REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

En Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Ecologie et Protection de l'Environnement

Thème :

Etude des composants de la phyllosphère du Pistachier lentisque (*Pistacia Lentiscus L 1753.)* tout au long d'un gradient d'élévation croissant à Médéa.

Par :

BETTAOULA Aicha
KOUIDRI Yasmine

Soutenue publiquement le 20/06 /2017, Devant le jury composé de :

M. CHABAANI	MAA,U.Médéa	Président
M. RAHAL	MAA,U.Médéa	Examinateur
M.LICIR	MAA,U.Médéa	Examinateur
H.MOSTEFAOUI	MCB,U.Médéa	Promotrice
Y.AIT OUAMER	Doctorante,U.Djelfa	Co-Promotrice

Médéa, 2016/2017

Remercîment

Avant tout, nous remercions DIEU qui a illuminé notre chemin et qui nous armés de courage pour achever nos études.

Nous tenons à remercier particulièrement Madame Ait Oaumer, et Madame Mestefaoui pour leur soutien et aide durant toute l'année. Pour leur patience, rigueur et disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Notre gratitude s'adresse également à notre Doyen Professeur Oumouna .M ainsi que tous nos enseignants sans exception qui nous ont guidés durant tout le cursus et en particulier Mr Belhadj, Mr CHAOUACHE A., Mme KHOUDIR S. et Mme CHAEOUATI Karima.

On tient tout aussi à remercier La Conservation des Forêts de Médéa, La subdivision de Berrouaghia et Ouezra. Ainsi que Mr Le Directeur de L'ANRH de Médéa pour leurs précieuses aide pendant la réalisation de notre projet de fin d'étude.

Nous remercions vivement Mr. ACHEK.R, de nous avoir permis de réaliser certaines expériences de cette étude avec ces propres moyens et pour son aide pratique car sans son apport et son aide ça n'aurai pas pu être possible.

Nous remercions également tous les membres du laboratoire de Biologie l'université DR YAHYA FARES à Médéa, pour leurs enthousiasmes, leurs aides et leurs conseils.

Nos remerciements vous également, Mesdames et Messieurs les membres du jury, qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger notre modeste travail.

Nous tenons à leur témoigner notre profonde gratitude, qu'ils soient assurés de notre parfaite considération.

Melle :BETAOULA Aicha.

Melle :KOUIDRI Yasmine.

Dédicace

A Dieu le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné durant toutes ces années d'études.

A mes très chers parents, en témoignage de leur amour, leur confiance et compréhension et leurs soutiens toute au long de ma vie et sans eux je ne serais jamais arrivée â ce niveau.

A mon oncle Ben souna et ma tante Naima, aucune dédicace ne saurait vous exprimer la profondeur de mes sentiments, Je veux vous remercier pour les plus belles années de ma vie. Que dieu vous protège et vous garde pour nous.

A mes très chères sœurs Wahilba, Houda, Fatima al zahra, mon neveu Abd el moneim et mon beau frère Mhamed.

A ma très chère cousine Ilhem, a mes chères cousines Ahlem, Zohra, Khadidja, et qui m'ont aidé tout le temps par leurs conseils précieux et toutes les conditions morales pour tous qu'ils ont fait pour moi, je vous aime beaucoup.

A mon cher oncle Djilali, sans oublié ma grand-mère Barkahom, Que dieu leur procure bonne santé et longue vie. Mon grand-pére Abd Elkader que Dieu bénisse son âme, Je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

A mes oncles tantes, cousins et cousines, vous avez de près ou de loin contribué à ma formation.

A ma binôme et amie Yasmine avec qui j'ai partagé des moments de joie,de pleurs, de fatigue ,avec qui j'ai vécu ,et passé l'un des plus beaux moments .

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude Mariem, Hanan, Amel, Malak, Amina, et Asma.

A toute ma promotion de master Ecologie et protection de l'environnement, DUF Médéa.

A mon pays.

BETTAOULA Aicha

Dédicace

Je remercie dieu tout puissant de m'avoir donné la force et le courage de finir ce modeste travail que je dédie tout particulièrement à mes très chers parents qui ont toujours été la pour moi ,pour l'éducation qui m'ont prodigué ,et pour le sens du devoir qu'ils mon enseigné depuis mon enfance.

A mes deux sœurs chéries Leila et Imane que j'aime plus que tout au monde et qui sans elles je ne pourrais avancer ,sans oublier mes deux splendides petites nièces Sara Lina et Narimene Meriem ,ainsi a mon beau frère mohamed .

A tout membre de ma famille ,grand et petit et une grande pensé a la mémoire de ma très chère tante Zoulikha et que dieu l'accueille dans son vaste paradis .

A mes professeurs: madame Ait ouamer Y,monsieur Belhadj H ,Mr Oumouna M ,Mr Chaouche A,Mme Mestefaoui H ,Mme Khoudir S

A ma binôme et amie Aicha avec qui j'ai partagé des moments de joie, de pleurs, de fatigue ,avec qui j'ai vécu ,et passé l'un des plus beaux moments .

A mes amis : Yousra, Nawel,Asma,Hanaa, Baya, a tout les membre du club Al-Hayet et a tout mes camarades de la faculté des sciences .

Et a la fin que tout personne m'ayant aidé de prés ou de loin trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Melle: Kouidri Yasmine

La liste des abréviations

- ACP : analyse en composantes principales.
- AND: acide désoxyribonucléique.
- ANOVA : analyse de la variance.
- API: Analytical Profile Index.
- ARNr 16S: Acide ribonucléique ribosomique de petite sous unité des ribosomes.
- B1 **:** Bactéries de la face supérieure**.**
- B2 **:** Bactéries de la face inferieure.
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.
- CBOL: le consortium international Barcode of Life.
- COX1 : gène du cytochrome oxydase 1
- EPS : Polysaccarides extracellulaire
- IAA : Indole-3-acétique.
- iBOL : le projet international Barcode of Life.
- IND: Indole.
- ITS :internal transcribedspacer.
- GN : Gélose nutritif.
- HSPs: High-scoring Segment Pair.
- LOOP-3D: Learning, Observing and Outputting Protein Patterns.
- MSP : Maximal Segment Pair.
- NCBI : Centre National pour l'Information Biotechnologique.
- Nit1: nitrate réductase.
- Nit 2: nitrate non réductase.
- ONM : Office National de Météorologique.
- ORF: Open Reading Frame = cadre de lecture ouvert.
- OTUs: unité taxonomique opérationnelle.
- PCR : Polymerase Chain Reaction.
- SF **:** Surface foliaire**.**
- TDA: le tryptophane désaminase.
- UV : Ultra Violet.
- VOCs : composants organiques volatils.
- VPI : réactif de Voges Proskauer1.
- VPII : réactif de Voges Proskauer2.

Liste des figures

Figure 01: Généralité sur les échanges histologique et biochimique de la phyllosphére.

Figure 02 :Photo du *Pistacia lentiscus L.*

Figure 03: Feuilles et fruits de *Pistacia Lentiscus L*

Figure 04 : *Pistacia lentiscus L.*

Figure 05 : Les feuilles de *Pistacia lentiscus L.*

Figure 06 : Aire de répartition du *Pistacia lentiscus* dans le bassin Méditerranéenne. (Alyafi, 1979).

Figure 07: Aire de répartition du Pistacia lentiscus en Algérie (Quezel, 1962- 1963).

Figure 08: Exigence pédoclimatique du Pistacia lentiscus (TELA BOTANICA, 2014).

Figure 09: Carte géographique de la wilaya de Médéa avec les stations d'études. (MapInfo).

Figure 10: Image satellitaires des zones d'études. (Google earh, 2017).

Figure 11 : Photos des arbres d'échantillonnage de la station d'Oued Harbil.

Figure 12 : Photos des arbres d'échantillonnage de la station EL Hamdania.

Figure 13 : Photos des arbres d'échantillonnage de la station de Berrouaghia.

Figure 14 : Photos des arbres d'échantillonnage de la station de Tamezghida.

Figure 15 : les surfaces foliaires des feuilles des quatre stations d'étude.

Figure 16 : Moyenne mensuelle des températures maximales des quatre stations d'étude.

Figure 17 : Moyenne mensuelle des températures minimales des quatre stations d'étude.

Figure 18 : Moyenne mensuelle des températures moyennes des quatre stations d'étude.

Figure19 : Moyennes mensuelle des précipitations des quatre stations d'étude.

Figure 20: Moyennes mensuelles du taux d'humidité relative.

Figure 21 : Moyennes mensuelles de la vitesse des vents.

Figure 22: Moyennes mensuelles de nombre de jours de gelées.

Figure 23 : diagrammes ombrothermique des quatre stations d'étude.

Figure 24 : Climagramme du quotient pluviothermique d'Emberger.

Figure 25 : Dogme central de la biologie moléculaire énoncé par Francis Crick en 1958.

Figure 26 : Illustration du barcoding gap et du chevauchement. En bleu sont les comparaisons intraspécifique de séquences du marqueur utilisé et en orange les comparaisons interspécifiques.

Figure 27: Schéma de l'opéron ribosomal de l'ADN nucléaire des champignons. Le 18S, le 5.8S et le 28S sont des zones très conservées, alors que l'ITS1 et l'ITS2 sont très variables d'une espèce à l'autre, ce qui en fait une cible de choix pour le barcoding.

Figure 28 : traitement des échantillons pour le séquençage.

Figure 29: carte représentatives des sites d'étude et leurs altitudes.

Figure 30: Nombre de bactéries des quatre stations en fonction de l'élévation.

Figure 31 : Nombre de bactéries des deux faces de feuilles des stations d'études en fonction des surfaces foliaires**.**

Figure 32 : Nombre de bactéries des deux faces de feuilles des stations d'études en fonction de la T moy**.**

Figure 33 : Nombre de bactéries des deux faces de feuilles des stations d'études en fonction de la Pr moy**.**

Figure 34 : Nombre de bactéries des deux surfaces de la feuille des quatre stations d'étude**.**

Figure 35: Le cercle des corrélations**.**

Figure 36 : Aspect des colonies bactériennes isolées des échantillons de Berrouaghia.

Figure 37 : Aspect des colonies bactériennes isolées des échantillons de Al Hamdania.

Figure 38 : Aspect des colonies bactériennes isolées des échantillons de Oued Harbil.

Figure 39 : Aspect des colonies bactériennes isolées des échantillons de Tamezguida.

Figure 40 : Aspects morphologique cellulaire des cultures des isolats de la station Berrouaguia.

Figure 41 : Aspects morphologique cellulaire des cultures des isolats de la station El Hamdania.

Figure 42 : Aspects morphologique cellulaire des cultures des isolats de station d'Oued Harbil.

Figure 43 : Aspects morphologique cellulaire des cultures des isolats de station de Tamezguida.

Figure 44: le mode d'association et le Gram des cellules de les isolats de station de Berrouaghia.

Figure 45: le mode d'association et le Gram des cellules de les isolats de station de El Hamdania.

Figure 46: le mode d'association et le Gram des cellules de les isolats de station de Oued Harbil.

Figure 47 : le mode d'association et le Gram des cellules de les isolats de station de Tamezguida.

Figure 48 : Résultat du test des galeries biochimique des quatre souches sélectionnées.

Figure 49: les deux stations d'étude (Oued Harbil et Berrouaghia).

Figure 50 : Les arbres phylogéniques des OTUs les plus significatifs.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les caractéristiques des stations d'études.

Tableau 02 : Les données géographique la station de référence.

Tableau 03 : Interprétation des valeurs d'expect calculés par BLAST.

Tableau 04 : les OTUs les plus significatifs étudiés dans les deux stations.

Tableau05: Les caractères des isolats bactériens.

Tableua 06 : One-way ANOVAIES.

Tableau 07: les OTUs les plus abondants dans chaque station.

Tableau 08: One-way ANOVAIES.

Tableau09 : l'identification des OTUs les olus significatifs.

Tableau 10 : Résultat de l'annotation les OTUs étudié.

RESUME

La partie aérienne des plantes, la phyllosphère, est colonisée par des communautés complexes de micro-organismes. Les bactéries y sont numériquement majoritaires à côté des archées et des champignons.

Les micro-organismes de la phyllosphère influencent de nombreux processus dans les écosystèmes et jouent un rôle non-négligeable d'un point de vue agronomique et environnemental. Certaines sont bénéfiques pour la plante, les bactéries peuvent par exemple, modifier la croissance des plantes, supprimer ou stimuler la colonisation et l'infection des tissus par les pathogènes et avoir un grand rôle dans la résistance a la sécheresse et au stress environnementaux.

D'autres par contre fonctionnent comme des pathogènes des plantes et peuvent agresser la plante hôte ou même la tuer. Cependant, la majorité des colonies microbiennes chez une plante donnée n'ont pas d'effet détectable sur la croissance ou la physiologie de la plante.

Dans cette étude nous avons comparé la composition de ces colonies par rapport à l'élévation du site, pour cela nous avons échantillonné selon un gradient d'élévation sur quatre stations de wilaya de MEDEA sur une espèce de pistachiers, le pistachier lentisque. Nous avons étudié les communautés fongiques et bactériennes grâce a la mise en culture de ces organismes et l'étude bioinformatique des séquences génomiques, les résultats on démontrés des corrélations positives entres ces assemblages, la surface foliaire et l'élévation, l'identification biochimique des isolats et l'étude bioinformatique nous ont permis d'annoter des espèces propre au pistachier lentisque voire même de la station.

Les mots clé : la phyllosphère, *Pistacia Lentiscus.l*, surface foliaire, élévation

ABSTRACT

The aerial part of plants, the phyllosphere, is colonized by complex communities of microorganisms. The bacteria are numerically majority next to arches and mushrooms.

The micro-organisms of the phyllosphere influence many processes in ecosystems and play a non-negligible role from an agronomic and environmental point of view. Some are beneficial to the plant, for example, bacteria can alter plant growth, suppress or stimulate colonization and infection of tissues by pathogens, and have a large role in resistance to environmental drought and stress. others, however, functions as plant pathogens and can attack the host plant or even kill it. However, the majority of microbial colonies in a given plant have no detectable effect on the growth or physiology of the plant.

In this study we compared the composition of these colonies in function to the elevation of the site; this is why we sampled according to a gradient of elevation on four stations in region of MEDEA on a species of Pistacia, *Pistacia Lentiscus L*.We studied fungal and bacterial communities through the culture of these organisms and the bioinformatics study of genomic sequences.

The results showed positive correlations between these assemblages, leaf area and elevation, biochemical identification of Isolates and the bioinformatics study allowed us to annotate species specific to the *Pistacia Lentiscus* or even to the station.

The key words: The phyllosphere, *Pistacia Lentiscus.l*, leaf area, elevation.

ملخص

الجزء العلوي من النباتات، وبالضبط مجال الورقة، تستعمر من قبل مجتمعات معقدة من الكائنات الحية الدقيقة. البكتيريا هي الأغلبية عددا وبعدها الفطريات. الكائنات الحية الدقيقة على سطح الورقة تتأثر بالعديد من الأنظمة الإيكولوجية وتلعب دورا لا يستهان به في المنظور الاقتصادي الزراعي والبيئي. و بعضها مفيد للنبات، فمثلا تعديل في نمو النبات، وطرد أو تحفيز الاستعمارات الممرضة للنباتات وأيضا لها دور كبير في مقاومة الجفاف والضغوط البيئية.

في هذه الدراسة قارنا تكوين هذه المستعمرات مقارنة مع ارتفاع الموقع، لذلك علينا أخذ عينات على ارتفاع أربع مناطق من ولاية المدية على النوع البطم العدسي.

درسنا المجتمعات الفطرية والبكتيرية بفضل زراعة هذه الكائنات الحية ودراسة المعلوماتية الحيوية للتسلسل الجينوم، وأظهرت النتائج ارتباط إيجابي بين هذه المجتمعات مساحة الورقة والارتفاع، و بفضل المعارض البيوكيميائية والدراسة المعلوماتية الحيوية تعيين الأنواع الخاصة بالطم العدسي في مختلف الارتفاعات.

الكلمات الرئيسية: سطح الورقة، البطم العدسي ، مساحة الورقة، والارتفاع

Sommaire

Introduction……..... 1

Partie I : synthèse bibliographique

Chapitre 01 : La phyllosphère comme habitat microbien

1-1- Définition……..……...3

1-2- La surface foliaire……..….....3

1-3- La diversité et variabilité de la communauté microbienne de la phyllosphère……....4

1-4- La phyllosphère, un habitat colonisé au cours de la saison végétative…….……...5

1-5- Les sources des microorganismes…….....5

1-6- Les sites les plus communs de la colonisation des microorganismes…….....6

1-7- Les facteurs structurant les microorganismes de la phyllosphère……...7

1-7-1-Les facteurs abiotiques……...….8

1-7-2-Les facteurs biotiques…….....8

1-8- L'adaptation microbienne à l'habitat phyllosphérique…….....9

1-9- Le rôle des microorganismes de la phyllosphère…….....10

Chapitre 02 : la plante étudié *Pistacia lentiscus L*

2-1- Étymologie…….……13

2-2- Systématique……...….....13

2-3- Description botanique du lentisque…….....….13

2-4- Caractère écogéographique.....14

2-4- Exigence pédoclimatique et écologique……15

2-5- Substances utiles et effets thérapeutiques de Pistacia lentiscus L.……..…...17

2-6- Effet et usage médicinaux……..…17

Partie II : Matériels Et Méthodes

1- Milieu d'étude…….……17

1-1- Présentation de la wilaya…….……..……17

1-2- Situation géographique……..…….17

1-2-2- Les sites d'échantillonnages……..24

1-3- Prélèvement des échantillons……..….....34

1-4- Mesures biométriques……..….....35

1-5- Caractères bioclimat des zones d'étude……...……..15

1-5-1- La Température…….....…15
1-5-2- La pluviométrie…….....…17
1-5-3- les phénomèneS météorologie…..……...…..18
1-5-4- Synthèse climatique……..……...…...20

2- Isolement et identification des microorganismes……..…….....…..35
2-2- Partie I : Mise en culture des isolats bactériens…….……..…….....35
2-2-1- Méthode d'isolement…….…….……...35

2-2-2- Identification phénotypique des isolats……..……...……36
2-2-2-1- identification phénétique……..…..36
2-2-2-2- identification physiologique……..……..37
2-2-2-3- Identification biochimique…….……38
2-3- Identification génotypique des isolats fongique……40
2-3-1- Matériel……...…39
2-3-2- Préparation des échantillons et la technique de séquençage…….…….40
A- BLAST……...41

B- Barcoding……...…..….43
D- Barcoding chez les champignons…….45
2-3-3- L'échantillonnage et la technique de séquençage……..…….……..45
2-3-4- Analyse des séquences……..46
2-3-5- L'annotation des queleques séquences……..……..……47

Partie 3 : Résultat
1- Etude des communités bactériennes de la phyllosphere…….……..……..…52
1-1- Les sites d'échanillonnage……..…...…....53
1-2- Etude statistiques des communautés bactériennes…….……. …53

A-Etude du nombre de bactéries en fonction de l'élévation……..……...…...54
B- Etude du nombre de bactéries en fonction des surfaces foliaire……..……..……...…..54
C- Etude du nombre de bactéries en fonction de la tempérture moyenne…….…..……...55
D- Etude du nombre de bactéries en fonction des précipitations moyenne…….…..…56
E- Etude du nombre de bactéries en fonction de la face supérieure et la face inférieure de la feuille……57

F- L'analyse de la variance ANOVA……...58
G- L'analyse en composantes principales ACP……...59
K- L'analyse de la variance ANOVA……..…….62
1-2-1. identification des quelques souches……..…….……..…….……63
A- caractères phénotypiques
B- Résultat de traitement les données……..……69
C- L'analyse de la variance ANOVA…….....69
1-2-2- Résultat de l'annotation des séquences……..…..70
Partie 4 : Discussion…….....…75

Conclusion……..…78
Référence
Annexe

Introduction

Il existe deux définitions de la phyllosphère dans la littérature, l'une désigne l'habitat fourni par l'ensemble des parties aériennes des plantes [3] et l'autre désigne seulement la partie foliaire des plantes [4]. Ces feuilles et autres parties aériennes abritent de nombreuses espèces bactériennes et fongiques sous forme de levures, de champignons filamenteux ou encore de spores en dormance [3]. Dans la présente étude, la phyllosphère fait référence à la partie foliaire des plantes.

Aussi vrai que la composition phyllosphérique a été déterminée chez certaines espèces, son origine reste mal connue, en premier lieu, les variations climatiques changerai considérablement la structure et l'assemblage de ces microorganismes [5]. Il se pourrait aussi qu'elle soit liée à la génétique de l'espèce [6], en l'occurrence à tous ce qui caractérise ses traits foliaires comme les huiles essentielles et les phénols [7], cas du pistachier lentisque qui présente d'importante propriété aromatiques.

Ces organismes peuvent être soit épiphytes en vivant sur la surface des feuilles [8], soit endophytes vivant à l'intérieur des tissus, dans les espaces intercellulaires des feuilles [9] ; [10]. La distinction entre le statut d'endophyte et d'épiphyte n'est pas évidente. En effet, certaines espèces microbiennes peuvent activement pénétrer les tissus de le feuille pour devenir endophytes [11] ; [12].

Le pistachier lentisque se présente sous forme d'arbuste, il s'étend jusqu'aux milieux humides, ses feuilles sont persistantes d'où leurs disponibilité a toutes les saisons, ces caractéristiques présentent un grand intérêt pour cette étude.

Les communautés bactériennes de La phyllosphere du pistachier lentisque ont été déjà étudiées, notamment par rapport a la composition des feuilles en huiles essentiels [7], mais aussi à l'interaction des facteurs chimiques avec les microorganismes [7] et à leurs réactions face a la variation de l'écosystème [1].

Ils ont conclut que Le profil foliaire structural et chimique du lentisque reflète la taille des populations épiphytes, or de part son feuillage de forte teneur en phosphore [15] très aromatique, il compte beaucoup de colonies bactériennes qui se sont adapté a l'activité anti microbienne des huiles essentiels et l'utiliserai même comme source de Carbone [7].

L'objectif principal est d'étudier les effets relatifs de l'espèce hôte et de l'élévation sur les assemblages fongiques et bactériens de la phyllosphère et de déterminer grâce aux techniques

d’isolation microbiologique et de l’annotation génomique des séquences les différences entre les communautés, leurs compositions et leurs structures.

Pour nous, L’objectif principal de cette étude est de déterminer la composition phyllosphérique du pistachier lentisque *Pistacia lentiscus* et d’étudier les effets potentiels du l’élévation et de l’apparenté génétique sur la structure et l’assemblage de ces microorganismes.

Pour cela nous avons choisi des stations d’échantillonnage tout au long d’un gradient d’élévation croissant sur la wilaya de Médéa.

Nous avons fait en premier lieu la mise en culture des microorganismes et leurs organisation en ensembles statistique nous permettant ainsi d’établir les différences liées au site et a la surface foliaire suivi d’une identification biochimique des isolats pour mettre en évidence les souches bactériennes les plus caractéristiques. En deuxième lieu une annotation des séquences d’ADN des communautés fongiques de deux stations et l’alignement des séquence a était fait afin d'estimer le niveau de diversité et caractériser les facteurs qui influent sur ces communautés , en fin une étude génomique et bioinformatique s’est imposé pour classer les espèces et les répertorier sur les banques de gènes .

PARTIE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01: La phyllosphère comme habitat microbien

1-1. Définition

La phyllosphère, est la partie aérienne plus particulièrement la surface des feuilles des plantes [7], c'est un habitat extrême et instable colonisé par des communautés complexes de microorganisme. Bien qu'ils sont invisibles à l'œil nu, ces derniers font partie de notre quotidien de par leur ubiquité et leur richesse [8].

Les communautés des microbes sont une niche pour les bactéries, les champignons, les eucaryotes, les levures, et les protistes [9], Où les bactéries sont majoritairement présentes à côté des archées [10]. La phyllosphère couvre plus de 10^8 km^2 et abrite jusqu'à 10^{26} cellules bactériennes [10].

1-2.La surface foliaire

La surface foliaire totale sur le globe est estimée à 6,4 x 10^8 km^2 [10], elle est par elle-même une architecture complexe des microenvironnements, qui possèdent des structures hétérogènes, bidimensionnelle et tridimensionnelle, ces derniers ont dénombrable caractéristiques qui font la particularité de la vie microbienne [12], [13].

Ces microorganismes pouvant être vivant sur la surface des feuilles, ce sont des épiphytes. A l'opposé ceux qui vivant à l'intérieur des tissus, dans les espaces intercellulaires des feuilles sont des endophytes [13], [14]. Tandis qu'ils existent des microorganismes épiphytes qui pénétrer les tissus des feuilles pour devenir endophytes.

Par conséquent on peut établir la présence d'une symbiose très répandue et ancienne entre les microorganismes et les feuilles associées [11], [12].

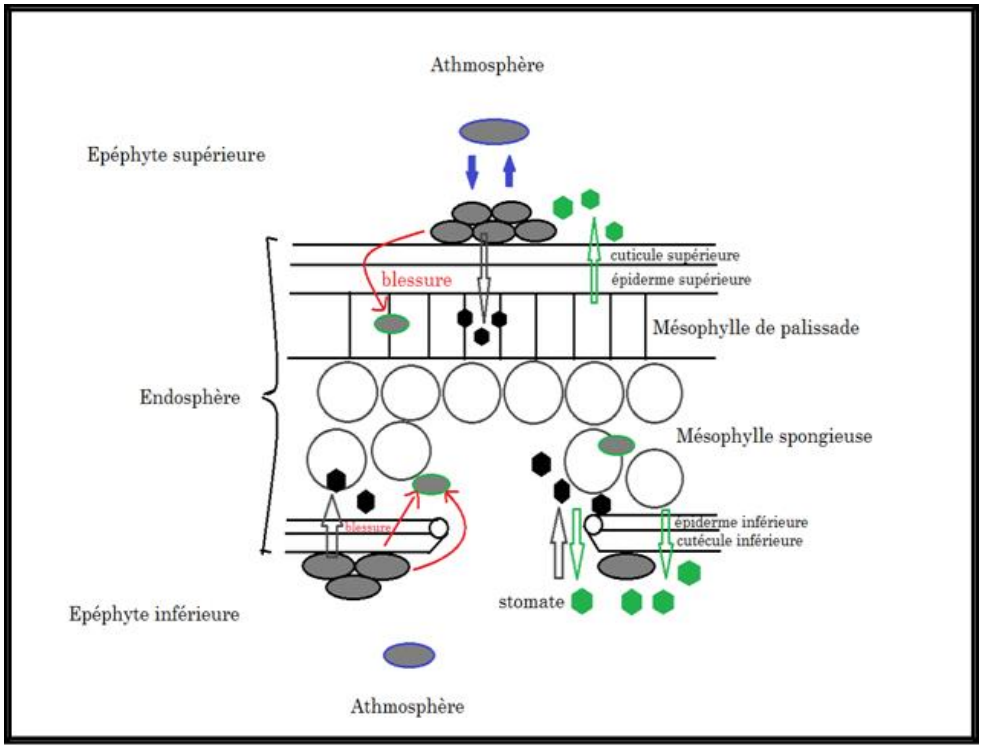


Figure 01: Généralité sur les échanges histologique et biochimique de la phyllosphére.

1-3. La diversité et variabilité de la communauté microbienne de la phyllosphère

L'identification générale des communautés, communément présentes dans la phyllosphére des plantes d'un taxon donné et des communautés spécialisées, adaptées à un type particulier de l'environnement phyllosphérique, est indispensable pour parvenir à une meilleure compréhension de l'écosystème de la phyllosphère et des interactions fonctionnelles entre les plantes, les microorganismes et l'environnement fonctionnel [11],[12].

L'étude de la diversité de l'assemblage des communautés nécessite des outils adaptés. Ces derniers incluent des méthodes moléculaires dont l'utilisation du séquençage d'ADN de haut débit couplé avec des méthodes bioinformatiques [8].

Aureobasidium pullulans est un champignon épiphyte qu'on le retrouve souvent sur la surface de différentes plantes dont le pommier ou sa répartition diffère en fonction de la vitesse de la photosynthèse, mais aussi des caractéristiques métabolique, génétique de la plante ainsi que des caractéristiques liées à l'histoire de la vie, qui est l'histoire évolutive des espèces végétales (domestication, relocalisation) [2].

La répartition de ce champignon est également liée à des propriétés spécifiques propres aux micro-organismes dans la phyllosphère, parmi eux :

La localisation anatomique, que ce soit sur le dessus des feuilles, feuilles du bas plus près du sol, qui influencent fortement la structure des communautés microbiennes.

Les caractéristiques environnementales : géographie, le climat tels que la température, la saison, l'exposition occasionnelle à des tempêtes de sable et les facteurs anthropiques tels que l'utilisation des pesticides, les traitements phytosanitaires, l'exposition aux polluants jouent un rôle important dans la structuration des communautés [15], [16].

