la fixation d'azote qui peut atteindre 60 kg N ha⁻¹ dans les arbres tropicaux. Cette valeur peut varier selon la plante et considérablement d'une région à l'autre. Les bactéries qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique sont dites diazotrophes, elles le réduisent en utilisant la nitrogenase, en azote organique qui satisfait la demande interne de la plante. Ce type de bactérie représente le groupe dominant dans le phyllosphère (Whipps *et al*, 2008).

Certains groupes microbiens jouent un rôle dans l'homéostasie de la plante, l'équilibre des paramètres physicochimiques et remplissent aussi plusieurs activités biologiques comme la production des hormones de croissance végétales stimulant la santé globale de la plante et pouvant améliorer sa défense contre des pathogènes. Grâce à ces hormones la plante pourrait exercer un effet antagoniste en supprimant la colonisation et l'infection par les agents

pathogènes (Lu, 2020 ; Whipps *et al*, 2008). La solubilisation du phosphore représente un autre processus de stimulation de croissance de la plante par son interaction avec certaines bactéries qui solubilisent le phosphore, surtout dans les environnements en carence du phosphate (Lu, 2020).

2.6.2 Inhibition et effet pathogène

Parmi les bactéries commensales qui colonisent le philosophe, sont les bactéries opportunistes pouvant devenir pathogènes lorsque les conditions deviennent défavorables ou lorsque la surface de la plante est endommagée (Lu, 2020).

Les maladies les plus connus causées par ces bactéries sur la surface des feuilles de vigne sont généralement des nécroses provoquées par *Xylophilus ampelinus*. Dans le cas d'une contamination par les vaisseaux, les feuilles présentent en premier lieu des dessèchements sectoriels du limbe de couleur havane puis après, elles se décolorent entièrement et tombent. Dans le cas d'une contamination des parenchymes, les feuilles présentent des petites taches brunes à noirâtres polygonales, entourées d'un halo jaune huileux (Petit, 2020).

Parmi les cépages les plus sensibles on peut citer : rose clairette blanche, colombard, vigne blanc sémillon Alicante bouschet, grenache et gamay (Petit, 2020).

2.7 Les principaux colonisateurs microbiens dans le phyllosphère et l'assemblage de communauté chez la vigne

Connaitre les principaux colonisateurs de la phyllosphère chez les espèces de vigne les plus cultivées du raisin (raisin de table), est un point principale pour comprendre les mécanismes qui contrôlent les opérations d'interaction entre cette plante et son microbiote.

Afin d'atteindre cet objectif, nous nous somme basé sur une étude récente qui s'est intéressée sur la microflore de la vigne (Singh *et al*, 2019). L'équipe de recherche a pu déterminer via la biologie moléculaire la diversité du microbiote de la vigne en prenant la phyllosphère de cinq espèces du raisin de table comme échantillons. Les espèces sont : *Vitis Vinifera*, *Cabernet sauvignon*, *Vitis pentagona*, *Muscadinia rotundifolia* et *Parthenocissus quinquefolia*. Chacun des amplicons de l'ARN ribosomique 16S et la région inter génique (région ARNr16S- ARNr23S), a montré qu'une importante diversité des microorganismes est présente en interaction avec la vigne. Le résultat a montré qu'il existe 10825 variantes de séquences pour chacun d'amplicon bactérien ou unité taxonomique opérationnelle (OTU) dont plus de 37% des OTU bactériennes ont été attribuées au niveau du phylum. Les protéobactéries qui sont présentes avec une abondance relative d'environ 15% et les

cyanobactéries qui sont présentes avec 14% d'abondance, étaient les embranchements les plus dominés dans les échantillons. Ces derniers sont suivis des firmicutes avec une abondance de 3% et des actinobactéries présentes avec 1,3%. Le résultat de cette étude a mis en évidence la présence de 677 genre bactériens parmi ceux-ci, *Sphingomonas* et *Methylobacterium*, sont les genres les plus abondants, suivis par les genres *Rubellimicrobium*, *Blastococcus alternaria*, (Figure 4), (Singh *et al*, 2019).

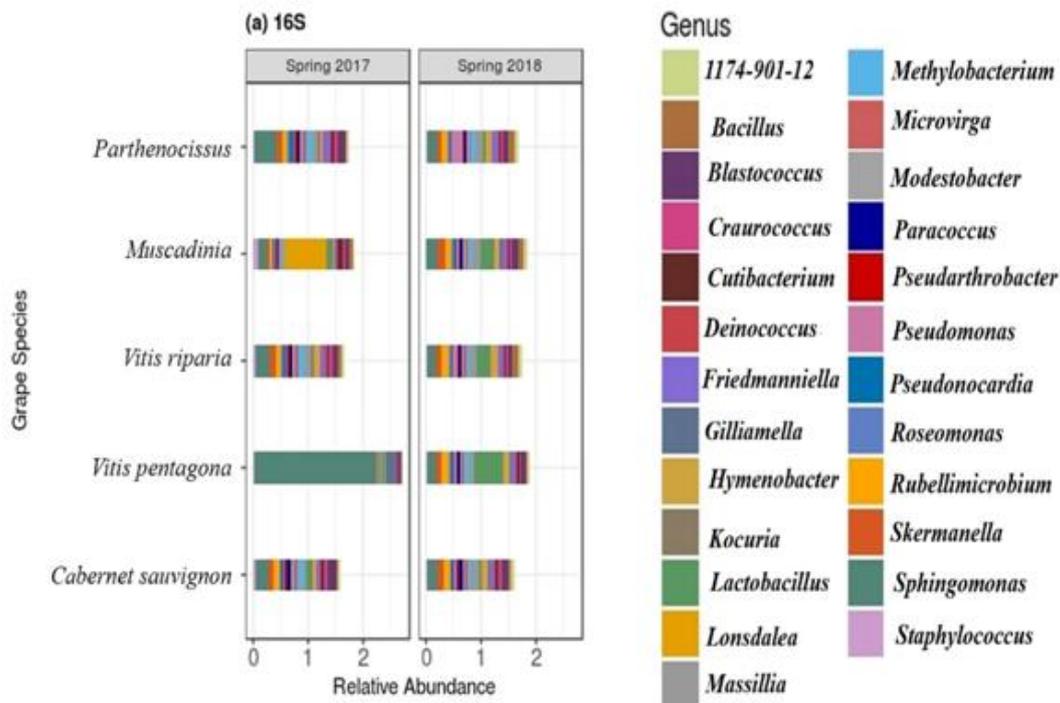


Figure 4 : Genres bactériens présents dans le phyllosphère foliaire de cinq espèces de raisin (Singh *et al*, 2019).

2.8 Intérêt écologique des compartiments plante-microorganismes et services écosystémiques émergent de l'interaction

Il existe un rôle fondamental de chacun des deux compartiments végétale et microbien dans le fonctionnement des écosystèmes et leur interaction est majoritaire dans ce rôle (Figure 5).

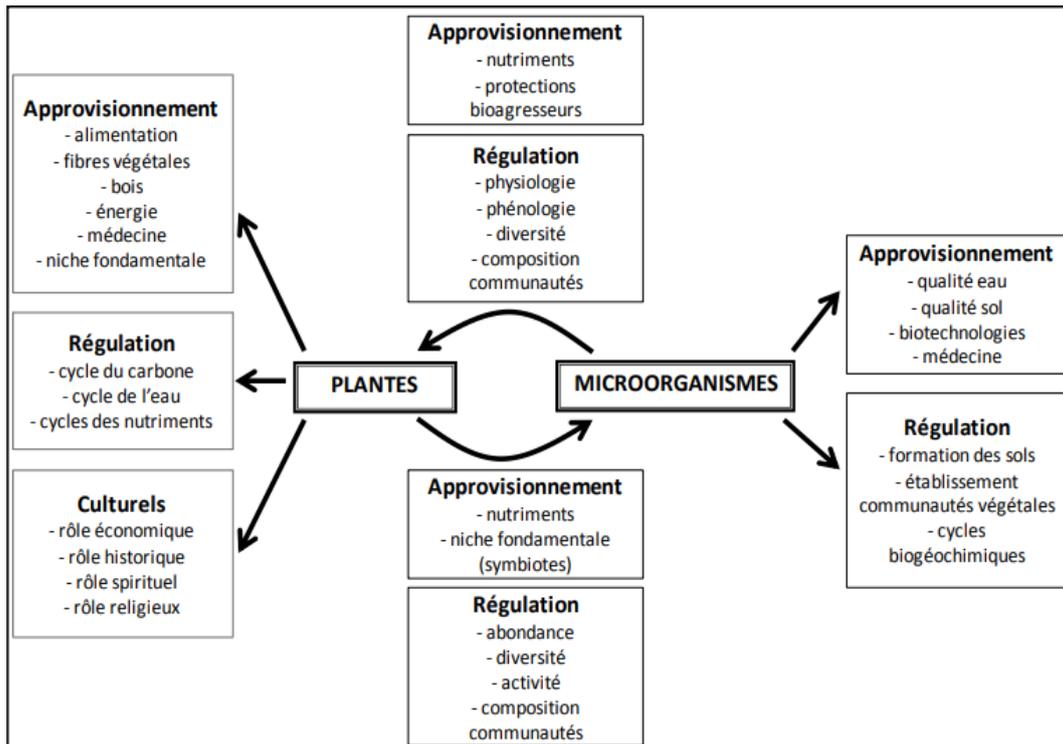


Figure 5 : Interactions et relations entre les plantes et les microorganismes (Lepinay, 2013).

