

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
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 Environnements

Spécialité : Ecologie Microbienne

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Contribution à la caractérisation de la phyllosphère des
grappes de raisin de table (Etude comparative)**

Présenté par : BOUSSADIA Hounaida

Le .../06/2022

BOUDRAA NOURI Hounaida

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mr BENHIZIA Yacine Professeur –U. Frères Mentouri Constantine 1.

Examineur 1 : Mme. DEKKICHE Samia MCB–U. Hadj Lakhdar. Batna 2.

Examineur 2 : Mr. CHABI Rabeh MAA-U. Frères Mentouri Constantine 1.

**Année universitaire
2021– 2022**

Remerciements

Tout d'abord nous remercions ﷻ de nous aider à avoir de la patience, courage et force pour atteindre nos objectifs et ainsi réaliser nos beaux rêves au terme de ce travail.

*Nous tenons dans un premier temps à remercier, notre directeur de mémoire monsieur **BENHIZIA Yacine** professeur à l'université Frères Mentouri Constantine I pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.*

Nous désirons remercier également toute l'équipe pédagogique du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC) Chaab Ersas université Frère Mentouri et les intervenants professionnels responsables de notre formation, pour avoir assuré la partie pratique.

*Nous voudrions remercier aussi l'ingénieure **BELAHRACHE Nour El Houda** du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire (BMC) Chaab Ersas Université Frère Mentouri, elle a partagé ses connaissances et expériences, tout en nous accordant sa confiance et une large indépendance dans le travail.*

*Enfin nos derniers remerciements et qui ne sont pas les moindres vont aux membres du jury Dr. **DEKKICHE Samia** et Dr. **CHABI Rabeh** qui ont accepté de juger notre travail.*

Nous adressons notre sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leur conseils et leurs critiques ont guidé notre réflexion et ont accepté de nous rencontrer et de répondre à notre question durant la réalisation de notre mémoire.

Dédicace 1

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce mémoire

A mon très cher père LAÏD, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'immense affection et

Amour que je te porte.

A la plus belle créature que Dieu à créer sur terre, à cette source de tendresse

De Patience et de générosité, à ma chère mère FATIMA que Dieu la garde.

A ceux qui j'ai partagé avec eux la douceur et la cruauté jours,

Mes sœur ZAINEB et YASSMIN pour votre soutien moral

A mon petit frère MOUAD ABD RAHIM.

A mon adorable petite sœur AFNEN MARAM qui

Réussissent à me procurer l'énergie et une parfaite relaxation, joie et harmonie.

Je tiens à rendre hommage à ma très cher Grand-Mère MESOUDA qui m'a soutenue tout au

Long de mon parcours,

Que dieu le très haut lui accorde une longue vie pleine de santé.

A ma tante LAÏLA et ses enfants NEDJNOU et TEDJOU

À mon cher mari, je dis merci de m'avoir donné tant d'amour et de l'optimiste

A ma famille et à tous ceux qui m'aiment

A mon cher binôme HOUNEIDA

Pour sa patience, sa compréhension durant ce projet

HOUNAÏDA

Dédicace 2

*À mes généreux parents qui ont tout sacrifié pour mes études et ma réussite pour mon bonheur et
Ma joie les mots ne suffisent pas pour exprimer mon grand amour et ma fierté que votre fille m'a*

Donné tout ce qui est matériel et moral pour arriver à ce moment et me voici

À mon père, BOUDRAA NOURI WHAHID, je te remercie pour ton soutien et tes

Encouragements, j'espère que tu seras fier de moi

À la personne la plus aimée de mon cœur dans ce monde. À ma mère ZERMANE SAMIRA. Je

Suis ici, grâce à Dieu et grâce à vous. Après lui, vous avez été mon principal soutien en tout.

Vous êtes la raison de ma fermeté. Et ma force rien n'est après toi

À mon oncle ZERMANE IBRAHIME, que je considère comme mon deuxième père, je te

Remercie pour tous tes dons et tes encouragements. A sa femme, KAHOUL MOUNIA, que je

Considère comme ma deuxième mère. Tous les mots ne te suffisent pas car tu es une

Personne merveilleuse

À mon oncle SALIME et sa femme LAMIA, je vous remercie de tout mon cœur pour votre

Soutien et vos encouragements

À mes cousins que je considère comme mes frères Ramzi, ZAHRA, SAMIA, MOUHAMEDDE,

DJEBER, LOUAY, MALAK il n'y a aucune dédicace qui puisse exprimer mon amour et les

Sentiments profonds que j'ai pour vous.

À l'homme de ma vie DJ, je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu m'as donné

Depuis le jour où je t'ai rencontré. Merci d'être à mes côtés. Tu ne peux pas imaginer à quel

Point je suis heureux de partager ma vie et ses détails avec tu.

À mes amies d'enfance AHLLEM, CHEIMA merci d'être dans ma vie, merci pour votre soutien

Et vos encouragements, Je vous aime

À ma chère binôme et collaboratrice HOUNAIDA avec qui j'ai eu le plaisir de Travailler.

À toutes ma famille entière BOUDRAA NOURI et ZERMANE

Houneida

Résumé

Le but de cette étude est de caractériser, d'isoler et d'identifier la flore phyllosphérique présente sur la surface des baies de raisin de table, en particulier la population bactérienne. Les échantillons de la variété « Red Globe » de la vigne (*Vitis vinifera*) proviennent d'un marché situé dans la willaya de Constantine.

Les techniques de caractérisation et d'identification utilisées sont basées sur une analyse phénotypique, cette identification s'appuie initialement sur des tests morphologiques et microbiologiques basés sur l'observation des colonies à l'œil nu et les tests d'orientation tels que : la coloration de Gram et la coloration au bleu de méthylène.

Les résultats de cette caractérisation phénotypique ont pu montrer l'existence sur les baies de raisin, d'une diversité microbienne en général et bactérienne en particulier, principalement après l'utilisation d'un antifongique, qui nous a permis de mettre en évidence les genres bactériens : *Entérobactéries*, *Staphylocoques*, *Micrococcus*.

En comparant ces résultats avec d'autres études sur les raisins récoltés à partir de la vigne, nous avons constaté des similitudes dans la population de bactéries.

Ce travail de recherche a révélé l'existence d'une assez grande diversité de la flore bactérienne de la grappe de raisin et devrait être confirmé par des techniques plus poussées comme celles s'appuyant sur la biologie moléculaire.

Mots clés

Bactéries, Identification, Baies, la vigne, caractérisation phénotypique.

Abstract

The purpose of this study is to characterize, isolate and identify the phyllo-spherical flora present on the surface of table grape berries, especially the bacterial population. The samples of the «Red Globe» variety of the vine (*Vitis vinifera*) come from a market located in the state of Constantine.

The characterization and identification techniques used are based on phenotypic analysis, this identification is initially based on morphological and microbiological tests based on the observation of colonies with the naked eye and orientation tests such as: Gram stain and methylene blue stain.

The results of this phenotypic characterization could show the existence on grape berries, a microbial diversity in general and bacterial in particular, mainly after the use of an antifungal, which allowed us to highlight the bacterial genera: *Enterobacteria*, *Staphylococci*, *Micrococcus*.

Comparing these results with other studies on grape harvested from the vine, we found similarities in the bacterial population.

This research has revealed the existence of a fairly large diversity of the bacterial flora of the grape cluster and should be confirmed by more advanced techniques such as those based on molecular biology.

Keywords

Bacteria, Identification, Berries, the vine, phenotypic characterization.

ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو وصف وعزل وتحديد البيئة الميكروبية النباتية الموجودة على سطح عنب المائدة و خاصة السلالات البكتيرية. العينة مأخوذة من كرمة (*Vitis vinifera*) صنف (Red globe) من سوق يقع في ولاية قسنطينة. تستند تقنيات التوصيف والتعريف المستخدمة إلى التحليل الظاهري، ويستند هذا التحديد في البداية إلى اختبارات مورفولوجية وميكروبيولوجية تعتمد على ملاحظة المستعمرات بالعين المجردة واختبارات التوجيه مثل: صبغة جرام و صبغة الميثيلين الأزرق

اظهرت نتائج هذا الوصف الظاهري وجود تنوع ميكروبي بشكل عام وبكتيري بشكل خاص، بعد استخدام مضادات للفطريات، مما سمح لنا بتسليط الضوء على الأجناس البكتيرية التالية *Micrococcus Entérobactéries* *Staphylococcus*

بمقارنة هذه النتائج مع دراسات أخرى حول العنب المحصود من الكرمة، وجدنا أوجه تشابه في السلالات البكتيرية كشف هذا البحث عن وجود تنوع كبير إلى حد ما في السلالات البكتيرية للعنقود العنب و الذي يجب تأكيده من خلال تقنيات أكثر تقدماً مثل تلك القائمة على البيولوجيا الجزيئية.

الكلمات الرئيسية

البكتيريا، تحديد ، عنب المائدة، الكرمة، الوصف الظاهري.

Liste des figures

Figure 1 : Illustration descriptive de la plante de vigne.	4
Figure 2 : La composition d'une grappe de raisin.	6
Figure 3 : Schéma d'une coupe transversale de baie de raisin.	6
Figure 4 : La situation de la viticulture.	10
Figure 5 : Schéma de la phyllosphère et de la rhizosphère.	14
Figure 6 : Échantillon de raisin de table cépage (Red Globe).	19
Figure 7 : Equipement utilisé après la stérilisation (a et b).	20
Figure 8 : La préparation de bouillon nutritif.	21
Figure 9 : L'agitation et la stérilisation du bouillon nutritif.	22
Figure 10 : La préparation de la suspension mère.	23
Figure 11 : Préparations des dilutions décimales à partir de la solution mère (SM).	24
Figure 12 : Etapes d'ensemencement à partir des dilutions décimales (10-1 à 10-3).	25
Figure 13 : Les étapes et les colorants utilisés dans la coloration de Gram.	26
Figure 14 : Méthode d'ensemencement de trois cadrans.	28
Figure 15 : Trouble montré par les dilutions décimales après 72h d'incubation.	30
Figure 16 : Résultats après 3 jours d'incubation des 3 répétitions des toutes les boites.	30
Figure 17 : Trouble observé dans les tubes BN 10-1 avec et sans ATF.	39
Figure 18 : Colonies bactériens observées avec et sans utilisation d'ATF.	39

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification taxonomique de la vigne (<i>Vitis vinifera</i>).	7
Tableau 2 : Croissance microbienne dans les dilutions décimales après 72h d'incubation.	29
Tableau 3 : Nombre de colonies microbiennes dans chaque boîte de pétrie en UFC (Unité formant colonie).	31
Tableau 4 : Aspect macroscopique des colonies isolées.	33
Tableau 5 : Récapitulatif des résultats de l'observation au microscope optique x100 après une coloration de Gram des différentes colonies.	35
Tableau 6 : Récapitulatif des résultats de l'observation au microscope optique x 100 après coloration au bleu de méthylène des différentes colonies.	37
Tableau 7 : Croissance microbienne sur bouillon nutritif.	38
Tableau 8 : La comparaison des résultats d'études phyllosphérique des raisins de table et des raisins immatures.	41

Liste des abréviations

Tpm : Rotation par minute.

ATF : Antifongique.

Ha : Hectares.

UFC : Unité formant colonie.

Min : Minutes.

OIV : Organisation Internationale de la vigne et du vin.

SM : Solution mère.