Les micro-organismes peuvent se produire individuellement sur la surface des feuilles, mais souvent, ils se produisent sous forme d'agrégats ou de structures de biofilm [17]. Mais il est à noter que pas tous les micro-organismes qui arrivent dans la phyllosphère sont capables de coloniser et de grandir. Dans une certaine mesure, cela reflète les processus d'émigration à travers des mécanismes de dispersion tels que les éclaboussures de pluie, le mouvement de l'eau ou de l'enlèvement par des insectes [17]. D'ailleurs, il a été suggéré que certains microorganismes peuvent être uniques ou des spécialistes d'un habitat donné.

Et enfin la capacité de survivre et de croitre dépendant des caractéristiques environnementales physico-chimique et génétiques de la plante et des propriétés spécifiques des microorganismes de la phyllosphère, qui déterminent ensemble la structure et la diversité de la communauté microbienne.

1-4. La phyllosphère, un habitat colonisé au cours de la saison végétative

Les micro-organismes épiphytes peuvent varier dans la composition et la concentration et doivent s'adapter à de multiples fluctuations impliquant le cycle de la saison, le cycle jour / nuit, et la dynamique de développement, morphologiques et anatomiques de la plante, à partir du bourgeon à la feuille de sénescence, ou de la fleur au fruit [11], [12], [19]. Ainsi qu'en réponse à des événements environnementaux tels que les précipitations et le vent fort [17], [20].

Les produits de la photoasmilation tels que le sucrose, le glucose et le fructose sont présent sur la surface des feuilles, mais les fluctuations du cycle jour/nuit provoque d'importante modifications du profil métabolique de la plante et par conséquent la disponibilité des nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes épiphytes est perturber.

Les populations microbiennes peuvent varier en taille et au sein des espèces végétales sur de courtes périodes de temps [21] ainsi que sur la saison de croissance [22], avec peu de bactéries épiphytes présents sur des feuilles peu après la levée des bourgeons ou des graines, mais il y aura une augmentation de la quantité par la suite [21].

Au cours d'une saison végétative, la biomasse microbienne de la phyllosphère a tendance à augmenter. Avec une majorité des bactéries après débourrement, ensuite une majorité de levures, et enfin une majorité de champignons filamenteux en fin de saison [23].

1-5. Les sources de microorganismes

Les sources de microorganismes de la phyllosphère peuvent être multiples. Épiphytes arrivent sur la surface de la feuille par des insectes, atmosphère, semences ou même transmises par des sources animales. Bourgeons d'arbres, des graines de plantes annuelles et des débris de cultures présidentes [24]. Ces derniers sont susceptibles d'être les sources les plus importantes de la colonisation de nouvelles plantes car elles contiennent d'importantes colonies de bactéries déjà adaptés à la phyllosphère [25].

Les microorganismes qui ne présente pas ou peu de multiplication dans la phyllosphère sont considérés comme épiphytes transitoires alors que ceux ayant la capacité de multiplication en l'absence de blessures sont connues comme épiphytes résiduels.

Le transfert des microorganismes de l'atmosphère aux feuilles peut se faire par l'impaction sur la surface de la feuille, la sédimentation ou les éclaboussures de pluie, ainsi que de la contamination par le sol [26].

La transmission des microorganismes à partir de la rhizosphère à des parties aériennes des plantes semble avoir été un domaine négligé de la recherche, néanmoins il existe de plus en plus de preuves que les microorganismes sur les semences ou les racines ont la capacité a devenir endophytes dans les racines, entrer dans le système vasculaire et être transféré en interne sur les parties aériennes des plantes ou il devient endophyte [27].

Les endophytes peuvent également provenir suite à la colonisation par les épyphytes ce qui suggère la présence d'une communication importante dans la phyllosphère [28].

1-6. Les sites les plus communs de la colonisation des microorganismes

Les sites les plus communs de la colonisation bactérienne se localisent au niveau des jonctions de la paroi cellulaire épidermique [29], en particulier dans les sites protégés, dans des rainures le long de nervures [30], les stomates et à la base de trichomes [31]. Ils sont également présents dans la cuticule [32], dans les dépressions dans la cuticule, à proximité de l'hydathodes [33] et dans des sites spécifiques particuliers à certaines plantes telles que les fosses stomates [7].

En générale les bactéries se trouvent en un plus grand nombre sur la surface inférieure des feuilles car cette dernière a une plus grande densité de stomate ou trichome, ou une couche cuticulaire plus mince [28].

La distribution des populations bactériennes dans la phyllosphère peut différer sur de très petites échelles, qui atteignent les 0.1mm² et fréquemment bien illustrer par une distribution log-normale tandis que les levures et champignons filamanteaux peuvent être mieux décrits par une distribution normale [11], [12]. Les microorganismes peuvent se produire individuellement sur la surface des feuilles, mais souvent, ils se produisent sous forme d'agrégats ou de structure de biofilm.

1-7.Les facteurs structurant les microorganismes de la phyllosphère

Les communautés microbiennes de la phyllosphère varié largement dans l'espace et dans le temps, principalement due à une large variété de facteurs qui détermine de quelle manière les cellules microbiennes sont capable de coloniser la feuille, et l'endroit ou ces cellules peuvent être localiser. L'établissement est déterminé par l'interaction entre les fluctuations extrêmes des conditions environnementales associées à la feuille qui interagissent entre eux.

1-7-1. Les facteurs biotiques

Le premier point de contacte des cellules microbiennes qui immigrent vers la phyllosphère est la cuticule, cette surface cireuse généralement microcristalline dans la nature présente de multiples fonctions : une barrière de diffusion, réduit les pertes en eaux et en soluté, protège contre la pollution aqueuse; joue comme réflecteur pour minimiser les fluctuations de température, confère la répulsion de l'eau et enfin elle agie comme élément protecteur contre les pathogènes.

La répulsion de l'eau est particulièrement importante pour prévenir l'immigration des microorganismes vers la surface de feuille, spécialement au niveau des jeunes feuilles ou la cuticule est relativement intact comparé aux feuilles plus âgées dont leurs cuticules devient érodé et la mouillabilité augmente. Plus encore la cuticule limite les pertes en nutriment de la feuille chose importante pour supporter la population microbienne épiphyte.

L'utilisation de tous les biocapteurs des cellules bactériennes pour le sucrose, fructose et glucose à démontrer que ces sucres sont localisés seulement dans des sites discret sur la feuille.

Ceci ainsi que d'autre évidence microscopique suggèrent que la plupart des microorganismes immigrant à la phyllosphère sont exposé à des environnements pauvres en nutriments et que seulement peu de cellules se trouvent dans des zones ou les nutriments sont relativement en abondance pour supporter la croissance.

Les feuilles de plantes libèrent également une large variété de composants organiques volatils (VOCs) dans la couche limite autour des feuilles. Incluant des micromolécules telles que le CO2, les acétones, ou d'autres molécules de taille moyenne (des terpenoids, un nombre d'aldéhydes et d'alcool) et tout comme des macromolécules, (une long chaine d'hydrocarbones et des sesquiterpenoides). Il est évident que certain des ces composants peuvent être inhibiteur ou toxique pour certains champignons. Similairement quelque protéine sécréter par des trhicomes glandulaires peuvent inhabité l'activité de certains pathogènes.

Donc Le carbone ainsi que les sources nutritives de la feuille limite considérablement la croissance microbienne en surface et joue le rôle de facteur sélectif.

La taille des populations fongiques et bactériennes des feuilles est corrélée avec la position de la feuille, l'architecteur de la plante et la hauteur de la canopée.

Les caractéristiques liées à l'espèce de la plante peuvent également influencer la capacité de la feuille à supporter des microorganismes. Le nombre total de bactéries vivent à l'extrémité de feuilles de certaines plantes herbacée comme chez le concombre et la laitue est significativement plus élevée que chez les graminées ou chez les plantes à feuille large et cireuse.

L'approche de la culture indépendante a démontré que la structure des communautés de la surface des feuilles d'un individu de la même espèce est similaire, mais elle varie significativement entre deux espèces.

1-7-2. Les facteurs abiotiques

Peu de choses sont connues sur l'effet potentiel du réchauffement climatique sur les champignons phyllosphériques, malgré leur impact important sur la dynamique et la diversité des communautés végétales. La structure des assemblages fongiques de phyllosphère le long des gradients d'élévation peut fournir des informations sur cet effet potentiel, car les gradients d'élévation correspondent aux gradients de température sur de courtes distances géographiques.

L'étude des variations dans la composition des assemblages fongiques qui habitaient la phyllosphère du hêtre européen (Fagus sylvatica) à quatre sites sur un gradient de 1000 m

d'élévation dans les Pyrénées françaises, a démontré que la composition des assemblages fongiques variait significativement entre les sites d'élévation, tant en termes d'abondance relative que de présence-absence d'espèces, et que les variations de composition d'assemblage étaient bien corrélées avec les variations des températures moyennes.

Les variations de température à court terme peuvent également expliquer les variations des assemblages fongiques d'une année sur l'autre. Cela suggère donc que le réchauffement climatique pourrait modifier l'incidence et l'abondance des espèces de champignons phyllosphériques.

Toutefois, d'autres paramètres potentiellement structurant co-varient avec l'altitude et la température [23], comme les rayonnements UV (Ultraviolet) [34] ; [22] et les variations de pression atmosphériques [17].

1-8. L'adaptation microbienne à l'habitat phyllosphérique :

Outre que les facteurs liés à la plante hôte ainsi que l'environnement, les propriétés des colonies des microorganismes déterminent dans quelle mesure ils sont capables de s'établir sur la surface des feuilles. Certains microorganismes possèdent une capacité inhérente à survivre dans l'habitat existant tandis que d'autre sont capables de modifier l'environnement pour réduire les niveaux de stress auquel ils sont exposés [38].

La tolérance aux rayons ultraviolets (UV) est susceptible d'être une pression de sélection important pour la survie la croissance de microorganismes. Les analyses de la culture indépendante ont indiqué que la plupart des microorganismes isolés de sont capables de supporter des niveaux élevés de rayonnement (UV) sur la surface de la feuille [39].

La carence en eaux et en nutriments sont des facteurs limitant la croissance microbienne de la phyllosphère. Pour y remédier plusieurs mécanismes sont mis en joue [40]. Par exemple l'épiphyte ***Pseudomonas spp*** peut libérer des tensioactifs qui augmente la mouillabilité de la surface des feuilles et renforce la solubilisation et la diffusion des nutriments ce qui rend l'utilisation de l'eau et des substrats plus accessible aux microorganismes [41]. Il a été récemment démontré qu'un certain nombre de bactérie de la phyllosphère augmente la perméabilité de la cuticule dans le but d'intensifier la quantité d'eau et la disponibilité des nutriments [42].

Un autre mécanisme qui permet toute aussi d'accroitre la disponibilité des nutriments peut se rapporté à l'aptitude de produire des toxines qui affectent le transport des ions à travers les membranes plasmatiques des cellules végétales [40].

La bactérie pathogène des plantes ***Pseudomonas syringae*** **pv.** ***syringae*** secrètent une toxine appelée syringomycin qui conduit à une lyse cellulaire. Néanmoins cette toxine peut être produite en quantité moindre par des souches non pathogènes de *P. syringae* pv. *syringae* de façon que la nécrose et la maladie ne se produisent pas tandis que la libération des éléments nutritifs des plantes est toujours stimulée [44].

Il est intéressent de signalé que la toxine syringomycin agit autant que agent tensioactif fournissant deux mécanismes possible afin d'améliorer la disponibilité des nutriments dans la phyllosphère [40].

Un autre mécanisme probablement plus répondu est la production et la libération de régulateur de croissance des plantes. La production d'indole-3-acétique (IAA) est fréquente chez les bactéries épiphytes est associée à l'amélioration des fuites, d'éléments nutritifs et la fitness microbienne [1].Il est suggéré que la présence d'une voie de sécrétion fonctionnelle de type III dans ***Pseudomonas fluorescens*** et ***Pseudomonas putida*** [45] fournit la capacité de modifier l'habitat local, peuvent être nécessaires pour la croissance et la survie dans la phyllosphère. La production de pili et de flagelles peut être également importante pour permettre la fixation des bactéries et la colonisation dans la phyllosphère [40].

La production de polysaccarides extracellulaire (EPS) par les bactéries peut les protéger du stress hydrique et peut aider les cellules a s'ancrait sur la surface des feuilles. Les agrégats de bactéries peuvent ainsi les protéger contre les (UVR), la prédation et les bactériocides, régule le PH et les échanges gazeux, améliore les échanges génétique particulièrement grâce au transfert de plasmide.

1-9.Le rôle des microorganismes de la phyllosphère

Les communautés microbiennes sur ou autour des plantes jouent un rôle majeur dans le fonctionnement et la vigueur de la plante. C'est microorganismes représentent la plus grande interface biologique sur Terre et Fournissent des services essentiels en tant que sites de fixation du dioxyde de carbone (intercepter des composés de carbone libérés directement dePlantes), jouent un rôle dans le cycle de l'azote (nitrification des polluants de l'ammonium interceptés par les plantes), rentrent dans la libération et la production primaire de biomasse. Et enfin joue un

rôle essentiel dans la protection des plantes contre les maladies et favorise leur croissance par divers mécanismes.

Suite à une hypothèse qui a été émise disant que les bactéries de la phyllosphère de certaines plantes pourraient jouer un rôle clé dans la tolérance à une salinité excessive. Huit bactéries endophytes appartenant à des Bacillus et des genres étroitement apparentés ont été isolées de la phyllosphère de l'halophyte Arthrocnemum macrostachyum poussant dans des sols agricoles salés.

L'inoculation avec un consortium comprenant les bactéries les plus performantes a considérablement amélioré la cinétique de germination et le pourcentage final de germination des graines de A. macrostachyum a des concentrations élevées de NaCl, l'inoculation des plantes a atténué les effets de la salinité élevée sur la croissance des plantes et la performance physiologique et, en outre, ce consortium semble avoir augmenté le potentiel de A. macrostachyum pour accumuler Na + dans ses pousses, améliorant ainsi Capacité de phytoextraction du sodium. Par conséquent ça peut être un outil adéquat pour améliorer l'adaptation des plantes et la phytoextraction du sodium lors de la restauration des sols dégradés par le sel.

Chapitre 02 : La plante étudié *Pistacia lentiscus L*

2- 1. Étymologie

***Pistacia Lentiscus L*, Darou** en arabe local, Pistachier Lentisque, Arbre au mastic. On l'appelle arbre à mastic car sa sève est utilisée pour la réalisation d'une gomme à odeur. Le nom pistachier vient du grec pistakê. Le nom lentisque vient du latin *lentus* (visqueux). *Pistacia lentiscus* synonyme : Lentiscus vulgaris cupani [46].

2-2. Systématique

La classification de l'espèce se fait selon .La position systématique de *Pistacia lentiscus* :

Règne	**:** Végétale.
Embranchement	**:** Spermaphytes.
Sous embranchement	**:** Angiospermes.
Classe	**:** Dicotylédones.
Ordre	**:** Térébenthales.
Famille	**:** Anacardiacées.
Genre	**:** Pistacia.
Espèce	**:** lentiscus L.

2- 3. Description botanique du lentisque

Pistacia Lentiscus est un arbrisseau (Haut de 1 à 3m) résineux [48]. Appartient à la famille Anacardiacée. (Photo 1), Constitué de :

- Rameaux à écorce brun rougeâtre, glabre, drageonnant à forte odeur de résine [49]. (Photo 2).
- Les feuilles paripennées à pétioles aillées de 6 à 12 folioles cariassent, de 2 à 4cm de longueur, vert foncé lustré dessus [51]. (Photo 2).
- Fleurs dioïque en courtes inflorescences denses dans les aisselles des feuilles; les fleurs mâles munies d'un calice à 5 lobes ,3-5 étamines courtes et de grande anthères, rouges foncées et les fleurs femelles sont vert jaunâtre, calice à 3-4 lobes [50]. (Photo 3).
- Fruits drupes charnues pisiformes d'environ 4mm de large, d'abords rouges, noires à la maturité [51] (Photo 2).



Figure 02 :Photo du *Pistacia lentiscus L.*



Figure 03: Feuilles et fruits de *Pistacia Lentiscus L*



Figure 04 : *Pistacia lentiscus L.*



Figure 05 : Les feuilles de *Pistacia lentiscus L.*

2-4. Caractère écogéographique

Le lentisque est originaire du bassin méditerranéen [52]; il pousse à l'état spontané ; il est fort répondu sur les bords de la méditerranée, comme il pénètre à l'intérieure et fréquente les plaines et les bases montagnes, il remontant les pentes chaudes et ensoleillées; [53] et peut atteindre 1600m d'altitude [54].

Le lentisque est une plante typique des régions sèches et arides [55]. Il est courant en site aride et coïncide avec l'étage semi-aride et sub-humide [56] de région méditerranéenne (de l'Asie, l'Europe, l'Afrique jusqu'aux Iles Canaries) [57] comme on le retrouve en Asie mineure. De point de vue édaphique le lentisque s'adapte à tous les soles qu'ils soient argileux, sableux, slissieux ou calcareux [56]. Il est très favorable au développement de la faune à laquelle il fourni: abris, nourriture et milieu de reproduction il se multiplié par semis, comme il peut rejeter des souches [57].

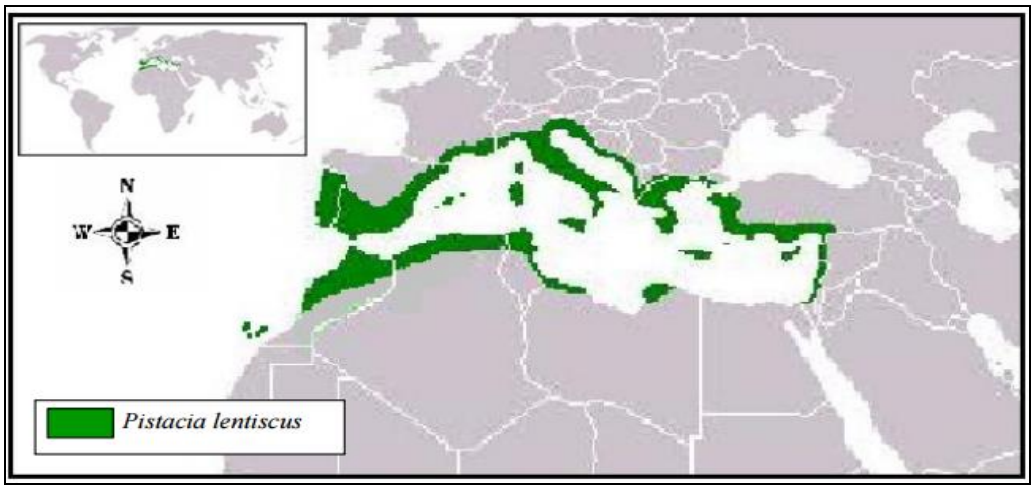


Figure 06 : Aire de répartition du *Pistacia lentiscus* dans le bassin Méditerranéenne. (Alyafi, 1979).

En Algérie, le *Pistacia lentiscus* occupe l'étage thermo-méditerranéen. Sa limite méridionale se situe aux environs de Saida, sa présence au sud de l'Atlas saharien n'est pas signalée. On le retrouve sur tout type de sol, dans l'Algérie subhumide et semi-aride [58], plus précisément dans le bassin du Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège [59].

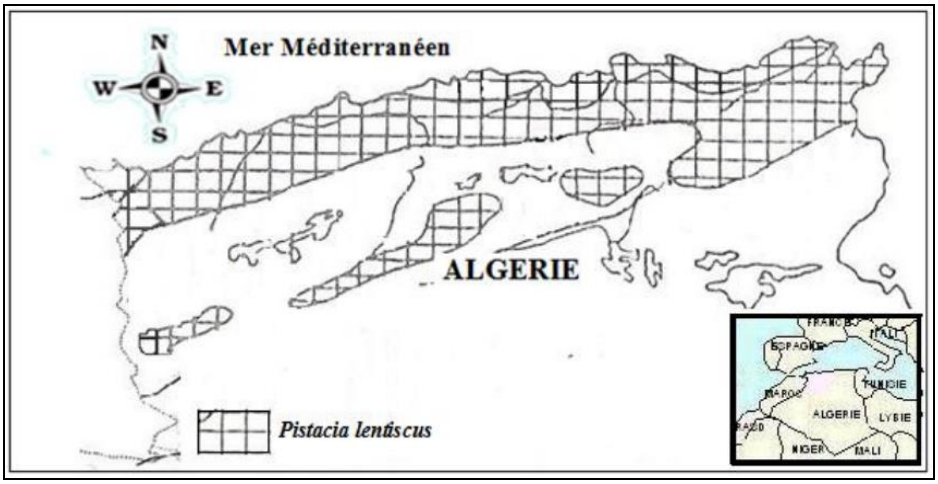


Figure 07: Aire de répartition du Pistacia lentiscus en Algérie (Quezel, 1962- 1963).

2-5. Exigence pédoclimatique et écologique

Afin de permettre la levée de dormance des bourgeons, il est nécessaire que les besoins en froid du lentisque soient satisfaits. Il faut noter que cette espèce régresse à des températures de - 12 à -14°C et discontinuer de -15 à -20 °C [60].

Pistacia lentiscus est l'une des espèces rejetant des souches; c'est une espèce très inflammable et très combustible, et donc très vulnérable aux incendies. Ce taxon est caractérisé par une forte sélection écologique et donc un bon ajustement au stress hydrique estival pouvant durer de 1 à 6 mois. Cette adaptation s'associe à des possibilités d'installation et de maintien sur tous les types

de sols sauf trop humide (Figure 8). C'est une espèce indifférente aux variations du milieu ; sa dispersion indique son adaptation optimale aux conditions globales qu'offre son milieu environnemental [61].

Pistacia lentiscus L. c'est un arbuste des maquis et des garrigues de toute la région Méditerranéenne à l'étage thermo-méditerranéen et méso-méditerranéen, en bioclimat humide, subhumide, subhumide inférieur chaud, semi-aride tempérés et chauds, semi -aride supérieur tempérée, il occupe toutes les altitudes. On le retrouve sur les différents substrats calcaires, calcaire-marneux, marnes ou calcaires compacts, les schistes, les silices.… Cette plante pousse sur différents types de sols tels que sablo-argileux-limoneux, argilo-limoneux, sableux et argileux .préfèrent les sols à faible taux de phosphore et de potassium, mais avec des carbonates de calcium et d'azote contenu [62], type d'habitat climacique et forêts sclérophylles ; conditions thermophiles à xérophiles, exposition: Pleine lumière (héliophile), chaude (Figure 8) [63].

L'étude phyto-dermologique de *Pistacia lentiscus* a permis de noter l'adaptation de cette espèce au manque d'eau par: une absence totale de stomates au niveau de la face supérieure des feuilles ; et la présence des stomates du type paracytique mésopérigène au niveau de la face inférieure de la feuille. Son système radiculaire est puissant et bien développé, s'accrochant sur les pentes rudes et les terrains rocheux, c'est un couvre sol idéal [58].

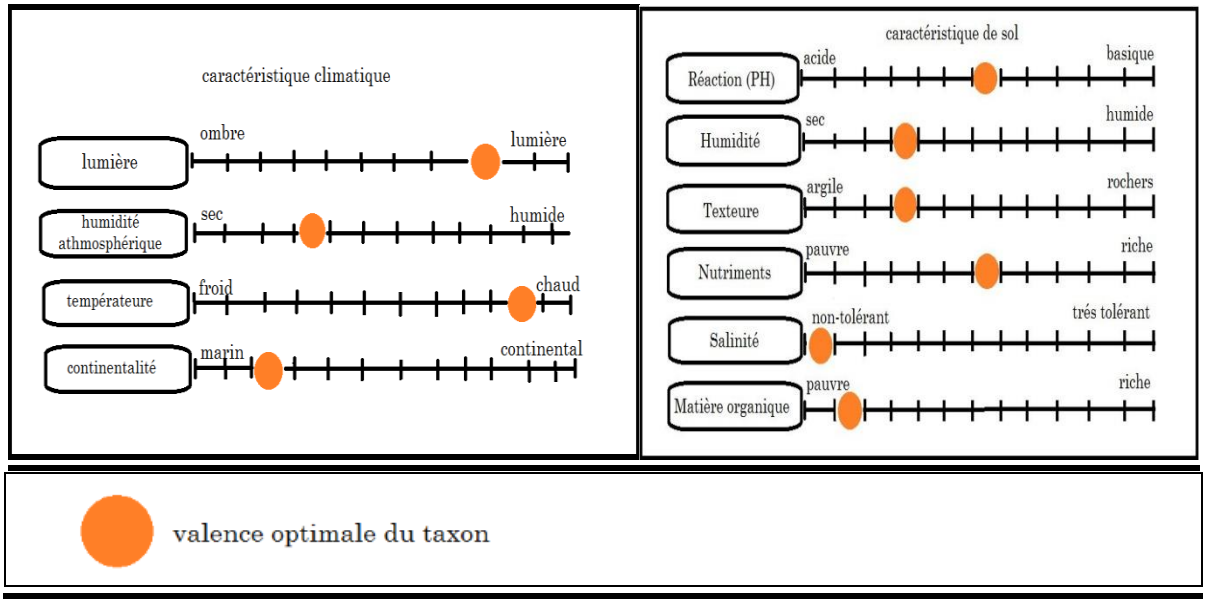


Figure 08: Exigence pédoclimatique du Pistacia lentiscus (TELA BOTANICA, 2014).

2-6. Substances utiles et effets thérapeutiques de *Pistacia lentiscus L*

Le lentisque est connu pour ses effets thérapeutiques, depuis l'antique on utilisant les feuilles, fruits et le mastic [65]. Il est employé en Orient par les dames dans de nombreuses formules

mystérieuses de baumes jadis réputés et autant qu'antiseptique pour la bonne protection des dents et de la cavité buccale [66].

En Algérie il a servi comme vulnéraire (ces feuilles sont mâchées puis appliquées sur les blessures sous l'effet cicatrisant), comme c'était appliqué contre les irritations et le ulcères de l'estomac [67]. La poudre ou décoction d'écorce et des feuilles pour guérir les troubles gastro-intestinaux et tenus pour durative et emménagogues.

L'huile extraite des fruits, servant de liniment en cas des douleurs dorsales. En Chine la résine est très appréciée où on la tient, en outre, pour astringente, carminative en cas de gonorrhée ou spermatorrhée, elle est aux vertus calmantes [48]. La résine de lentisque était utilisée en Egypte pour embaumer les morts [52]. Dans l'Est du bassin méditerranéen le "mastic" été utilisé pour fabriquer la colle du pansement [69].

2-7. Effet et usage médicinaux

Le lentisque a des principes actifs d'une grande importance, en effet il agit comme antiseptique, stimulant, hémostatique, expectorant et vulnéraire [52].

Leur huile essentielle contenue dans la résine à des propriétés anti-inflammatoire, sédatives, astringentes et antiseptique des muqueuses et surtout des voies respiratoires et urinaires, très utilisé pour fluidifier le catarrhe et pour combattre certain cas de mauvaise haleine. Il est employé en cas d'affection des voies urinaires, les calculeuses ou bien en cas des diarrhées ou même les dysenteries, c'est-à-dire comme astringent de l'intestin.

Les extraits de lentisque viennent aussi pour l'irrigation contre les leucorrhées et comme rivage et gargarismes contre l'affection de la cavité dentaire [53]. La résine de lentisque est appliquée sur les ulcères et les furoncles, elle est mélangée à d'autres composants, servent de pansement dentaire provisoire [52].

PARTIE II

MATERIELS ET METHODES

1- Le milieu d'étude

1-1. Présentation de la wilaya

La wilaya est située au Nord de l'Algérie, le chef lieu de la wilaya est située à 88 km à l'Ouest de la capitale, Alger. Elle s'étend sur une superficie de 8.775,65 Km². Situé au cœur de l'Atlas Tellien, la wilaya de Médéa est caractérisée par une altitude élevée et un relief mouvementé enserrant quelques plaines assez fertiles mais de faible extension pour s'estomper ensuite aux confins des hautes plaines steppiques, en une série de collines mollement ondulées. Une telle position stratégique a fait de Médéa une zone de transit principale et un trait d'union entre le Tel et le Sahara, d'une part, et entre les Hauts Plateaux de I'Est et ceux de I'Ouest, d'autre part [121].

La wilaya de Médéa est limitée par les wilayas suivantes : La Wilaya de Blida au Nord, La wilaya de Djelfa au Sud, Les Wilayas d'Ain Defla et Tissemsilt à l'Ouest et Les Wilayas de M'sila et Bouira à l'Est [121].

1-2. Présentation des milieux d'études

Le choix des stations d'études est orienté par la présence de *Pistachier lentisque* qui fait l'objet de notre étude, La consultation des travaux précédents, ainsi que selon l'altitude, le climat et la pollution. Nous avons donc choisi quatre stations: Oued harbil, EL Hamdania, Berrouaghia et Tamasguida.

1-2-1. Description des stations

Oued Harbil est située dans la daïra d'Ouamri, la wilaya de Médéa. Située à 6 km au sud-est d'Ouamri la plus grande ville des environs. Située à 400 mètres d'altitude, Caractérisée par un Climat méditerranéen avec été chaud *(Classification de Köppen : Csa)* [126].

El Hamdania est situé dans la daïra d'Ouzera, wilaya de Médéa.Le village s'étend sur 139 km².Situé à 560 mètres d'altitude, Caractérisée par un Climat méditerranéen avec été chaud *(Classification de Köppen : Csa)* [127].