La composition et la diversité végétale représentent une niche fondamentale et une ressource importante pour de nombreux organismes qui contribuent à la diversité biologique au sens large. Les plantes assurent des services de régulation, elles sont fortement impliquées dans le cycle de carbone intervenant dans la régulation du climat, aussi dans le cycle de l'eau d'azote et d'autres nutriments (p, k..). Un rôle culturel et écologique est aussi fourni aussi par ces végétaux en plus de leur rôle économique (Lepinay, 2013).

Le compartiment microbien est doué des services de régulation et d'approvisionnement. Les différents microorganismes de ce compartiment interviennent dans la formation des sols et l'établissement et la défense des espèces végétales par élimination des composés toxiques et des organismes phytopathogènes (Lepinay, 2013).

Les services écosystémiques fournis par les plantes sont indirectement dus aux microorganismes, à la composition et à la diversité des communautés végétales. Tous les cycles biochimiques font intervenir les composants végétales et microbiens, ces cycles ne pourraient pas être rendus sans l'intervention de ces deux partenaires (Lepinay, 2013)

Partie II : Partie
expérimentale

I : Matériel et méthodes

1 Echantillonnage, prélèvement et stockage des feuilles de vigne

1.1 Présentation du site d'échantillonnage

Le site d'échantillonnage est une exploitation du raisin de table, implanté dans une région de la Willaya de Skikda (El Harrouch). La plateforme s'étend sur 2 ha avec 800 plantes de vigne supportées par des pergolas et une distance de 4 mètre entre chaque pergola.

L'exploitation emploie 20 collaborateurs (fellahs). Elle produit deux variétés de raisin Red Globe et Victoria. Comme son nom le Red Globe indique à des raisins pour la consommation fraîche, rosés, de grand taille, une forme ellipsoïde globuleuse, une couleur rouge violacé et cette variété est très sensible à l'ensoleillement ainsi qu'au mildiou. Le Victoria est un raisin précoce, ces grains gros, ovale, très sucrée et croquants. Cette entreprise produit une moyenne de 15 tonnes dans un hectare par an.

1.2 Localisation géographique de site d'étude

Le site se situe à El Harrouch ($36^{\circ} 39' 11$ N et $6^{\circ} 50' 11$ E), exactement dans le quartier de Bachir Boukadoum (Willaya de Skikda) depuis 5 années. Cette région est située dans l'est du pays à 54km de Nord-Constantinois (**Figure 6**).

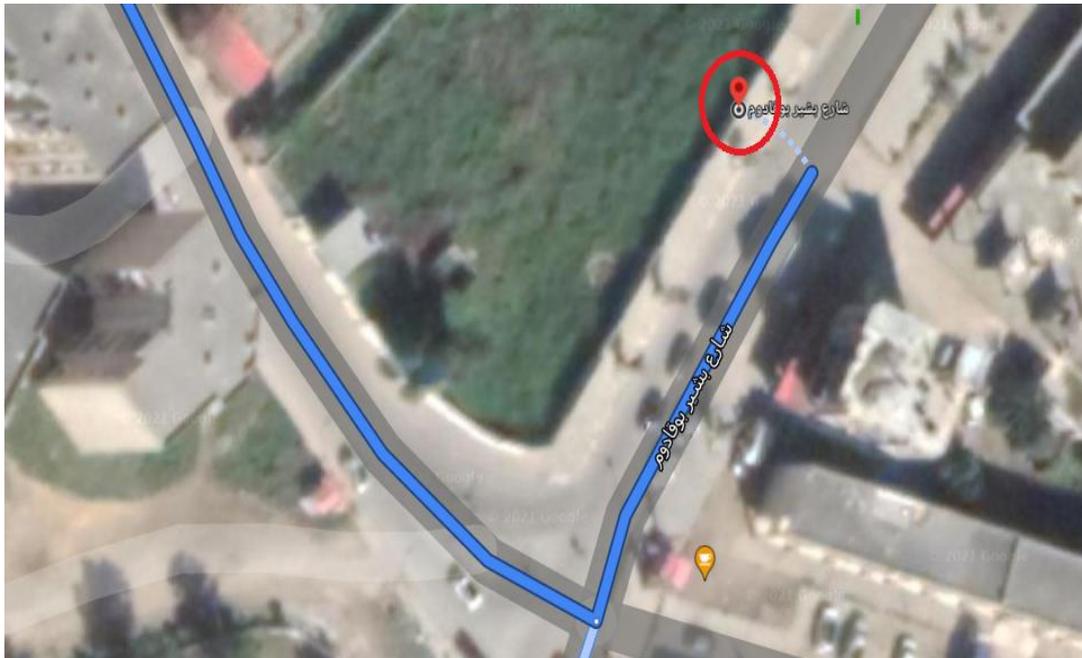


Figure 6 : Localisation géographique de site d'étude.

1.3 Matériel et produits utilisés pour le prélèvement

Afin de réaliser un bon prélèvement stérile des feuilles de la vigne, nous avons pris avec nous une série d'outils sur le site d'échantillonnage :

- Alcool
- Ustensile (Un ciseau)
- Sacs de plastiques stériles et autoclavables (Whil Park)
- Marqueurs indélébiles permanents
- Ruban adhésif
- Glacière propre

1.4 Stratégie de prélèvement des feuilles de vigne

Dans cette étude, le prélèvement de feuilles est réalisé à partir de la variété red globe, le 19 Juin 2021, au niveau d'EL Harrouch. Les points de prélèvement sont choisis arbitrairement au niveau du site d'échantillonnage. Trois points de prélèvements positionnés au nord, milieu et sud du centre de site d'échantillonnage sont exploités. Pour chacun de ses 3 points, 3 feuilles sont prélevées et considérées comme des répliques.

Le prélèvement est commencé du point du nord, (début du champ), sans toucher la feuille (pour éviter la contamination des prélèvements) de la vigne, le limbe est mis dans un sac de plastique stérile (**Figure 7**). Ceci est réalisé en coupant le pétiole avec un ciseau stérilisé au par avant par immersion dans l'éthanol et flamage avec la flamme du briquet. L'opération est répétée avec le même processus pour tous les autres points de prélèvement.

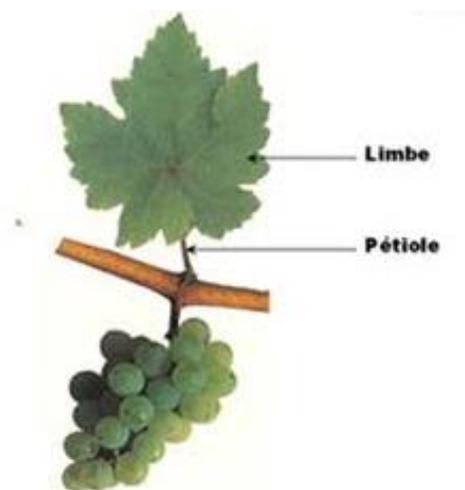


Figure 7 : Localisation du limbe et du pétiole sur la plante de la vigne (wiki aurea, 2016).

1.5 Conservation des feuilles

Chaque sac de prélèvement est étiqueté par l'enregistrement de la date, lieu, nom de prélèvement et position exacte dans le site de prélèvement. Les sacs de feuilles sont ensuite bien fermés avec un ruban adhésif (pour éviter l'entrée d'air et toute contamination extérieure), puis stockés dans une glacière à -20 °C afin de les transférer au laboratoire.

2 Préparation des milieux et des solutions pour l'isolement

L'isolement des microorganismes se trouvant sur les feuilles collectées nécessite la préparation des milieux de culture, la préparation de la solution mère contenant les feuilles de la vigne et la préparation des solutions diluées à partir de la solution mère.

2.1 Milieux de culture utilisés

Deux milieux de culture ont été utilisés dans la partie expérimentale. Ces milieux contiennent les sources d'énergie nécessaires pour la croissance des bactéries et autres microorganismes :

La gélose nutritive (GN) appelée encore gélose nutritive ordinaire. Il s'agit d'un milieu non-sélectif solide, à usage général qui favorise la croissance d'un large éventail d'organismes non filamenteux. La GN est populaire parce qu'elle permet la croissance de divers types de bactéries et de champignons.

Le bouillon nutritif (BN) qui est un milieu non-sélectif liquide, utilisé comme milieu de pré-enrichissement. Le BN constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de microorganismes ne présentant pas d'exigences particulières. Dans un bouillon, la croissance microbienne se traduit par l'apparition d'un trouble.

2.2 Préparation de la solution mère contenant les feuilles

A l'aide d'un scalpel stérilisé par flamage au bec bunsen, la feuille est coupée en petits morceaux. Ces derniers sont mis dans une fiole contenant 150ml de bouillon nutritif stérile (BN). La fiole est ensuite bien fermée avec un papier film et le tout est mis à agiter dans un agitateur magnétique pendant 1h. Ceci permet de décrocher les bactéries et les autres micro-organismes se localisant sur les tissus (épiphytes) et permet ainsi de maximiser le nombre de bactéries potentiellement cultivables. La solution finale obtenue après cette opération constitue la solution mère.