Introduction	1
Partie I : revue bibliographique	
1. La plante de vigne	3
1.1 Généralité	3
1.2 Description de la plante	4
1.2.1 Les racines	4
1.2.2 Le tronc	4
1.2.3 Les rameaux	5
1.2.4 Les feuille	5
1.2.5 Les bourgeons	5
1.2.6 Les fleurs et l'inflorescence	5
1.2.7Les grappes	5
1.2.8Les baies	6
1.2.9 La graine	7
1.3 Classification	7
1.4 Les diversité de vigne	8
1.4.1 Les cépages des raisins de cuve	8
1.4.2 Les cépages des raisins de table	8
1.4.2.1 Les raisins de primeur	8
1.4.2.2 Les cépages de table de saison	8
1.4.2.3 Les cépages des raisins tardifs	9
1.4.3 Les cépages des raisins secs	9
1.5 La distribution géographique	9

1.5.1 La viticulture dans le monde	9
1.5.2 Viticulture en Algérie	10
1.6 Ecologie de la vigne	11
1.6.1 Températures	12
1.6.2 L'enseillement	12
1.6.3 La pluviométrie	12
1.6.4 Le vent	12
1.6.5 Le sol	12
2. La flore phyllosphérique de la grappe de raisin de table	13
2.1 La phyllosphère	13
2.2 La flore phyllosphérique	14
2.3 La source de la flore phyllosphérique	15
2.4 Les stratégies d'adaptation microbiennes dans l'habitat phyllosphérique	15
2.4.1 Production des pigments	15
2.4.2 Production des hormones	15
2.4.3 Production des toxines	16
2.4.4 Production des différents polymères	16
2.4.5 Engagement des facteurs de virulence	16
2.4.6 Sporulation	16
2.5 Les principaux colonisateurs microbiens dans le phyllosphère des grappes de raisin de table	17
Partie II : partie expérimental	
I : matériel et méthodes	18
1. Echantillonnage, prélèvement et stockage de grappe de raisin	18

1.1 Caractéristiques des fruits	18
1.1.1 Le grappe	18
1.1.2 Baies	18
1.2. Matériel et produits utilisés pour le prélèvement	18
1.3 Mode de prélèvement	19
2 Préparation des milieux et des solutions pour l'isolement	19
2.1 Stérilisation	19
2.2 Milieux de culture utilisés	20
2.2.1 Préparation de l'eau physiologique pour les dilutions	20
2.2.1.1 Les produits et méthode utilisée	21
2.2.2 Préparation du bouillon nutritif (BN)	21
2.2.2.1 Les produits	21
2.2.2.2. La méthode	21
2.2.3 La gélose nutritive	22
2.3. Préparation de la suspension mère	22
2.4. Préparation des dilutions	23
3 Isolement des bactéries à partir des baies de raisin de table	24
3.1 Isolement des bactéries sans l'utilisation d'un antifongique	24
3.1.1 Ensemencement	24
3.1.2 Incubation	24
3.2 Caractérisation morphologique des isolats	25
3.2.1 Observation macroscopique des colonies bactériennes	25
3.2.2 Observation microscopique	25

3.3 Isolement avec utilisation d'un antifongique	27
3.3.1 Ensemencement sur bouillon nutritif (BN)	27
3.3.2 Ensemencement sur gélose nutritive (GN)	27
Partie III : Résultat et discussion	
1. Isolement des microorganismes des baies de raisin sans utilisation d'un antifongique (ATF)	27
1.1 Mise en évidence d'une diversité bactérienne à la surface des baies de raisin de table	29
1.1.1 Observation d'un trouble (milieu liquide)	29
1.1.2 Observation des colonies (milieu solide).	30
1.2 Dénombrement des colonies	32
1.3 Caractérisation morphologique des colonies obtenues	32
1.3.1-Caractères macroscopiques	32
1.3.2 Caractérisation microscopique	33
2. Isolement des microorganismes des baies de raisin avec utilisation D'un antifongique (ATF)	38
2.1 Croissance sur le bouillon nutritif (BN) milieu liquide	38
2.2 Croissance sur gélose nutritive (GN) milieu solide	39
Discussion générale	40
Conclusion	43
Références bibliographiques	44

Introduction

Pendant longtemps les recherches en microbiologie étaient focalisées essentiellement sur la diversité microbienne d'un écosystème précis. Caractériser les interactions entre les micro-organismes, identifier le rôle des micro-organismes et étudier les interactions hôtes-microorganismes et est-ce qu'il comprend le domaine de l'écologie microbienne, l'avancée des méthodes et des techniques des identifications à contribué à la connaissance de la diversité et des adaptations des communautés microbiennes dans les différents écosystèmes en particulier la phyllosphère des plantes de grand intérêt économique et cela a aidé à expliquer les interactions qui se passe entre eux.

Une grande variété de bactéries se trouve sur les surfaces et dans les parties aériennes des plantes qui ont des interactions complexes avec elle à différents stades du développement. Cette diversité est représentée par des bactéries épiphytes et endophyte, L'ensemble de ces interactions contribue à la nutrition et à la santé des plantes et conditionne-leur (Deveau et Martin, 2016).

La plante de la vigne et un écosystème terrestre et comme toutes les plantes elle héberge une large diversité de microorganismes. Le microbiote végétal peut contenir des bactéries, des champignons et des virus. Cette plante est l'une des plus vieilles cultures qui ont pris naissance il y a quatre mille ans environ ; elle possède de grandes facultés d'adaptation aux conditions pédoclimatiques. Elle est cultivée dans les régions chaudes et également sous des climats relativement froids, son importance économique considérable se situe au niveau de la production des fruits (le raisin), commercialisé comme raisin de table, jus de fruits, mais surtout utilisé pour la production du vin.

Le principal cépage cultivé dans le monde et en Algérie, est représenté par la vigne (*Vitis vinifera*) qui couvre environ 7.660 millions d'hectares sur l'ensemble des cinq continents avec une production de 206 356 000 Qx de raisins de table (Agouazi, 2013), notamment les variétés de raisins de table la viticulture de (Red globe) qui sont très abondantes en Algérie.

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). La baie est le fruit de la vigne, qui avec la rafle forme la grappe de raisin. Elle est composée de la pellicule, de la pulpe et des pépins.

Cette présente étude a pour objectif de décrire et de déterminer la diversité et l'abondance des populations bactériennes se trouvant sur les baies de raisin. « Quels sont les genres bactériens les plus abondants sur les baies de raisin ? », et faire une étude comparative avec d'autres études sur la plante 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 sections regroupées en deux principales parties :

- La première partie représente une synthèse bibliographique concernant des généralités sur la vigne et leur fruit, des notions sur la flore phyllosphérique des grappes de raisin, origine, établissement adaptation et composition.
- La deuxième partie expérimentale. 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.

***Partie 1 : Revue
bibliographique***

1. La plante de vigne

1.1 Généralité

L'histoire de la vigne accompagne de l'humanité depuis millénaires, la vigne existe depuis près de 50000 ans, les Grecs ont été les premiers à cultiver la vigne (Dubois et Deshaies, 1997).

La culture de la vigne est répandue dans tous les pays tempérés depuis l'Inde jusqu'à l'occident Européen (Enjalbert, 1975).

La vigne est une plante frutière à graine (spermatophyte), ligneuse et grimpante grâce à ses vrilles. Elle appartient à la classe des dicotylédones, à l'ordre des vitales et à la famille des Vitacées ou Ampélidacées, On retrouve 19 genres dans cette famille (Galet, 2000). Les Vitacées sont des phanérogames et appartiennent aux angiospermes est représentée par environ 1100 espèces. La distribution géographique des Vitacées est surtout intertropicale, 80% des espèces de cette famille se trouvant dans cette région. Le continent Africain avec Madagascar (43% des espèces) et Asiatique avec l'Indonésie (40% des espèces) sont plus abondants que L'Amérique (15% des espèces) ou L'Océanie (2% des espèces) (Toumi, 2006).

L'espèce la plus connue et la plus cultivée de la vigne est représenté par l'espèce *Vitis vinifera* que soit au niveau nationale ou internationale, car il est le seul à produire des fruits consommables par l'homme (Bertrand, 2016). En viticulture, les arbrisseaux de la vigne sont cultivés sur une large variété de sols : caillouteux, sableux, argileux pouvant présenter une faible ou forte fertilité et poussent sur un pH de 6 à 6,5. La nutrition minérale de la plante et en particulier la nutrition cationique a une grande influence sur la qualité des fruits de la vigne. Le potassium favorise la croissance, augmente la résistance à la sécheresse ainsi que la proportion de sucre et le magnésium intervient essentiellement sur la photosynthèse.

1.2 Description de la plante

La vigne, comme toute plante, développe un système racinaire qui colonise le sol et le sous-sol tout au long de sa vie et un système aérien, formé d'un tronc qui se divise en bras portant des bois de taille qui peuvent être longs (lattes, asters, arçons) ou courts (coursons, cots) ces bois appelés sarments portent des yeux, ou ensemble de bourgeons qui donneront naissance à des rameaux feuilles, fructifères ou non (Reynier, 2007) (Fig. 1).

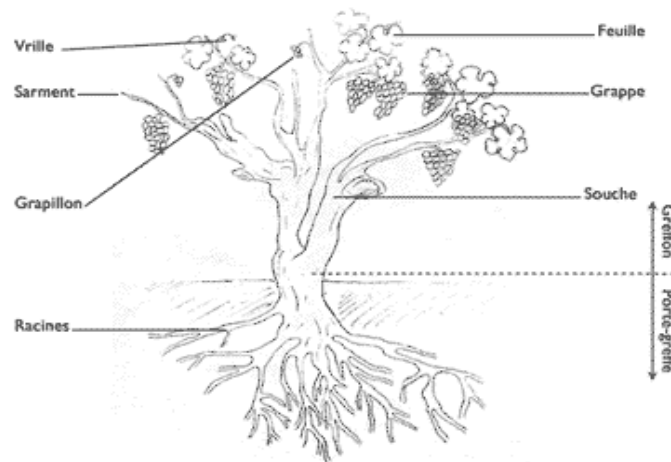


Figure 1. Illustration descriptive de la plante de vigne (Gout et vin, 2021).

1.2.1 Racines

La racine constitue la partie souterraine de la plante (Ribereau-Gayon et Peynaude, 1971). La longueur de croissance des racines est généralement comprise entre 10 m, 15 m et 20 m (Mahboub, 2017). Son rôle est de fixer la plante au sol et d'absorber l'eau et les éléments minéraux nécessaires à son fonctionnement (Ribereau-Gayon et Peynaude, 1971). Elle joue aussi un rôle important de réserve, car dans les tissus des racines se déposent de nombreuses substances de réserve (notamment de l'amidon) (Galet, 1970).

1.2.2 Tronc

Le tronc s'étend en plusieurs branches ou bras qui portent les tiges de l'année appelées rameaux tant qu'elles demeurent herbacées et sarments après aoutement. Le système végétatif aérien est constitué d'un tronc ; qui est chez la vigne n'est pas un fut droit, mais il est de plus en plus flexueux,

tordu des supports sur lesquels il grimpe et même lorsqu'il rampe sur le sol (Galet, 1970).

1.2.3 Rameaux

Dans les rameaux, à l'automne s'accumulent des réserves des éléments nutritifs (fabriquées dans les feuilles) qui permettent aux bourgeons de se développer au printemps suivant. Par une conséquence pratique en choisir les boutures ou les greffons sur des rameaux aoutés (Mazouzi et Salem, 2019).

1.2.4 Feuilles

Les feuilles sont rattachées au rameau par les pétioles qui se ramifient en cinq nervures principales, puis en nervures secondaires pour former finalement un réseau de canicules qui alimentent et soutiennent le limbe des feuilles. La forme des feuilles varie un peu avec les cépages d'une manière générale. (Huglin, 1986 et Galet, 1988).

1.2.5 Bourgeons

Les bourgeons sont essentiellement des branches de feuilles vertes embryonnaires miniatures, tous les bourgeons de la vigne sont constitués d'écailles brun foncé à l'extérieur et de riches bourgeons blancs à l'intérieur (Hidalgo, 2010).

1.2.6 Fleurs et l'inflorescence

Les fleurs sont groupées en inflorescence : selon la variété et le milieu, Le nombre de fleurs par inflorescence varie de 100 à 1000 selon les cépages, la position sur le rameau et la vigueur (Huglin, 1986 et Joly, 2005). La majorité des espèces cultivées possèdent des fleurs hermaphrodites très petites variant de 2 à 7mm.

1.2.7 Grappes

La grappe (Fig. 2) est composée d'un pédoncule qui la fixe au rameau, d'un rachis, ou rafle plus ou ramifié dont les ultimes ramifications, les pédicelles, portent les baies. Les grappes peuvent varier de 6 à 24 cm de longueur, et de 100 g à 500 g pour la plupart des cépages (Huglin et Schneider, 1998 ; Galet, 2000).

1.2.9 Graine

La graine ou pépin résulte du développement de l'ovule fécondé. Le nombre des graines est en général de 4 par baie, il peut y en avoir moins si les ovules ne sont pas fécondés. Dans certains cas les raisins n'ont pas du tout de pépin et ils sont dits apyr es (Sultanine, Corinthe) (Galet, 1998 ; Renier, 2003 et Joly, 2005) la forme des pépins est assez spécifique la face ventrale présente deux dépression ou fossettes séparées par une arête parcourue par un cordon ou raphé qui contourne la graine (Ribereau-Gayon et Peynaud, 1971).