Berrouaghia est située dans la daïra de Berrouaghia , la wilaya de Médéa. La ville s'étend sur 161,3 km, Se situe à 800 mètres d'altitude n'accueille aucune réserve naturelle sur son territoire. Caractérisée par un Climat méditerranéen avec été chaud *(Classification de Köppen : Csa)* [127].

Tamezguida est située dans la daïra de Médéa et la wilaya de Médéa. La ville s'étend sur 99 km². Située à 1000 mètres d'altitude, Caractérisée par un Climat méditerranéen avec été chaud *(Classification de Köppen : Csa)* [128].

1-2-2. Les sites d'échantillonnage

Les échantillons ont été prélevés dans différents lieux de la Wilaya de Médéa : Oued harbil,EL Hamdania, Berrouaghia et Tamezghida, effectuées le mois de février 2017. Ces régions ont été choisies selon leur altitude, et leurs proximités géographiques à fin de mieux cibler le facteur altitudinal.

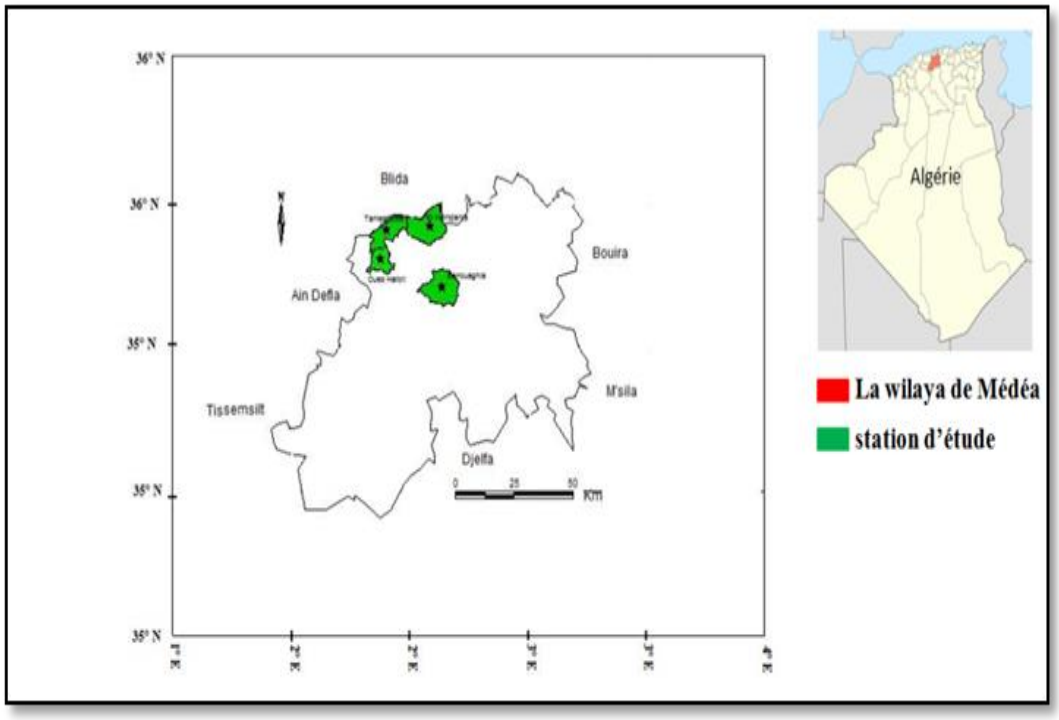


Figure 09: Carte géographique de la wilaya de Médéa avec les stations d'études. (MapInfo)

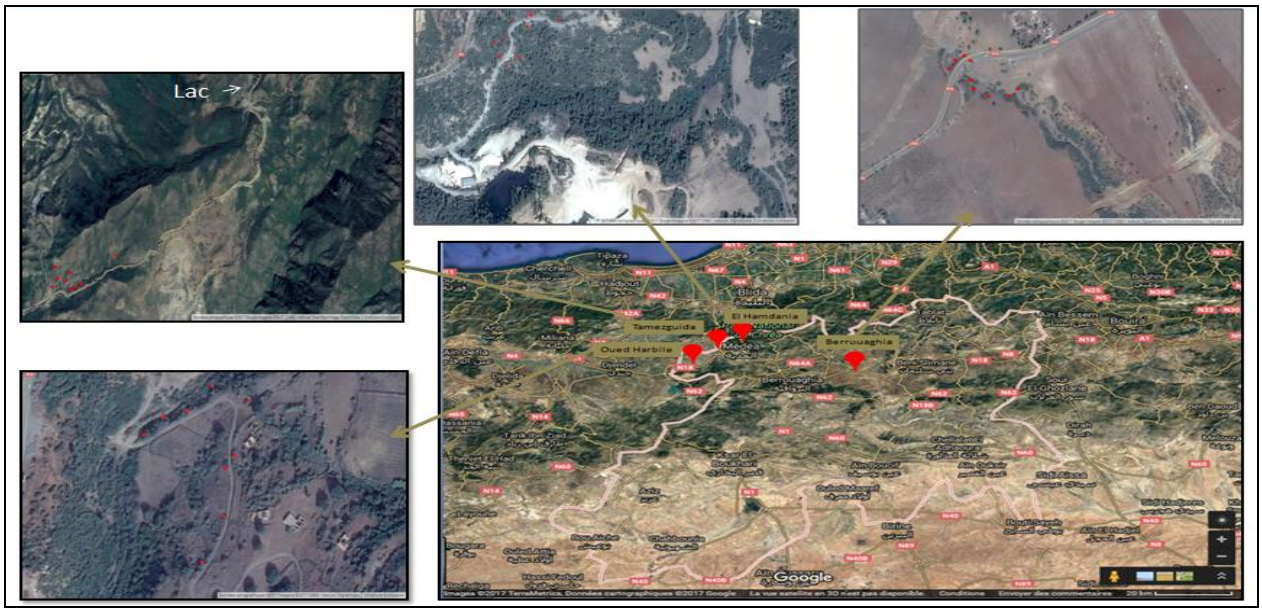


Figure 10: Image satellitaires des zones d'études. (Google earh, 2017)

1-3. Prélèvement des échantillons

Les prélèvements de 27 feuilles du *pistachier lentisque* ont été effectués aléatoirement sur 9 arbres d'âges et de sexes différents. Les feuilles ont été prélevées tout autour de l'arbre et à différentes hauteurs. Les sujets échantillonnés sont sains et à l'état frais, les feuilles ont été mises dans des sacs en papier et transportées ensuite dans une glacière au laboratoire, a fin d'éviter la contamination des feuilles qui entraine la prolifération des souches pathogènes, nous ne n'avons pas dépassé 24h à 36h entre la cueillette des feuilles et la mise en culture au laboratoire.



Figure 11 : Photos des arbres d'échantillonnage de la station d'Oued Harbil.

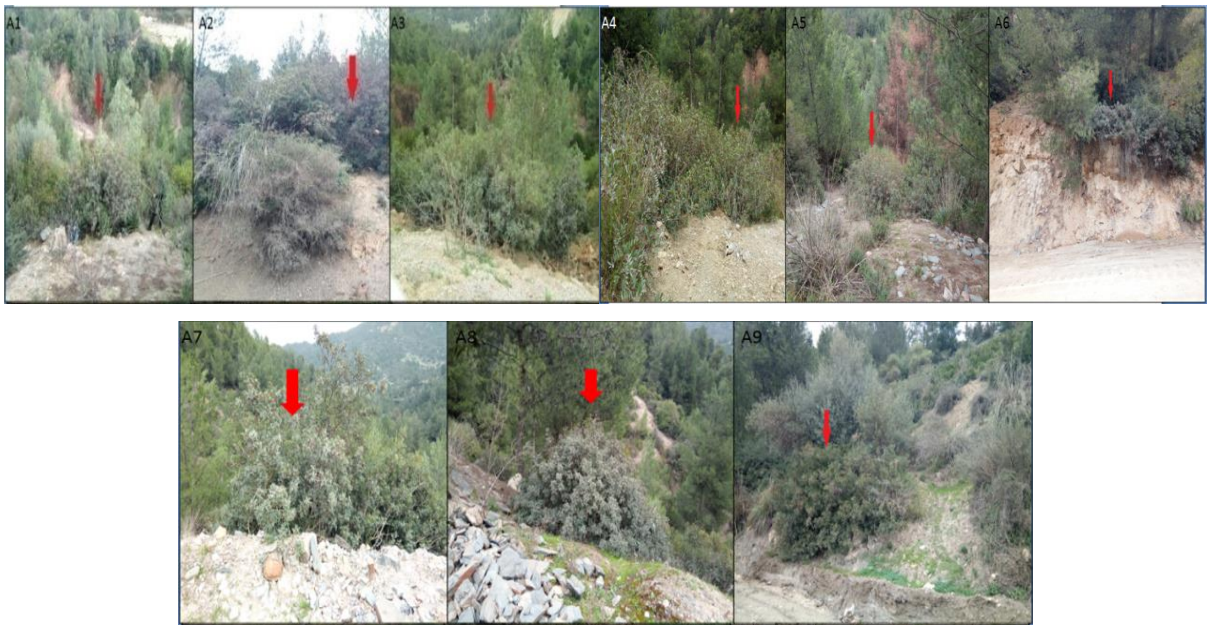


Figure 12 : Photos des arbres d'échantillonnage de la station EL Hamdania.

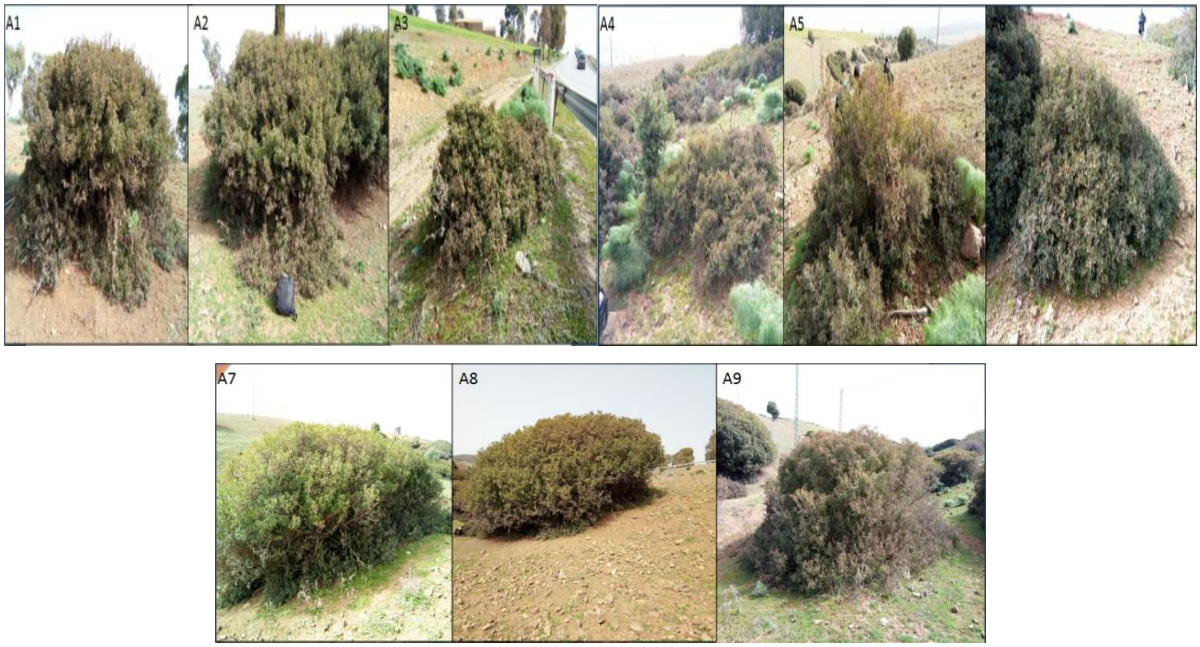


Figure 13 : Photos des arbres d'échantillonnage de la station de Berrouaghia.

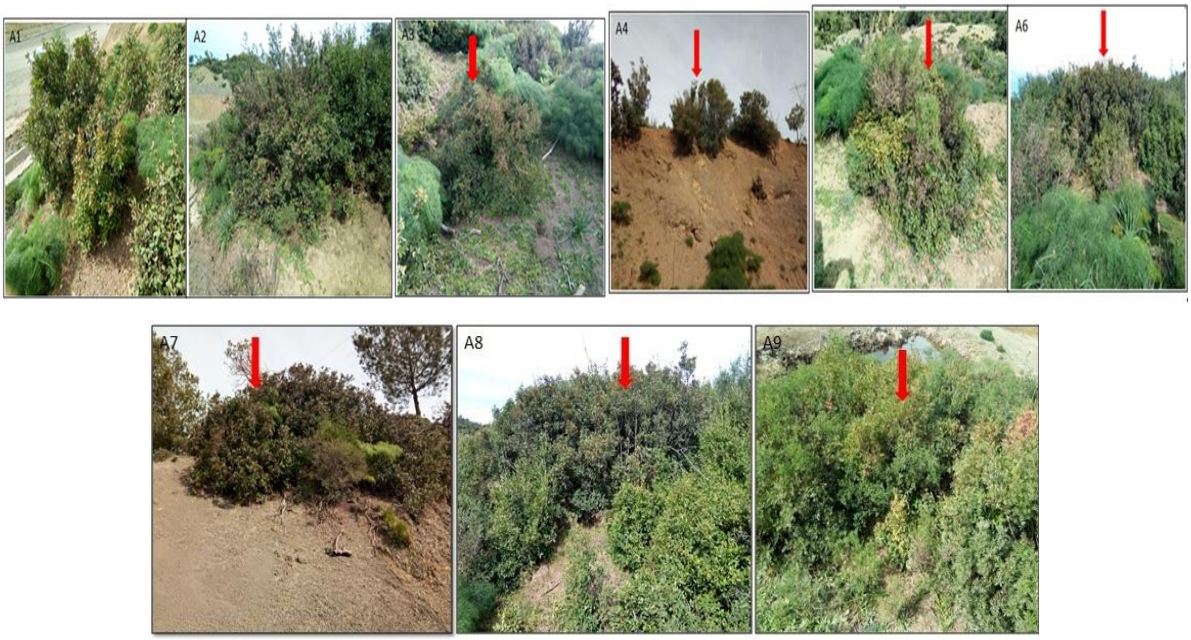


Figure 14 : Photos des arbres d'échantillonnage de la station de Tamezghida.

Tableau 01 : Les caractéristiques des stations d'études.

Les stations	Altitude (m)	Les coordonnés géographique	Les espèces entourant les arbres d'échantillonnages.	Caractères étudié
Oued Harbil	400	36.35276801N 2.711368560E	▪ Hyphaene ▪ Pistachier Atlantica ▪ Olea Oleaster ▪ Crataegus	▪ Zone non pollué. ▪ L'existence d'une vallée permanente. ▪ Une zone rurale, L'absence des populations et les routes.
El Hamdania	560	36.2991907N 2.78579592E	▪ Calicatame Villosa ▪ Juniperus Oxycedrus ▪ Olea Oleaster ▪ Pin d'Alep ▪ Brucaria	▪ Zone pollué. ▪ Zone qui se trouve a proximité de la route nationale N°01 ▪ Zone à proximité de la plâtrière.
Berrouaghia	800	36.1692429N 2.99376904E	▪ Pin d'Alp ▪ Eucalyptus ▪ Cyprès ▪ Genévrier Oxycédre	▪ Zone pollué. ▪ A côté de la route. La présence de la mobilité permanente
Tamazgida	1000	36.3612584N 2.69450426E	Une forêt de Chêne Séculaire. Composées de ▪ Chêne à Gland. ▪ Chêne liège. ▪ Chêne Vert.	▪ Zone non pollué. ▪ Zone humide protégée. ▪ La présence d'un

			▪ Erable Champêtre. ▪ Orme.	lac qui s'étend sur une superficie de 0,70 ha.

1-4. Mesures biométriques

Une caractérisation par des mesures biométriques a été réalisée : La surface foliaire a été calculée par le logiciel MESURIM. (Annexe). La surface foliaire par plante est un critère particulièrement pertinent pour expliquer les variations de composition microbiennes de la phyllosphère en liaison avec les conditions climatiques.

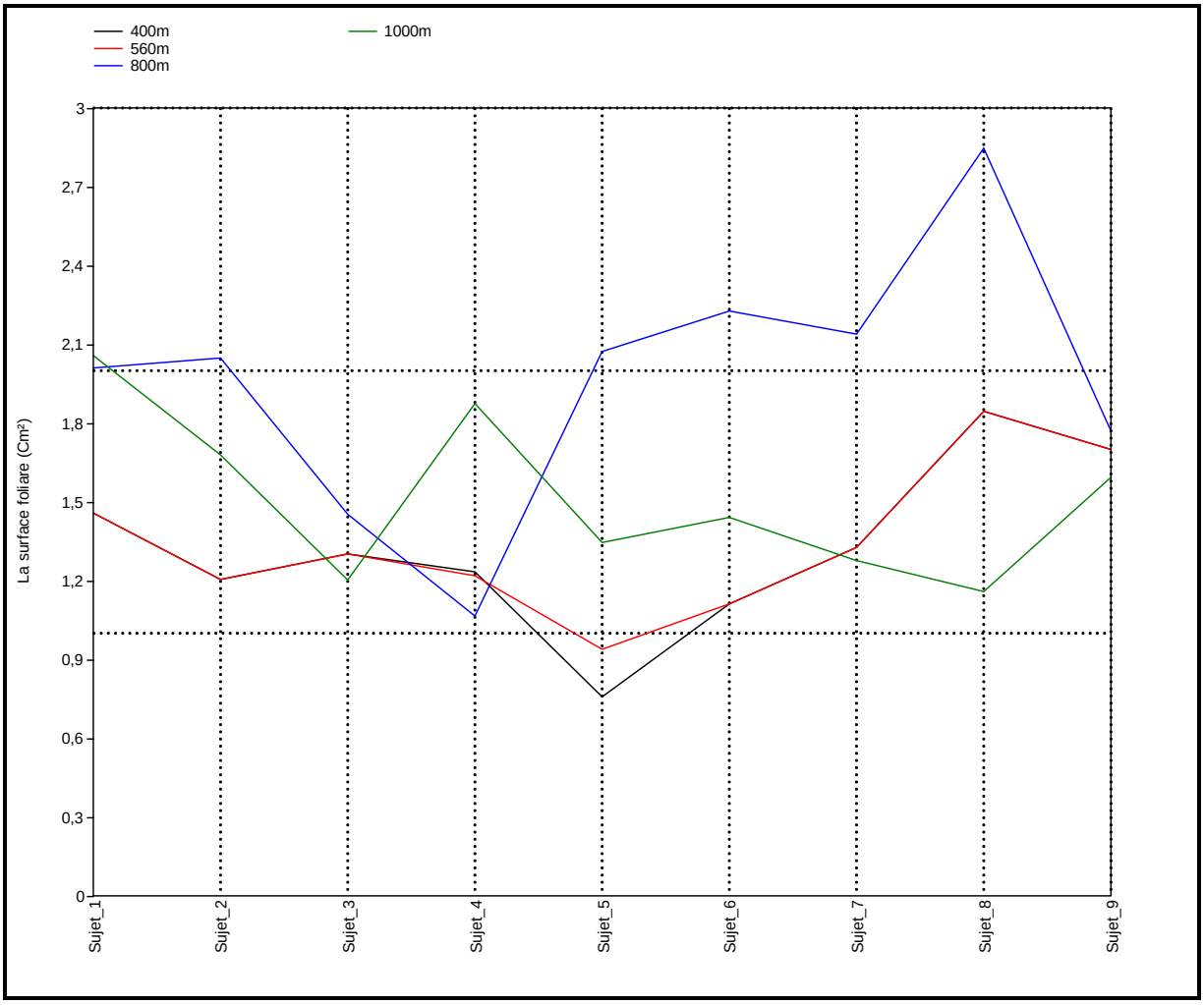


Figure 15 : les surfaces foliaires des feuilles des quatre stations d'étude.

1-5. Le climat

Le climat est un facteur déterminant de premier ordre pour une approche du milieu. C'est un ensemble de phénomènes météorologiques qui sont principalement la température, les précipitations et les vents. Le climat se place en amont de toute étude relative au fonctionnement des écosystèmes écologiques [77]. Il s'agit de mettre en évidence les relations qui existent entre la végétation et les facteurs climatiques.

Les facteurs climatiques d'un milieu agissent directement sur la composition microbienne de la phyllosphère ou indirectement sur la transmission microbienne, par la température, la pluviosité, l'humidité, le vent et gelée qui sont capable d'influencer la diversité microbienne de la phyllosphère. Le climat à Médéa (Algérie) se distingue par des caractéristiques dues à sa position sur les monts de I'Atlas tellien, de type méditerranéen caractérisé par un photopériodisme à la fois quotidien et saisonnier, par l'existence des saisons thermiques nettement tranchées et par des précipitations concentrées pendant la saison froide.

Par manque de données la station météorologique de la zone en question, la station de la wilaya de Médéa (ONM), a été choisie comme station de référence, ceci grâce à la disponibilité des données (données complètes et longue période), ces caractéristiques sont les suivantes :

Tableau 02 : Les données géographique la station de référence.

Station ONM	Latitude (X)	Longitude (Y)	Altitude (m)
AIN ARAYES	36.28119480	2.73190498	1045

Afin d'obtenir des données climatiques précises pour chaque station choisis nous avons apporté des corrections, pour cela on utilise un Gradient altitudinal pluviométrique Seltzer 1946 [75] de l'ordre de 40mm/100m pour l'ensemble de l'Algérie septentrionale. Et d'autres part, un gradient altitudinal thermique SELTZER qui est également un gradient pour M et m qui est de l'ordre de : (- 0.4 °C /100 m) pour m et (- 0.7 °C/100 m) pour M.

1-5-1. La température

La température joue un rôle important dans la vie et le développement de la végétation et la diversité microbiennes de la phyllosphère, principalement par deux paramètres : la température minimale du mois le plus froid et la température maximale du mois le plus chaud.

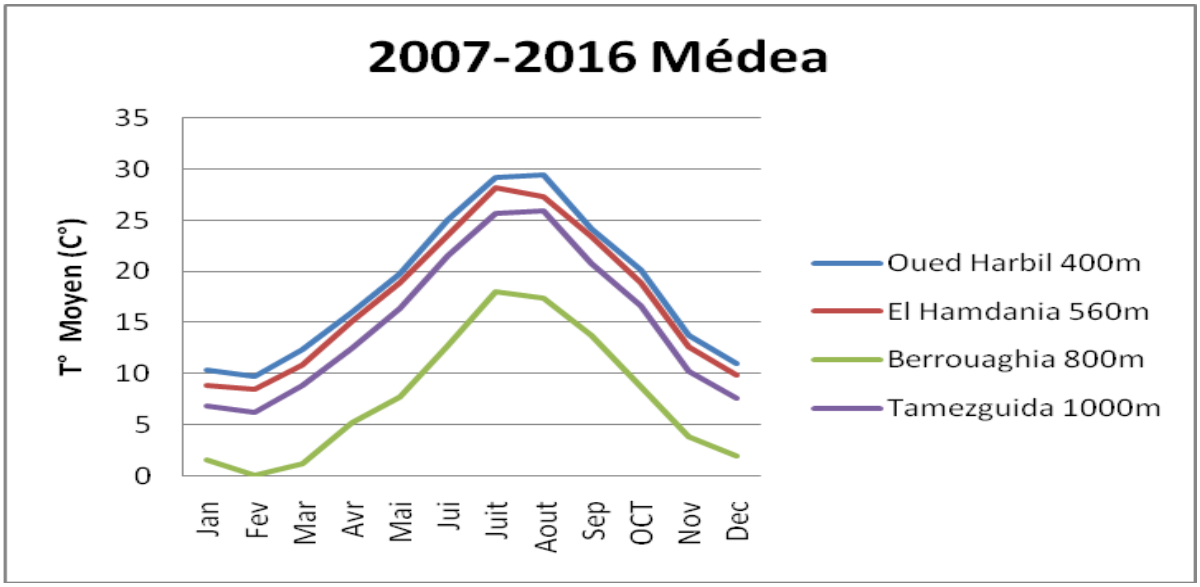


Figure 16 : Moyenne mensuelle des températures moyennes des quatre stations d'étude.

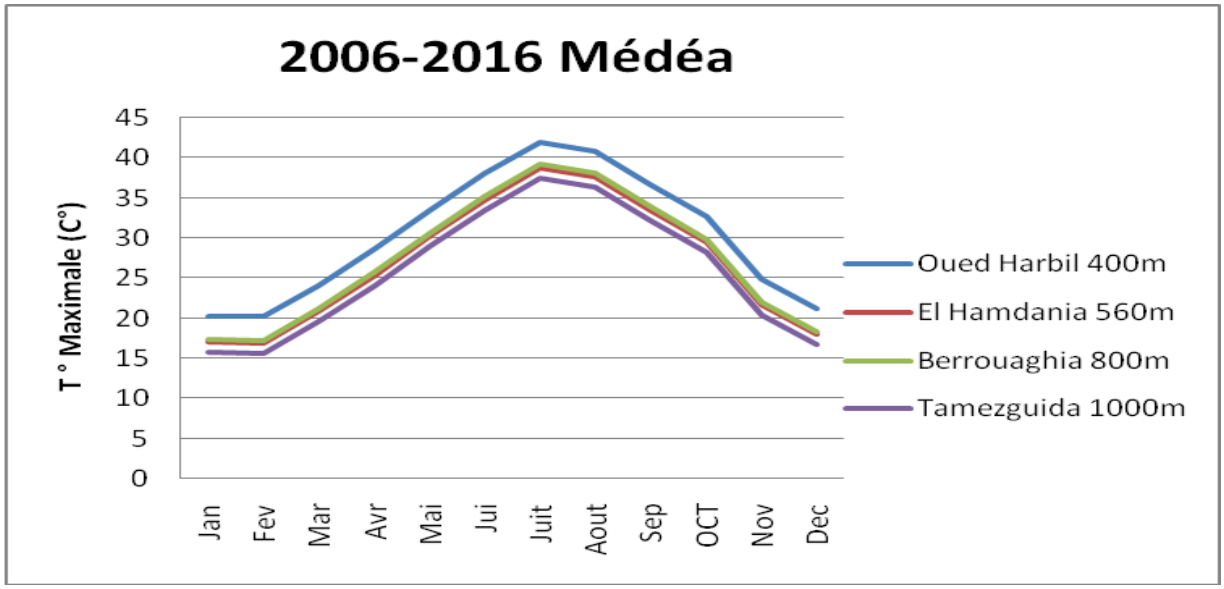


Figure 17 : Moyenne mensuelle des températures maximales des quatre stations d'étude.

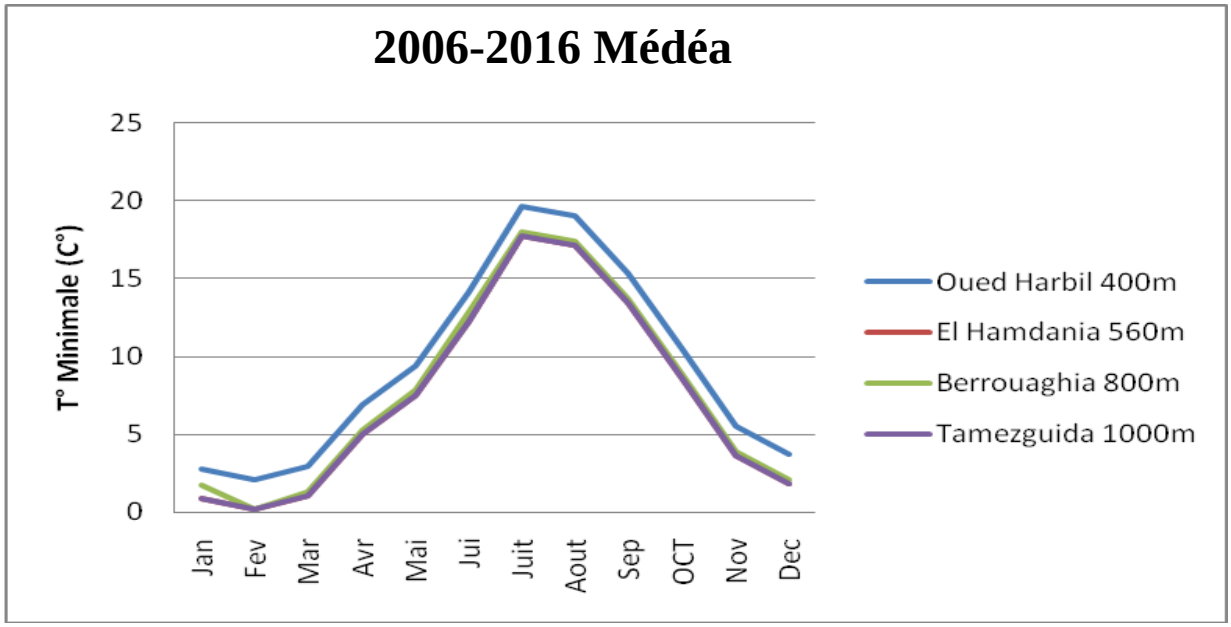


Figure 18 : Moyenne mensuelle des températures minimale des quatre stations d'étude.