2.3 Préparation des dilutions

Dans un tube à essai contenant 10ml de bouillon nutritif stérile, un volume de 1ml de la solution mère (précédemment préparée) est ajouté, ce qui représente la première dilution (10^{-1}). Pour l'obtention de la deuxième dilution (10^{-2}), un volume de 1ml de dilution (10^{-1}) est prélevé et ajouté à 10ml de bouillon nutritif stérile. Le même processus est réalisé pour l'obtention de la dernière dilution 10^{-3} (**Figure 8**).

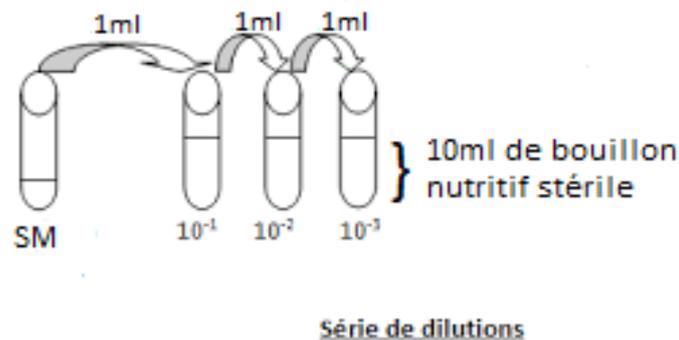


Figure 8 : Préparations des dilutions décimales à partir de la solution mère (SM).

Les différents tubes contenant les différentes solutions préparées sont mis à incuber avec agitation, pendant 24h à 28 °C et sont examinés pour la croissance bactérienne après incubation par présence ou absence de trouble.

3 Isolement des bactéries à partir des feuilles

3.1 Isolement des bactéries sans l'utilisation d'un antifongique

L'isolement permet de séparer les microorganismes différents dans un mélange pour qu'ils soient étudiés individuellement.

3.1.1 Ensemencement

L'ensemencement est réalisé à partir de chacune des dilutions retenues (10^{-1} à 10^{-3}), ces dernières représentent l'inoculum (**Figure 9**).

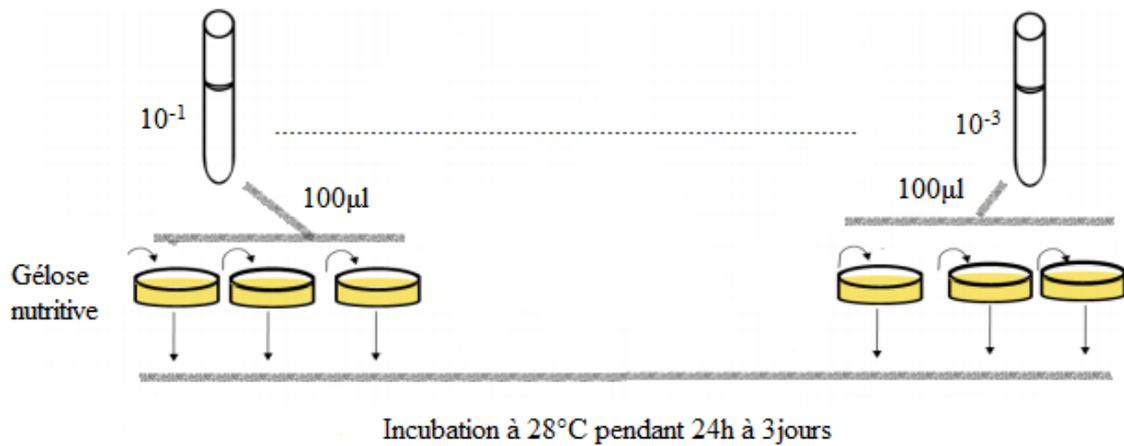


Figure 9 : Etapes d'ensemencement à partir des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-3}).

Une quantité de $100\mu\text{l}$ de l'inoculum est ensemencé en surface à l'aide d'une anse de platine et par la méthode de trois cadrans dans les boîtes de pétri contenant la GN préalablement coulée et séchée. L'opération est réalisée avec 3 répétitions pour chaque dilution (**Figure 10**).

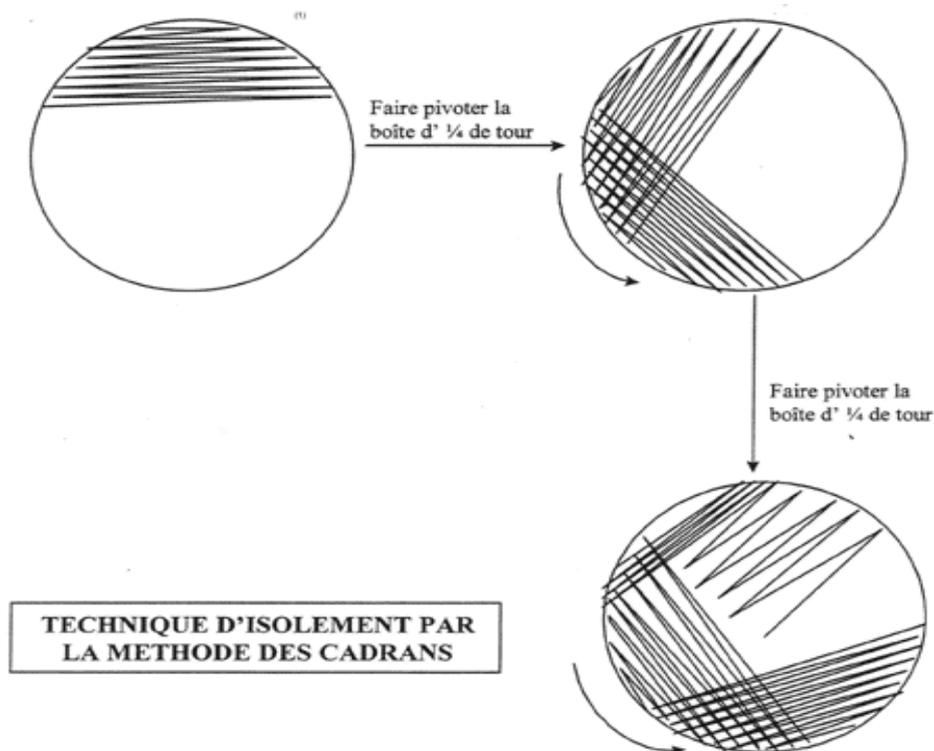


Figure 10 : Méthode d'ensemencement de trois cadrans (source <http://csenv.free.fr>).

3.1.2 Incubation

Une fois séchées, les boîtes ensemencées sont mises en incubation à 28°C pendant 24h jusqu'au 4 jours à l'étuve. Après l'incubation les boîtes sont exploitées pour l'observation des colonies apparues sur la GN. La prospection des boîtes est réalisée après 1 jour et après 4 jours d'incubation.

3.2 Caractérisation morphologique des isolats

3.2.1 Observation macroscopique des colonies bactériennes

C'est une étude morphologique à l'œil nu pour distinguer les caractéristiques des colonies qui sont apparues sur milieu GN après incubation. Différents caractères d'identification macroscopique sont examinés dans cette observation macroscopique tels que : La forme (ronde, entière, ondulée, zonée, filamenteuse...), la taille, l'élévation (concave, convexe, plate), l'opacité (opaque, translucide, transparent), structure de la surface (lisse, rugueuse, sèche), la couleur, l'aspect (collant, filamenteux...) et la bordure (régulier, lobé, ondulé...).

3.2.2 Observation microscopique

Afin de réussir une observation microscopique on a référé à une coloration des colonies. Deux types de coloration sont réalisés, une au bleu de méthylène et l'autre une coloration de Gram.

a- Coloration au bleu de méthylène

La coloration au bleu de méthylène est une coloration très simple et rapide à effectuer, elle colore toutes les bactéries à l'exception des mycobactéries et respecte mieux la structure des cellules que le Gram. Cette coloration est utilisée lorsqu'on s'assure qu'il y a bien des bactéries visibles dans le prélèvement, elle permet de distinguer leurs formes, groupements, tailles et pour bien voir les cellules présentes (Gille, 2015).

Protocole de réalisation :

La coloration se débute par la préparation et fixation de frottis, faire ensuite couler du colorant de bleu de méthylène sur le frottis fixé et attendre pour 1min, rincer la lame par l'eau distillée et sécher la lame doucement avec du papier ou à l'air libre enfin observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile.

b- Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de différencier les bactéries selon 2 critères : leur forme et leur affinité pour les colorants. Le principe de cette coloration est que la paroi des bactéries Gram négatif à un taux élevé de lipide et une couche mince de peptidoglycane ce qui rend la paroi des bactéries plus poreuse et incapable de retenir la coloration, décolorant ainsi la bactérie. Le contraire est observé pour la paroi des bactéries à Gram positif.

Protocole de réalisation (Figure 11) :

Après préparation et fixation du frottis on dépose le violet de Gentiane (cristal violet) sur le frottis et le laisser agir pour 1min, on rince très brièvement en faisant couler l'eau distillée sur la lame, on dépose quelque goutte de lugol sur le frottis, on laisse agir encore 1min et on rince à l'eau distillée comme précédemment décrit, on fait couler l'alcool sur la lame pendant 5 à 15seconde, Enfin, on dépose la fuchsine, après 1min, on rince à l'eau distillée et on fait sécher par un papier ou on laisse sécher à l'air libre et observer à l'objectif x100 par immersion dans une huile.