1.3 Classification

Les vignes cultivées appartiennent de l'ordre des *Ramnales*   la famille des *Vitaceae* et comprend 19 genres, ce sont des plantes pérennes, lianescentes ou herbacées adaptées à des environnements variés. Parmi les quelles le genre *Vitis* est sous divisé en deux sous genre *Muscadinia* (2n=40) et *Vitis* anciennement appelé *Euvtis* (2n=38). La plupart des espèces cultivées fait partie des *Vitis* (Tab. 1) ; cependant, le sous genre de *Muscadinia* comprend le *V.rotundifolia* et le *V.munsoniana*.

A l'intérieur d'*Euvtis*, on distingue trois groupes : un groupe **eurasiatique**, formé par *V.vinifera* et *V. vinifera sylvestris* ; un groupe **asiatique** et un groupe **américain** (*V.rupestris*) (Lekhrif, 2011).

Tableau 1 : Classification taxonomique de la vigne (*Vitis vinifera*) (INPN, 2021)

Règne	Plantae
Classe	Equisetopsida
Sous-Classe	Magnoliidae
Ordre	Vitales
Famille	Vitaceae
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 Les diversité de vigne

Vignoble, raisins et vins ont marqué de leur empreinte les paysages, l'imaginaire, l'économie et l'alimentation des habitants de la Méditerranée et de l'Europe depuis des milliers d'années. Cette relation étroite s'appuie sur une biodiversité exceptionnelle (Hélène, 2005).

1.4.1 Les cépages des raisins de cuve

Ce sont des variétés cultivées pour la fabrication de vin, est composée essentiellement des cépages classiques, il se trouve deux catégories de vins : les vins de consommation courante (V.C.C) et les vins de qualité ou vins d'appellation d'origine garantie (V.A.O.G). Pour les raisins noirs aux vins rouges, on citera le Garignan, le Cinsault et le Grenache, tandis que pour les raisins à vins blancs, l'on relèvera les variétés suivantes : Alicante, Bouchet, Clairette et Ferrana (Hélène, 2005).

1.4.2 Les cépages des raisins de table

Le raisin de table est le fruit de la vigne attribué essentiellement de par ces caractéristiques à la consommation en nature et produits par des cépages spécieux cultivée à cet effet (Allouani, 2011).

1.4.2.1 Les raisins de primeur

Sont ceux qui arrivent à maturité avant les raisins de cuve dont ils n'ont par conséquent à redouter la concurrence, on caractérise parmi eux les raisins précoces et les raisins de première époque : la perle de Saba, le Khalili, Madeleine engevine, Madeleine royale, le prims, le chasselas, le chaouch, le cardinalla reine de vigne.

1.4.2.2 Les cépages de table de saison

Leur temps de maturation à la première époque tardive, deuxième époque hâtive et troisième époque moyenne on raconte : le muscat de Hambourg, l'italia, l'adari, musta d'Alexandrie, dattier de Beyrouth.

1.4.2.3 Les cépages des raisins tardifs

Sont ceux qui arrivent à maturité après la date des vendanges, après le Carignon en Algérie, ils appartiennent à la fin de la troisième époque ou quatrième époque, on distingue : Valenci, Ahmar Bou Ahmar, Guerbez le Dabouki.

1.4.3 Les cépages des raisins secs

Denrée facile à entreposer et à transporter les raisins secs ont un rôle important dans les anciennes civilisations nomades du proche orient et sur les bords de la Méditerranée. Ils sont appelés à se développer surtout dans la région de Mascara où on rencontre la Sultanine, Kings Ruby (Toumi, 2006).

1.5 La distribution géographique

La viticulture de table est une technique qui vise à tout mettre en œuvre pour obtenir des raisins mûrs et agréables à consommer à des moments bien précis de la saison viticole (Toumi, 2006)

1.5.1 La viticulture dans le monde

En 2007, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture a estimé les vignobles mondiaux à 7,792 millions d'hectares et la production mondiale de raisins à 665 millions de Qantar (Anonyme, 2007).

En 2010, le vignoble offre une large répartition, sur les cinq continents avec une superficie d'environ 8 millions d'hectares. La majorité des régions viticoles du monde se situent en Europe (57,9%), et le reste se répartit entre l'Asie (21,3%), l'Amérique (13,0%), l'Afrique (5,2%) et l'Océanie (2,7%) (OIV, 2010).

La production mondiale des raisins en 2010 (Consommation directe, séchage) est estimée à 12 millions de tonnes. Environ 18 % (2,2 millions de tonnes) sont expédiés vers les marchés étrangers. Les exportations ont une forte concentration géographique. Les plus grands pays producteurs sont l'Italie, la Chine et les États-Unis. Ce dernier est en même temps géral L'importateur après l'Allemagne et le Royaume-Uni, qui importe principalement des raisins secs

(Aigrin, 2003 ; Oiv, 2010). Les pays méditerranéens arrivent en tête en termes d'importance des zones viticoles avec une superficie d'environ 6 millions d'hectares. En 2012, la superficie agricole a augmenté pour atteindre 7528 millions d'hectares (Aghwazi, 2013).

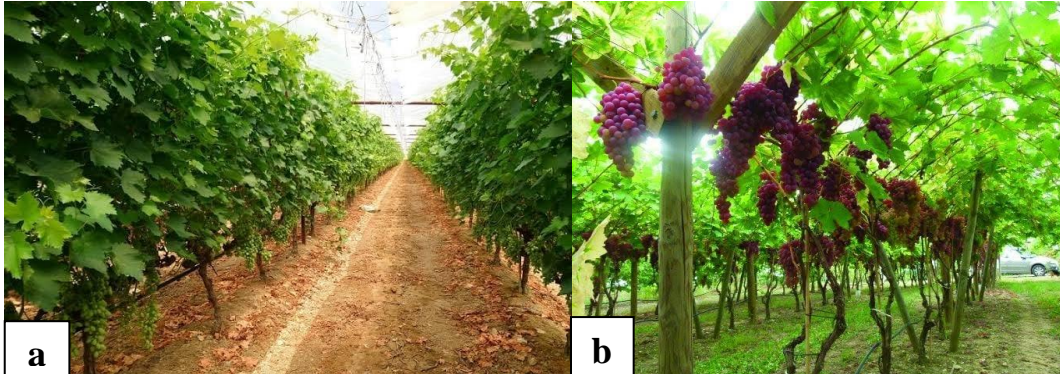


Figure 4. La situation de la viticulture (Agriculture Mono, 2020).

1.5.2 Viticulture en Algérie

Compte tenu du climat, des terrains disponibles et de l'expérience agricole acquise par la profession, la viticulture a sa place en Algérie. Dans de nombreuses régions, notamment dans le centre et l'ouest du pays, la viticulture représente l'utilisation optimale des sols (Basler, 2000).

La plus grande production est réalisée dans la région centrale (75%), environ 25% à l'ouest et très faible à l'est (Toumi, 2006).

En 1830, la superficie occupée par un vignoble (ferme de raisin de table) était estimée à plus de 2 000 hectares (Aldebert, 1959). Les colons s'intéressent à la viticulture (vignoble) qui s'étend rapidement jusqu'à 400 000 hectares en 1935 (Isnard, 1951 et Aldebert, 1959).

En 1840, le plateau de Staouli est reconstruit en colonie agricole sur 45 hectares de vignes, avec les plants ramenés de France. D'autres vignobles ont été érigés sur les pentes de Zaccar à Wadi Chlef, Miliana, Médea. Le mascara était le plus important. On peut également trouver plus à l'est ; Bougie, Guelma, Sétif, Constantine (Isnard, 1951).

En moins de 20 ans, le vignoble algérien a doublé de superficie, couvrant 17 hectares (ISNARD, 1951). Bien que le Phylloxéra ait été étendu en 1885, la superficie du vignoble ne cessait d'augmenter grâce à la reconstruction du vignoble algérien à travers la création des

racines américaines, progressent rapidement de 1913 à 1933 pour atteindre 400 000 hectares en 1935 (Aldebert, 1959).

Après l'indépendance de l'Algérie (1962), le vignoble de cuve occupait une superficie de 350000 hectares pour 4000 ou 5000 hectares de vignoble de table (Boudjellal, 1972).

En 2003, la viticulture dans la wilaya d'Alger s'étendait à plus de 85 mille hectares à Mitidja et sur la côte et dans les régions de Miliana, Médine et Ain Bessem. En Oranie, elle compte moins de 125 000 hectares de vignes dans les régions de Mostaganem, Tlemcen, Sidi Bel Abbas et Mascara. Dans le département de Constantine, elle dépasse à peine la superficie 17 000 hectares, s'écartant légèrement du côté de la zone de Boujie et Djedjelli (<http://www.alger-roi.net>).

1.6 Ecologie de la vigne

La culture de la vigne s'est répandue sur tous les continents. Elle occupe une place majeure dans les secteurs agricoles de plusieurs pays viticoles et une place étendue dans leur économie par les biais de la fabrication de vin ainsi que de raisin sec ou de table (Reynier, 1991).

Les facteurs de la production viticole sont d'une part des factures naturelles (sol, climat...) et des factures techniques dont le choix dépend des décisions de la viticulture (Raynier, 1986). Le climat de Méditerranée 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 (Pépinière, 2019 ; Parker, 2021).

Selon les secteurs, par exemple alimentaire, pharmaceutique, etc..., toutes les parties de la vigne peuvent être exploitées les fruits, les feuilles, la sève et le bois. En effet les produits alimentaires issus de la Vigne sont vendus dans les grandes surfaces commerciales : jus de raisin, huile de pépins de raisin, gelées, confiture, le muscat et le raisin noir (Judd et al, 2002).

1.6.1 Température

La chaleur est essentielle pour la floraison, la fécondation et la maturation afin que les grappes parviennent à maturité, La vigne est exigeante en chaleur, c'est une plante qui propage dans les parties chaudes des zones tempérées, elles ont besoin des seuils thermiques précis en été.

Ainsi les températures supérieure ou égale à 10°C sont considérées comme étant le zéro de végétation (Galet, 2000). Lorsqu'elles sont inférieures à 10°C, un développement très lent est observé chez les cépages précoces ; une température entre 10 et 30°C stimule le développement et une température supérieure à 40°C provoque un dessèchement et des brûlures plus ou moins graves suivant les années (Huglin, 1989).

1.6.2 Ensoleillement

La nécessité d'un bon ensoleillement favorisé la photosynthèse est particulièrement évidente pour la vigne (Crespy, 1987). Et constitue un facteur primordial dans le cycle végétatif et reproducteur de la vigne, elle nécessite un climat lumineux (Galet, 1993) avec un ensoleillement entre 1500/1600 heures/an dont au moins 1200 heures durant la période de végétation (Simon et al, 1992). Les pentes et la couleur de sol jouent un rôle très important pour l'ensoleillement des grappes et les heures de chaleur (Pépinère, 2019).

1.6.3 Pluviométrie

La vigne est résistante à la sécheresse, elle ne supporte pas l'excès d'humidité à l'exception des cépages tardifs. La vigne nécessite des précipitations de 600 mm/an (Simon et al, 1992) ; la pluviométrie supérieure à 500 mm donne de bons rendements ainsi les pluies du printemps sont très importantes car elles conditionnent la vitesse de croissance, l'élongation finale des rameaux et l'importance de la surface foliaires.

1.6.4 Vent

Le vent intervient en modifiant les autres facteurs météorologiques, un faible vent de printemps empêche la formation des gelées nocturnes et un vent violent pendant l'été dessèche l'air et le sol et provoque le folletage, ce qui induit un stress chez les jeunes souches et induit les blessures (Resgui, 2019).

1.6.5 Sol

La vigne est une plante peu exigeant sur le choix de sol, elle peut s'accommoder à divers types de sols, mais il remarque que le sol calcaire assure le meilleur goût aux raisins (Bretaudéau, 1988).

2. La flore phyllosphérique de la grappe de raisin de table

2.1 La phyllosphère

Les parties aériennes des plantes vivantes, y compris les feuilles, les tiges, les bourgeons, les fleurs et les fruits, représentent un habitat pour les micro-organismes appelés la phyllosphère. Les bactéries sont les microorganismes dominants dans la phyllosphère, bien que les archées, les champignons filamenteux et les levures puissent également jouer un rôle important. Ces microbes peuvent être trouvés sous forme d'épiphytes à la surface des plantes et sous forme d'endophyte dans les tissus. La surface globale de la phyllosphère a été estimée à plus de 4×10^8 km², supportant des assemblages bactériens dans une région de 1026 cellules. De plus, des estimations récentes de la diversité des bactéries de la phyllosphère dans les 20 000 plantes vasculaires peuplant les forêts atlantiques brésiliennes suggèrent que 2 à 13 millions d'espèces de bactéries pourraient être présentes dans ce seul habitat (Lambais et al, 2006).