L'été se caractérise par de très haute températures, entrainant ainsi une aridité assez forte et plus partiellement un épuisement des réserver utiles. L'hiver est par contre, humide et froid. Le mois le plus chaud de l'année est le mois d'aout, avec une moyenne de 41.94 C° pour Oued Harbil , 41.94C° pour El-Hamdania, 39.14C° pour Berrouaghia et 38C° pour la station Tamezghida , alors que le mois le plus froid est le mois de février avec une moyenne de 2.06C° à Oued Harbil, 2.06C° au niveau de El-Hamdania, 0.16C° à Berrouaghia et – 0.5 C° dans la station Tamezghida.

1-5-2. Pluviométrie

C'est un facteur climatique important dans la dynamique et transfert des microorganismes de la phyllosphère. Les résultats des précipitations mensuelles moyennes sont présentés dans la figure (19).

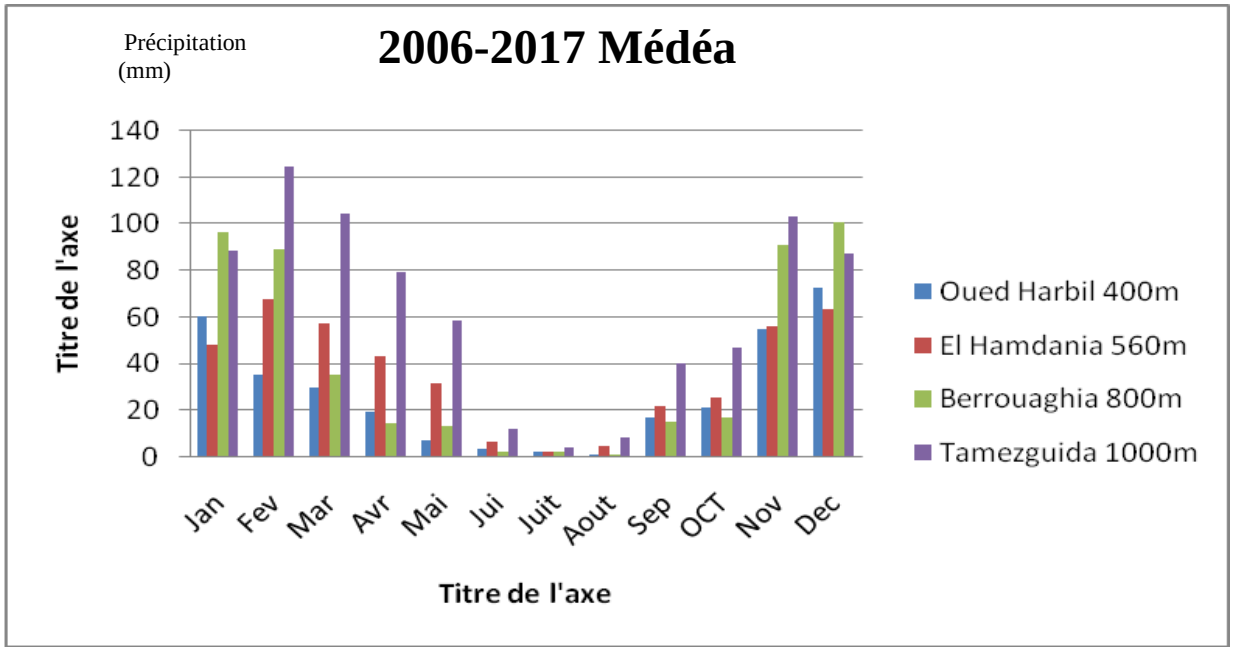


Figure19 : Moyennes mensuelle des précipitations des quatre stations d'étude.

L'étude de la figure (19) des précipitations met en évidence l'irrégularité de la répartition des précipitations au niveau des quatre stations. D'abord, On remarque une nette diminution de la quantité des pluies durant la période estivale, qui oscille entre 1 à 2mm (El Hamdania et Oued Harbil) ,7 à 3mm (Berrouagia), et 17 à 7mm(Tamezghida). La période la moins arrosée s'étale de Juin à Août pour les quatre stations, et nous pouvons constater que le mois le plus pluvieux est celui de Février pour la station de Berrouagia (68.10mm), le mois et enfin le mois février est le mois le moins arrosé pour la station Tamazghida dont la pluviosité dépassée (125 mm).

1-5-3. L'humidité

D'après Stray1970 [76], l'humidité relative est extrêmement liée aux températures. Cet auteur ajoute qu'une faible humidité associée à des températures élevées, affectent considérablement la vie des microbiotes et leur succès reproductif.

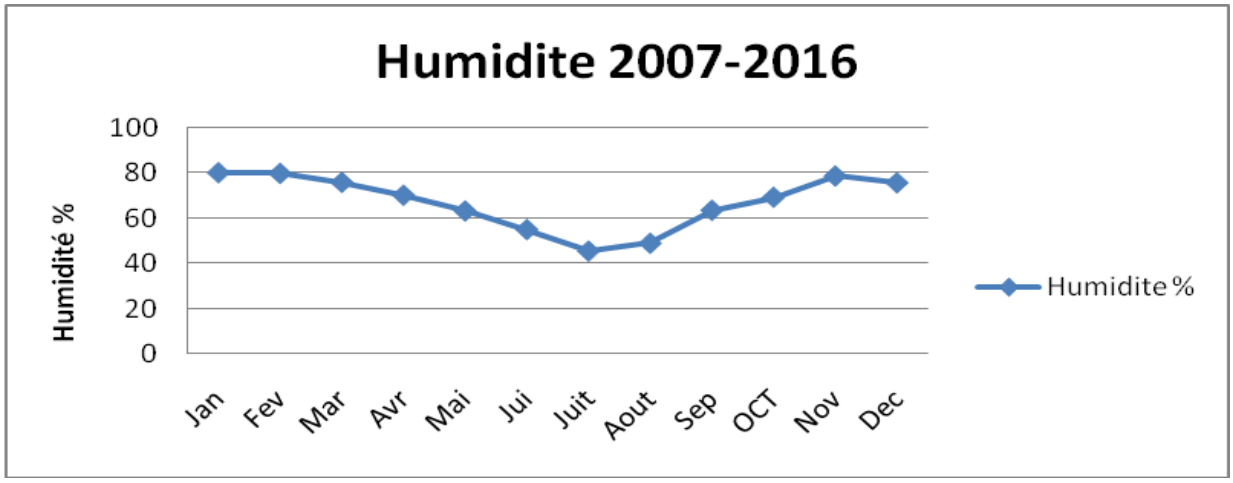


Figure 20: Moyennes mensuelles du taux d'humidité relative.

L'humidité est supérieure à 60 % sur les 9 mois de l'année et ceux à partir du mois de novembre. Le maximum est enregistré en saison hivernale avec 79% alors que le minimum est de 45.7%, observé en été au mois juillet.

1-5-4. Le vent

Le vent est un des éléments météorologiques caractérisant le climat. Son influence dépend dans une large mesure des particularités du relief et du degré de recouvrement des terrains. Cependant le vent exerce une influence importante sur l'évaporation du sol d'où sur la croissance de la végétation dans toute sa variété et particulièrement sur la transmission des microorganismes de la phylosphère. Les vents soufflent fréquemment dans des directions instables et à différentes intensités en fonction des saisons.

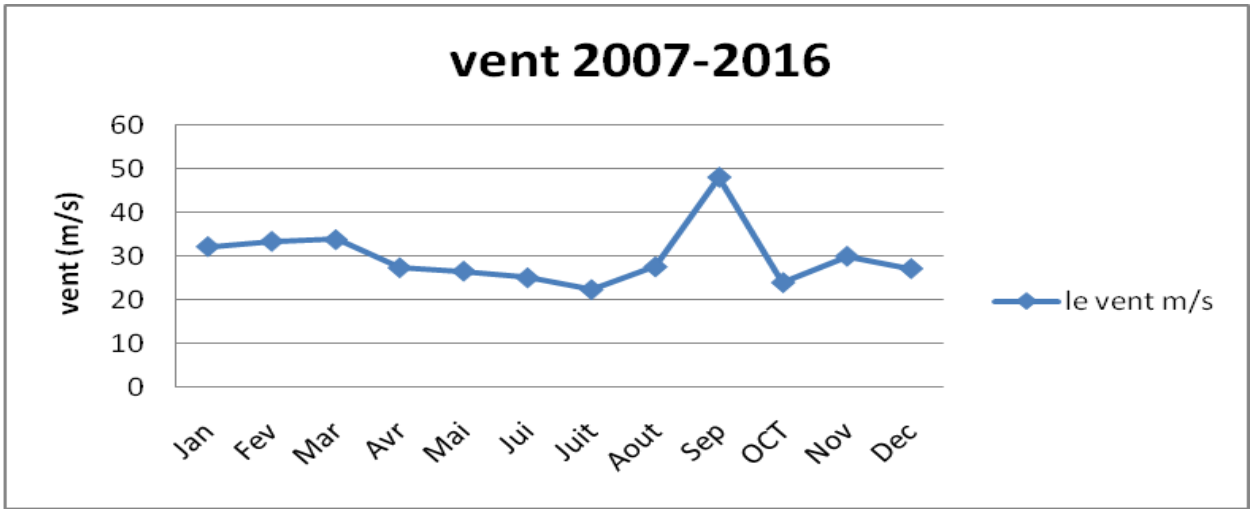


Figure 21 : Moyennes mensuelles de la vitesse des vents.

La répartition spatiale de la vitesse annuelle du vent (Figure 21) montre, d'une manière générale, que le vent le plus faible est observé au cours de la période estivale, en particulier, pendant le mois d'Avril, Mai, Juin, Juillet et Aout. Le vent le plus fort se manifeste pendant la période d'automne, particulièrement, au mois de Septembre.

1-5-5. Gelées

Elles sont fortement influencées par l'altitude, et considéré comme facteur limitant de la présence et l'absence de microorganismes de la phyllosphère.

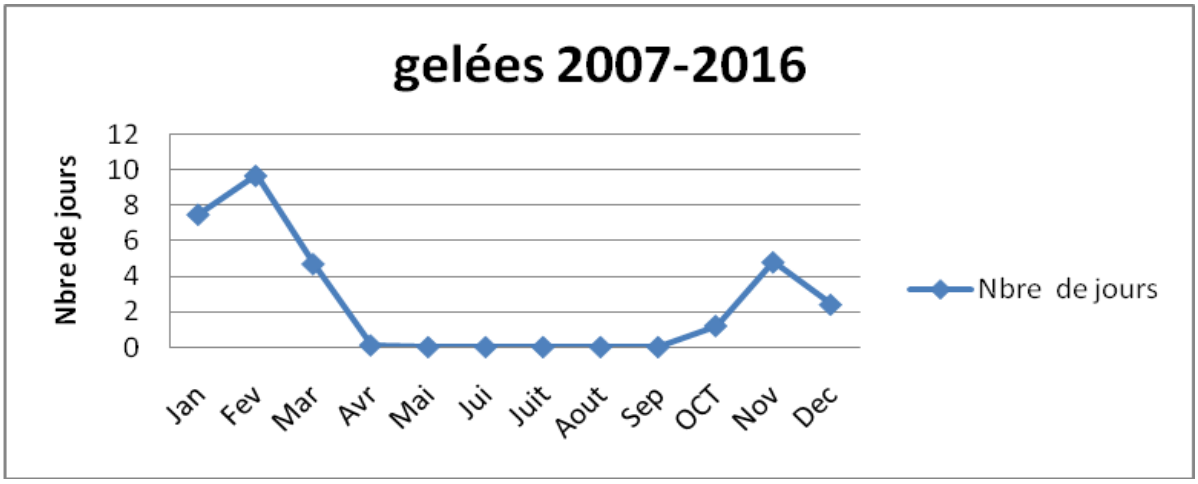


Figure 22: Moyennes mensuelles de nombre de jours de gelées.

La figure (22) montre que le nombre moyen de jours de gelées est de 2.4 jours/ an. La période d'hiver enregistre 80 % des gelées annuelles. Le maximum de gelées est enregistré durant les mois de Février (9.7) et de janvier (7.5).

1-6. Synthèse climatique

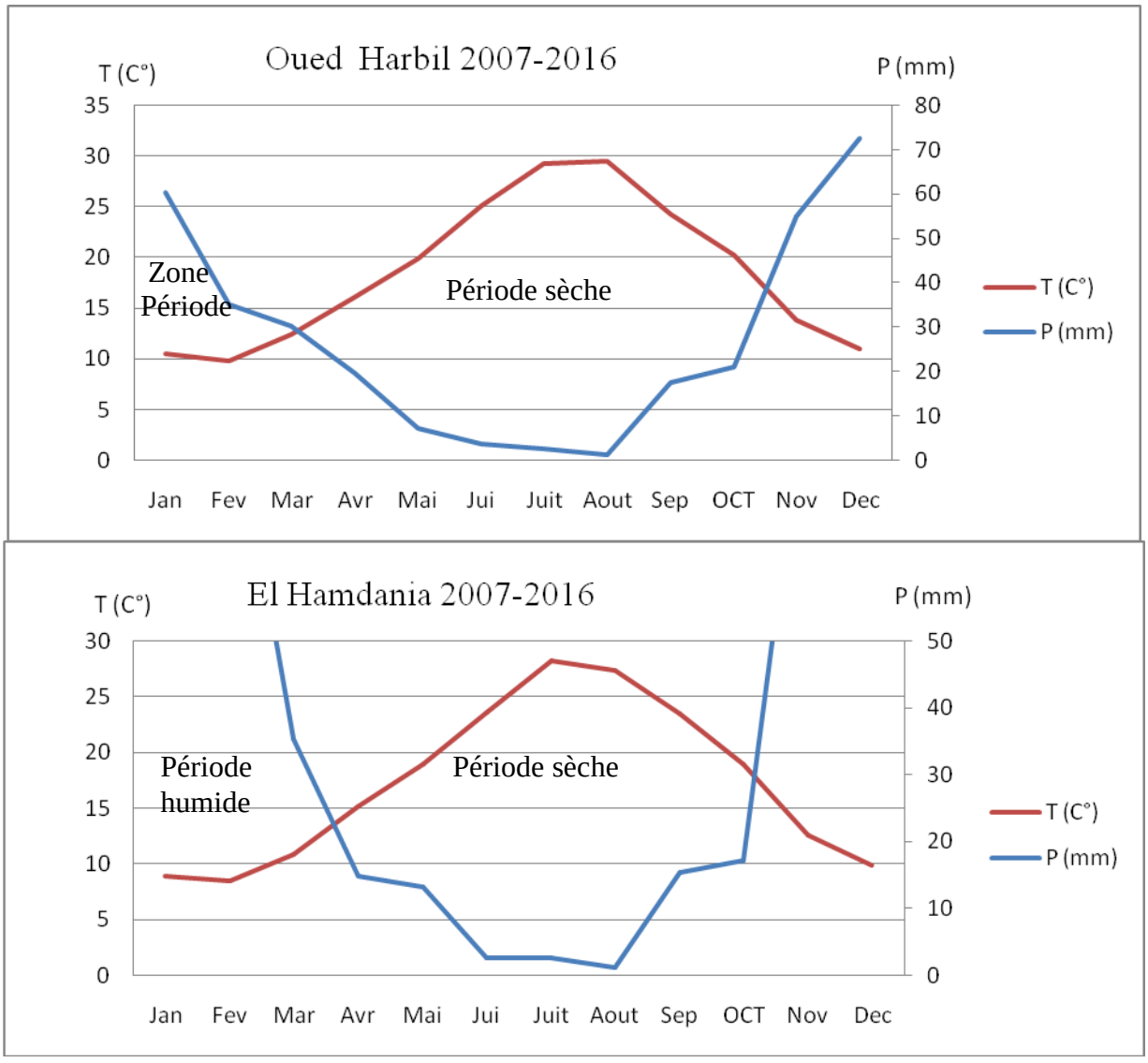
Pour rendre les données climatiques ci-dessus plus significatives plusieurs auteurs ont proposé des indices climatiques qui sont des combinaisons des moyennes des différentes composantes du climat notamment la température et les précipitations. Cette synthèse met en évidence les différentes caractéristiques du climat méditerranéen. En effet ce dernier est caractérisé par un hiver modéré et un été relativement sec et chaud. Cette différence chronologique entre l'alimentation en eau par les précipitations et la température est responsable de la période sèche de ce type de climat. Ce décalage est souvent dénommé Xérotherme, ce qui signifie long et sec.

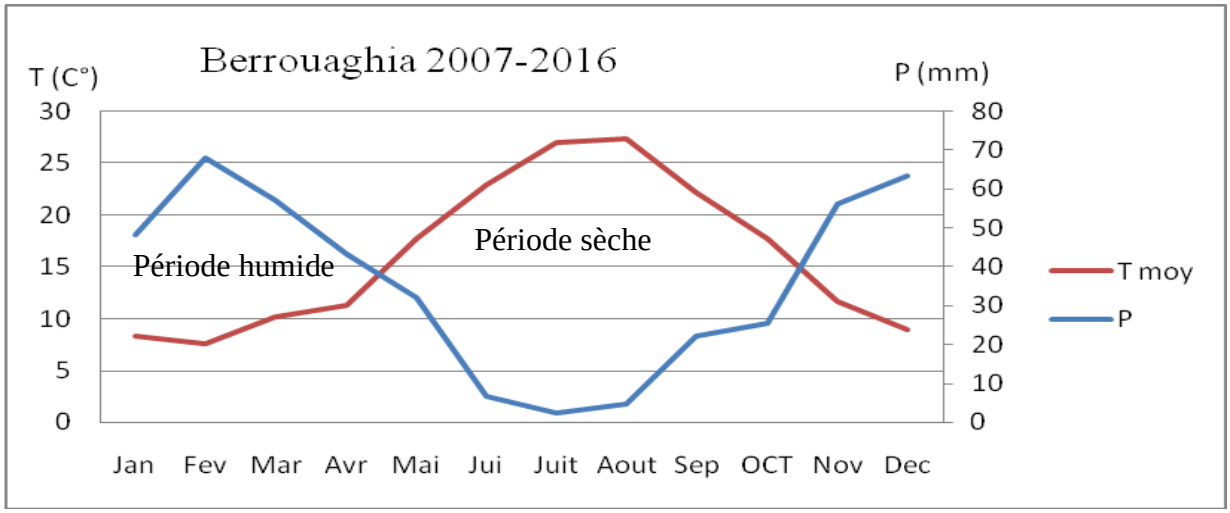
La réalisation du diagramme ombrothermique de BAGNOULS et GAUSSEN et du climagramme pluviométrique d'Emberger. EMBERGER, (1955) et BAGNOULS & GAUSSEN, (1953) [77] , dans le quelle ils ont combiné les différents paramètres climatiques afin de

déterminer l'impact du climat sur la végétation et leur composition et donc particulièrement sur la phyllosphère des feuilles de pistachier lentisque.

1-6-1. Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gaussen[77]

La représentation de ce diagramme (figure 23) consiste à porter sur le même graphique les variations des températures et les précipitations portées sur deux axes parallèles en fonction du temps.





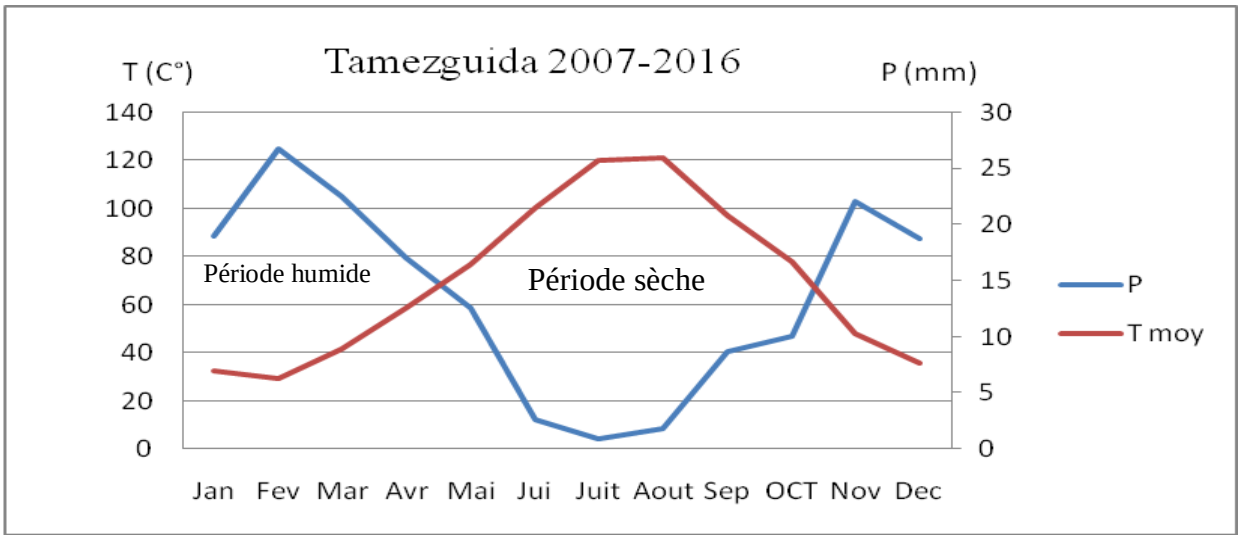


Figure 23 : Diagrammes ombrothermique des quatre stations d'étude.

L'examen de la figure (23) qui représente les diagrammes ombrothermique de 10 ans (2007-2016) des quatre stations d'étude, montre que les différents diagrammes permettent de visualiser deux périodes humides et une autre période sèche selon les différents paramètres, précipitations et température.

La station Oued Harbil, elle passe par deux périodes humides la première s'étend du mois de janvier jusqu'à la fin du mois de Mars et la seconde débute du mois de novembre jusqu'au mois de décembre. On note aussi la présence d'une période sèche qui s'étale du mois de Mai jusqu'au mois de septembre. Les minimax absolus sont d'ordre de 2.75C°, le mois le plus arrosé est le mois de Décembre (72.57mm), les maxima absolus sont d'ordre de 20.21C°, le mois le plus sec est le mois de Aout (1.24mm).

En ce qui concerne la station El Hamdania on constate la présence de deux périodes humides, la première s'étend du mois de janvier jusqu'à la fin du mois de Mars et la deuxième du début du mois de novembre jusqu'au mois de décembre. On note aussi la présence d'une période sèche qui dure depuis le mois de Mai jusqu'au mois de septembre. Les minimax absolus sont d'ordre de 0.87 C°, le mois le plus arrosé est le mois de Décembre (100,57mm), les maxima absolus sont d'ordre de 17C°, le mois le plus sec est le mois de Aout (1,24mm).

La station Berrouaghia passe par la première période humide qui s'étale de janvier jusqu'à Avril et la deuxième de Novembre à décembre. La troisième période est la période sèche qui débute au mois d'Avril et se termine au mois de Novembre. En général, durant la saison froide elle s'échelonne sur plus de six mois (Novembre jusqu'à fin Avril), les minimax absolus sont d'ordre de 7.5C°, le mois le plus arrosé est le mois de Février (68mm). Et les maxima absolus sont d'ordre de 27C°, le mois le plus sec est le mois de Juillet (5mm)

Et enfin la station Tamezguida passe par la première période humide qui s'étale de janvier jusqu'à Mai et la deuxième de fin Septembre à décembre. La troisième période est la période sèche qui débute au mois d'Mai et se termine au mois de Septembre. Les minimax absolus sont d'ordre de 6C°, le mois le plus arrosé est le mois de Février (125mm), les maxima absolus sont d'ordre de 27C°, le mois le plus sec est le mois de Juillet (3mm).

Par conséquent ce diagramme climatique montre ainsi la durée de la période favorable et défavorable à la croissance de Pistachier lentisque et donc présente une signification de la diversité et la dynamique de microorganismes de la phyllosphère.

1-6-2. Le Quotient pluviothermique d'Emberger (1955) [78]

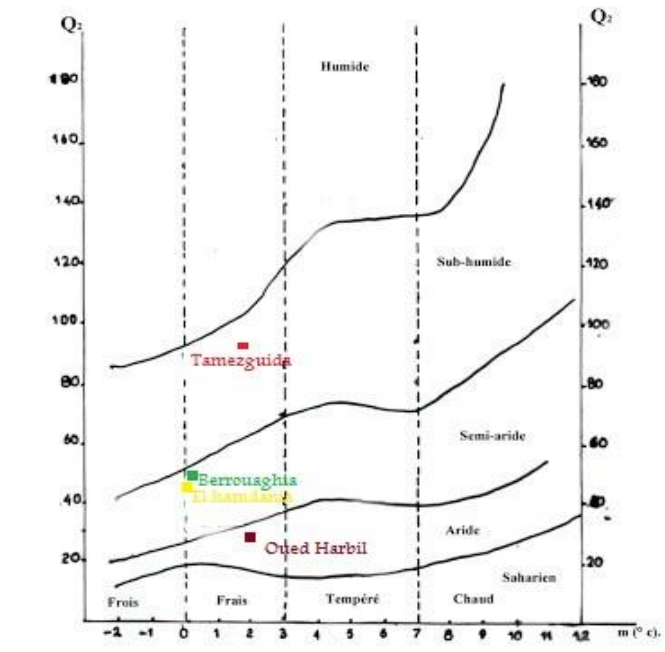


Figure 24 : Climagramme du quotient pluviothermique d'Emberger.

L’étude bioclimatique entreprise auparavant montre bien qu’il y a des différences climatiques entre les stations étudiées ; ces différences s’observent au niveau des deux facteurs climatiques qui sont les précipitations et la température. Après cette étude qui est axée sur la variabilité de chaque paramètre climatique au sein de ces stations, Nous avons constaté qu’il y a une légère différence entre les stations étudiés.

Les régions d’études ont un climat méditerranéen avec un étage bioclimatique comme suit:

La station de Oued Harbil se localise dans l’aride avec un Q2 de 26.82, la température minimale moyenne du mois le plus froid 2.06°C.

La station de Berrouaghia se localise dans le semi aride avec un Q2 de 46, la température minimale moyenne du mois le plus froid 0.16°C.

La station d’El hamdania se localise également dans le semi aride avec un Q2 de 43. 71, de la température minimale moyenne du mois le plus froid 0.18°C.

La station de Tamezguida se trouve dans le sub humide avec un Q2 de 93, la température minimale moyenne du mois le plus froid varie 0.17°C.

2- Isolement et identification des microorganismes

L'intégralité de ce travail a été réalisée au niveau du laboratoire de la Faculté des sciences de l'Université de Médéa, durant la période Mars de l'année 2017. Les objectifs de cette étude s'articulent autour des points suivants :

Isolement et identification des bactéries inconnues à partir des deux cotés de feuilles de pistachier lentisque afin de caractérisé la diversité des bactéries selon l'élévation. Etude macroscopique, microscopique et biochimique des souches.

2-1. Calcule de la surface foliaire

Nous avons fait le calcule de la surface foliaire de toutes les feuilles récoltées grâce au logiciel **Mesurim**, on a d'abord pris les feuilles en photo sur une surface blanche, ensuite en l'a transféré sur le logiciel qui calcule la surface de tout objet sans forme géométrique précise, ces calcules nous ont permis de faire une comparaison entre les feuilles des différentes stations.

2-2. Préparations des feuilles et mise en culture des microorganismes

Les boites des du milieu de gélose nutritive et ont été préalablement préparées en coulant entre 15 et 20ml de milieu de culture fondu au bain marie et conservé au réfrigérateur dans une période n'excédant pas une semaine pour éviter les contaminations.

2-2-1. Matériels pour mise en culture

Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants :

- Les colorants : Violet de Gentiane, fuschine, cristal violet, bleu de méthylène ;
- Les réactifs : Le réactif de Tashiro, réactif de Vogues Proskaeur (VPI et VPII), réactif de Kovacks, réactif de Bradford, TDA, James, Nit 1, Nit 2, Zym 1, Zym 2.
- Alcool et autres : Ethanol, lugol, eau oxygénée, sulfate de potassium, Sulfate de cuivre, caséine, acides aminés (tyrosine, D-L phénylalanine, leucine, cystéine, glycine), sucres (glucose, galactose, lactose, xylose, arabinose, saccharose, tréhalose, adonitol, tergitol, inositol, raffinose, sorbose, mannose, cellobiose et dextrine), trypsine, albumine sérique bovine (BSA).

Les milieux d'isolement nécessitent des milieux gélosés (La composition des milieux de cultures utilisés figure dans l'annexe), contenant de nombreux facteurs de croissance. Il est important de toujours utiliser des milieux fraîchement préparés et conservés en aérobiose avant leur utilisation.