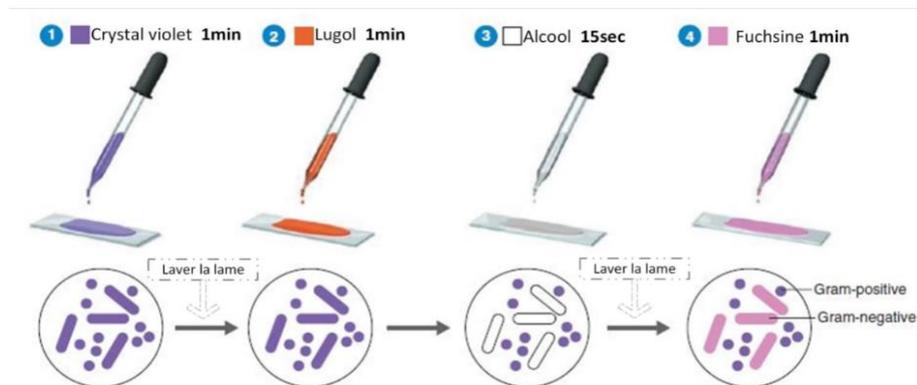


Figure 11 : Les étapes et résultats explicatifs de la coloration de Gram (microbiologie clinique, 2021).

3.3 Isolement avec utilisation d'un antifongique

3.3.1 Ensemencement sur bouillon nutritif (BN)

Une série de 8 tubes à essai est préparée dans un portoir, 4 de ces tubes ne contiennent que le BN et chacun des tubes restant contient le bouillon nutritif et 500µl d'antifongique, afin de ne sélectionner que les bactéries.

A partir de la solution mère (SM) et des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-3} , on porte aseptiquement 1000µl dans chacun des tubes préparés. Le tout est bien mélangé puis les tubes sont mis à incuber à l'étuve pendant 2 jours à 28 °C (**Figure 12**).

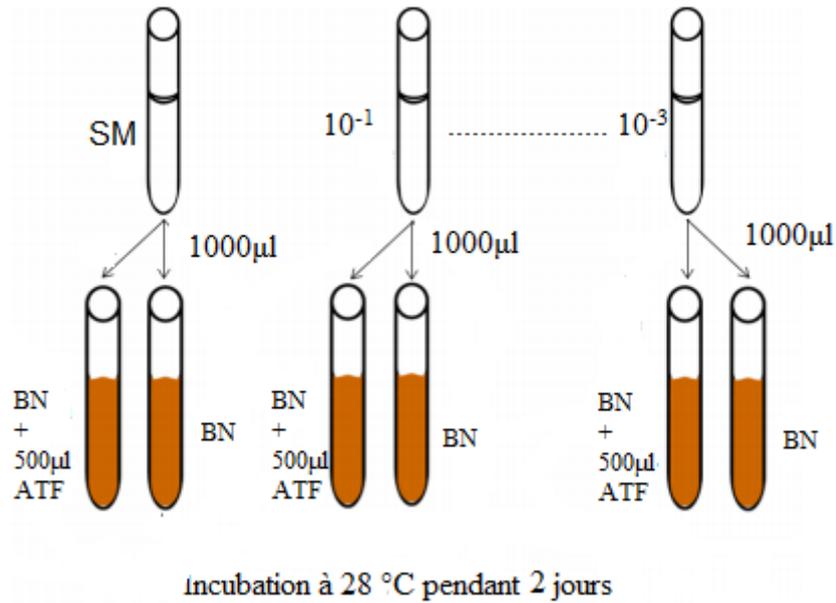


Figure 12 : Séries d'ensemencement de BN à partir des dilutions décimale et après utilisation d'ATF.

3.3.2 Ensemencement sur gélose nutritive (GN)

Après incubation, les tubes (sans ATF et contenant d'ATF), qui ont montré un trouble, ont servi d'inoculum pour ensemencement sur milieu solide.

A partir de chaque tube montrant un résultat positif, une quantité de 500 µl est étalée sur boîte de pétrie contenant de la GN. Le tout est incubé à 28 °C pendant 3 jours.

II : Résultats et discussion

1 Isolement des microorganismes sans utilisation d'un antifongique (ATF)

1.1 Mise en évidence des microorganismes présents sur les feuilles de vigne

Pour examiner la présence des microorganismes présents sur les feuilles de la vigne, nous nous sommes basés sur une observation des solutions préparées à partir de ces feuilles. L'observation à l'œil nu de chacune des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-3}) incubées pendant 24h montre que tous les tubes donnent un résultat positif (**Tableau 2**), (**Figure 13**).

Tableau 2 : Croissance microbienne dans les dilutions décimales après 24h d'incubation.

Dilutions	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Résultats	+	+	+

(+) : présence de trouble, (-) : absence de trouble

Les tubes avec leurs différentes dilutions, ont tous montré un certain trouble qui témoigne la présence et la croissance de micro-organismes (**Figure 13**).

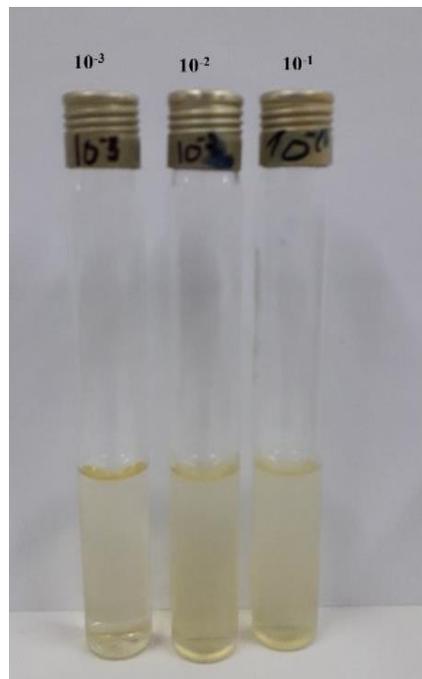


Figure 13 : Trouble montré par les dilutions décimales après 24h d'incubation.

1.2 Analyse des microorganismes présents sur les feuilles de vigne

1.2.1 Analyse macroscopique après 24h d'incubation

a- Colonies sur gélose nutritif

Nombreuses et différentes colonies microbiennes sont observées sur la surface de milieu de culture (GN) après une incubation de 24 h. Certaines colonies sont séparées et d'autres sont bien confuses et donnent un tapis (**Figure 14**).

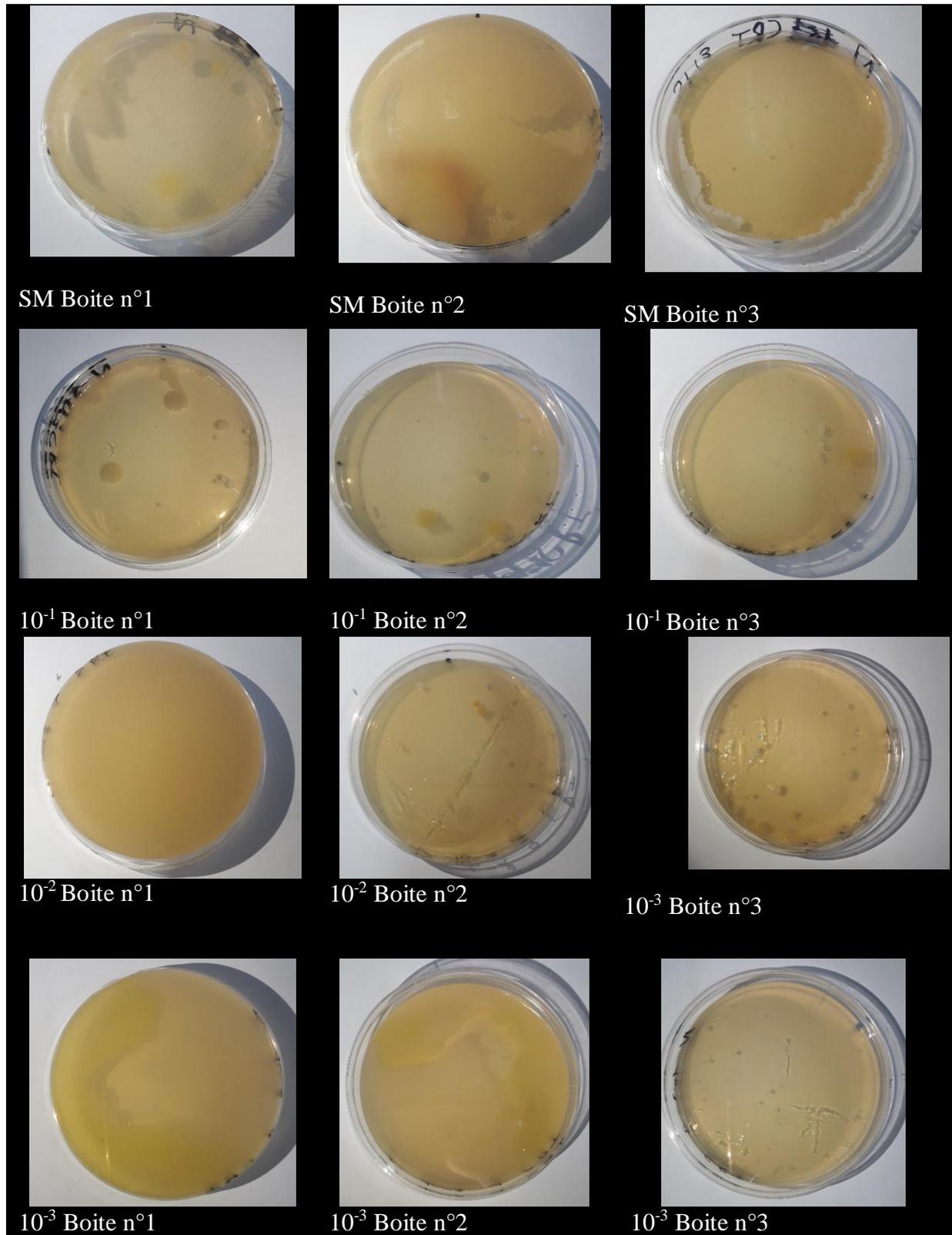


Figure 14 : Colonies observées sur GN après 24h d'incubation.