La phyllosphère (fig.5) signifie une niche à grande importance agricole et environnementale. Il existe de plus en plus de preuves d'interactions importantes entre les habitants microbiens de la phyllosphère qui peuvent affecter la valeur adaptative des populations de plantes naturelles ainsi que la qualité et la productivité des cultures agricoles. Les bactéries de la phyllosphère peuvent favoriser la croissance des plantes et à la fois supprimer et stimuler la colonisation et l'infection des tissus par des pathogènes végétaux. De même, les endophyte fongiques des feuilles peuvent dissuader les herbivores, protéger contre les agents pathogènes et augmenter la tolérance à la sécheresse. De plus, les interactions dans la zone de la phyllosphère déterminent dans quelle mesure les agents pathogènes humains sont capables de coloniser et de survivre sur les tissus végétaux, un domaine d'importance croissante avec l'augmentation des cas de maladies humaines associées à la consommation de salades fraîches, de fruits et de légumes (Whipps et al, 2008).

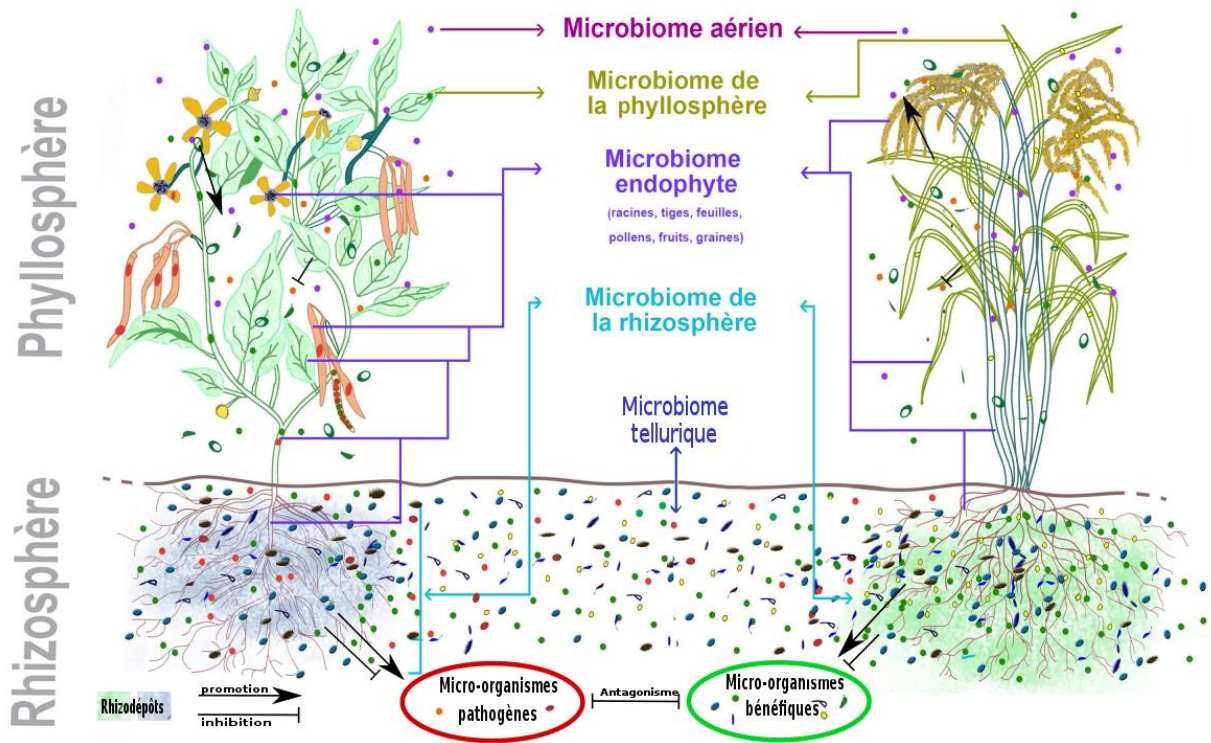


Figure 5. Schéma de la phyllosphère et de la rhizosphère (Lu, 2020).

2. 2 La flore phyllosphérique

Les communautés microbiennes de la phyllosphère sont diverses et abritent de nombreux genres de bactéries, de champignons filamenteux, de levures, d'algues et, dans certaines situations, de protozoaires et de nématodes. Les bactéries sont les colons les plus nombreux et les plus diversifiés avec un nombre de cellules cultivables variant entre 10² et 10¹² cellules par gramme.

Les levures sont le principal groupé de champignons épiphytes dans la phyllosphère avec des champignons filamenteux se produisant largement comme des spores dormantes plutôt que comme mycélium actif. La diversité des levures cultivables semble être principalement limitée aux genres *Cryptococcus*, *Sporobomomyces* et *Rhodotorula*, avec plusieurs espèces de chacune de chaque coexistant dans la phyllosphère, ainsi qu'un certain nombre d'autres genres qui se produisent moins fréquemment (Whipps et al, 2008).

2.3 La source de la flore phyllosphérique

Les sources de micro-organismes sur la phyllosphère peuvent être multiples. Les champignons filamenteux épiphytes, les levures et les bactéries peuvent arriver à travers des sources d'insectes, d'atmosphère, de semences ou même d'animaux. Les bourgeons d'arbres, les graines de plantes annuelles et les débris des cultures précédentes sont probablement les sources les plus importantes pour la colonisation de nouvelles plantes, car elles constituent une source majeure de bactéries déjà adaptées à la phyllosphère (Whipps et al, 2008).

La microflore phyllosphérique peut varier de la composition et de la concentration de manière diurne ainsi qu'en réponse aux événements environnementaux tels que les précipitations et le vent fort, influençant directement l'immigration des micro-organismes à la phyllosphère. La végétation locale et dans les zones de production des cultures, les pratiques agricoles telles que la récolte et la culture, influencent également la microbiologie phyllosphérique et la colonisation des usines voisines (Whipps et al, 2008).

2.4 Les stratégies d'adaptation microbiennes dans l'habitat phyllosphérique

Les espèces microbiennes qui colonisent la phyllosphère peuvent évoluer différemment les procédés d'adaptation aux différentes conditions environnementales.

2.4.1 Production des pigments

La plupart des bactéries qui colonisent la partie aérienne peuvent résister à des niveaux élevés des rayons UV, et sont plus tolérantes à celles qui produisent des pigments rouge ou rose. Ce sont des bactéries qui colonisent directement les zones riches en nutriments (Whipps et al, 2008).

2.4.2 Production des hormones

Certaines bactéries épiphytes produisent des hormones végétales phytohormones telles que l'indole-3-Acétique, pour faciliter l'assemblage des nutriments en adhérant à la paroi végétale (Lu, 2020; Whipps et al, 2008).

2.4.3 Production des toxines

Certaines bactéries produisent des toxines affectant le transport des ions à travers les membranes plasmidiques 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 subtils de transmission de leurs toxines à l'intérieur de la cellule végétale. Par exemple, le système de sécrétion de type 3 est une « machine nano-injectée toxines dans la cellule eucaryote au moyen d'une seringue moléculaire appelée aiguille T3SS ». Le système a été initialement créé par les bactéries de la phyllosphère infecte les cellules végétales après la formation du port de translocation. Cela permet aux protéines bactériennes d'être injectées dans le cytoplasme de la cellule (Whipps et al, 2008).

2.4.4 Production des différents polymères

Pour se fixer à la surface, les micro-organismes forment souvent des agrégats ou de biofilms en produisant des polymères qui leur permettent d'adhérer aux surfaces. Les exopolysaccharides protègent les communautés bactériennes de la dessiccation (Lu, 2020; Whipps et al, 2008).

2.4.5 Engagement des facteurs de virulence

Certaines bactéries possèdent dans leur structure des pilis et des flagelle, ce sont des facteurs de virulence utilisés dans la fixation à la surface et protègent les bactéries du stress hydrique modéré et du pH du milieu (Lu, 2020 ; Whipps et al, 2008)

2.4.6 Sporulation

Certaines bactéries sont capables de former des spores dans des conditions défavorables. C'est une structure protectrice au fil de temps. Les spores germent pour devenir des cellules végétatives actives lorsque les conditions deviennent mieux encore (Whipps et al, 2008).

2.5 Les principaux colonisateurs microbiens dans le phyllosphère des grappes de raisin de table

La microflore présente à la surface de la baie de raisin constitue une communauté complexe, composée d'une grande variété de moisissures, levures et bactéries. De nombreuses études ont permis d'identifier les différents intervenants de ce consortium microbiologique, et les facteurs qui peuvent l'influencer, et le mode de colonisation peut se faire soit à la surface de la plante « épiphyte », soit à l'intérieur « endophyte ».

Elles constituent une niche écologique pour des champignons saprophytes souvent retrouvées dans la baie des raisin *Alternaria alternata*, *Aerobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Diplodia spp.*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium laterium*, *Penicillium spp.*, *Phomopsis viticola*, *Rhizopus stolonifer*, *Ulocladium atrum* (Guilherme, 2012).

Les baies de raisin sont la source primaire de levures lors de la fermentation du moût. Dans différentes régions viticoles au monde, les travaux d'isolement et d'identifications des levures ont montré que les genres *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Torulasporea*, *Dekkera*, *Schizosaccharomyces* et *Sporidiobolus* sont les plus fréquemment retrouvées (Guilherme, 2012).

Les communautés bactériennes ont aussi fait l'objet de travaux récents, montrant la présence des genres *Sphingomonas*, *Hymenobacter* et *Methylobacterium* Ainsi que les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* (Guilherme, 2012).

*Partie 2 : Partie
expérimentale*

*Matériel et
méthodes*

I. Matériel et méthodes

1. Echantillonnage, prélèvement et stockage de grappe de raisin

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire (BMC) Chaab ersas, université de Frères Mentouri Constantine 1.

Les échantillons de la grappe de raisin de table ont été apportés au niveau d'un centre commercial Al Ritadj Ali Mendjli wilaya de Constantin Algérie. Le 17 avril 2022 à 10h, nous avons acheté 300 grammes de raisin au marchand de fruits une petite grappe qui constitue environ 20 baies de raisin.

Nous avons choisi pour notre recherche la variété (red glob), raisin rouge qui indique à des raisins pour la consommation fraîche et rosée.

1.1 Caractéristiques des fruits

1.1.1 Le grappe

Grande taille, compacité moyenne, forme uniforme, pédoncule long, homogène en couleur et taille des baies.

1.1.2 Baies

Comme son nom l'indique la red glob à des raisins de grande taille, de forme ellipsoïde, globuleuse, peau épaisse, et ferme couleur rouge violacé, très attrayante, pulpes charnues et de saveur fruitée.

1.2. Matériel et produits utilisés pour le prélèvement

Afin de réaliser un bon prélèvement des baies des raisins, nous avons pris avec nous une série d'outils sur le site d'échantillonnage le marché : Sacs de plastiques stériles et autoclavables (Whil Park), Marqueurs indélébiles permanents, Ruban adhésif.

1.3 Mode de prélèvement

Nous avons demandé au marchand de fruits de peser environ 300 grammes de raisin rouge, puis nous les avons mis dans les sacs plastiques et bien fermé avec un ruban adhésif pour protéger de toute influence extérieur (éviter l'entrée d'air et toute contamination), Le sac plastique est étiqueté par l'enregistrement de la date et le nom du prélèvement, puis nous l'avons transféré au laboratoire le même jour dans une glacière (Fig. 6).



Figure6. Échantillon de raisin de table cépage (Red Glob).

2 Préparation des milieux et des solutions pour l'isolement

2.1 Stérilisation

La stérilisation est une opération permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes portés par des milieux inertes contaminés ou des instruments, le résultat de cette opération ayant pour objectif le degré 0 en fin d'opération.

Dans le domaine de la microbiologie il est nécessité de stériliser tous les équipements et les instruments utiliser pendant la recherche scientifique et surtout les verreries pour éliminer tous les contaminants présents sur le matériel pour obtenir des résultats précis et corrects à la fin de travail par un appareil présente au toutes les laboratoires de la microbiologie autoclave. La

stérilisation se fait pendant 20 min à 120°C après nous les gardons dans du papier d'aluminium (Fig.7a et 7b).