2-2-2. **Méthode d'isolement**

Les techniques de culture sont nombreuses, Parmi les techniques fréquemment employées, on trouve l'ensemencement d'une souche sur boîte de Pétri: Il s'agit de placer des bactéries à la surface ou à l'intérieur d'une gélose. L'opération a été réalisée dans des conditions d'asepsie totale (bec Bunsen, pince flambée). La feuille est étalé puis tapoter sur boite de Pétri contenant un milieu gélose (annexe), le tapotage se fait des deux cotés de la feuille, donc pour chaque feuille on obtient deux boites de pétri pour chaque surface, cela est très important pour étudier l'éventuel possibilité qu'il y est une déférence entres les microorganismes des deux surfaces. Les boites sont ensuite misent à incubation dans une étuve, à 37 °C pendant 5 jours pour les bactéries. L'étape suivante consister a sélectionné les souches les plus représentatives pour procéder à leur purification par un repiquage sur milieu Gélosé. Chaque colonie choisie a été prélevée, et ensemencée, puis incubée à 37 °C pendant 24H. L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser sur une boite de milieu Gélosé. Méthode de nevot :

- Prélever à l'aide de l'anse de platine une fraction de l'inoculum
- Ensemencer par stries fines et très serrées le premier demi- cercle puis flamber l'anse de platine, laisser refroidir
- Ensemencer le deuxième demi- cercle
- Flamber l'anse de platine
- Ensemencer le troisième demi-cercle.

Et enfin la conservation de toutes les souches utilisées se fait au congélateur à une température de – 80°C pour les bactéries.

2-2-3.Caractères morphologiques

L'identification des souches isolées est réalisée selon les techniques décrites par GUIRAUD et GALZY et al, 1980 [68].

2-2-3-1. Examen macroscopique

Il consiste à décrire les colonies obtenues après croissance des souches bactérienne sur le milieu Gélose, suite à une incubation de 5 jours à 37°C pendant 24 à 48 h, on se base sur les critères suivants : la taille, La forme, la pigmentation, le contour, l'aspect…

2-2-3-2. Examen microscopique

L'examen microscopique est révélé par le corps bactérien (La morphologie, l'arrangement cellulaire), La mobilité de la souche qui été vérifiée par un été frais sur des cultures jeunes et une coloration de Gram.

2-2-3-2-a. Observation à l'état frais

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme, bien que ce renseignement soit plus accessible sur des frottis colorés. Si la bactérie est sporulée, l'état frais permet également de mettre ce phénomène en évidence. Pour observer la mobilité, on doit prendre garde à ne pas détruire les flagelles bactériens lors du prélèvement et de la préparation de la lame. L'observation à l'état frais a été effectuée selon les étapes suivantes : une petite goutte d'eau stérile a été disposée sur la lame, puis une fraction de colonies sur gélose a été prélevée pour faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum et en remuant très délicatement (afin de ne pas casser les flagelles) et enfin la lame a été recouverte par une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air. L'observation à l'état frais à objectif 40 nous a permis de visualiser, des bactéries qui sont considérées comme mobiles (lorsque des trajets très différents sont observés) et des bactéries immobile (animée de mouvements d'agitation normaux dits mouvements browniens : agitation moléculaire, qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité).

2-2-3-2-b. Coloration de Gram :

Cette technique permet de faire la différentiation entre les bactéries Gram positives et Gram négatives et renseigne sur la forme et la disposition des bactéries. La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode classique décrite par Gram (1884), et c'est la méthode la plus utilisée dans l'étude et la classification des bactéries en fonction de la composition de leur paroi. La coloration de Gram a été effectuée selon les étapes suivantes : Une colonie a été prélevée à partir d'une culture sur boite et étalée sur une lame de verre. La lame a ensuite été séchée à l'air libre, passée à la flamme afin de fixer l'échantillon puis laissée refroidir à l'air libre. Après fixation, la lame a été posée sur un porte-objet et colorée avec le violet cristallisé pendant 1 min avant d'être rincée à lugol. Recouverte avec du lugol pendant 1 min, la préparation a ensuite été rincée à l'eau distillée pendant environ 5s. La lame ainsi rincée, a été soumise à une décoloration à l'éthanol pendant environ 15s jusqu'à ce que l'étalement ait pris une couleur gris-bleu puis rincée à l'eau distillée pendant environ 5s avant d'être colorée à la safranine pendant 1 min, rincée à nouveau à l'eau distillée puis séchée.

La coloration de Gram nous a permet après visualisation au microscope (objectif 100/ grossissement × 1000), de distinguer les bactéries à Gram négatif, qui précédemment décolorées à l'éthanol, adoptent alors une teinte rose alors que les bactéries à Gram positif conservent la première coloration violette.

2-2-4. Caractères physiologiques

L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée. Elle est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à volumes 10 sur lame. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme.

La recherche de l'oxydase est un des critères le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bactéries, surtout celles des bactéries à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée, à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées semi-quinoniques rose-violacées. Nous avons utilisé pour cela des disques d'oxydase.

2-2-5. caractères biochimique

Au-delà des notions de classification, l'identification repose sur le profil biochimique de la bactérie à l'aide de galerie biochimique. La manipulation a été réalisé au niveau du laboratoire de la faculté des sciences à Médéa on utilisant les galeries de types api20NE, api20E, api staph, et api50CH/E :

La préparation de la galerie et l'inoculum (tous les types de galeries) : Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation. A partir d'une culture pure jeune de 18 à 24 heures, nous avons préparé une suspension bactérienne ayant une concentration de 5×10^8 UFC/ml dans 5 ml d'eau distillée stérile, il faut bien mélanger la suspension bactérienne au vortex 5-10 secondes pour l'homogénéiser, cette suspension doit être utilisée extemporanément.

L'inoculation de la galerie (selon le type de galerie) :

2-2-5-1.Identification biochimique des souches bactériennes par le système API Staph

A l'aide d'une pipette, nous avons rempli les tubes de la galerie API Staph avec la suspension bactérienne. Puis nous avons créé une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe. Enfin la boîte d'incubation a été renfermer et incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures. Après incubation, nous avons procédé à la lecture des réactions conformément au tableau de lecture en ajoutant une goutte de chacun des réactifs suivants : Test VP : VP 1 et VP 2. Test NIT : NIT 1 et NIT 2. Test PAL : ZYM A et ZYM B. puis nous avons attendu 10 minutes après chaque test.

2-2-5-2. Identification biochimique des souches bactériennes par le système API 20 NE

Les tubes des tests NO3 à PNPG ont été remplis (et non les cupules) avec la suspension précédente. Puis nous avons rempli les tubes et cupules des tests GLU à PAC, ensuite nous avons du remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests GLU, ADH, URE. Après incubation, pour le test NO3 : nous avons ajouté une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO3. Et en dernier pour le test TRP : On ajoute une goutte de réactif JAMES.

2-2-5-3. Identification biochimique des souches bactériennes par le système API 20 E

Nous avons déposé soigneusement 150 µl de la suspension bactérienne dans chaque cupule de la galerie en utilisant un embout stérile, puis ajouter de nouveau 150 µl de la suspension bactérienne aux cupules (citrate), VP (pyruvate de sodium) et GEL (gélatine) afin d'obtenir un volume final de 300 µl par puits, après l'inoculation, nous avons du recouvrir les cupules ADH (arginine déshydrolase), LDC (lysine déshydrolase), ODC (ornithine décarboxylase), H2S (sulfure d'hydrogène) et URE (uréase) d'huile végétale (huile de paraffine) afin de créer une anaérobiose, la galerie est incubée à 30°C pendant 18 à 24 heures. Après la durée d'incubation, la lecture de la galerie a été faite pour l'ensemble des micro-tubes sauf pour les micro-tubes VP, TDA (tryptophane désaminase) et IND (indole) dont la lecture n'a été faite qu'après l'addition des réactifs nécessaires de la façon suivante : VP : une goutte d'hydroxyde de potassium (40%) et une goutte d'alpha-naphtol (6%) ont été ajoutées (il faut attendre 10 minutes avant de faire la lecture de la réaction). TDA : une goutte de chlorure ferrique (10%) a été additionnée. La lecture de la réaction se fait immédiatement. IND : la lecture de la réaction se fait aussi immédiatement après l'ajout d'une goutte du réactif de James.

2-2-5-4. Identification biochimique des souches bactériennes par le système API 50CHB/E

API 50 CHB/E c'est un test pour l'identification des *Bacillus*, notamment des bacilles à Gram négatif appartenant aux *Enterobacteriaceae*, cette galerie peut être remplacé part la combinaison entre la galerie API 50CH et API 20^{E}. Par conséquent suite au fait que la galerie API 50CH n'est pas disponible, nous avons utilisé seulement la galerie API 20^{E}.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

2-3. Identification génotypique des séquences fongiques

Pour certains champignons à croissance difficile les caractères phénotypiques sont difficiles à déceler ; la biologie moléculaire simplifie dans ce cas l'identification [91]. Dans ces situations, l'amplification et le séquençage du gène 16S rRNA suivi de la comparaison de la séquence obtenue à des bases de données ont démontré leur efficacité pour l'identification fongique. Il s'agit d'une méthode universelle, précise et objective, dont la variabilité interopérateur est limitée par rapport aux techniques conventionnelles [92].

Au sein d'une même espèce, ou communauté, il existe une diversité génétique (suivant les séquences des nucléotides). Une OTU est un regroupement d'individus d'une même espèce dont les séquences d'ARNr 16S présentent une similitude de plus de 97,5%. Cette standardisation internationale permet à des chercheurs d'une même discipline de comparer leurs résultats, mais elle n'a pas forcément une signification biologique et d'autres valeurs de similitude ont été proposées. Des individus d'OTU différentes ne peuvent pas appartenir à une même espèce.

2-3-1. Matériel pour la séquennsage fongiques

Le but de cette partie du travail est d'étudier les effets relatifs de l'espèce hôte et de l'élévation sur les assemblages fongiques de la phyllosphère est de faire l'analyse bioinformatique des séquences génomique afin de déterminer grâce à l'annotation les différences entre les communautés fongiques, leurs compositions et leurs structures. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs programmes complémentaires:

Logiciels utilisé pour le traitement statistique : EXEL, Past et STATISTICA : pour la réalisation de différent tableaux, figures et illustrations ainsi que des tests statistique pour mettre en évidence les résultats et de s'assurer de leur fiabilité.

Logiciels bioinformatiques pour l'annotation génomique :

- SMS:(**S**équence **M**anipulation **S**uite) recherche d'ORF.
- LOOP-3D: après traduction de notre séquence on passe à ça modalisation 3D, cela nous permettra de mieux comprendre et rendre notre travail plus réaliste pour cela On utilise ce logiciel **(**Learning, Observing and Outputting Protein Patterns)
- Logiciel Rasmol : pour ouvrir le modèle 3D.
- Blast : **(B**asic **L**ocal **A**lignement **s**earch **T**ool), pour la comparaison rapide d'une séquence à une banque de séquences telles que le NCBI afin de trouver des homologues.
- MABLIRMM : pour la réalisation de l'arbre phylogénique.

2-3-2.Préparation des échantillons et la technique de séquençage

La bioinformatique est la discipline scientifique récente qui englobe la collecte, l'organisation et l'analyse de données biologiques au moyen de l'outil informatique. Le terme bioinformatique, aussi appelé en anglais ≪computationalbiology≫ ou ≪ in silico biology≫ regroupe sous le même mot, 2 approches. La première approche correspond à la sensibilité plus informatique du domaine et consiste en l'élaboration d'algorithmes et le développement de programmes pour extraire l'information biologique ainsi que la création de banques de données. La seconde approche correspond à la bio-analyse dont le but est centre sur l'analyse de ces données et leur signification dans un contexte biologique. Ces 2 approches, bio analytique et informatique, sont complémentaires et sont naturellement liées l'une à l'autre dans leur évolution. En effet, l'étude d'un système biologique complet n'est rendue possible que par l'existence d'outils adaptes et performants et la bonne compréhension des systèmes biologiques permet de mettre au point des programmes adaptes et efficaces.

La bioinformatique est une discipline jeune qui date de la seconde moitié du vingtième siècle. Elle doit son essor à l'émergence et à la diffusion de l'informatique qui a permis de disposer d'ordinateurs puissants capables de stocker et de traiter un nombre croissant de données. La bioinformatique doit également son développement à la compréhension des objets biologiques majeurs (ADN, ARN et protéine) et l'avènement d'outils de prédictions. L'évolution conjointe de ses 2 approches de la bioinformatique en fait actuellement une discipline indispensable à la compréhension du vivant.

Depuis l'énonce du dogme central en biologie moléculaire en 1958 par Francis Crick [101] marquant les fondements de la biologie moléculaire et la définition des objets majeurs en biologie jusqu'à la publication des séquences complètes du génome de la levure Saccharomyces cerevisiae et de l'homme à la fin du XXème siècle de grands changements ont été opères en biologie.

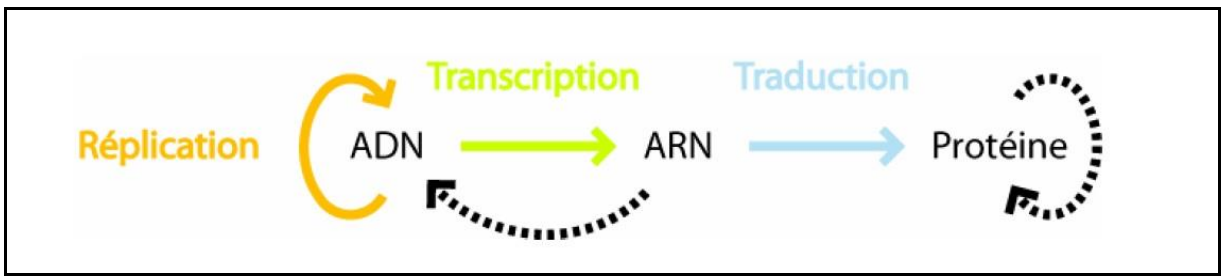


Figure 25 : Dogme central de la biologie moléculaire énoncé par Francis Crick en 1958.

En à peine 50 ans, la recherche en biologie est passée de l'étude d'un seul gène à l'étude de génomes et de protéomes d'organismes complets. Ce bouleversement a nécessité des moyens de calculs de plus en plus importants, le rassemblement des banques de données existantes comme GenBank/EMBL/DDBJ, le développement de programmes performants (BLAST, BLAT, ProbCons) et le développement de nouvelles techniques (les puces à ADN). Cette nouvelle échelle a bouleverse les méthodes d'analyse et génère de plus en plus de données.

L'analyse de cette grande quantité de données n'est rendue possible que par l'utilisation de la bioinformatique. En effet, la bioinformatique est un élément essentiel pour le passage de la biologie à l'ère post génomique et aux études à haut débit.

Le BLAST : BLAST (Basic Local Alignement SearchTool) [102] est le programme de recherche de similarité le plus utilisé pour les comparaisons protéine-protéine. Il fait la même hypothèse que pour FASTA, c'est-à-dire que les meilleurs alignements doivent contenir quelque part des petits segments strictement identiques ou de score très élevé. Ces éléments constituent les points d'ancrage à partir desquels l'alignement est étendu. L'algorithme initial de BLAST ne permet ni les insertions ni les délétions, mais il est très rapide et attribue une valeur statistique au score obtenu. L'algorithme initial a été modifié plusieurs fois pour répondre à différents besoins. Ainsi, BLAST2 autorise les insertions et les délétions (mais la statistique n'est plus exacte) alors que PSI-BLAST est une version qui construit des motifs consensus stockes sous forme de matrices qui seront utilisés lors de recherches et d'alignements itératifs [103].

De plus, des filtres comme les programmes SEG [104] et DUST [105] ont été conçus pour éliminer les régions répétitives et segments de ≪ faible complexité ≫ qui bruitent les résultats. Pour cela, la séquence ≪ appât ≫ est tout d'abord comparée à une banque de données contenant des séquences représentatives des familles surreprésentées dans les banques. Les sous-fragments de la séquence ≪ appât ≫ appartenant à ces familles ainsi que les régions poly X sont alors masques (et ne seront pas utilisés) avant d'effectuer la recherche de similitude sur la banque complète. Du point de vu algorithmique BLAST se décompose également en quatre étapes:

- La séquence à aligner est décomposée en ≪ mots ≫ d'une longueur W fixe (3 par défaut pour les protéines, 11 pour les nucléotides) et une banque de mots proches ou similaires aux mots de la séquence initiale est créée.
- Chacun de ces mots est alors recherche à l'identique dans toutes les séquences de la base.
- Les alignements autour de ces mots trouves sont alors étendus tant que le score de cet alignement ne chute pas d'une valeur X ou qu'une extrémité ne soit atteinte. Les alignements

sont alors appelés HSPs (High-scoring Segment Pair). Le HSP de plus haut score est appelé MSP (Maximal Segment Pair).

- Enfin, les HSPs qui ont un score supérieur à un seuil S sont sélectionnés et affiches. S'il existe plusieurs HSPs par séquence détectée leur score est combines.

Enfin, l'interprétation des résultats ou l'analyse de la signification des alignements est un point capital. Cette signification est évaluée statistiquement en fonction de la longueur et de la composition de la séquence, de la taille de la banque et de la matrice de scores utilisée. BLAST calcule ainsi un score, l'≪ E-value ≫ qui correspond à la probabilité d'observer au hasard cet alignement dans les banques de séquences considérées. Ainsi plus la ≪ E-value ≫ est faible, plus l'alignement est significatif (Tableau 1). Cependant, la décision finale repose aussi et (peut-être surtout ?) sur une inspection visuelle du résultat par l'expérimentateur.

Tableau 04 : Interprétation des valeurs d'expect calculés par BLAST.

E-value	Signification
$E<1e^{-100}$	appariement exact, même séquence, même origine
$1e^{-100}< E < 1e^{-50}$	séquences quasiment identiques (allèles, mutations, espèces voisines)
$1e^{-50}< E < 0,1$	un éventuel lien entre la séquence requête et celles qui ont été trouvées
$E > 0,1$	séquences de l'alignement à rejeter, sans lien avec la séquence requête

On peut noter que pour des séquences requêtes très courtes, la "E-Value" est très faible, on ne peut donc pas se baser sur ces valeurs pour estimer la signification des alignements (par exemple pour des alignements d'oligonucléotides). Les séquences alignées et détectées par BLAST sont appelés également≪Subject≫ ou ≪ hit ≫.

Barcoding : Le barcoding désigne l'usage d'un marqueur génétique standard court pour identifierun organisme au niveau spécifique. L'idée est de développer un moyen simple, rapide

et utilisable par des non experts, d'identifier une espèce. Le terme « barcode ADN » a été pour la première fois employé dans une étude sur *Plasmodium falciparum*(l'agent responsable de la malaria). Il désignait l'usage d'un gène hyper-variable comme outil pour identifier les différentes lignées d'une espèce et mener ainsi des études de génétique des populations et d'épidémiologie .Le terme a été repris en 2003 dans un article proposant le gène du cytochrome oxydase 1 (COX1) comme barcode pour les animaux supérieurs [106].

La même année, le consortium international Barcode of Life (CBOL) et le projet international Barcode of Life (iBOL) ont réuni des équipes de recherche du monde entier et d'importants moyens financiers ont été déployés pour organiser la constitution de bases de données de séquences et de spécimens de référence.

L'identification d'une espèce par barcode ADN permet de s'affranchir des limites liées à la morphologie et de délimiter les espèces d'un complexe d'espèces cryptiques [107] ; [108] ; [109].

Et de plus, l'inventaire des espèces par ce moyen est beaucoup plus rapide et ne requiert pas de spécialisation pour l'identification des différents groupes taxonomiques. Un barcode idéal est un gène orthologue (présent chez toutes les espèces), court (moins de 1000 pb), facilement amplifiable par PCR (Polymerase Chain Reaction) et ayant surtout un niveau de variabilité interspécifique minimal supérieur au niveau maximal de variabilité intraspécifique.L'usage strict du barcode ADN n'en reste pas moins une approche avec des limites.

D'abord, l'usage d'un seul marqueur peut conduire à des erreurs, puisqu'il est possible que des espèces différentes possèdent exactement la même séquence pour ce marqueur par des transferts interspécifiques de gènes ou par une spéciation inachevée [109].

Ensuite, la variabilité intraspécifique du marqueur par rapport à sa variabilité interspécifique est loin d'être à un niveau fixe. Ce seuil de délimitation (ou « barcoding gap ») est en effet bien plus souvent un chevauchement qu'une vraie séparation , ce qui pose problème pour établir un seuil de similarité de séquence comme délimitation spécifique.

L'approche par seuil peut donc générer de faux positifs et négatifs, c'est-à-dire une assignation erronée à une espèce connue ou non [110] ; [111].

Ainsi, le débat est encore animé et plusieurs études ont souligné l'importance d'établir un diagnostic sur un faisceau d'informations plutôt que sur l'une ou l'autre approche uniquement [112] ; [113] ; et [111].

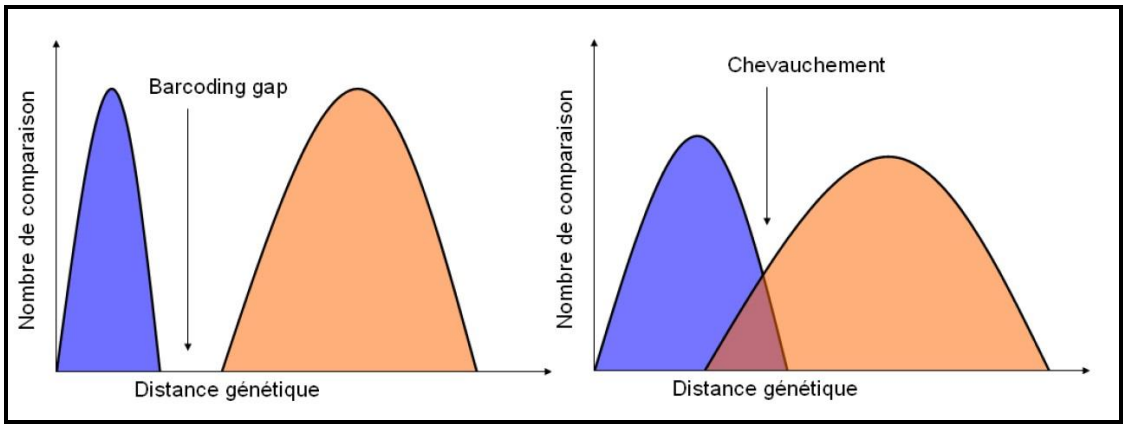


Figure 26 : Illustration du barcoding gap et du chevauchement. En bleu sont les comparaisons intraspécifique de séquences du marqueur utilisé et en orange les comparaisons interspécifiques.

En dernier, la constitution de bases de données de séquences fiables repose sur l'expertise de taxonomistes en collaboration avec des molécularistes, et sur une couverture taxonomique suffisante des espèces par clade. Les bases de données internationales comme GenBank (NCBI) ou EMBL (l'équivalent Européen) contiennent des accessions insuffisamment voire mal identifiées [114] ; [115].

Afin de pallier ces problèmes, une initiative comme UNITE [16], qui associe taxonomistes (mycologues), molécularistes et bioinformaticiens pour construire une base de données « corrigée », semble la plus adaptée pour l'usage du barcode ADN [117].

Barcoding chez les champignons : Le barcoding pour les champignons était déjà utilisé sans que le terme ne soit spécifiquement utilisé [118], notamment avec les travaux sur l'ITS (internaltranscribedspacer, Figure 27) dans les années 1990 [119]. Etant le marqueur historique pour ces organismes, il est le plus représenté dans les bases de données comme GenBank. Le barcode COX1, proposé par le CBOL, n'est pas suffisamment résolutif pour les champignons et est trop variable en taille pour représenter une alternative crédible [118]. Ainsi, l'ITS s'est rapidement imposé pour les champignons [115]; [118] même si son utilisation comporte plusieurs limites. Parmi les limites, on peut citer une faible résolution pour certains taxons. Il existe certains genres (*Cladosporium, Fusarium, Penicillium*) pour lesquels l'ITS n'est pas assez variable pour permettre une identification spécifique [118], et d'autres pour lesquels il est trop variable pour séparer les espèces proches, ce qui est le cas des endomycorhizes à arbuscules, les Glomeromycètes [120].

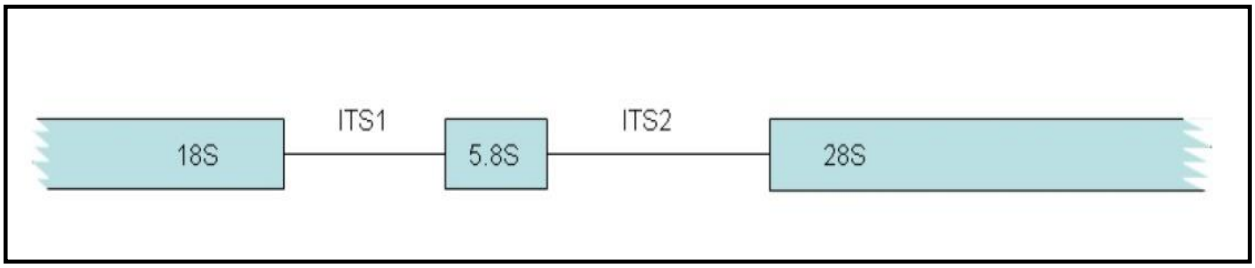


Figure 27: Schéma de l'opéron ribosomal de l'ADN nucléaire des champignons. Le 18S, le 5.8S et le 28S sont des zones très conservées, alors que l'ITS1 et l'ITS2 sont très variables d'une espèce à l'autre, ce qui en fait une cible de choix pour le barcoding.

2-3-3. Préparation des échantillons

L'échantillonnage est d'une importance capitale dans les études d'écologie des communautés, et particulièrement dans le cas des études des communautés microbiennes par des approches moléculaires.

L'échantillonnage a était fait a la fin de l'année 2014 par Mme AIT OUAMER Yasmine dans le cadre de ça thèse de doctorat : 9 arbres par station, sur chaque arbre a été prélevé 9 feuilles dont 3 sur chaque côté de l'arbre une d'elles est une foliole apicale. Les échantillons ont ensuite été transportés dans des sachets de silicagel. Ensuite une fois les échantillons arrivés au laboratoire un plan de travail a été établi, qui a permet de représenter chaque station avec trois réplicas, en suivant un plan de plaque d'extraction et en respectons le nombre de puits disponible pour le séquençage.

Le schéma ci dessue est représentatif du traitement des échantillons

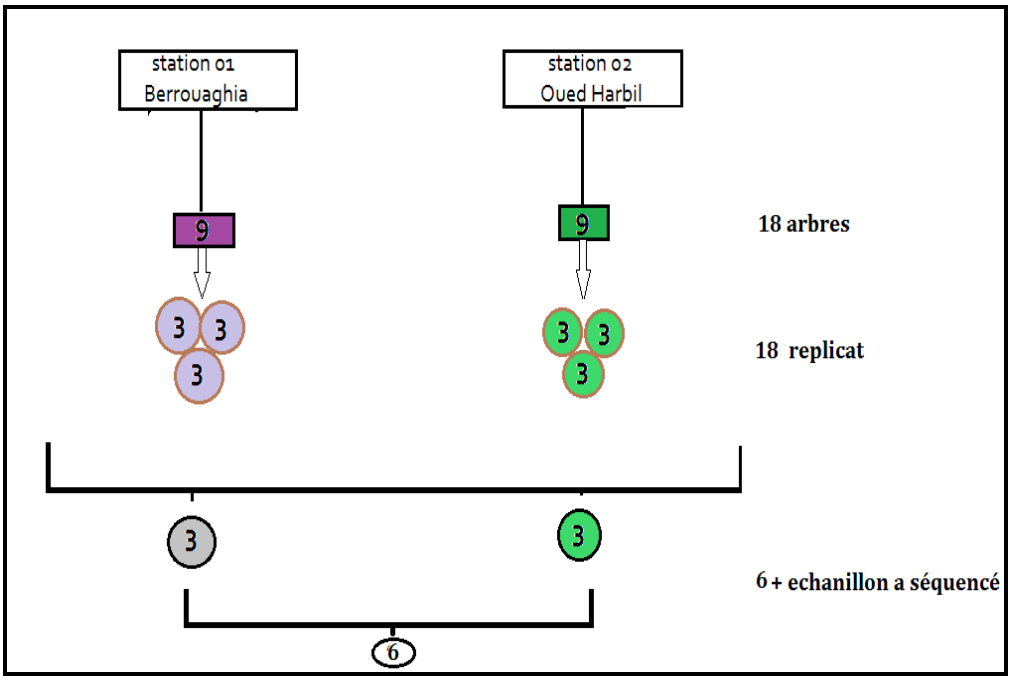


Figure 28 : traitement les échantillons pour le séquençage.

- Ensuite les feuilles ont été sorti des sachets de silicagel pour les découper avec un pioncent de 4 mm de diamètre en suivant le Protocol de Mr Thomas Fort. (Annexe).
- Extraction d'ADN : Placement des échantillons sur les plaques d'extraction, l'extraction d'ADN a été faite sur l'ensemble des échantillons découpées, selon un nouveau plan de plaque, des puits ont été laissés vide, trois par plaques, pour qu'ils servent de blanc pour l'étude (Thomas fort).
- Et enfin l'extraction a été faite selon le Protocole d'extraction d'ADN de plantes avec le kit QIAGEN ;

A-Broyage des feuilles et extraction d'ADN

B- Pool des échantillons : le pool des échantillons dans 19 puits pour l'envoi des séquences, 18 correspondants aux trois réplicas des 6 stations et un blanc. (Un plan de pool qui correspond a l'emplacement des échantillons dans la plaque).