b- Dénombrement des colonies

Pour chacune des dilutions et pour chacune des boîtes de pétrie, un comptage des colonies présentes est réalisé. Le nombre de colonies exprimé en UFC (unité formant colonie), est variable entre les différentes dilutions et même entre les boîtes de la même dilution (**Tableau3**).

Tableau 3 : Nombre de colonies microbiennes dans chaque boîte de pétrie en UFC (Unité formant colonie).

Dilution et numéro des boîtes	SM			10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
UFC	31	Tapis	8	21	29	18	Tapis	22	19	3	6	19

1.2.2 Analyse des isolats après 4jours

a- Colonies sur gélose nutritif

Après une incubation de quatre jours des mêmes boîtes de GN, une augmentation de la population microbienne est observée sur chacune des boîtes. Les colonies sont bien distinguées les unes des autres. Leur différence en morphologie est bien claire surtout dans les dilutions 10⁻² et 10⁻³ (**Figure 15**).

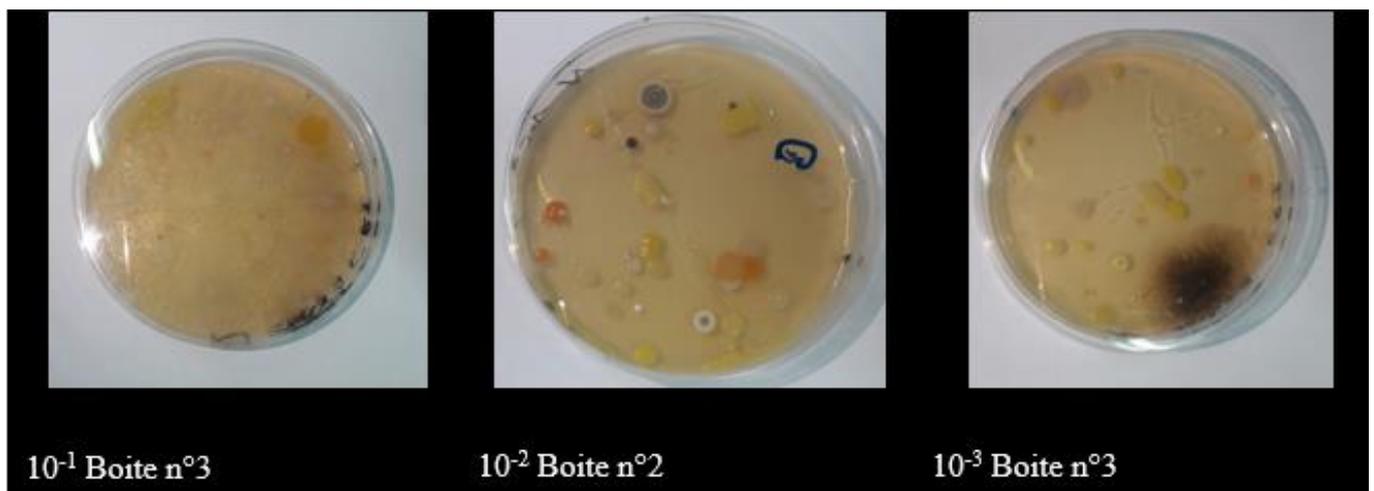


Figure 15 : Colonies observées sur GN après 4jours d'incubation.

b- Dénombrement des colonies

Le dénombrement des colonies observées après 4 jours d'incubation, montre aussi une augmentation en nombre UFC pour la majorité des boîtes (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Dénombrements des boîtes après 4 jours.

Dilution et numéro des boîtes	SM			10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
UFC	41	Tapis	10	30	40	Tapis	Tapis	22	26	7	Tapis	23

2-3-Caractérisation morphologique des colonies obtenues

2-3-1-Caractères macroscopiques

L'observation macroscopique des boîtes gélosées incubées, a permis de mettre en évidence la présence d'une diversité microbienne démontrée par l'obtention de différentes colonies. A partir de l'incubation de 24h et 4 jours, nous avons choisis sept (07) colonies qui sont les plus séparées et les plus visibles, afin de les examiner du côté macroscopique et microscopique. Ces colonies sont nommées par les lettres A, B, C, D, E, F et G (**Figure 16**).

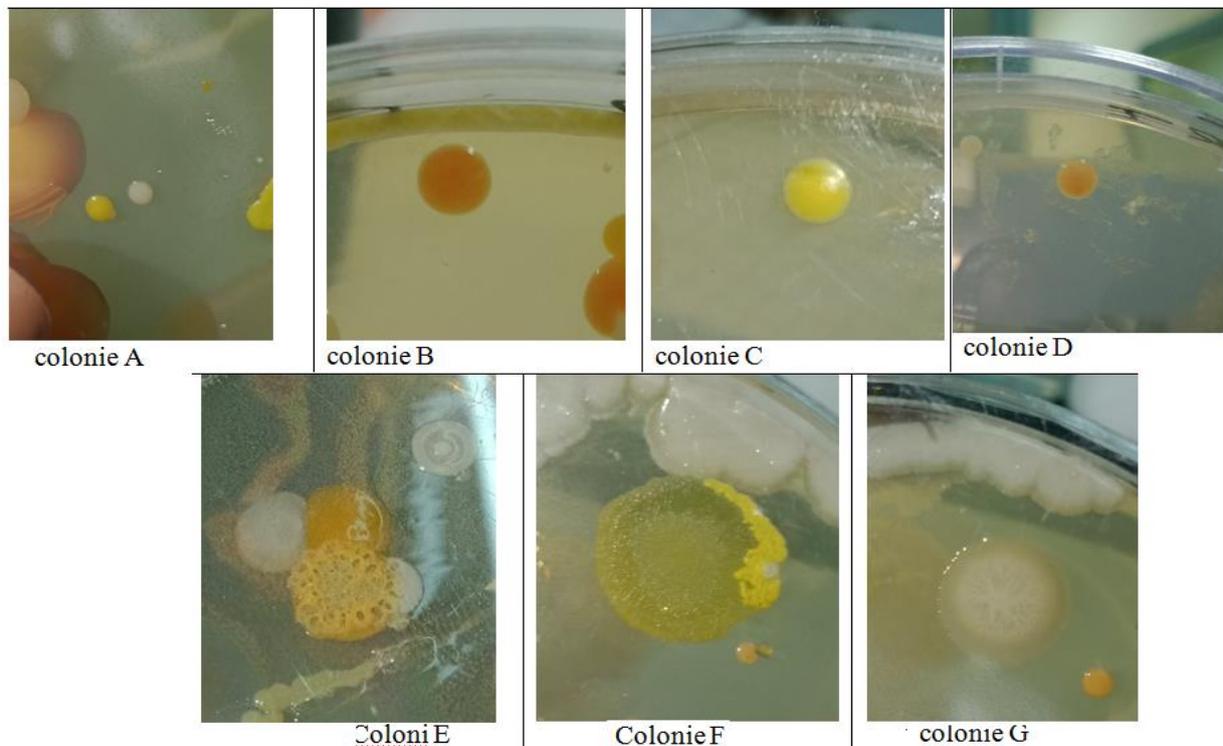


Figure 16 : Colonies bactériennes observées sur GN.

La comparaison des sept colonies à examiner est portée sur des caractères macroscopiques différents (couleur, aspect de la surface, bordure, opacité, élévation de la colonie, forme, structure de la surface et la taille). Pour ces paramètres les colonies ont montré une grande diversité, (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Aspect macroscopique des colonies isolées.