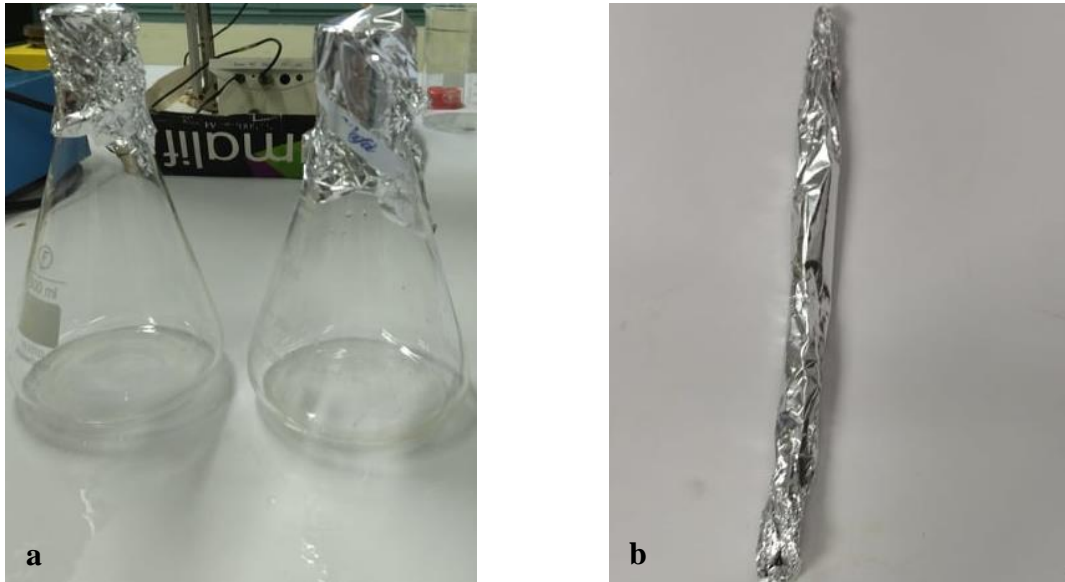


Figure 7. Equipement utilisé après la stérilisation.

2.2 Milieux de culture utilisés

Pour étudier les bactéries d'un échantillon précis dans notre cas les bactéries présentes dans une grappe de raisin de table nécessitent une étape connue sur le nom d'isolement qui permet de séparer les bactéries et d'obtenir des colonies différentes, espacées les unes des autres.

La préparation des milieux de culture non sélectifs (le bouillon nutritif et la gélose nutritive), et la préparation de la solution mère contenant les baies de raisin de table et la préparation des solutions diluées à partir de la solution mère. Ce sont des étapes préalables.

2.2.1 Préparation de l'eau physiologique pour les dilutions

Une solution physiologique est un liquide isotonique au sang, c'est-à-dire présentant la même osmolarité que les principaux fluides corporels, en particulier le sang. La solution est généralement composée d'eau distillée stérile et de chlorure de sodium (NaCl) utilisé pour les dilutions ou la réalisation de suspensions bactériennes.

2.2.1.1 Produits et méthode utilisée

On utilise dans cette préparation, 9g Chlorure de Sodium avec 1 L d'eau distillé stérile. Nous avons pesé 9g d NaCl pour 1 L d'eau distillée stérile puis mélangée et dissoute complètement à l'aide d'un agitateur pendant 30 min.

2.2.2 Préparation du bouillon nutritif (BN)

Le bouillon nutritif est un milieu liquide non sélectif à usage général utilisé pour la culture d'une grande variété de microorganismes fastidieux et non fastidieux dont les besoins nutritionnels sont inexistant. Le bouillon nutritif est utilisé comme milieu de pré-enrichissement lors de l'analyse la croissance bactérienne dans le bouillon nutritif est mise en évidence par l'obtention d'une turbidité résultant de la multiplication microbienne (Fig. 8).

2.2.2.1 Produits

On utilise pour cette préparation :

- Peptones 10g
- Extrait de bœuf 01g
- Extrait de levure 02g
- Chlorure de sodium 05g
- Eau distillée 01L



Figure 8. La préparation de bouillon nutritif.

2.2.2.2. Méthode

Nous avons pesé 13 à 15g de bouillon nutritif en poudre, une petite quantité d'eau distillée a été versée dans un erlenmeyer de 1000 ml, Mélanger et dissoudre complètement à l'aide d'un agitateur pendant 10 min puis compléter le mélange avec l'eau distillée jusqu'à 1L et mélanger pendant 1 heure. De plus nous avons pris 150 ml de quantité totale et versé dans un flacon de 250 ml et Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes (Fig. 9).



Figure9. L'agitation et la stérilisation du bouillon nutritif.

2.2.3 Gélose nutritive

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 exigeants. La GN est populaire par elle est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

2.3 Préparation de la suspension mère

Nous avons sélectionné de manière aléatoire 3 baies de raisins, ces derniers sont mis dans une fiole contenant 150 ml de bouillon nutritif stérile (BN) préalablement préparer et agiter pendant 1 heure à 150 tpm. Afin de mettre en évidence les bactéries qui se développent sur les tissus appelés bactéries épiphytes, et maximiser le nombre de bactéries potentiellement cultivables.

La suspension mère est utilisée pour le dénombrement de la flore totale qui est obtenue à partir d'un produit solide (baies de raisin) (Fig. 10).



Figure 10. La préparation de la suspension mère.

2.4 Préparation des dilutions

Les dilutions de l'échantillon sont préparées à partir de la suspension mère préalablement préparée et sont préparées dans l'eau physiologique.

À partir de la SM, on transfère 1ml à l'aide d'une pipette graduée stérile dans un tube à essai stérile contenant au préalable 9 ml de l'eau physiologique, cette dilution sera alors la dilution (10^{-1}) ; après agitation à l'aide d'un vortex, on introduit 1ml de la dilution (10^{-1}) dans un autre tube à essai stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant : cette dilution sera alors (10^{-2}) et on continue de la même manière jusqu'à la dilution (10^{-3}) (Fig. 11).

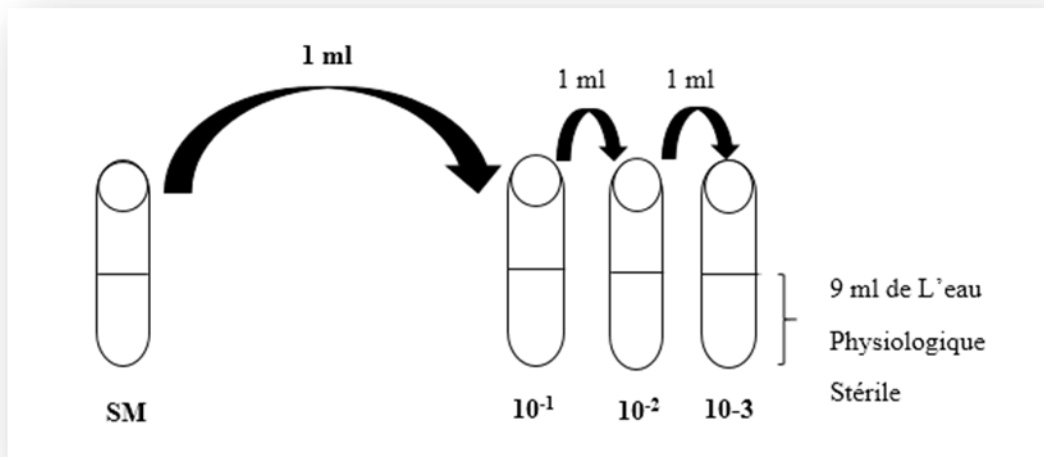


Figure 11. Préparation des dilutions décimales à partir de la solution mère (SM).

3. Isolement des bactéries à partir des baies de raisin de table

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

Comme nous l'avons dit plus tôt afin de pouvoir identifier une espèce bactérienne de façon convenable, il faut obtenir des colonies bien isolées.

3.1.1 Ensemencement

L'ensemencement est le fait d'introduire des micro-organismes (microbes, germes, bactéries) dans un bouillon de culture comme dans une boîte de Pétri qui contient d'un milieu favorable à sa multiplication à partir de chacune des dilutions décimales retenues (10^{-1} à 10^{-3}) ces dernières représentent l'inoculum.

L'opération est réalisée par la technique de l'inondation (Fig. 12), une quantité de $100\mu\text{l}$ de l'inoculum ont été déposés aseptiquement dans différentes boîtes de pétri stériles, ensuite à l'aide d'un râtelier stérile ensemencé en surface les boîtes de pétri contenant la GN préalablement coulée 3 répétitions sont réalisées pour chaque dilution.

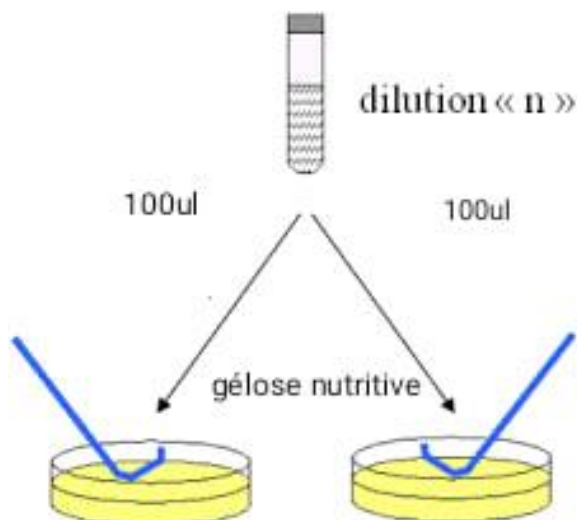


Figure12. Etapes d’ensemencement à partir des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-3}).

3.1.2 Incubation

Les boîtes sont mises à incuber à l’étuve pendant 3 jours à 30°C . Après cette période les boîtes sont observées.

3.2 Caractérisation morphologique des isolats

3.2.1 Observation macroscopique des colonies bactériennes

Afin d’identifier une souche microbienne l’examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l’isolement après l’incubation, c’est une étude morphologique à l’œil nu pour distinguer les caractéristiques des colonies qui sont apparus sur le milieu GN, 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

L’examen microscopique permet de faire une étude morphologique (la forme et la taille) et d’évaluer le mode de regroupement ainsi différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif et qui représenté par deux types de coloration une au bleu de méthylène et l’autre

une coloration de Gram par une utilisation d'un microscope optique (grossissement X 100), on ajoute une goutte d'huile d'immersion.

A. Coloration de Gram

La coloration de Gram est la coloration différentielle microbiologique la plus largement utilisée, publiée par Hans Christian Gram, elle permet de différencier les bactéries selon 2 principaux critères : leur forme et leur affinité pour les colorants, la coloration des bactéries révèle la morphologie globale des bactéries. Le principe de cette coloration est que les parois des bactéries à Gram négatif ont un taux élevé de lipides et une fine couche de peptidoglycane. L'alcool contenu dans le décolorant extrait le lipide, ce qui rend la paroi des bactéries à Gram négatif plus poreuse incapable de retenir la coloration, décolorant ainsi la bactérie. Le peptidoglycane plus épais et le degré de réticulation plus élevé piège le complexe violet-lugol, ce qui rend la paroi Gram positif moins sensible à la décoloration (Fig. 13).

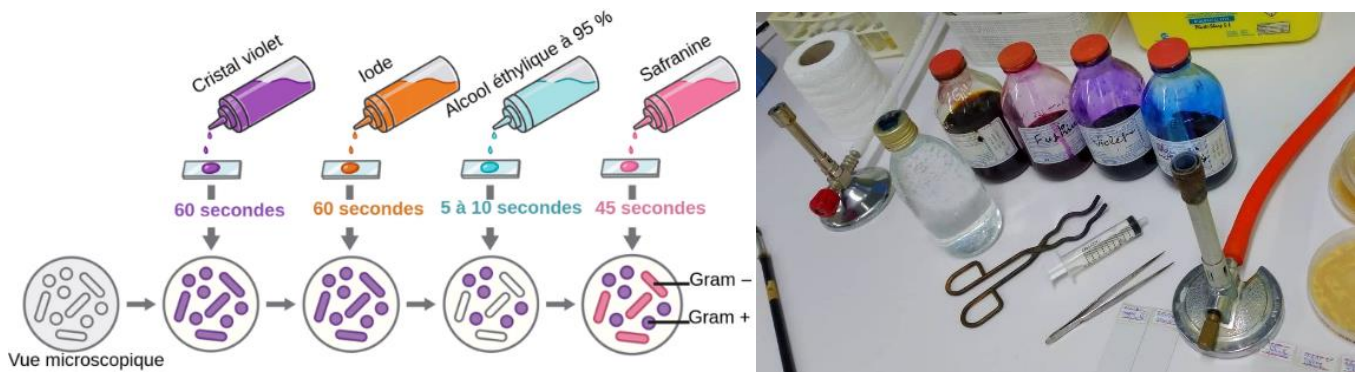


Figure13. Les étapes et les colorants utilisés dans la coloration de Gram (microbiologie clinique, 2021).