2-3-4. Analyse des séquences

Avec le fichier des OTUs (521 OTUs) que nous avons obtenu par Mme Ait Ouamer Yasmine, nous avons fait une classification avec la somme de l'expression des OTUs sur EXEL les plus abondants et les plus spécifiques d'ordre croissant jusqu'à un seuil de limite de 400, un autre tableau a été fait pour les fréquences d'expression de chaque station des OTUs non identifié classé par ordre décroissant d'abondance, et enfin nous avons créé une matrice avec des classe

de 0 , 1 ,2, 3 des 30 OTUs les plus significatifs sur STATISTICA correspondante chacune a une abondance d'expression des OTUs.

De 0 à 150 (classe 0)

De 150 à 200 (classe 1)

De 200 à 1000 (classe 2)

De 1000 et plus (classe 3)

2-3-5. L'annotation des séquences

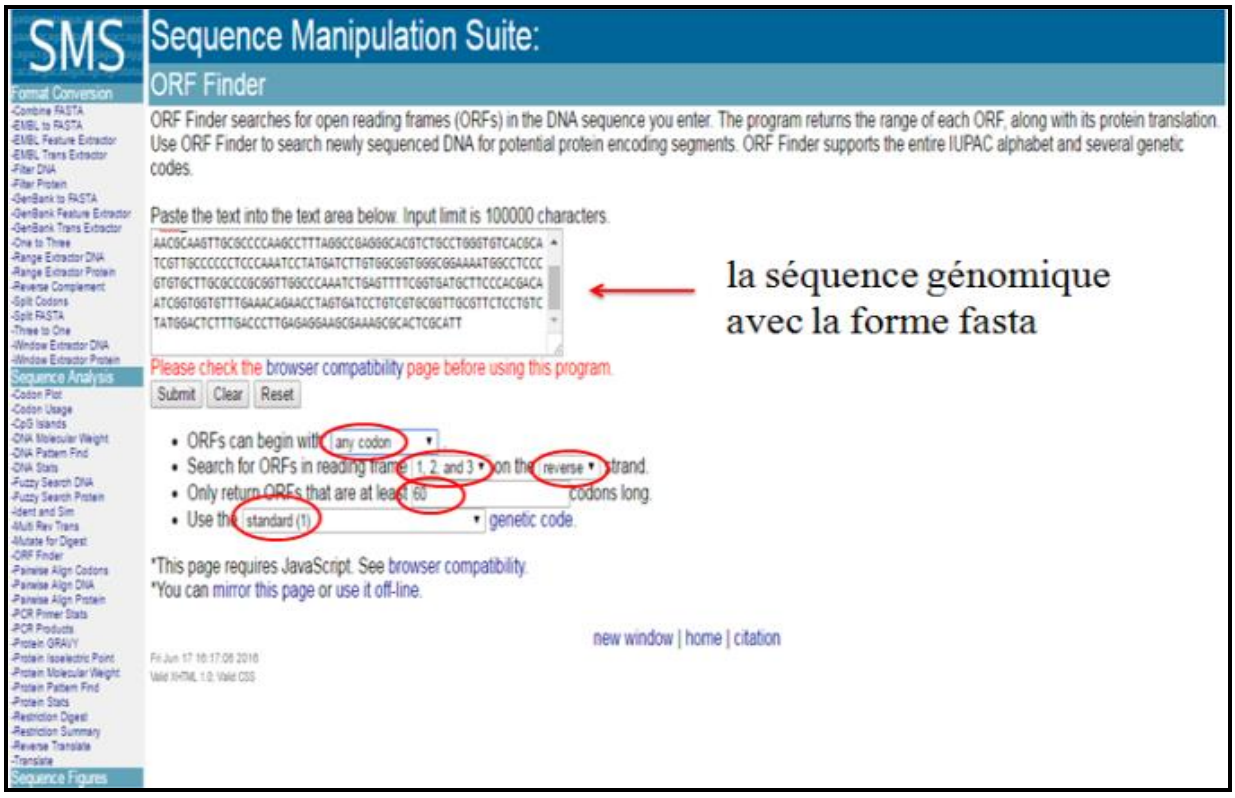
L'Analyse des 10 séquences sélectionnées parmi les 521 a pu être faite par comparaison avec les banques de données effectuer par le logiciel BLAST, nous n'avons sélectionné que des séquences interprétables. L'identité d'une séquence fongique est obtenue après une recherche d'homologie dans les banques de données NCBI (Centre National pour l'Information Biotechnologique).

Il est à noter que ce travail de comparaisons et de recherche d'homologies des séquences sont rapportés ci-après :

A. recherche d'ORF

(Open Reading Frame = cadre de lecture ouvert) On a utilisée le logiciel SMS Séquence Manipulation Suite avec le module ORF finding pour la recherche de la localisation des régions de plus de 100 nucléotides entre un codon start (ATG) et un codon stop (TAA, TAG, TGA) et susceptible d'encoder une protéine ou un peptide.

Il s'agit de Traduction de la séquence nucléique dans les 6 phases de lecture et Identification des codons de la transcription.



ORF Finder results

Results for 278 residue sequence "OTU_2" starting "AACGCAAGTT"

```
No ORFs were found in reading frame 1.

>ORF number 1 in reading frame 2 on the reverse strand extends from base 2 to base 199.
ATGCGAGTGCGCTTTCGCTTCCTCTCAAGGGTCAAAGAGTCCATAGACAGGAGAACGCAA
CCGCACGACAGGATCACTAGGTTCTGTTTCAAACACCACCGATTGTCGTGGGAAGCATCA
CCGAAAACTCAGATTTGGGCCAACCGCGGGCGCAAGCACACGGGAGGCCATTTTCCGCCC
ACCGCCACAAGATCATAG

>Translation of ORF number 1 in reading frame 2 on the reverse strand.
MRVRFRFLSRVKESIDRRTQPHDRITRFCFKHHRLSWEASPKTQIWANRGRKHTGGHFPP
TATRS*

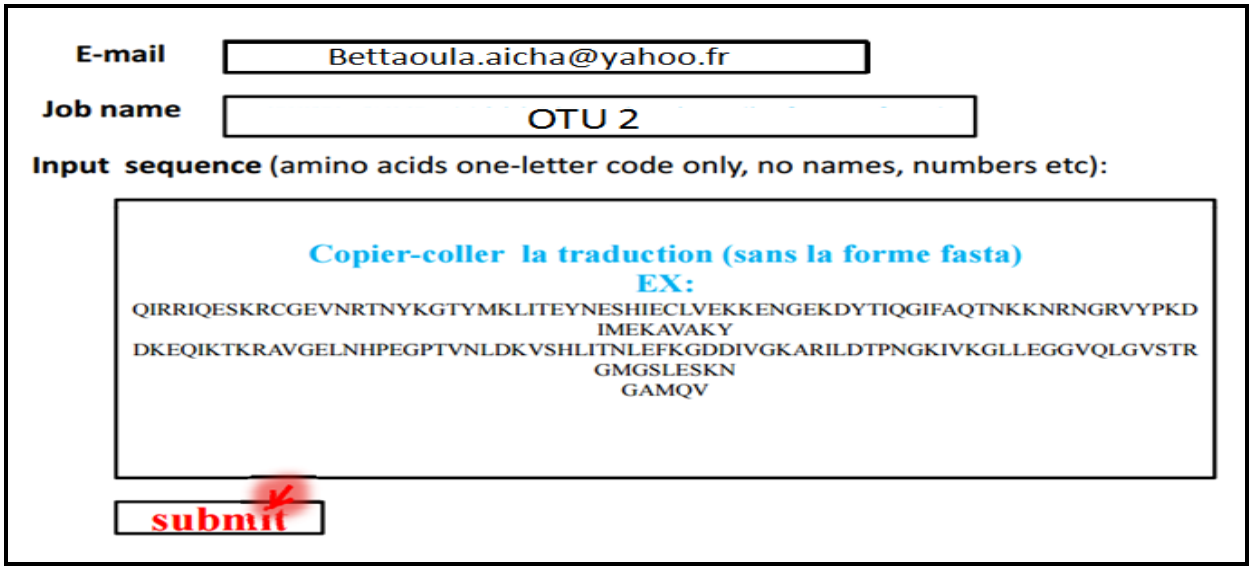
>ORF number 1 in reading frame 3 on the reverse strand extends from base 48 to base 227.
ACAGGAGAACGCAACCGCACGACAGGATCACTAGGTTCTGTTTCAAACACCACCGATTGT
CGTGGGAAGCATCACCGAAAACTCAGATTTGGGCCAACCGCGGGCGCAAGCACACGGGAG
GCCATTTTCCGCCCACCGCCACAAGATCATAGGATTTGGGAGGGGGGCAACGATGCGTGA


>Translation of ORF number 1 in reading frame 3 on the reverse strand.
TGERNRTTGSLGSVSNTTDCRGKHHRKLRFGPTAGASTREAIFRPPPQDHRIWEGGNDA*
```

Séquence traduit

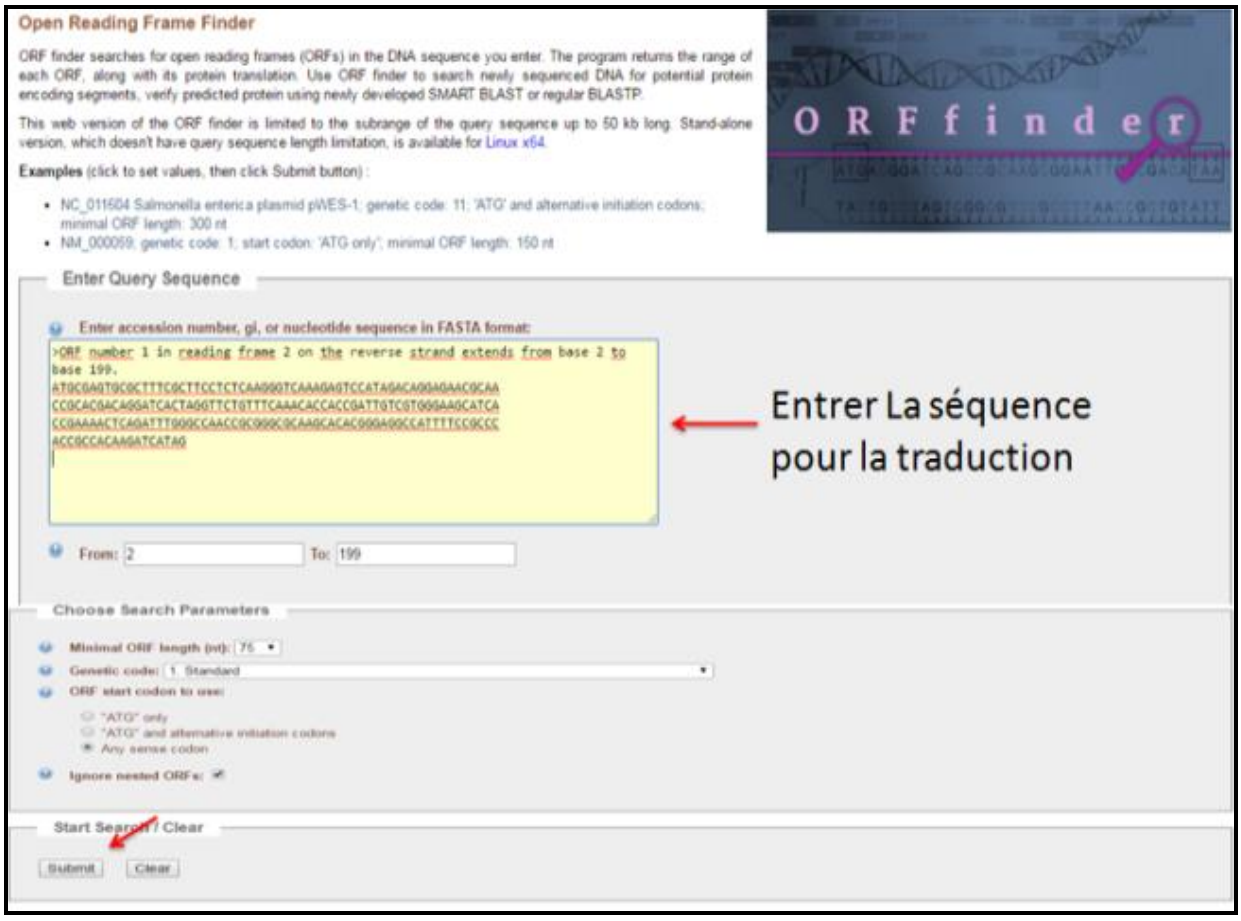
B. Modélisation 3D

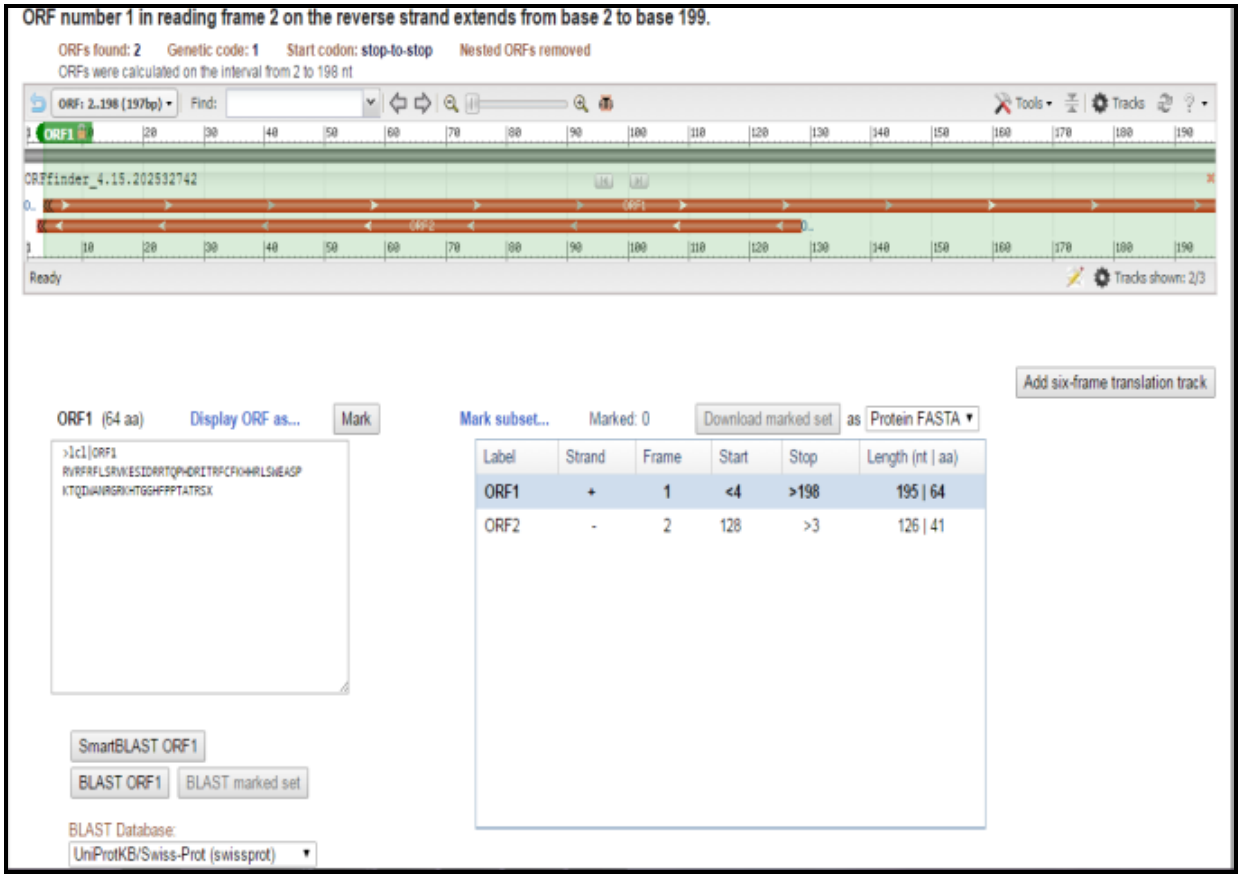
On a utilisé le logiciel LOOP-3D (Learning, Observing and Outputting Protein Patterns) car après traduction de notre séquence on passe à ça modalisation 3D, cela nous permettra de voir que notre séquence est authentique. Après 1 jour nous avons reçu un E-mail (fichier qui contient la protéine de cette séquence pour utiliser la forme 3D) ensuite, nous avons ouvert ce fichier avec le logiciel Rasmol. Après 1 jour nous avons reçu un E-mail (fichier qui contient la protéine de cette séquence pour utiliser la forme 3D) ensuite, nous avons ouvert ce fichier avec le logiciel Rasmol.



C. Domaines Protéiques

Les domaines protéiques peuvent être utilisées pour la classification et l'annotation automatique des protéines, pour cela on a utilisé L'INTERPRO qui classe les séquences en superfamilles, familles et sous-familles; prédit l'occurrence des domaines fonctionnels et des sites importants.


Open Reading Frame Finder
ORF finder searches for open reading frames (ORFs) in the DNA sequence you enter. The program returns the range of each ORF, along with its protein translation. Use ORF finder to search newly sequenced DNA for potential protein encoding segments, verify predicted protein using newly developed SMART BLAST or regular BLASTP.
This web version of the ORF finder is limited to the subrange of the query sequence up to 50 kb long. Stand-alone version, which doesn't have query sequence length limitation, is available for Linux x64.
Examples (click to set values, then click Submit button) :
NC_011604 Salmonella enterica plasmid pWES-1: genetic code: 11; 'ATG' and alternative initiation codons; minimal ORF length: 300 nt
NM_000059: genetic code: 1; start codon: 'ATG only'; minimal ORF length: 150 nt
ORFfinder
Enter Query Sequence
Enter accession number, gi, or nucleotide sequence in FASTA format:
>ORF number 1 in reading frame 2 on the reverse strand extends from base 2 to base 199.
ATGCGAGTGCGCTTTCGCTTCCTCTCAAGGGTCAAAGAGTCCATAGACAGGAGAACGCAA
CCGCACGACAGGATCACTAGGTTCTGTTTCAAACACCACCGATTGTCGTGGGAAGCATCA
CCGAAAACTCAGATTTGGGCCAACCGCGGGCGCAAGCACACGGGAGGCCATTTTCCGCCC
ACCGCCACAAGATCATAG
Entrer La séquence pour la traduction
From: 2
To: 199
Choose Search Parameters
Minimal ORF length (nt): 75
Genetic code: 1 Standard
ORF start codon to use:
"ATG" only
"ATG" and alternative initiation codons
Any sense codon
Ignore nested ORFs:
Start Search / Clear
Submit
Clear

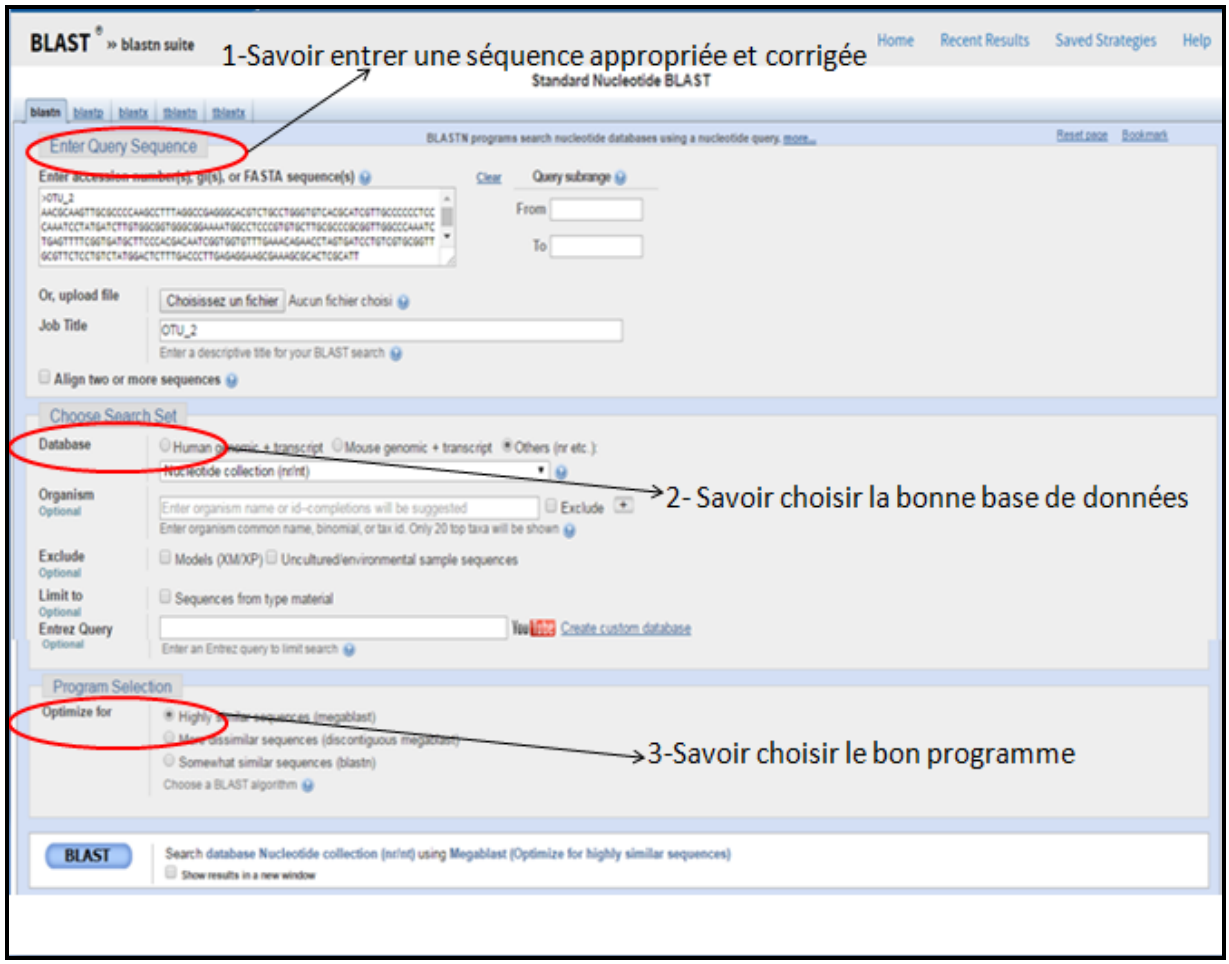

ORF number 1 in reading frame 2 on the reverse strand extends from base 2 to base 199.
ORFs found: 2 Genetic code: 1 Start codon: stop-to-stop Nested ORFs removed
ORFs were calculated on the interval from 2 to 198 nt
ORF: 2..198 (197bp)
Find:
Tools
Tracks
ORF1
ORFfinder_4.15.202532742
ORF2
Ready
Tracks shown: 2/3
Add six-frame translation track
ORF1 (64 aa)
Display ORF as...
Mark
Mark subset...
Marked: 0
Download marked set
as
Protein FASTA
>lcl|ORF1
RVRFRFLSRVKESIDRRTQPHDRITRFCFKHHRLSWEASP
KTQDHAVRGRKHTGGHFPPTATRSX
Label
Strand
Frame
Start
Stop
Length (nt | aa)
ORF1 + 1 <4 >198 195 | 64
ORF2 - 2 128 >3 126 | 41
SmartBLAST ORF1
BLAST ORF1
BLAST marked set
BLAST Database:
UniProtKB/Swiss-Prot (swissprot)

D. Les homologues

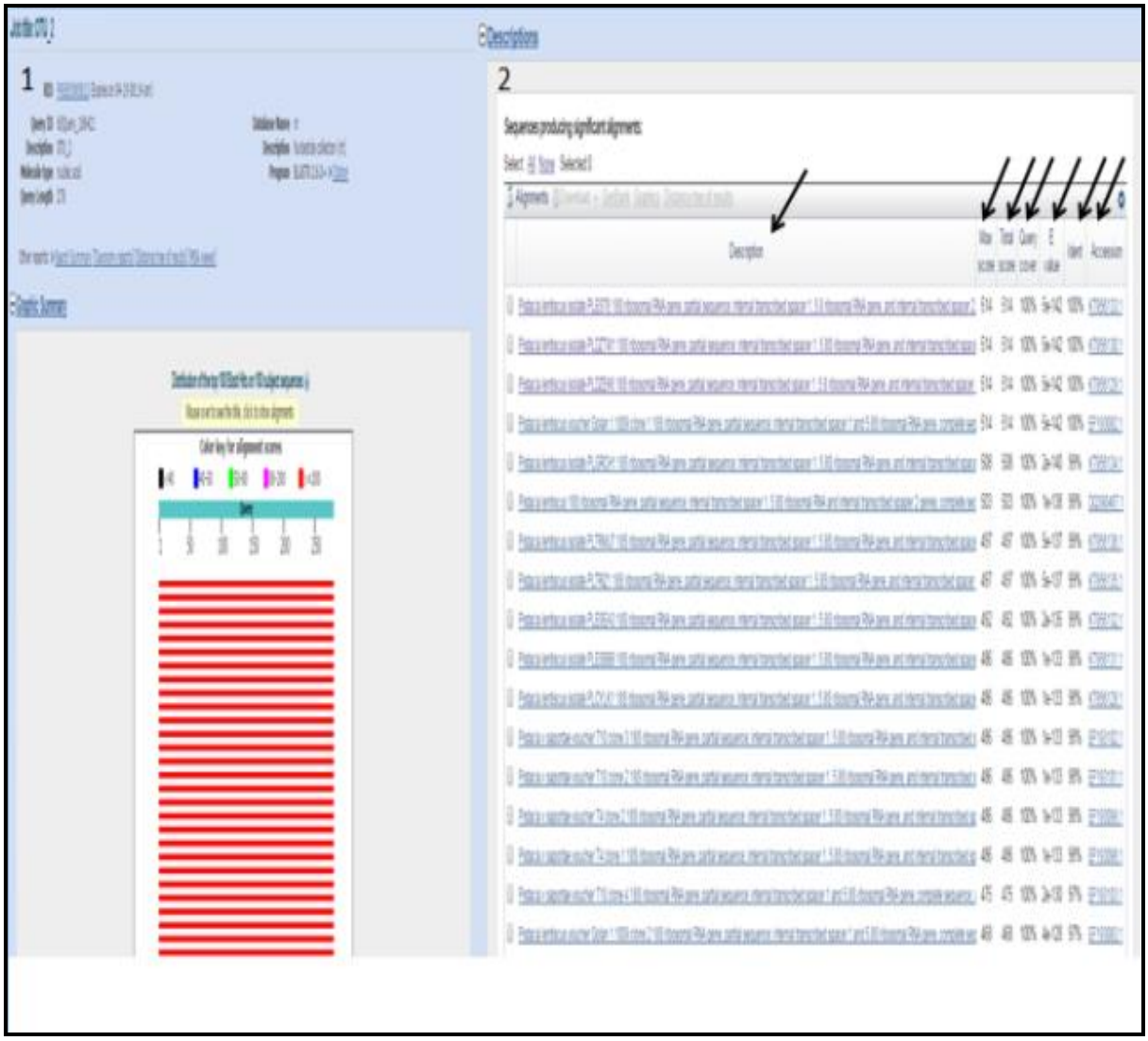
La recherche d'homologues est effectuée par l'analyse BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) au NCBI pour trouver d'éventuelles protéines similaires à notre protéine traduite (protéines homologues). Nos séquences sont alignées avec celles qui sont connues et présentes dans les banques de données fournissent la liste des résultats probables correspondant à notre séquence, avec les valeurs de similarités des séquences.

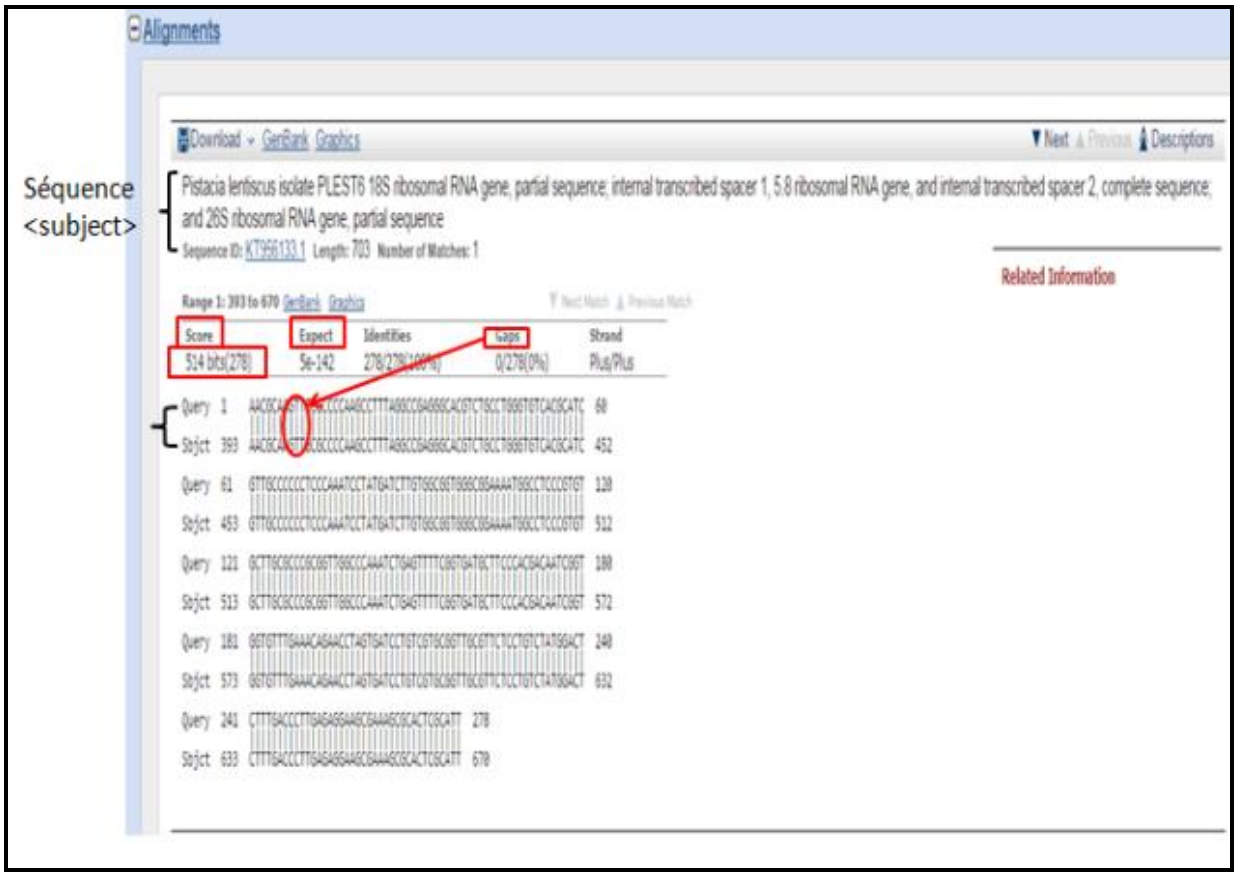
Les programmes de comparaison de séquences ont pour but de repérer les endroits où se trouvent des régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui correspondent à un sens biologique de celles qui sont observées dans les banques internationales.