Critères colonie	Couleur	Aspect	Bordure	Opacité	élévation	Forme	Structure de la surface	taille
A 10 ⁻¹ Boite 1	Blanche	Collant	Régulier	Opaque	élevé	Circulaire	lisse	petite
B 10 ⁻² Boite 2	Orangé	Collant	Régulier	Opaque	élevé	circulaire	lisse	moyenne
C 10 ⁻³ Boite 3	Jaune	Collant	Régulier	Opaque	élevé	circulaire	lisse	petit
D 10 ⁻³ Boite 3	Rose	collant	régulier	Opaque	élevé	circulaire	lisse	petit
E 10 ⁻² Boite 2	Orangé	filamenteux	arbrisseau	opaque	plane	filamenteuse	rugueuse	moyenne
F SM Boite 1	Jaune	mate	irrégulier	Translucide	plane	circulaire	sèche	grande
G SM Boite 1	Transparent	filamenteux	régulier	opaque	élevé	circulaire	rugueuse	grande

2-3-2-caractérisation microscopique

a- Observation après coloration par le bleu de méthylène

L'observation microscopique a montré que les bactéries obtenues à partir des formes cellulaires blanches de la boîte 1 correspondante à la deuxième dilution (10^{-2}), sont de forme bacilles (**Figure17**).

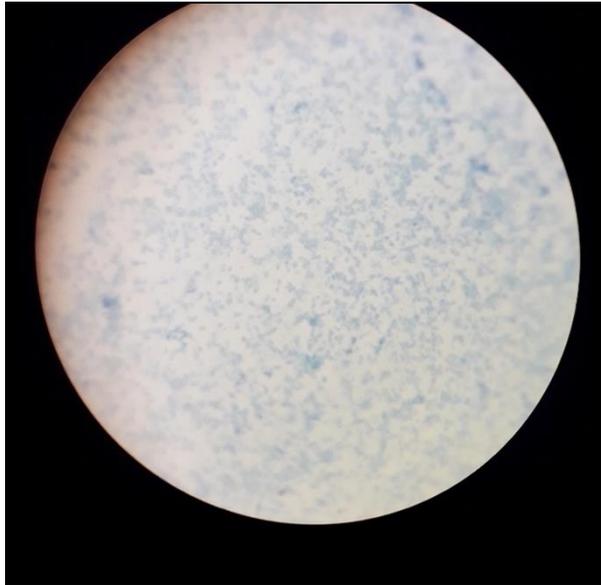


Figure 17 : Forme cellulaire des colonies de la boîte 1 (10^{-2}), après coloration par le bleu de méthylène (observation au microscope optique $\times 100$).

b- Observation après coloration de Gram

Les observations dans ce cas ont concernés trois isolats prises respectivement des colonies (A, B, C) et qui ont subi une coloration de Gram. L'isolat A est prélevé à partir d'une colonie blanche, l'isolat B est prélevé a partir d'une colonie orangé et enfin l'isolat C est prélevé a partir d'une colonie jaune.

Le résultat montre que les trois isolats sont de forme cocci, leur mode de regroupement correspond à un diplococci, et sont de couleur violet. Cette couleur permet de déduire que chacun de ces isolats possède une couche épaisse de peptidoglycane dans la composition de la paroi cellulaire, ainsi on peut dire que ces isolats sont de Gram positif (**Figure 18**).

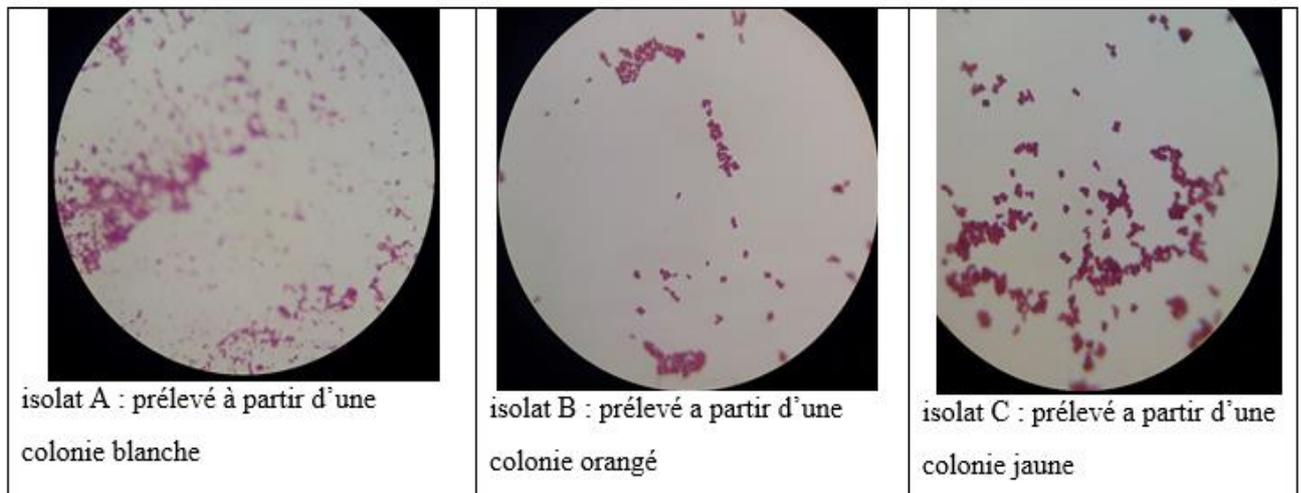


Figure 18 : Observation de quelques isolats après coloration de Gram au microscope optique $\times 100$.

2 Isolement des microorganismes des feuilles de vigne avec utilisation d'un antifongique (ATF)

2.1 Croissance sur le bouillon nutritif (BN)

Après incubation des tubes de la solution mère et ceux des dilutions pendant 2 jours à 28°C, la plupart des tubes en présence ou en absence de l'antifongique ont montré un résultat positif représenté par un trouble (**Tableau 6**), (**Figure 19**).

Tableau 6 : Croissance microbienne sur BN.

Dilution	Tubes sans ATF				Tubes avec ATF			
	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
Résultat	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Présence de trouble

(-) : Absence de trouble

Remarque : Présence d'une voile au niveau des tubes 10⁻¹ (sans ATF) et 10⁻² (avec ATF).

En comparant la clarté et l'intensité du trouble obtenu sans et présence de l'antifongique (ATF), il s'avère que concernant de la solution mère l'intensité du trouble est importante dans les deux cas (en absence et en présence de l'ATF). Pour les cas des trois autres dilutions, il est clair que le trouble est bien intense en absence de l'antifongique (**Figure 19**).

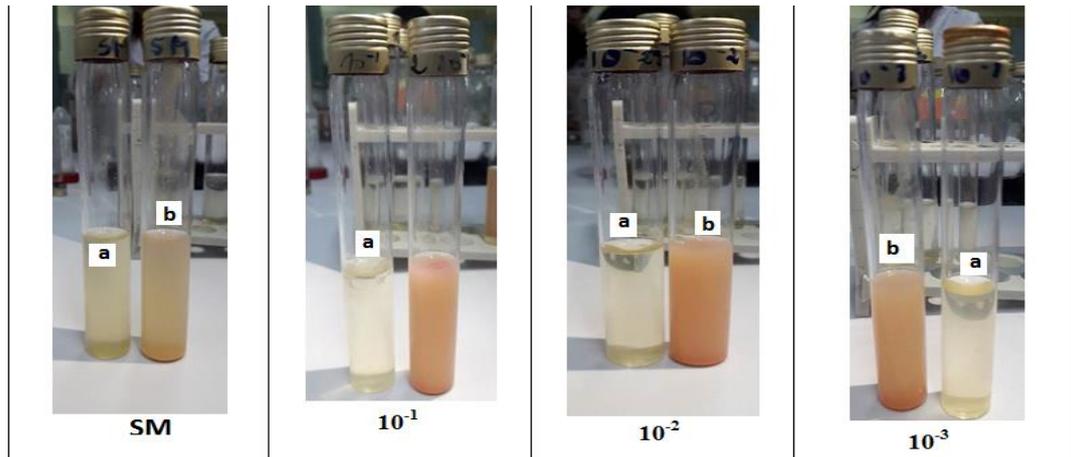


Figure 19 : trouble observé dans les tubes de BN (a : absence d'ATF et b : présence d'ATF)

2.2 Dénombrement sur gélose nutritive (GN)

Pour avoir une idée sur la croissance microbienne des isolats sur milieu solide, en présence et en absence de l'antifongique, les colonies obtenues sur boîtes de GN sont comptées et le nombre est estimé en unité formant colonie (UFC). Le comptage concerne la solution mère et chacune des dilutions (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Nombre de colonies sur les boîtes GN avec et sans ATF (en UFC).

Dilution	SM (sans ATF)	SM (avec ATF)	10 ⁻¹ (avec ATF)	10 ⁻² (sans ATF)	10 ⁻³ (sans ATF)	10 ⁻³ (avec ATF)
UFC	10	6	tapis	5	3	1

Les résultats d'incubation des tubes de BN étaient tous positifs (en présence et absence d'ATF) ce qui explique que les microorganismes ensemencés sur les boîtes de GN sont des bactéries. Le but D'ATF a été l'inhibition de la croissance des champignons dans les milieux

d'ensemencement, donc avec ce résultat, on peut confirmer que la feuille de vigne présente une biodiversité bactérienne cultivable (**Figure 20**).