B. Coloration au bleu de méthylène

La coloration au bleu de méthylène est une coloration rapide, économique et d'usage courant, qui permet d'observer les bactéries, les champignons. Elle permet de renseigner sur : La forme des bactéries, la taille et le mode de regroupement.

1. Protocole de réalisation

Premièrement on commence par la préparation et la fixation d'un frottis sur une lame puis on coule du colorant de bleu de méthylène sur la lame et attendre pour 1min, rincer la lame par l'eau de robinet et sécher la lame doucement avec du papier ou à l'air libre enfin observer à l'objectif x100 par immersion dans une huile.

3.3 Isolement avec utilisation d'un antifongique

Un antifongique est un médicament indiqué dans le traitement des infections dues à une prolifération de champignons microscopiques aussi appelés mycoses, L'antifongique agit directement sur la paroi du champignon, ce qu'on appelle l'action fongicide. Il peut aussi bloquer la division cellulaire du champignon et empêcher ainsi sa reproduction.

Le but d'utilisation d'un antifongique dans notre recherche c'est améliorer la précision des résultats obtenus en ce qui concerne la flore microbienne (en particulier les bactéries) des baies de raisin de table par inhibition de croissance des champignons et les levures.

On utilise antifongique sous le nom Fluconazole qui est un médicament de forme comprimé nous fondons une capsule dans un 100 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une solution antifongique.

3.3.1 Ensemencement sur bouillon nutritif (BN)

8 tubes à essai est préparée 4 de ces tubes ne contient que le BN et les tubes restants contiennent le bouillon nutritif avec 1 ml d'antifongique.

Nous utilisant les solutions diluées précédant 10^{-1} jusqu'à 10^{-3} et la solution mère pour l'incubation, avec une micropipette on porte 1000 μ l dans chacun des tubes préparés et mélangés par un vortex puis incube à l'étuve pendant 48 h à 30°C.

3.3.2 Ensemencement sur gélose nutritive (GN)

L'opération est réalisée à partir des 8 tubes incubés précédents représente un trouble bien observé une quantité de 100 μ l de l'inoculum qui ensemencé en surface à l'aide d'une anse de platine stérile et par la méthode de trois cadrans dans les boîtes de pétri contenant la GN (Fig. 14), on incube les boîtes GN à l'étuve pendant 3 jours à 30°C.

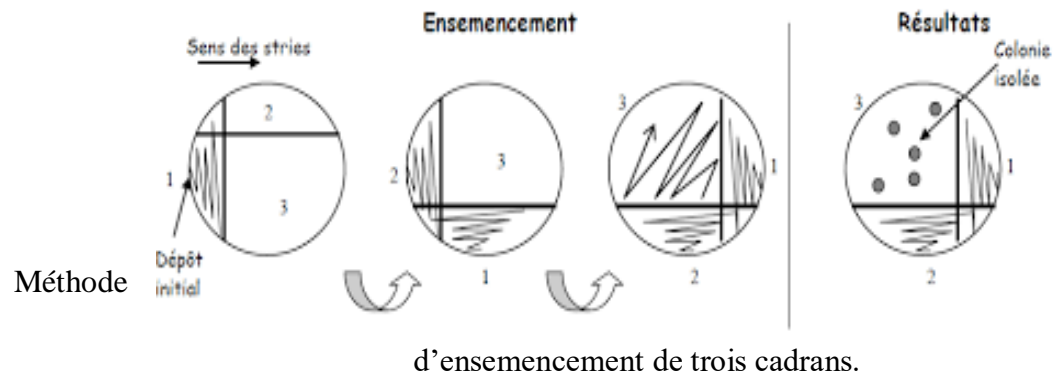


Figure14.

Résultats et Discussion

1. Isolement des microorganismes des baies de raisin sans utilisation d'un antifongique (ATF)

1.1 Mise en évidence d'une diversité bactérienne à la surface des baies de raisin de table

1.1.1 Observation d'un trouble (milieu liquide)

Une fois le temps imparti d'incubation écoulé pendant 3 jours à 30°C toute les échantillons (solution mère et dilution) qu'on a préparé à partir des baies de raisin de table montre la présence et la croissance des microorganismes à la surface de ces baies.

L'observation a l'œil nu de chacune des dilutions décimales (10^{-1} et 10^{-2}) incubées pendant 72 h montre que les deux tubes donnent un résultat positif (un trouble).

La dilution 10^{-3} donne un résultat négatif cela peut être dû à une diminution de la quantité de bactéries présentes dans cette échantillon (Tab. 2).

Tableau 2 : Croissance microbienne dans les dilutions décimales après 72h d'incubation.

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

La présence de trouble indique une croissance de différents types de microorganisme (Fig. 15).

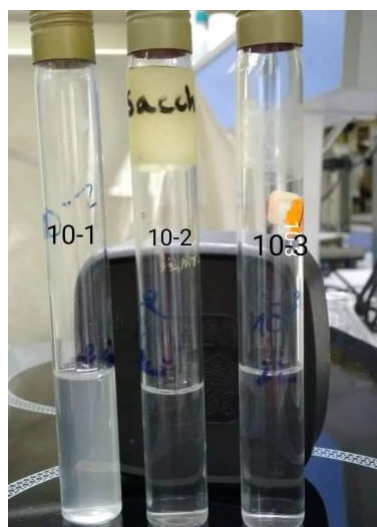


Figure 15. Trouble montré par les dilutions décimales après 72h d'incubation.

1.1.2 Observation des colonies (milieu solide).

Sur toutes les boîtes GN incubées à étuve pendant 3 jours à 30°C des nombreuses et différentes colonies microbiennes sont observées différentes en matière de taille et de forme et même de l'aspect certains sont séparés d'autres sont des amas structurés et donnent un tapis (Fig. 16).

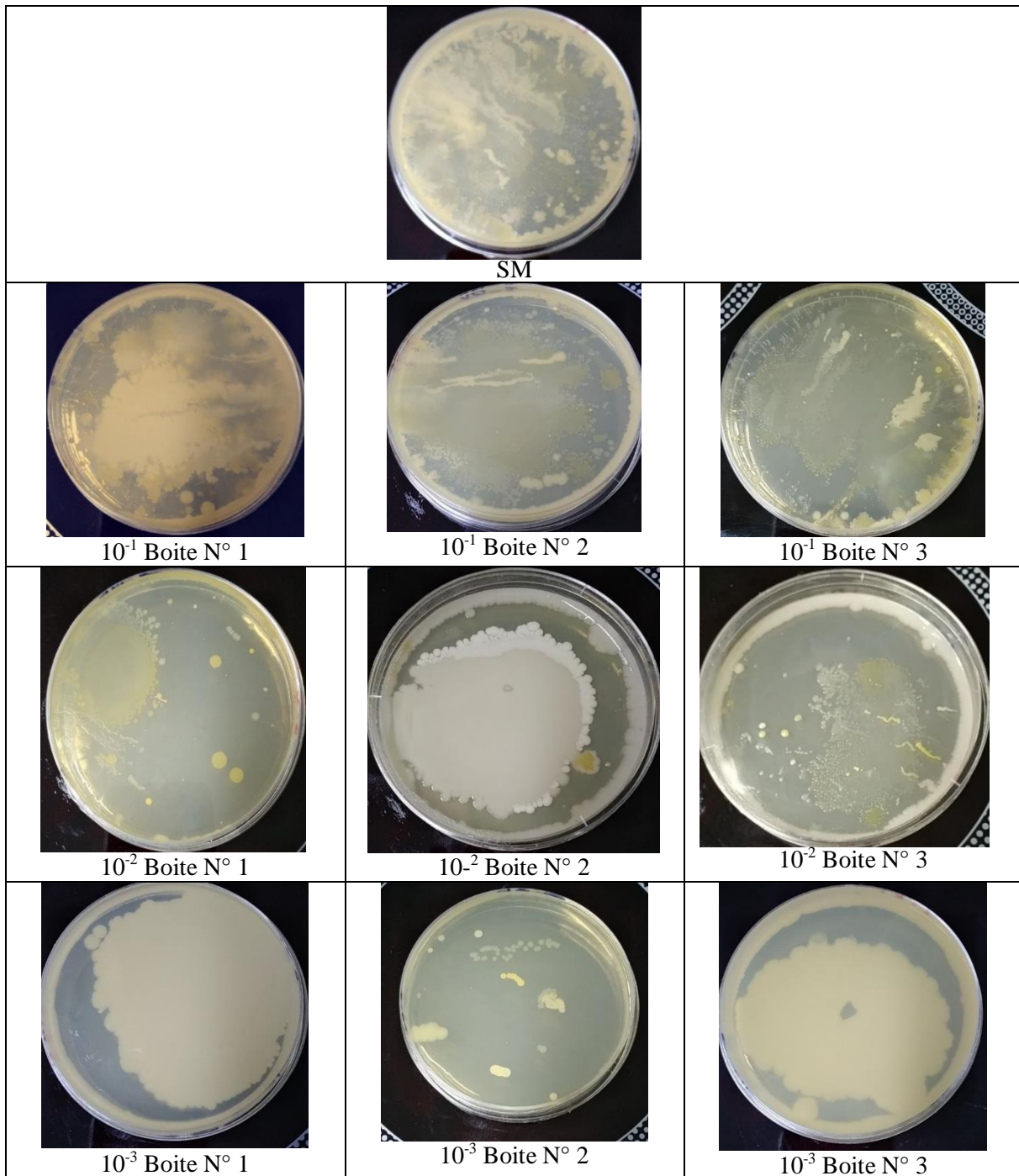


Figure 16. Résultats après 3 jours d'incubation de SM et les dilutions décimales.

1.2 Dénombrement des colonies

Qu'il s'agisse d'une suspension mère ou d'une série de dilutions, qui incube pendant 3 jours à 30°C sur GN, les résultats montrent plusieurs colonies ont mis en évidence l'énorme diversité microbienne à la surface des baies. Nous l'avons compté de façon générale. Le nombre de colonies. Après l'observation, il existe plusieurs types des colonies bien visibles et plus abondantes de couleurs et de formes différentes, et même en fonction de leur nombre. Des colonies (blanche petite, blanche grande transparente, jaune clair, jaune foncé et orange). Nous avons compté chacun individuellement sur 3 répétitions pour chacune des suspensions diluées (Tab. 3).

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
UFC	Tapie	Tapie	Tapie	Tapie	13	Tapie	50	Tapie	54	Tapie

1.3 Caractérisation morphologique des colonies obtenues

1.3.1 Caractères macroscopiques

Lorsqu'on a fait une observation macroscopique des boîtes gélosées incubées la couleur est la première caractéristique qui fait paraître l'œil nu grande diversité microbienne est remarquée à partir de cette différente colonie obtenues 6 colonies sont les plus visibles et les plus séparées ce qui nous a permis de les choisir pour une analyse macroscopique et microscopique ces colonies sont nommées par les lettres A, B, C, D, E, F.

En plus de caractère de couleur il y a d'autres caractères macroscopiques tels que (aspect de la surface, bordure, opacité, élévation de la Colonie, forme, structure, et la taille). La majorité

des colonies ont une forme circulaire élevée ou plane avec une consistance sèche ou crémeuse de petites ou grandes tailles (Tab. 4).

Tableau 4 : Aspect macroscopique des colonies isolées.

Colonies \ Critères	Couleur	Aspect	Bordure	Opacité	Élévation	Forme	Structure de la surface	Taille
Colonie A 10^{-1}	Blanche	Mate	Irrégulier	Opaque	Elevé	Circulaire	Rugueuse	Grande
Colonie B 10^{-3}	Blanche	Collant	Régulier	Translucide	Elevé	Circulaire	Lisse	Petite
Colonie C 10^{-3}	Transparent	Filamenteux	Arbrisseau	Translucide	Plane	Circulaire	Sèche	Moyenne
Colonie D 10^{-2}	Jaune claire	Collant	Régulier	Opaque	Elevé	Circulaire	Lisse	Grande
Colonie E 10^{-3}	Jaune foncé	Collant	Régulier	Opaque	Elevé	Circulaire	Lisse	Petite
Colonie F 10^{-2}	Orange	Collant	Régulier	Opaque	Elevé	Circulaire	Lisse	Petite

1.3.2 Caractérisation microscopique

Pour faire un examen microscopique des isolats présents dans différents échantillons, on a purifié d'abord les isolats et incubé dans un milieu gélosé 4 types des colonies qui ont choisi pour appliquer l'analyse montrant les différentes couleurs et tailles suivantes (blanche grande, blanche petite, jaune foncé et jaune clair) en plus de la différence en couleur, ces colonies montrent différents types morphologiques bactériens présents. On utilise deux types de coloration (coloration de Gram et coloration au bleu de méthylène).