Le BLAST détecte de courts segments (onze nucléotides identiques ou deux tripeptides similaires) qui sont localement homologues à la séquence inconnue. Les résultats des comparaisons de séquences sont présentés sous forme de ratio d'homologie entre les séquences obtenues et les séquences de référence les plus proches.

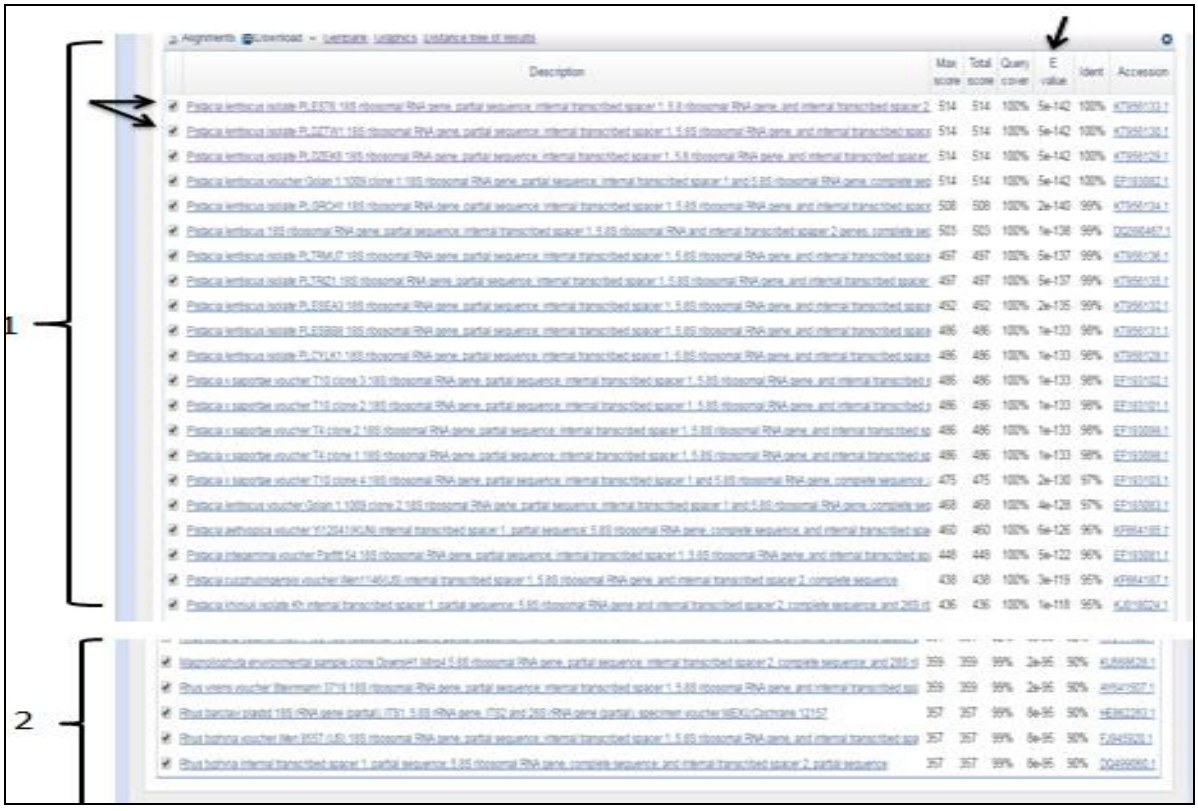


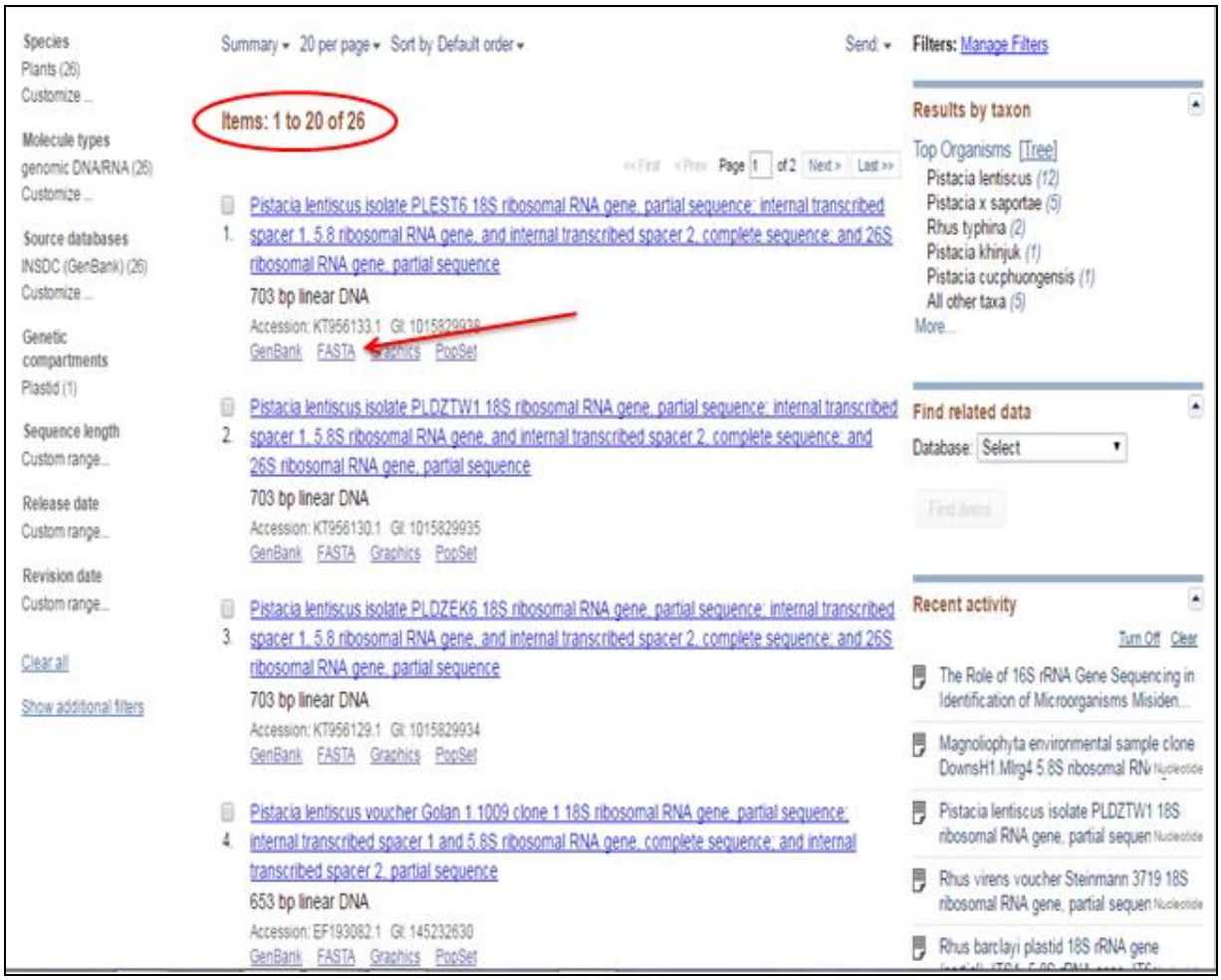
Toutes les séquences de référence proches de nos souches ont été extraites des banques de données NCBI. En fonction des critères de qualité de l'alignement (E-value, maximum d'identité, couverture, etc), le choix de la séquence la plus pertinente on le retrouve entre 3 et 5 premiers résultats qui ont les mêmes régions étudiées. Ces séquences de références constitueront ainsi une source de séquences de référence, outil essentiel pour nos études taxonomiques et pour des prochaines études phylogénétiques.



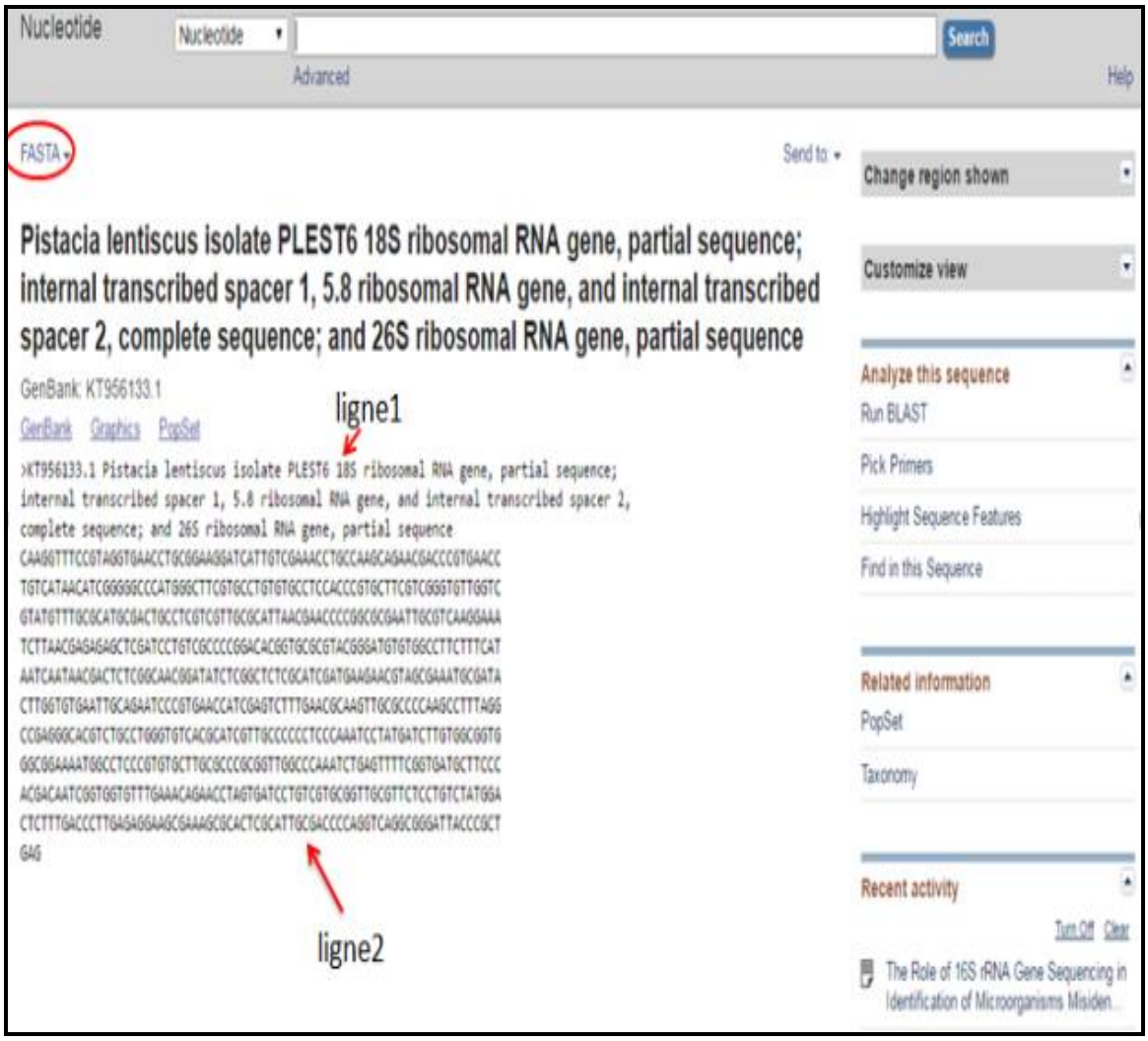


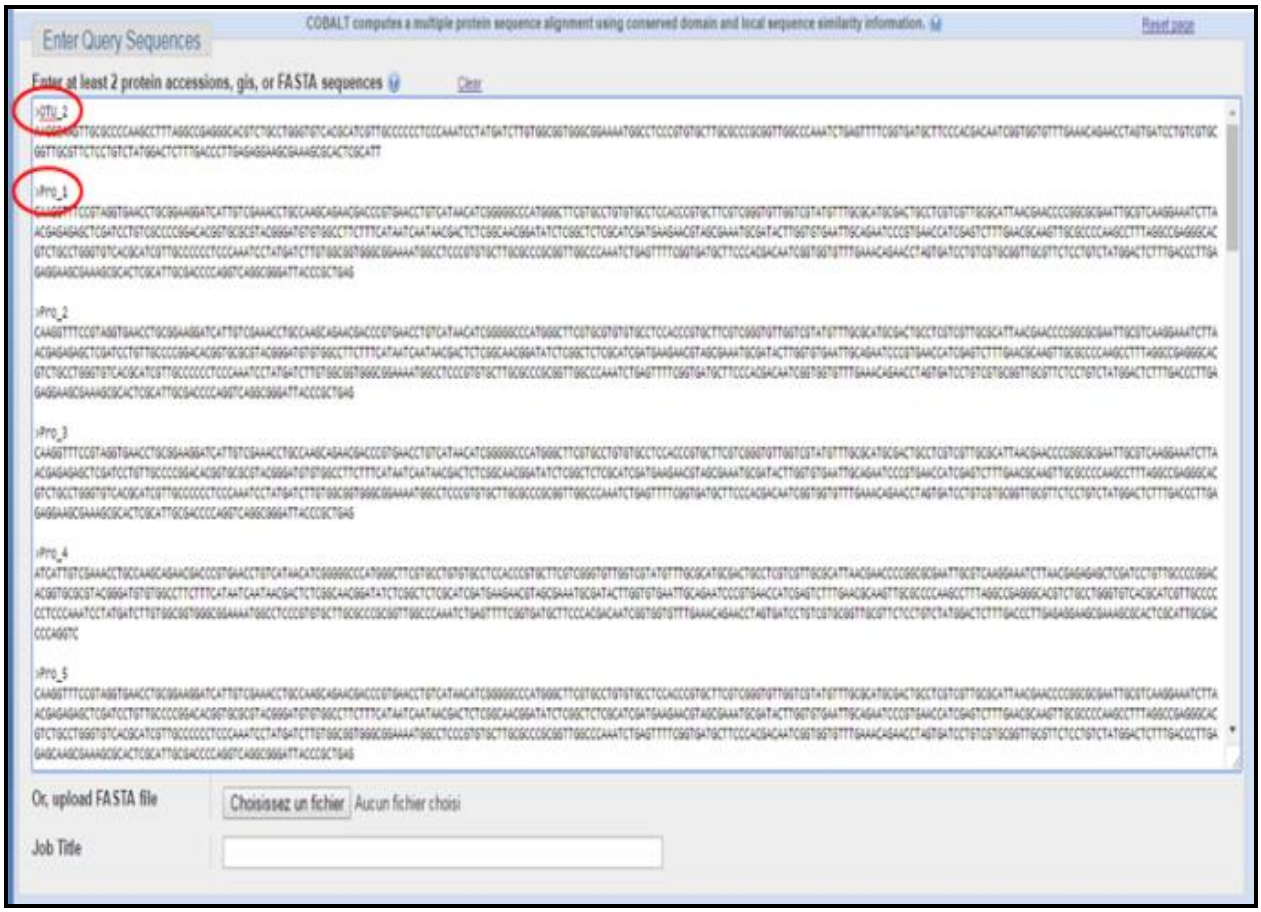
Ensuit, nous avons couché les groupes choisit (groupe d'étude et groupe externe) pour obtenir les homologues. Pour enrichir l'arbre phylogénétique.





Ces dernières sont utilisées sous un format de fichier texte (**FASTA)** pour stocker des séquences biologiques de nature nucléique.

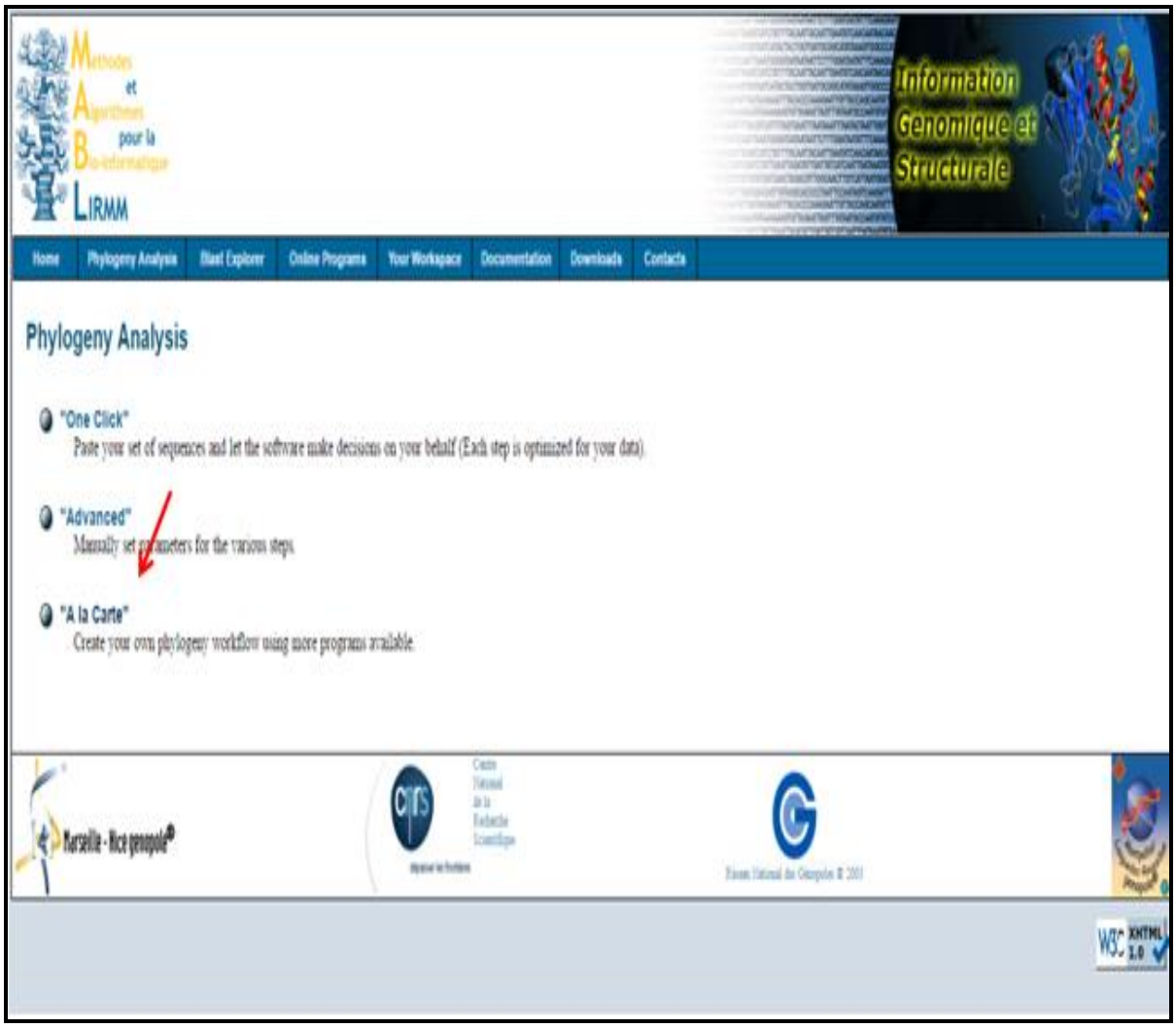

Nucleotide
Nucleotide
Search
Advanced
Help
FASTA
Send to
Change region shown
Customize view
Pistacia lentiscus isolate PLEST6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: KT956133.1
GenBank Graphics PopSet
ligne1
>KT956133.1 Pistacia lentiscus isolate PLEST6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
CAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACC
TGTCATAACATCGGGGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTCGGGTGTTGGTC
GTATGTTTGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAACGAACCCCGGCGCGAATTGCGTCAAGGAAA
TCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTGTCGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCAT
AATCAATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATA
CTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGG
CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCCTCCCAAATCCTATGATCTTGTGGCGGTG
GGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCCCAAATCTGAGTTTTCGGTGATGCTTCCC
ACGACAATCGGTGGTGTTTGAAACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA
CTCTTTGACCCTTGAGAGGAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCT
GAG
ligne2
Analyze this sequence
Run BLAST
Pick Primers
Highlight Sequence Features
Find in this Sequence
Related information
PopSet
Taxonomy
Recent activity
Turn Off Clear
The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misiden...



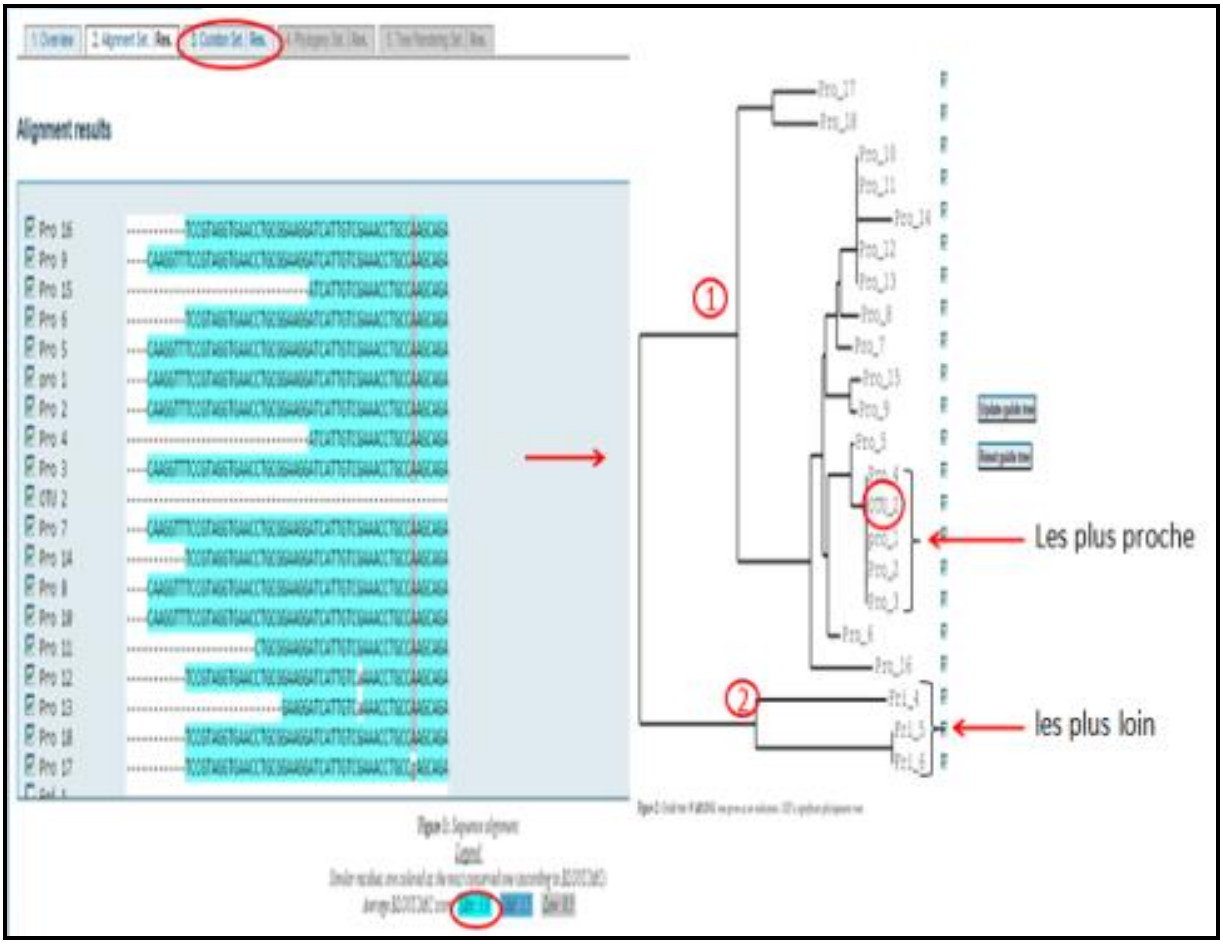
Nous avons mis les étiquettes (OTU) pour notre séquence, (Pro1, Pro2…) pour les homologues de groupe d'étude et (Tri1, Tri2…) de groupe extérieure.

E. Arbre Phylogénique

L'arbre phylogénique présente les relations de parenté entre organismes vivants. Il montre qui est proche de qui, et non pas qui descend de qui. Il permet d'identifier les homologies et les homoplasies. Nous avons utilisés logiciel (MAB LIRMM) à la carte.

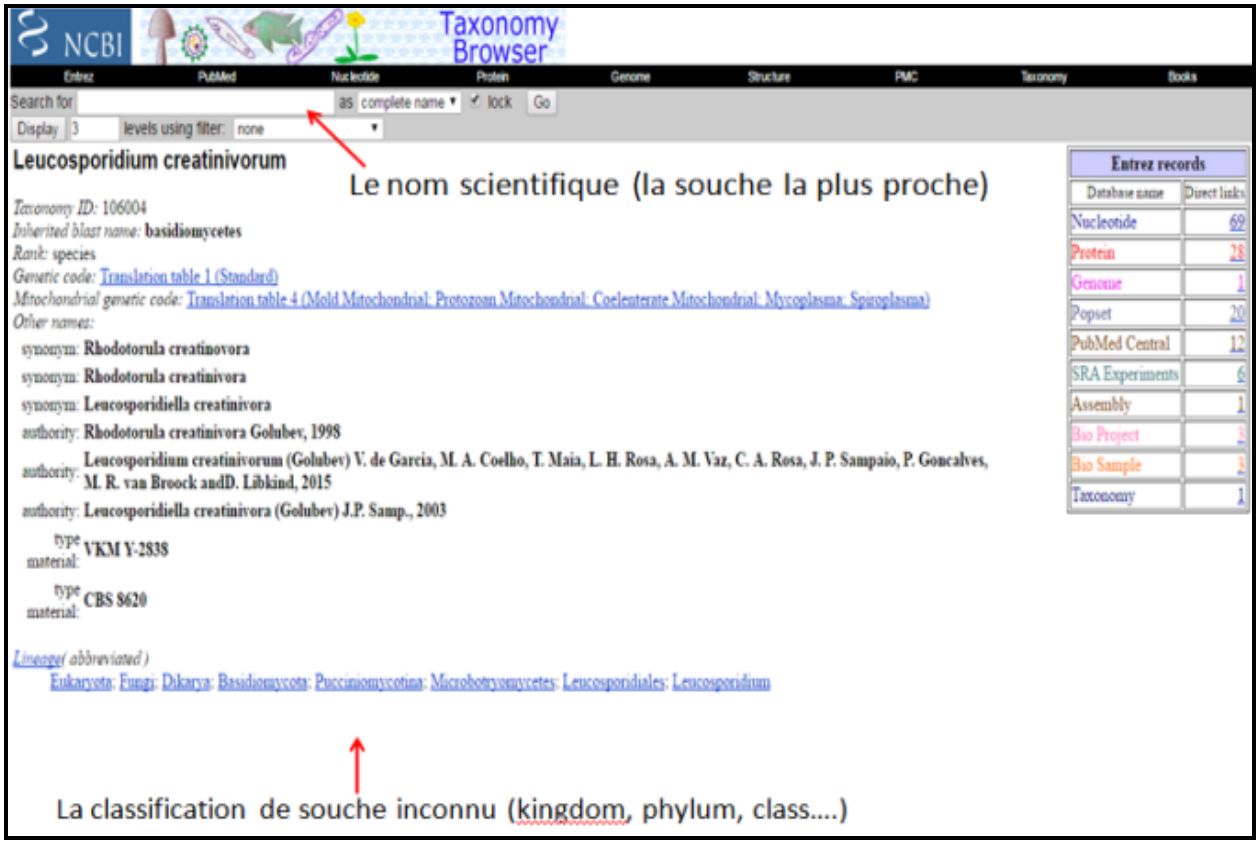

Methodes
et
Algorithmes
pour la
Bio-informatique
LIRMM
Information
Genomique et
Structurale
Home
Phylogeny Analysis
Blast Explorer
Online Programs
Your Workspace
Documentation
Downloads
Contacts
Phylogeny Analysis
"One Click"
Paste your set of sequences and let the software make decisions on your behalf (Each step is optimized for your data).
"Advanced"
Manually set parameters for the various steps.
"A la Carte"
Create your own phylogeny workflow using more programs available.
Marseille - Nice genopole
cnrs
XHTML 1.0


Home
Phylogeny Analysis
Blast Explorer
Online Programs
Your Workspace
Documentation
Downloads
Contacts
OTU_2
Alignment MUSCLE
Curation Gblocks
Phylogeny Neighbor
Tree Rendering TreeDyn
Help ?
Input Data
Upload your set of sequences in FASTA, EMBL or NEXUS format from a file
Choisissez un fichier
Aucun fichier choisi
Or paste it here
>OTU_2
>Pro_1
Clear
les ensembles de séquences fasta


Alignment results
Les plus proche
les plus loin

F. Classification Taxonomique

C'est une classification qui donne la nomenclature, le nom scientifique qui existe dans les bases de données de la souche la plus proche à l'organisme qu'on cherche à identifier, on a utilisé la taxonomie à partir des bases de données de taxonomie NCBI.