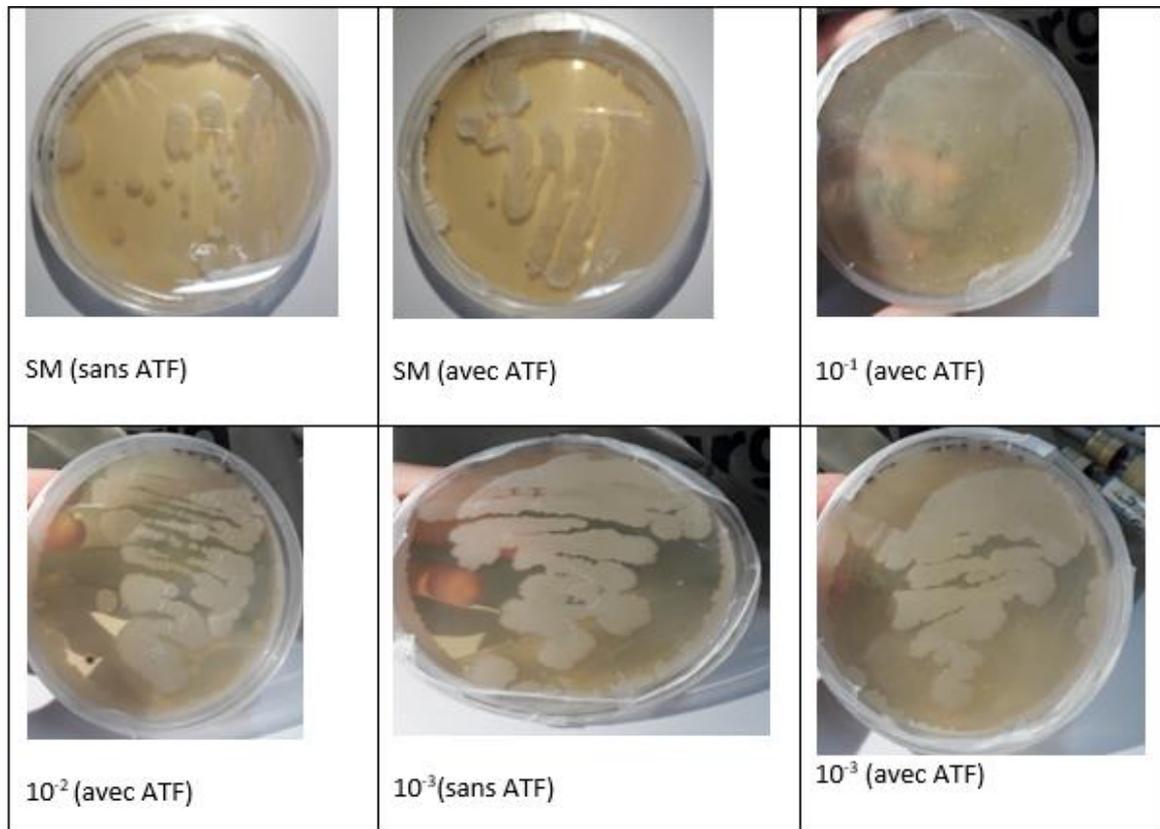


Figure 20 : Colonies bactériennes observées sur GN avec et sans utilisation d'ATF.

Discussion générale

Discussion générale

La présence des microorganismes sur les feuilles de la vigne analysée, dans ce présent travail est démontrée par la présence d'un trouble dans toutes les solutions de dilutions. Le trouble correspond à la croissance des microorganismes qui ont trouvé dans ces solutions le besoin nutritionnel permettant leur viabilité et leur croissance. Puisque nous avons utilisé au départ un milieu nutritionnel non spécifique, les microorganismes présents sont bien diversifiés entre bactéries, champignons et autres. La présence de plusieurs types de microorganismes sur les feuilles de vigne a été souvent signalée par d'autres méthodes de recherches (Leveau et Tech, 2011 ; Kántor *et al*, 2017).

Sachant que le temps nécessaire à la croissance est dépendant du type de microorganismes, nous avons choisi deux périodes de temps différentes pour l'incubation (1jour et 4jours), afin de donner la chance au plus grand nombre des micro-organismes de se développer. Après chacune des incubations une analyse macroscopique et microscopique est réalisée.

Que ce soit après 24h ou après 4jours d'incubation, différentes colonies sont apparues sur la GN. Ces colonies sont bien distinguées les unes des autres, beaucoup plus après 4 jours d'incubation et leur différence en morphologie est bien claire surtout dans les dilutions 10^{-2} et 10^{-3} . Ceci est bien logique car plus la dilution est augmentée plus il y aura moins de compétition alimentaire et plus le microorganisme aura plus la chance de se développer et montrer ses propriétés morphologiques telles que la taille, la couleur, la forme...etc. Ces différents caractères morphologiques permettent souvent de vérifier la pureté des souches microbiennes. Ces caractères phénotypiques peuvent aussi, représenter un outil d'identification d'un microorganisme donné. De toute façon l'analyse phénotypique des microorganismes est connue par être une méthode classique pour caractériser et identifier les souches en microbiologie (Bendifallah, 2007).

Un nombre très important en colonies est apparu après incubation sur gélose, ce qui permet de dire qu'il existe une importante diversité microbienne sur les feuilles de la vigne. Ceci a été bien enregistré dans beaucoup d'autres études portant sur la vigne en générale (Martins, 2012) et sur les feuilles en particulier.

Parmi les différentes colonies apparues sur la gélose, nous avons opté pour sept colonies ayant un profil bactérien afin d'essayer de les identifier morphologiquement. Ces sept colonies sont bien séparées sur la gélose et sont bien distinguées les unes des autres par

plusieurs aspect bactériennes ce qui permet de penser à une diversité bactérienne présente sur les feuilles de vigne.

Afin d'identifier les isolats formants ces sept colonies et pour faciliter l'analyse microscopique nous avons réalisé deux coloration différent, la première est une coloration simple au bleu de méthylène et la deuxième consiste à une coloration différentielle de Gram.

La coloration par le bleu de méthylène a montré la présence de certaines bactéries sous forme de bacille. La coloration de Gram a montré la présence de certains isolats prévenant des colonies à différentes couleur (blanc, orangé et jaune). Il s'agit des bactéries de forme cocci, avec un mode de regroupement diplococci et qui ont montré un Gram négatif.

Puisque notre but dans ce présent travail et de mettre en évidence la présence d'une diversité bactérienne sur les feuilles de la vigne, nous avons pensé à faire émerger la présence de ces bactéries en utilisant un antifongique (ATF), la confirmation de leur présence dans cette présente étude nécessite une analyse plus profonde que ce soit par une caractérisation phénotypique ou via la biologie moléculaire.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les interactions entre les deux compartiments végétale et microbien, jouent un rôle fonctionnel dans la qualité agricole, l'écologie et l'écosystème terrestre. Ainsi pour une plante donnée, la connaissance de sa microflore et sa caractérisation est un point très important pour l'amélioration de sa qualité agricole, écologique et économique.

Ce travail est une contribution dans les études s'intéressant à la mise en évidence de la diversité micro-organismes de la flore phyllo sphérique associée aux plantes en général et à l'identification des bactéries associées à la surface des feuilles de vigne en particulier. La variété « Red Globe » est la vigne prise en examinations dans ce présent travail. La technique d'identification classique basée sur la caractérisation phénotypique des communautés microbiennes est appliquée pour l'analyse de la microflore dans cette étude.

L'analyse a montré la présence sur les feuilles de la vigne d'une diversité importante de micro-organismes en générale et en bactéries en particulier. La mise en évidence de la présence de différentes bactéries est confirmée d'un côté par la comparaison de la croissance microbienne en absence et en présence d'un antifongique et d'autres coté par l'utilisation de coloration via le bleu de méthylène et la coloration de Gram. Le résultat permet de penser à la présence sur les feuilles de la vigne, de différents genres bactériens tels que les lactobacilles les staphylocoques.

Suite à cette analyse et aux résultats obtenus, nous pouvons enregistrer deux points essentiels :

-le premier point consiste à insister sur l'application de la technique d'identification phénotypique comme moyen pour mettre en évidence la présence d'une diversité microbienne en générale et bactérienne en particulier. Le résultat obtenu montre que malgré les limitations des méthodes phénotypiques classiques, elles ont pu donner dans cette étude, une orientation ou une identification des genres bactériens présents sur les feuilles de la vigne comme les lactobacilles les staphylocoques. Cette technique est rapide et permet d'interpréter les résultats d'analyse des échantillons environnementaux afin d'identifier les genres bactériens cultivables et les plus abondants dans la communauté microbienne.

- le deuxième point consiste à une étude morphologique de la diversité bactérienne qui existe sur les feuilles de la vigne.

Plusieurs études peuvent être lancées comme perspectives pour ce modeste travail. La diversité microbienne et bactérienne mise en évidence dans cette étude n'a employé que les analyses phénotypiques les plus simples, l'identification via la biologie moléculaire serait le moyen le plus puissant pour confirmer ces résultats. Les analyses appliquées dans cette étude se sont concentrées que sur les bactéries. Aussi les résultats obtenus dans cette présente étude ne concernent que les feuilles de la vigne, l'exploration microbienne des autres parties de la vigne serait une étude intéressante pour découvrir la majorité des micro-organismes qui participent dans la viabilité, le développement et la qualité économique de la vigne. La détermination des facteurs qui contrôlent l'interaction de cette plante avec sa microflore, serait un deuxième volet des études très intéressantes concernant la vigne.