- **Caractérisation des isolats après coloration de Gram :**

Les colonies (ABDE) qui ont subi une coloration de Gram obtenues à partir de la dilution 10^{-1} et 10^{-3} . L'isolat A et B est prélevé à partir d'une colonie Blanche de taille moyenne et l'autre de taille petite des dilutions 10^{-1} boîte de répétition numéro 2 l'isolat D et E est prélevé à partir d'une colonie jaune de dilution 10^{-3} boîte numéro 3.

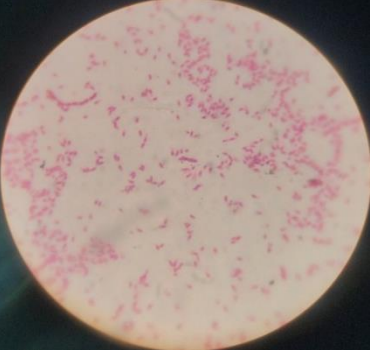
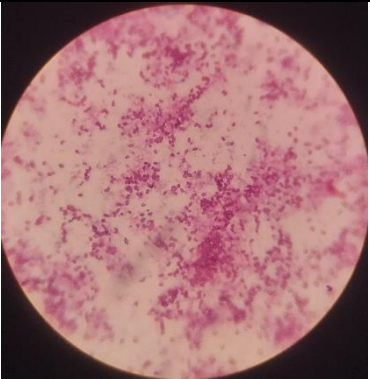
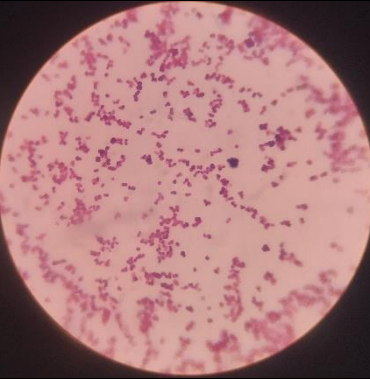
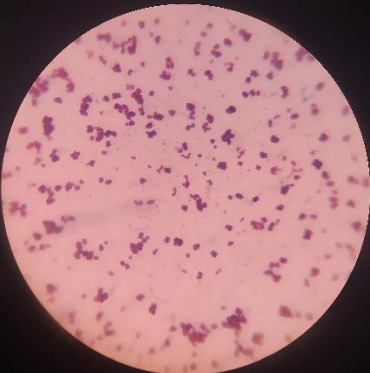
1. Isolats blanc (A et B)

Le résultat montre que l'isolat A est de forme bacille leur mode de regroupement un diplocoque, colorés en rose on peut dire que ces isolats sont de Gram négatif et l'isolat B est de forme bacille ces bacilles sont regroupés en paire diplobacilles coloré en rose et donc sont de Gram négatif.

2. Isolats jaune (D et E)

Les isolats D sont de forme cocci en amas coloré en violet cette couleur permet de déduire que ces isolats possèdent une couche épaisse de peptidoglycane dans la composition de la paroi cellulaire, donc sont de Gram positif et enfin le résultat montre que l'isolat E est de forme Cocci coloré en violet Gram positif (Tab. 5).

Tableau 5 : Récapitulatif des résultats de l'observation au microscope optique x100 après une coloration de Gram des différentes colonies.


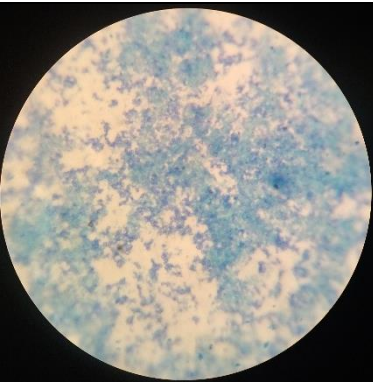
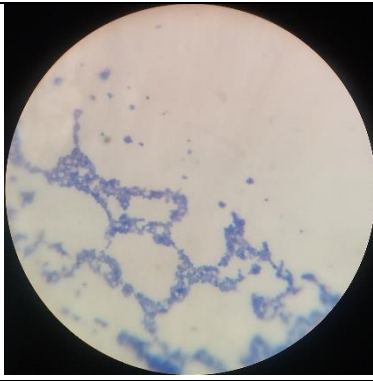

<p>Isolat A : Colonie blanche grande de la dilution 10^{-1}</p>		<p>Observation microscopique : Gram négatif, Bacille, regroupés en paire diplobacilles</p>
<p>Isolat B : Colonie blanche petite de la dilution 10^{-3}</p>		<p>Observation microscopique : Gram négatif, Coccobacilles, regroupés en diplocoque</p>
<p>Isolat D : Colonie jaune clair 10^{-2}</p>		<p>Observation microscopique : Gram positif, Cocci</p>
<p>Isolat E : Colonie jaune foncé 10^{-3}</p>		<p>Observation microscopique : Gram positif, forme Cocci en amas</p>

- **Caractérisation des isolats après coloration au bleu de méthylène**

Dans cette coloration les colonies (ABDE) sont obtenues des mêmes dilutions décimales dans la coloration de Gram 10^{-1} boîte numéro 2 et 10^{-3} boîtes numéro 3.

Isolat blanc A et B sont successivement des formes bacilles et des coccobacilles comme la montre (tableau) et les isolats jaunes E et D sont des coques groupées en amas et des cocci. Les résultats obtenus confirmer les différentes formes et mode de regroupement correspondant dans les résultats de première coloration (Tab. 6).

Tableau 6 : Récapitulatif des résultats de l'observation au microscope optique x100 après coloration au bleu de méthylène des différentes colonies.

<p>Isolat A : Colonie blanche grande de la dilution 10^{-1}</p>		<p>Observation microscopique : Bacilles</p>
<p>Isolat B : Colonie blanche petite de la dilution 10^{-3}</p>		<p>Observation microscopique : Coccobacilles</p>
<p>Isolat D : Colonie jaune clair 10^{-2}</p>		<p>Observation microscopique : Coque</p>
<p>Isolat E : Colonie jaune foncé 10^{-3}</p>		<p>Observation microscopique : Cocci en amas</p>

- **Affiliation des bactéries estimée en genre**

L'identification phénotypique Microscopique et macroscopique permet de penser que les coccobacilles et les bacilles Gram négatif peuvent être des Entérobactéries, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, les coques groupées en amas et les Cocci Gram positif peuvent être des *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Microcoques*.

2. Isolement des microorganismes des baies de raisin avec utilisation D'un antifongique (ATF)

2.1 Croissance sur le bouillon nutritif (BN) milieu liquide

Après incubation des 8 tubes de chacune de la solution mère et les dilutions décimales à étuve pendant 72 h à 30°C toute les tubes quelques soit en présence ou en absence de l'antifongique ont montré un résultat positif un trouble donc une croissance bactérienne (Tab. 7).

En fonction d'un témoin qui représente un tube Contenir bouillon nutritif stérile et vide des germes (Fig. 17).

Tableau 7 : Croissance microbienne sur bouillon nutritif.

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

(+) : Présence de trouble



Figure 17. Trouble observé dans les tubes BN 10^{-1} avec et sans ATF.

2.2 Croissance sur gélose nutritive (GN) milieu solide

Les tubes ensuite mise sur la gélose nutritive et incubé pendant 48 h à 30°C . Différentes colonies bactériennes obtenues dans le cas des tubes en présence ou en absence de l'antifongique ce qui explique que dans la surface des baies de raisin il y a une biodiversité bactérienne cultivable (Fig. 18).

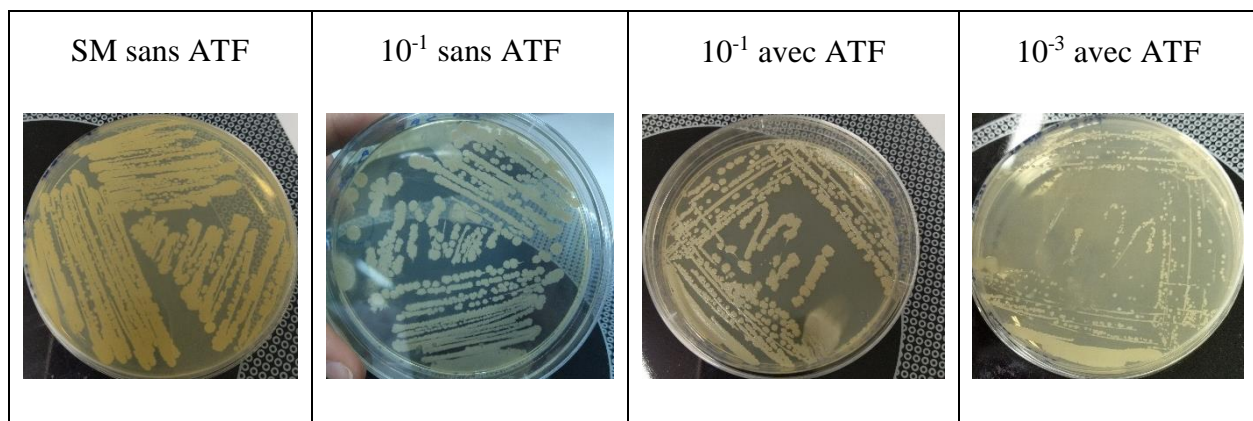


Figure 18. Colonies bactériennes observées avec et sans utilisation d'ATF.

Discussion
Générale

Discussion

Au terme de cette étude sur la communauté microbienne de la phyllosphère des baies de raisin de table à partir de plusieurs analyses microscopiques et macroscopiques et observations à l'œil nu, les résultats montrent que la baie de raisin est un écosystème formidable pour un énorme nombre de bactéries.

Cette étude vise à identifier le plus grand nombre possible de ces colonies bactériennes en connaissant leurs propres caractéristiques phénotypiques et particulièrement la morphologie après isolement et incubation des échantillons de raisin.

Nous avons choisi la variété « Red Globe » que nous avons achetée à partir du marché aux fruits. Après la mise en suspension des microorganismes se trouvant sur la surface du fruit et la réalisation des différentes dilutions, nous avons observé la présence d'un trouble dans les tubes 10^{-1} et 10^{-2} et absence dans le tube 10^{-3} . Ceci après une incubation qui a duré 3 jours à une température de 30°C . Le trouble est un signe de croissance des germes.

A partir des tubes positifs, nous avonsensemencé les différents isolats dans des boîtes de Pétri contenant de la GN pendant 3 jours pour donner la chance à un plus grand nombre de micro-organismes de se développer. A la fin de la période d'incubation nous avons effectué des observations macroscopiques et microscopiques.

L'examen macroscopique nous a permis de distinguer les différentes morphologies et formes des colonies. Alors que le microscopique nous informe sur le mode de regroupement et la forme des microorganismes obtenus.

Après le temps d'incubation, différentes colonies sont apparues sur la GN et l'analyse basée sur des critères phénotypiques et morphologiques (couleur, forme, aspect...) nous a permis d'enregistrer les observations qui se résume en ce qui suis : pour les dilutions $10^{-2}/10^{-3}$ une charge microbienne de 6 colonies avec des couleurs différentes (grande blanche, petit blanche, transparente, jaune clair, jaune foncé et orangé).

Et pour plus de précision en termes d'identification, nous avons entamé des observations microscopiques de 4 colonies. Ces dernières sont choisies par rapport à leur disposition sur les boites de Pétrie. Les colonies prises en considération dans notre étude sont : les colonies grandes

et petites blanches, la jaune clair et le jaune foncé. L'observation est réalisée en utilisant deux techniques de coloration différentes. La première coloration est celle du Gram et la deuxième coloration est une coloration simple au bleu de méthylène (Delarras, 2007). Les résultats montrent la présence de bactéries en forme coccobacilles et des bacilles Gram négatif et des coques Gram positif, et que nous avons confirmé par la coloration avec le bleu de méthylène.

Sur la base de ces études et résultats, nous avons formulés des hypothèses sur les types de bactéries colonisant la surface des baies qui sont : *Entérobactéries*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* connus par leur forme de bacilles et leur Gram négatif. *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* connus par leur forme de coque et leur Gram positif.

Nous avons confronté nos résultats avec une autre étude réalisée en 2021 sur la phyllosphère du raisin non mûr cueilli de la vigne, dont le titre est : (caractérisation de la flore phyllosphérique du fruit de la vigne). Il ressort que nous sommes arrivés à des résultats similaires dans la population bactérienne (Tab.8).

Tableau08 : La comparaison des résultats d'études phyllosphérique des raisins de table et des raisins immatures.

Comparaison	Grappe de raisin mur	Grappe de raisin non mur
Nombre des colonies	+300	617
Nombre des isolats à analyser selon la couleur	4	2
Les couleurs les plus abondants	Blanche grande, Blanche petite, jaune foncé, jaune claire, transparente et orange	Blanche, jaune, orange et noir
Croissance dans un bouillon nutritif avec ATF	Trouble	Trouble
Croissance dans un bouillon nutritif sans ATF	Trouble	Trouble
La forme des colonies les plus abondants avec leur Gram	Cocci Gram+ Bacille Gram- Coccobacilles Gram-	Cocci Gram+ Bacille Gram- Coccobacilles Gram-
Espèce type bactériens obtenus	<i>Entérobactéries</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Micrococcus</i>	Bactérie lactique Bactérie acétique

L'écosystème des baies de raisin contient un certain nombre de microorganismes (levures, champignons, bactéries...), partageant ainsi la même source de nutriment. L'utilisation d'un antifongique (ATF) a permis l'augmentation de la probabilité de trouver plus d'espèces bactériennes. Il ressort que les deux ensemencements avec ou sans ATF donnent un résultat positif. Croissance de colonies blanche majoritairement.

L'identification des espèces bactériennes présentes à la surface des baies de raisin de table par une analyse classique nécessite une autre approche plus poussée en utilisant des techniques comme celles qui appliquent les méthodes de la biologie moléculaire et le génie génétique.

Conclusion

Bien que l'analyse et l'identification de la diversité des bactéries associées à la surface du raisin en soit encore à ses débuts, il ressort clairement des travaux réalisés jusqu'à présent que la baie de raisin héberge un écosystème microbien riche et complexe.

Notre expérimentation avait pour but la mise en évidence de la diversité des micro-organismes de la flore phyllosphérique associée à la plante en général et l'identification des bactéries associées à la surface des baies de raisin en particulier.

Nos résultats ont montré qu'il y avait une diversité bactérienne plus ou moins importante. Nous avons pu identifier des isolats bactériens à différents morphotypes où les souches présentaient les deux types de Gram (positif et négatif) dont les cellules étaient pour la majorité en forme de bacille et cocci. Ces résultats sont également cohérents avec les autres travaux précédemment publiés sur les études viticoles où l'écologie microbienne de la phyllosphère de raisin a été évaluée et ceux de l'année dernière. Plus de 300 isolats représentant des bactéries appartenant à 6 genres entre espèces à Gram négatif et Gram positif.

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 baies de raisin. Ce qui nous permet de conclure que les raisins ont une écologie microbienne complexe comprenant des champignons, des levures et des bactéries avec des caractéristiques physiologiques diverses (Barata, 2011).

Les bactéries épiphytes sur les baies de raisin jouent un rôle critique dans la santé et la qualité du raisin, qui influencent de manière décisive le processus de la vinification. Malgré leur importance, les bactéries liées à la surface des baies de raisin restent peu étudiées et la plupart des travaux antérieurs étaient basés sur des méthodes dépendantes de la culture, qui offrent une vision limitée de la diversité réelle (Albert et al, 2015).

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

Agouazi, (2013). Contribution à la caractérisation physico-chimique de cépages de *Vitis vinifera* ssp *vinifera* autochtones d'Algérie. Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Sciences Agronomiques p : 1

Aigrain, P. (2003). Note de conjoncture mondiale. Bulletin de l'O.I.V., 867-868, p.424-454

Albert B, Maria P, Judit F, Isabel A, Cristina R, (2015). Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain), 2016 Feb 16; 219:56-63.

Aldebert, P. 1959. Le vignoble algérien. Bulletin Technique d'information des ingénieurs des Services agricoles, 142, 9 p.

Allouani, (2011). Contribution à l'étude des causes de la disparition du patrimoine végétal local à travers la viticulture. Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de master. Tlemcen, P39-50.

Anonyme, 2007. Production mondiale de raisin et de vin, FAO, Rome

Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V, (2011). The microbial ecology of wine grape berries. 2012 Feb 15 ; 153(3) :243-59.

Basler, A. (2000). L'environnement international pour le développement de L'arboriculture et la viticulture en Algérie. Deutsche Gesellschaft Technische Zusammenarbeit, p 70.

Bertrand, (2016). Approche éco-anatomique du bois de vigne (*Vitis vinifera*) 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.

Boudjellal, 1972. La conversion reconstitution du vignoble algérien. C.I.H.E.A.M. Option Méditerranéennes.

Bretonneau, (1988). Atlas d'arboriculture fruitière. Paris : J-B. Baillière.

Bureau, (2016). Microbiote et plantes (Partie 1) : introduction et application pratique aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Phytothérapie 14, 370–375.

<https://doi.org/10.1007/s10298-016-1082-z>

- Crespy, (1987).** Viticulture d'aujourd'hui. Paris : J-B Baillière Lavoisier
- Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire. Tec et Doc. France.
- Deveau, o. Martin, F.** Microbiote : les plantes aussi ! [en ligne]. (Page consulté le 26-06-2016).
https://www.pourlascience.fr/sd/biologie-vegetale/microbiote-les-plantes-aussinbsp9337.php?fbclid=IwAR1eiF_siQnBQaD9ycPfsfoJLPRm9hjHYb2cyRsXqO06bYtIIVjYSpJJ0
- Dubois et Deshaies, (1997).** Guides de vignobles du Québec : sur la route des vins les presses de l'université Laval. (QC) P297.
- Enjalbert, (1975).** Histoire de la vigne et du vin, l'avènement de la qualité, Bordas.Feuilles) [en ligne]. (Page consulté le 03-02-2020).
« <https://www.verdeterreprod.fr/la-phylosphere-interractions-plantes-microorganismes-a-lasurface-des-feuilles/>»
- Galet, (1971).** Précis de viticulture. ED Paul Dhan, Montpellier. Paris, P19_63.
- Galet, (1988).** Précis d'ampélographie pratique. Impression, Montpellier.
- Galet, (2000).**Dictionnaires encyclopédiques des cépages, Paris Hachette.
- Galet, (2000).** Précis de viticulture. Édit Broché, 7^{ème} édition, Paris Hachette.
- Galet, P. (1993).** Précis de viticulture 6^{ème} Ed. Déhan, Montpellier
- Galet, P. (1998).** Précis d'ampélographie pratique. Saint Jean de Vedas : Imprimerie JF Impression.
- Galet, P. M1970.** Précis de Viticulture. Ed., PAUL DEHAN, Montpellier, paris
- Guilherme, M. (2012)** Communautés microbiennes de la baie de raisin : incidence des facteurs Biotiques et abiotiques. Thèse pour le doctorat Sciences, Technologie, Santé. France : Université Bordeaux 2.
https://www.researchgate.net/publication/306199887_Communautes_microbiennes_de_la_baie_de_raisin_incidence_des_facteurs_biotiques_et_abiotiques

- Hélène, (2005).** Produits du terroir méditerranéen[En ligne].«<https://www.abhatoo.net.ma/content/download/18307/328352/Version/2/fille/produits.du.terroir.mediterraneen.>» PDF.
- Hidalgo, (2010).** Taille de la vigne. Mundi, Prensa, Madrid.
- Huglin et Schneider, (1998).** Biologie et écologie de la vigne, Tec et Doc, Paris.
- Huglin, (1986).** Biologie et écologie de la vigne. Payot Lausanne, P369.
- Isnard, H. 1951.** La vigne en Algérie, étude géographique. Tome 1 Ophysgop
- Joly, (2005).** Génétique moléculaire de la floraison de la vigne. Thèse doctorat, université Louis Pasteur Strasbourg, P109.
- Lambais, M.R., Crowley, D.E., Cury, J.C., Bull, R.C. and Rodrigues, R.R. (2006).** Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. Science 312, 1917
- Lekhrif, (2011).** Magistère : Contribution à la caractérisation de la diversité variétale des vignes la cales par la mise au point d'un modèle bio-informatique et statistique à base de données ampélographique, P2.
- 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-phylosphere-interractions-plantes-microorgnismes-a-lasurface-des-feuilles/>»
- Mahboub, (2017).** Contribution à l'étude des maladies de quelque variété de la vigne dans la région de Tlemcen. Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de master en agronomie.
- Mazouzi et Salem, (2019).** Préparation d'une base de données moléculaire pour la vigne algérienne (vitis vinifera. L) par apport à la vigne magrébine. Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de master. Biskra, P5.
- 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.

O.I.V. 2010. Statistiques de viticulture mondiale

Parker,R. (2021). Climat pour le vin [en ligne]. (Page consulté le 04-08-2021). <https://www.oenologie.fr/climat-pour-le-vin/amp> »

Parker,R. (2021). Climat pour le vin [en ligne]. (Page consulté le 04-08-2021). « <https://www.oenologie.fr/climat-pour-le-vin/amp> »

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> »

Reynier, (2007). Manuel de viticulture, édit Lavoisier, Tec et Doc, P529.

Reynier, 2003. Manuel de viticulture. 9e Édition. J.L Bailliere. Paris. Microbiologie clinique(2021), coloration de gram [en ligne]. (Page consulté en 2021). <https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Gram.html>

Reynier, A. (1991). Manuel de viticulture technique et documentation. Eds. J.B Bailliére. Paris 6 éme Edition,Paris

Ribiereau, Gayon et Peynaud, (1971). Science et technique de la vigne. Dunod, Paris.

Simon, J.L., Eggenberger, W., Koblet, W., Mischler, M., Schwarzenbach, J. (1992). Viticulture. Ed. Payot, Lausanne/Paris.

Toumi, (2006). Evaluation de l'état nutritionnelle du vignoble de table. Thèse : sciences agronomiques. Institut National Agronomique El Harrach Alger, P19.

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.

Zhang J, Wang ET, Singh RP, Guo C, Shang Y, Chen et Liu C, (2018). Grape berry surface bacterial microbiome: impact from the varieties and clones in the same vineyard from central China. The Society for applied Microbiology; 126(1): 204-214.doi: 10.1111/jam.14124. Epub 2018 Oct 29.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30288862/>.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BOUSSADIA Hounaida
BOUDRAA NOURI Hounaida

Contribution à la caractérisation de la phyllosphère des grappes de raisin de table (Etude comparative)

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

Le but de cette étude est de caractériser, d'isoler et d'identifier la flore phyllosphérique présente sur la surface des baies de raisin de table, en particulier la population bactérienne. Les échantillons de la variété « Red Globe » de la vigne (*Vitis vinifera*) proviennent d'un marché situé dans la willaya de Constantine.

Les techniques de caractérisation et d'identification utilisées sont basées sur une analyse phénotypique, cette identification s'appuie initialement sur des tests morphologiques et microbiologiques basés sur l'observation des colonies à l'œil nu et les tests d'orientation tels que : la coloration de Gram et la coloration au bleu de méthylène.

Les résultats de cette caractérisation phénotypique ont pu montrer l'existence sur les baies de raisin, d'une diversité microbienne en général et bactérienne en particulier, principalement après l'utilisation d'un antifongique, qui nous a permis de mettre en évidence les genres bactériens : *Entérobactéries*, *Staphylocoques*, *Micrococcus*.

En comparant ces résultats avec d'autres études sur les raisins récoltés à partir de la vigne, nous avons constaté des similitudes dans la population de bactéries.

Ce travail de recherche a révélé l'existence d'une assez grande diversité de la flore bactérienne de la grappe de raisin et devrait être confirmé par des techniques plus poussées comme celles s'appuyant sur la biologie moléculaire.

Mots-clefs : Bactéries, Identification, Baies, flore phyllosphérique, caractérisation phénotypique

Laboratoires de recherche : biologie moléculaire et cellulaire

Encadreur :	Mr. BENHIZIA Yacine	professeur - UFMC 1.
Examineur 1 :	Mme. DEKKICHE Samia	MCB –U. Hadj Lakhdar. Batna 2.
Examineur 2 :	Mr. CHABI Rabeh	MAA-U. Frères Mentouri Constantine 1.