Références

bibliographiques

- Aimene, W. (2018).** Biodiversité de la flore bactérienne du palmier dattier poussant au sud est Algérien. Effet du climat sur le comportement de cette flore. Thèse : Biotechnologies microbiennes. Université Frères Mentouri Constantine 1. P89.
- Balédont, F. (1997).** Coloration usuelles en bactériologie. Centre hospitalier Robert-Ballanger. Département et santé n°127.
- Bendifallah, N. (2007).** Caractérisation phénétique de souches de *Rhizobium* associées au groupe des Intertextae (Genre *Medicago*). Mémoire de Magister : Biothéchnologie et biodiversité végétales. Institut National Agronomique El Harrach, Alger. P23-25.
- Huglin, P. Schneider, C. (1998).** Biologie et écologie de la vigne (2^{ème} édition). Tec & Doc (Editions). France. 370
- Kàntor, A. Mareček, J. Ivanišová, E. Terentjeva, M. Kačániová, M. (2017).** Microorganismes of grapeberreies. Proceeding of the latvian academy of sciences. Section B. Vol 71. P502-508.
- Loquet, A. Habenstein, B. Demers, J.P. Becker, S. Lange1, A. (2012).** Structure d'une nanomachine bactérienne, *Med Sci. Paris*, 28(11), P926–928.
- Jouenne, T (2008).** Qu'est-ce qu'un biofilm ? Biofilm bactériens [en ligne]. (Page consulté le 10-05-2008).
- Lepinary, C. (2013).** Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes, au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale. Thèse : Ecologie microbienne. Université de Bourgogne. P35-39.
- Leveau, J H J. Tech, J J. (2011).** Grapevine microbiomics: bacterial throughput sequence analysis of 16s RRNA amplicons. P31-42.
- Meng, B. Maztelli, G. Galino, D. Fuchs, M. (2017).** Grapevine viruses: Molecular biology, Diagnostics and manegnement. The grapevine viticulture and wine making. Springer international publishing. Swisse. P3-31.
- Mion, S. Rémy, B. Plener, L. Chabrière, E. Daudé, D. (2019).** Quorum sensing et quorum quenching : comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ?, *Med Sci. Paris*, 35. P31-38.
- Martins, G. (2012).** Communautés microbiennes de la baie de raisin. Incidence des facteurs biotique et abiotiques. Thèse de doctorat : Œnologie. Université Bordeaux 2. P289.
- Riaz, S. Delorenzis, G. Velasco, D. Koehmsteat, A. Maghradze, D. Bobokashvi, Z. Musayev, M. Zdunic, G. Laucou, V. Walker, A. Failla, O. Preece, J. Anadhya, M. Annoyo-Gracia, R. (2018).** Genetic divercity analysis pf cultivated and wild grapevine (*Vitis Vinifera* L) accessions around the mediterranean basin and centrel Asia [en ligne]. *BMC. Plant biol*18.
- Singh, P. Santoni, S. Weber, A. This, P. Péros J.P. (2019).** Understanding the phyllosphere microbiome assemblage in grape species (*Vitaceae*) with amplicon sequence data structures, *Scientific Reports* [en ligne]. 9(1): 14294.

Whipps, J. M., Hand, P., Pink, D., Bending, G.D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology* [en ligne]. 105(6), P1744–1755.

Crivellaro, M. (2021). Facteur climat et terroir viticole/Notion de terroir viticole/Géologie/vins vignes vigneron [en lignes]. (Page consulté le 12-7- 2021).

« <http://www.vinsvignesvignerons.com/Geologie/Notion-de-terroir-viticole/Facteur-climat-et-terroir-viticole> »

Combes, C., Euzet, L., Mangenot, G., (2021) « PARASITISME », *Encyclopædia Universalis* [en ligne], consulté le 15 septembre 2021.

« <https://www.universalis.fr/encyclopedie/parasitisme/> »

Cillimore, J., Gough, C (2011). Signalisation symbiotique [en ligne]. (Page consulté le 01-04-2016).

« <https://www6.toulouse.inrae.fr/lipm/Recherche/Signalisation-symbiotique> »

Deveau, A., Martin, F. Microbiote : les plantes aussi ! [en ligne]. (Page consulté le 26-06-2016).

« https://www.pourlascience.fr/sd/biologie-vegetale/microbiote-les-plantes-aussinbsp-9337.php?fbclid=IwAR1eiF_siQnBQaD9ycPfsfoJLPRm9hjHYb2cyRsXqO06bYtlIVjYSpJJ0 »

Douglas, E. (2019). What Kind of Soil Do Grapevines Like? [en ligne]. (Page consulté le 11-11-2019).

« <https://homeguides.sfgate.com/kind-soil-grapevines-like-55816.html> »

Gille, Y. Biologie tropicale. Coloration au bleu de méthylène [en ligne]. (Page consulté le 14-08-2015).

« <http://www.bioltrop.fr/spip.php?article417> »

Inventaire National du Patrimoine Naturel. Vigne cultivée (Français) *Vitis Vinifera* L., 1753 [en ligne]. (Page consulté le 17-08-2021)

« https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/129968/tab/taxo »

Lu, H. (2020). La phyllosphère (interactions plantes-microorganismes à la surface des feuilles) [en ligne]. (Page consulté le 03-02-2020).

« <https://www.verdeterreprod.fr/la-phyllosphere-interractions-plantes-microorgnismes-a-la-surface-des-feuilles/> »

Microbiologie clinique(2021), coloration de gram [en ligne]. (Page consulté en 2021).

« <https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Gram.html> »

Nedu, M. Cristea, M. Georgescu, AV. (2020).Comparative Study Regarding the Properties of Methylene Blue and Proflavine and Their Optimal Concentrations for In Vitro and In Vivo Applications. Pathology and molecular diagnostics. [en ligne], 10(4) : 223. (Page consulté le : 27-03-2020).

« <https://www.mdpi.com/2075-4418/10/4/223/htm> »

OIV, (2020).Note de conjoncture vitivinicole mondiale [en ligne].

« <https://www.oiv.int/public/medias/7899/oiv-note-de-conjoncture-vitivinicole-mondiale-2020.pdf> »

Pépinières, B. (2019). Ou peut-on planter une vigne ? Température, altitudes, pluviométrie [en ligne]. (Page consulté le 12/7/2021).

« <https://viticulturevignoble.fr/ou-peut-on-planter-vigne.html> »

Peit, A. (2020). La nécrose bactérienne de la vigne [en ligne].

« <https://www.vignevin-occitanie.com/fiches-pratiques/la-necrose-bacterienne-de-la-vigne/> »

Parker,R. (2021). Climat pour le vin [en ligne]. (Page consulté le 04-08-2021).

« <https://www.oenologie.fr/climat-pour-le-vin/amp> »

Tripathi N, Sapra A. (2021). Gram Staining. [en ligne]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

«https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/#_NBK562156_pubdet »

Wiki Auréa, Analyse de limbe et de pétiole : un outil de diagnostic en phase végétative [en ligne]. (Page consulté le 19-07-2016)

« https://wiki.aurea.eu/index.php/Analyse_de_limbe_et_de_p%C3%A9tiole:_un_outil_de_diagnostic_en_phase_v%C3%A9g%C3%A9tative »

Gout at vin, les cépages-les aromes. (2021).

« <https://www.gout-et-vin.com/les-cepages-les-aromes/> »

Mémoire présenté par :

- KELLOU Chiraz
- REDJEM Rayene
- BOUHROUM Imen

Année Universitaire : 2020-2021

Contribution a la caractérisation de la flore phyllosphérique des feuilles de la vigne (*Vitis Vinifera*)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie Microbienne

La flore phyllosphérique des feuilles de vigne (*Vitis Vinifera*), a fait l'objet de ce présent modeste travail qui se concentre sur l'isolement, l'identification et l'abondance des micro-organismes en interaction avec cette partie de la plante, notamment la population bactérienne abondante. Des tests morphologiques, microbiologiques et un dénombrement microbien sont appliqués pour cet objectif. Le prélèvement des feuilles est réalisée à partir de la variété « red globe » de la vigne cultivée, sur un site situé à El Harouche (willaya de Skikda), Algérie. Les résultats de cette caractérisation phénotypique ont pu montrer l'existence sur les feuilles de la vigne, d'une diversité microbienne en générale et bactérienne en particulier. Même si l'analyse phénotypique ne permet qu'une simple orientation dans le classement des isolats au niveau de genre, elle a pu dans cette étude d'orienter vers la présence et l'abondance de multiples genres bactériens tels que *Staphylococcus* et *Lactobacillus* sur la feuille de vigne.

Ce travail de recherche a donné une idée globale sur la grande diversité de la flore bactérienne des feuilles de la vigne et pourrait être vérifié et complété via les techniques fiables de la biologie moléculaire.

Mots clés : flore phyllosphérique, *Vitis Vinifera*, diversité bactérienne, caractères morphologiques, feuilles de vigne.

Laboratoire de recherche : Biologie moléculaire et cellulaire

Jury d'évaluation :

Président du jury : M. KITOUNI Mahmoud - Professeur- UFMC1

Encadreur : M. BENHIZIA Yacine - Professeur - UFMC1

Co-encadreur : Mme. DEKKICHE Samia -MCB- Université Batna 2

Examinatrice : Mme. GUERGOURI Ibtissem - MAA- UFMC1

Date de soutenance : 22/09/2021