PARTIE III

RESULTATS ET DISSCUSIONS

1- Résultat

1-1. L'étude des communautés bactériennes de la phyllosphere

1-1-1- Les sites d'échantillonnage

Nous avons échantillonné sur quatre sites de différentes altitudes , avec une mise en culture de neuf arbres par station avec trois feuilles de chaque coté de l'arbre , ces feuilles ont été tapotées sur les deux faces supérieur et inferieure sur deux boites de pétri différentes , les résultats obtenus sont représentes par trois paramètres dans chacune des stations :le nombre des colonies bactériennes de la surface supérieure (B1), le nombre des colonies bactériennes de la surface inferieure (B2) et la surface foliaire (SF) calculé avec le logiciel mesurim .

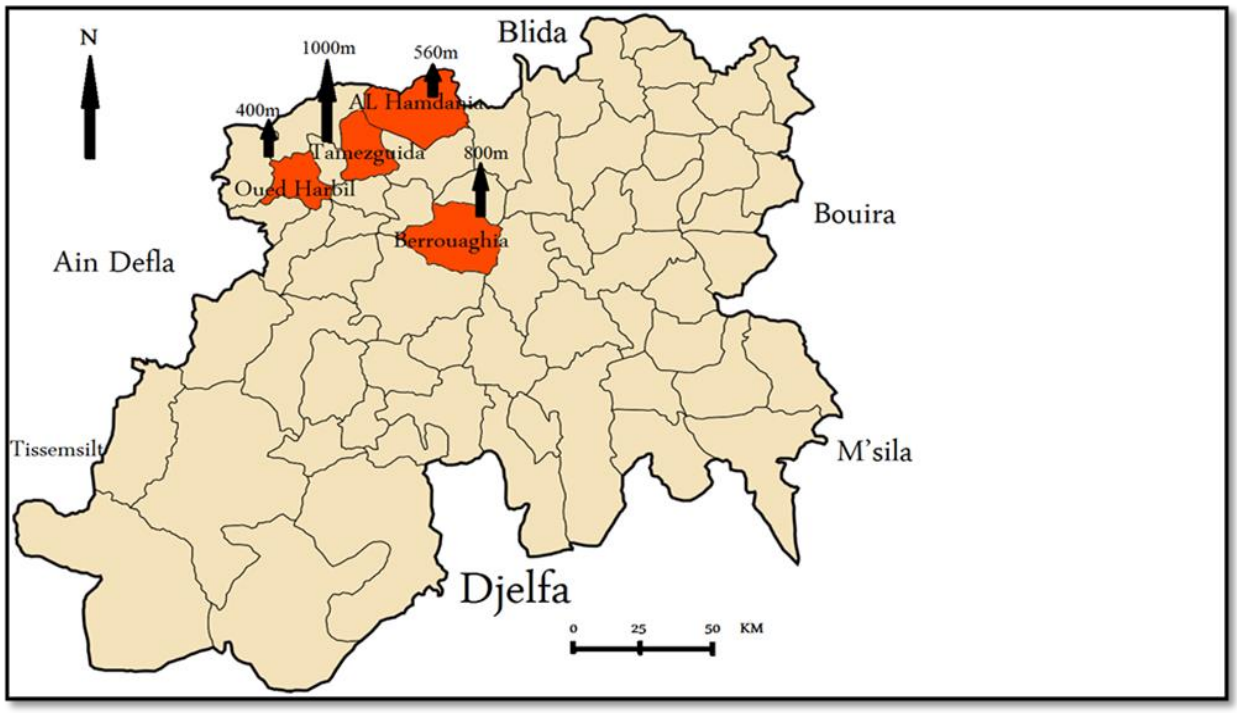


Figure 29: carte représentatives des sites d'étude et leurs altitudes.

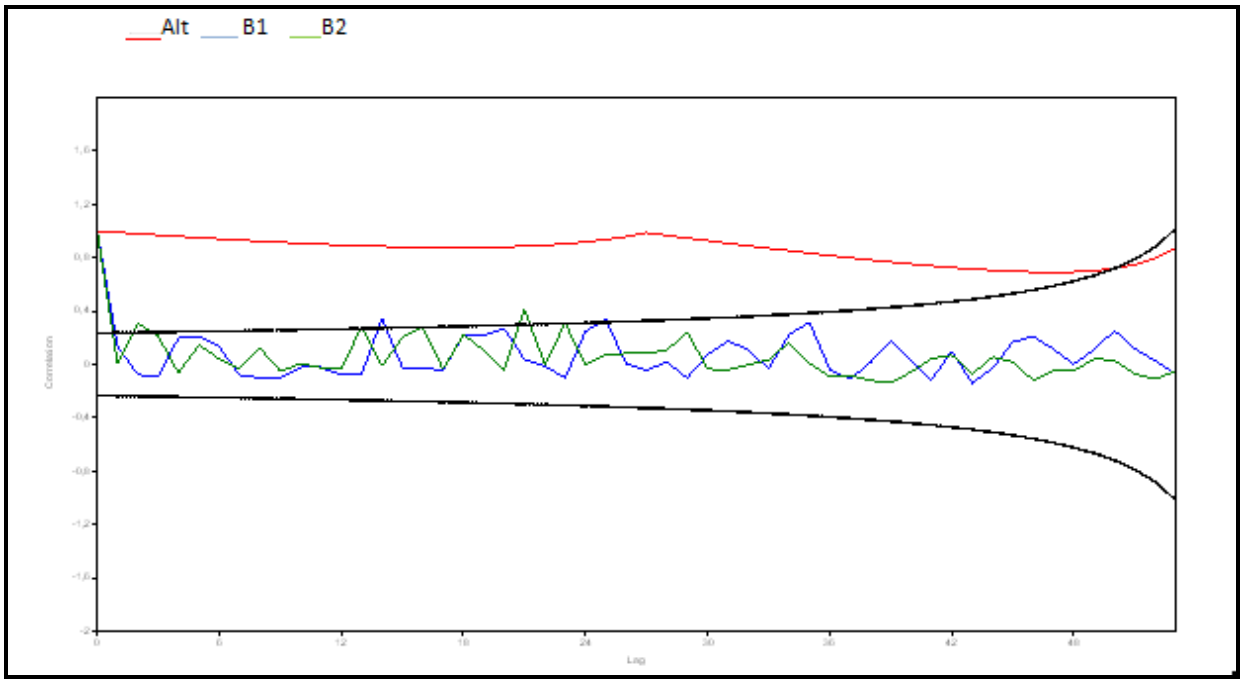
1-1-2. Etude statistiques des communautés bactériennes

L'objectif principal est d'étudier les effets relatifs de l'espèce hôte et de l'élévation sur les assemblages des communautés bactériens de la phyllosphère et de déterminer grâce aux techniques d'isolation microbiologique les différences entre les communautés, leurs compositions et leurs structures.

Afin de confirmé nos résultats nous avons eu recours à des approches corrélationnelles pour mener à bien l'analyse de nos données «corrélations, ANOVA (analyse de la variance), ACP (analyse en composantes principales)». pour cela nous avons utilisé le logiciel PAST.

A-Etude du nombre de bactéries en fonction de l'élévation :

Les micro-organismes de la phyllosphère dont les communautés bactériennes sont souvent influencés par de nombreux facteurs environnementaux, dans notre cas d'étude nous avons choisi d'explorer l'influence de l'élévation sur le développement des bactéries de la phyllosphere du pistachier lentisque tant par rapport à la présence absence, l'abondance et la composition.



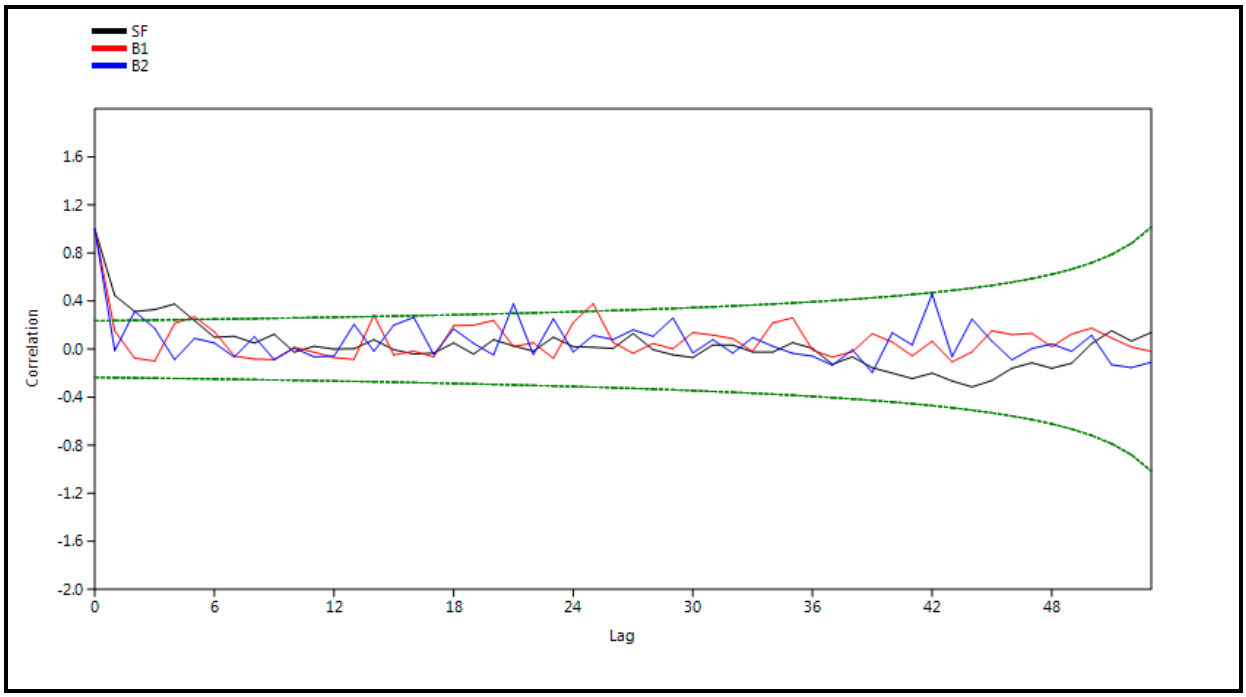
Alt : Elévation **; B1 :** Bactéries de la face supérieur **; B2 :** Bactéries de la face inferieure.

Figure 30: Nombre de bactéries des quatre stations en fonction de l'élévation.

Le test de corrélation entre les variables : nombre de bactéries des deux faces des feuilles des stations d'études et le gradient d'élévation croissant démontre une bonne corrélation.

B- Etude du nombre de bactéries en fonction des surfaces foliaire

La surface foliaire est aussi un critère important pour déterminé le nombre de bactéries présent à la surface d'une feuille, c'est ainsi qu'on nous avons calculé la surface foliaire de tous nos échantillons, suite à cela nous avons fait une corrélation du nombre bactéries des deux faces en fonction de la surface foliaire grâce au logiciel Past, les résultats est le suivant :



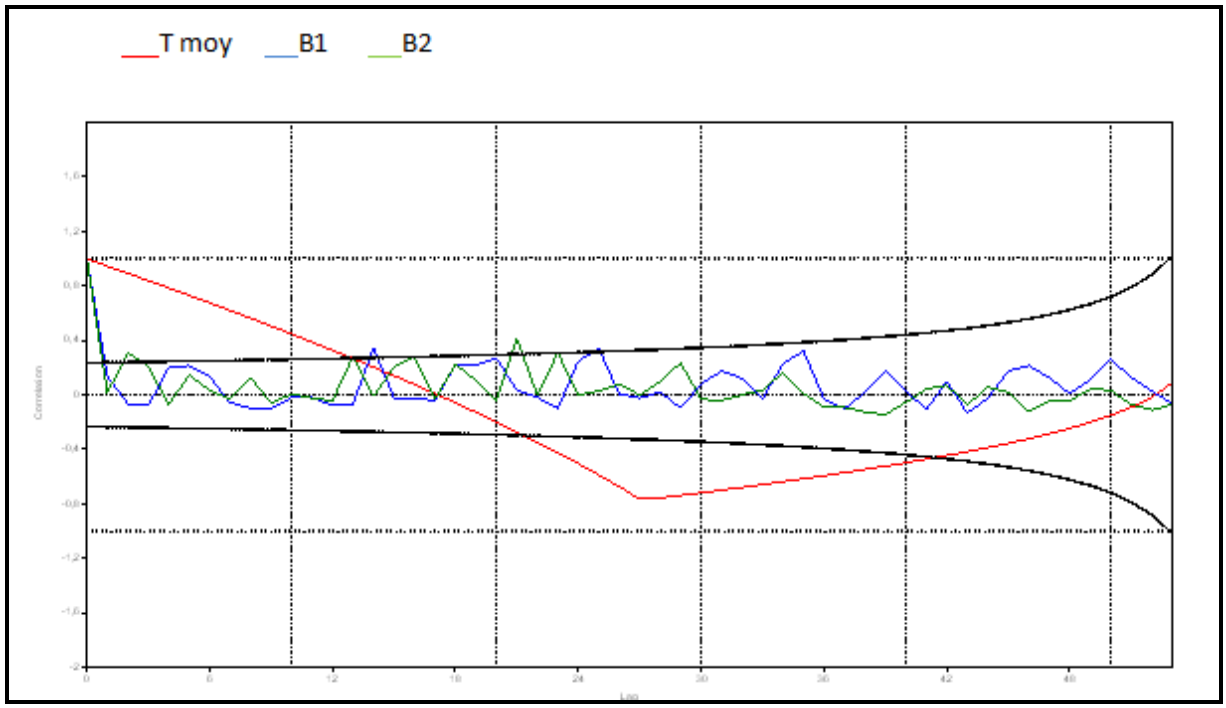
SF : Surface foliaire **; B1 :** Bactéries de la face supérieure **; B2 :** Bactéries de la face inferieure.

Figure 31 : Nombre de bactéries des deux faces de feuilles des stations d'études en fonction des surfaces foliaires**.**

Le test de corrélation entre le nombre de bactéries des deux faces avec la surface foliaire démontre une bonne corrélation.

C- Etude du nombre de bactéries en fonction de la température moyenne

La température joue un rôle important dans la vie et le développement de la végétation et par conséquent sur la diversité microbienne de la phyllosphère, d'où l'intérêt de l'étudiée, le résultat du test de corrélation entre le nombre de bactéries des deux surfaces de la feuille en fonction de la température moyennes (Tmoy) est comme suit :



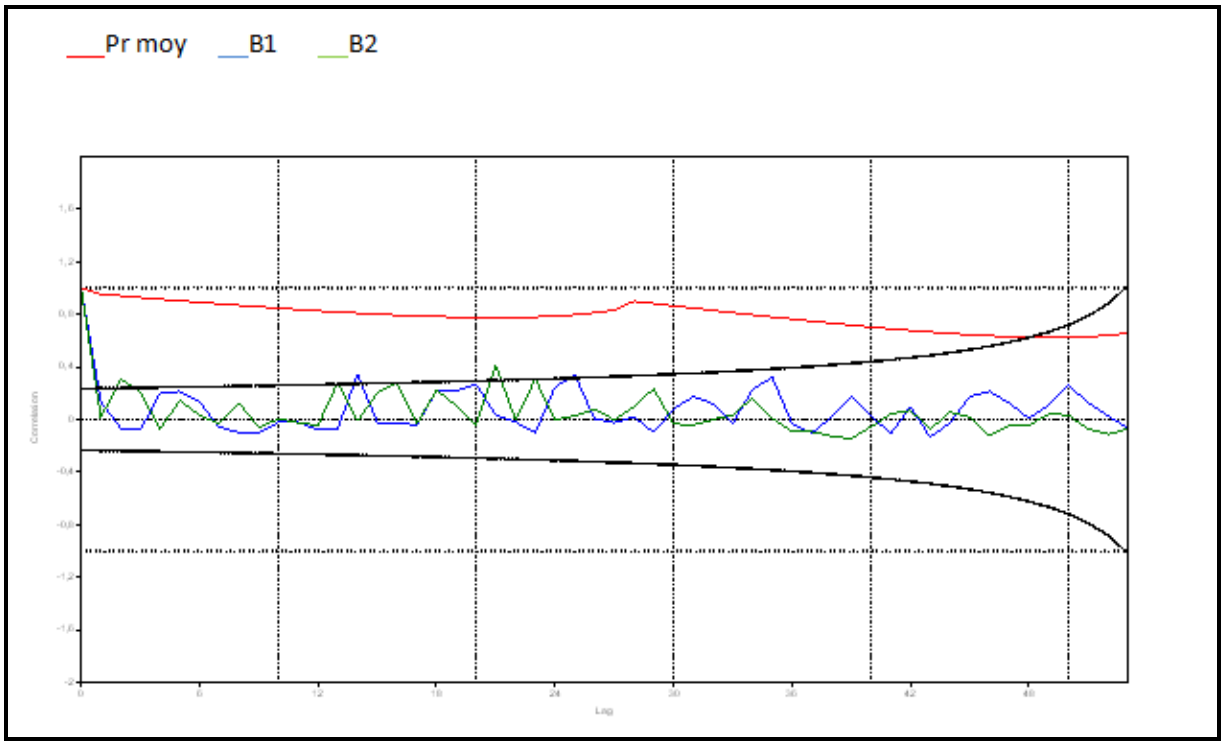
T moy : température moyenne **; B1 :** Bactéries de la face supérieure **; B2 :** Bactéries de la face inferieure.

Figure 32 : Nombre de bactéries des deux faces de feuilles des stations d'études en fonction de la T moy**.**

Le test de corrélation entre le nombre de bactéries des deux faces en fonction de la Tmoy démontre une bonne corrélation mais qui présente certaines différences a l'intérieur des stations.

D- Etude du nombre de bactéries en fonction des précipitations moyenne

Le taux de précipitations est d'une importance capitale car il influe directement sur les microorganismes de la phyllosphere en jouent un rôle dans la dynamique de leur transfert, pour cela nous avons effectué des corrélation a fin affirmer avec certitude son importance, le résultat est le suivant :



Pr moy : précipitations moyenne **; B1 :** Bactéries de la face supérieure **; B2 :** Bactéries de la face inferieure.

Figure 33 : Nombre de bactéries des deux faces de feuilles des stations d'études en fonction de la Pr moy**.**

Le test de corrélation entre le nombre de bactéries des deux faces en fonction des Pr moyennes démontre une bonne corrélation.

E- Etude du nombre de bactéries en fonction de la face supérieure et la face inférieure de la feuille

A fin d'étudié les développements des microorganismes phyllosphériques au niveau de la face supérieur par rapport à la face inférieure nous avons voulu comparé le nombre de bactéries au niveau des deux faces, le résultat est le suivant :

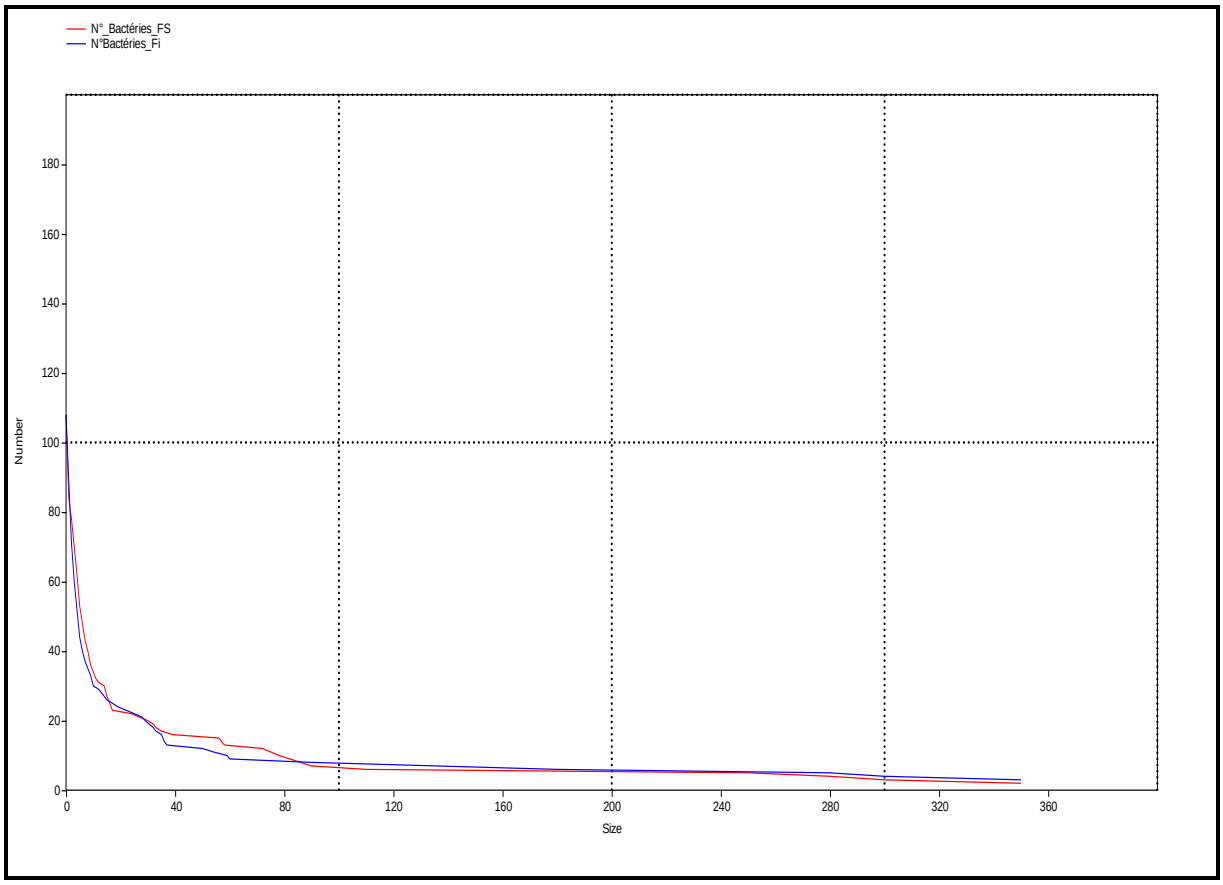


Figure 34 : Nombre de bactéries des deux surfaces de la feuille des quatre stations d'étude**.**

On constate que les deux courbes se développent de façon similaire mais il y a une légère différence observée au niveau de la courbe des bactéries de la surface supérieure qui dépasse celle des bactéries de la surface inférieure.

E- L'analyse de la variance ANOVA

Tableau05: One-way ANOVAIES

P=0,001	Effect De l'elevation
NB1	0,001***
NB 2	0,001***
Leaf area	0,001***
Pr	0,001***

L'analyse de la variance permet d'étudier le comportement d'une variable quantitative à expliquer en fonction d'une ou de plusieurs variables nominales catégorielles. Le résultat de notre analyse de la variance ANOVA est très significatif avec un taux de p de 0.001.

G- L'analyse en composantes principales ACP

C'est une méthode de la famille de l'analyse des données et plus généralement de la statistique multivariée, qui consiste à transformer des variables liées entre elles (dites « corrélées » en statistique) en nouvelles variables décorrélées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont nommées « composantes principales », ou axes principaux. Elle permet de réduire le nombre de variables et de rendre l'information moins redondante. Le but est ici d'analyser les corrélations entre les variables et d'identifier des états se différenciant fortement des autres.

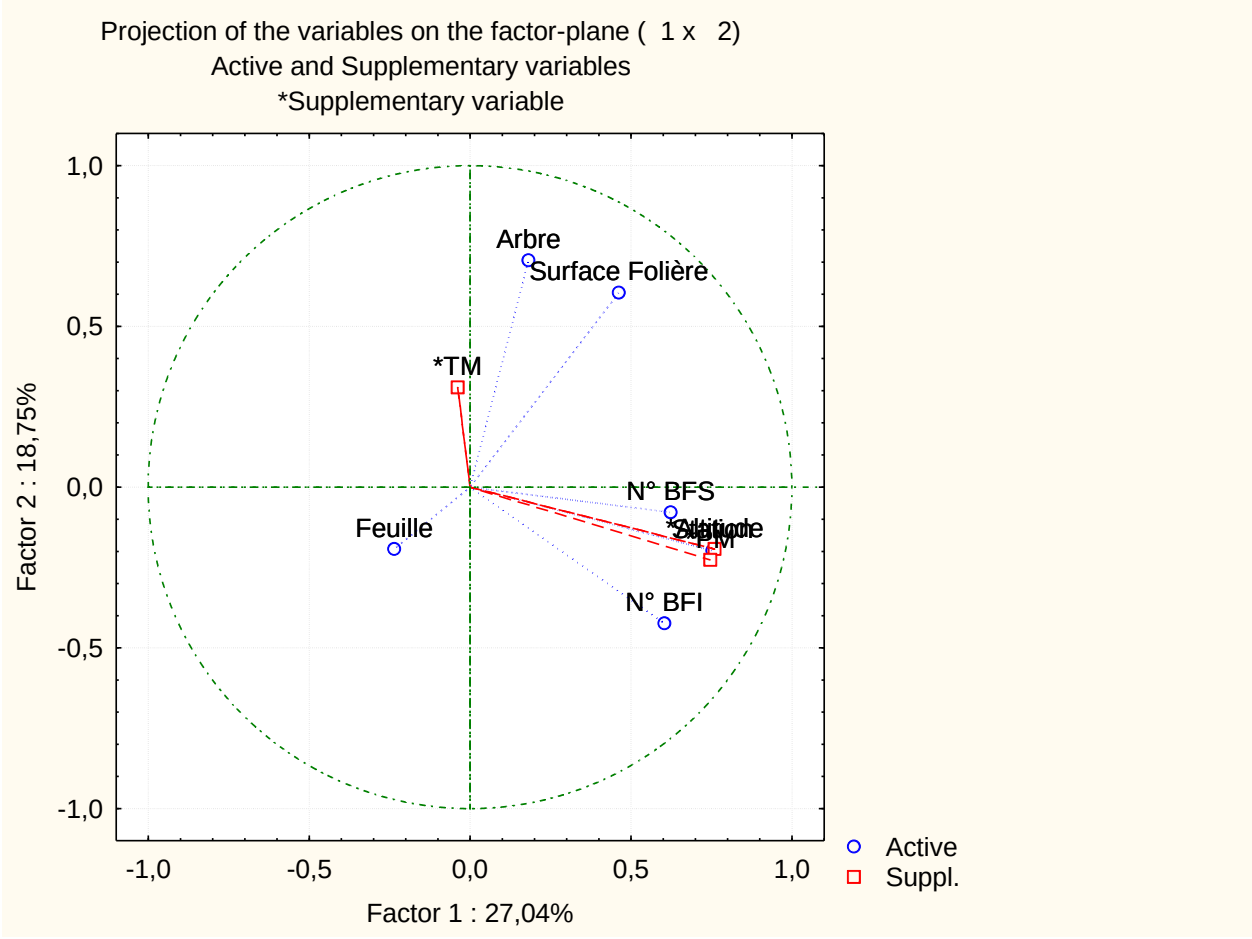


Figure 35: Le cercle des corrélations**.**

On remarque que les deux facteurs de pluviométrie moyenne et altitude représentent les deux facteurs les plus importants qui ont différenciées nos ensembles

1-1-3. Identification de quelques souches bactériennes

1-1-3-1. Caractérisation macroscopique

A caractérisation macroscopique, permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide GN Gélose après 24h d'incubation à 37°C et de déterminier les critèers relatifs aux colonies des isolats, pigementation, contou, aspect, viscosité), pour les isolats testés on a observé sur milieu solide des petites colonies de diamètre varie, de forme lenticulaire irriguliére et en étoile, de couleur blanchaitres, vert,maron ou laiteuses, avec une surface lisse, et un pourtour circulaire régulier,et une épisseur varie à la surface du milieu GN solide. Les aspects des colonies représenter dans le tableu (01).

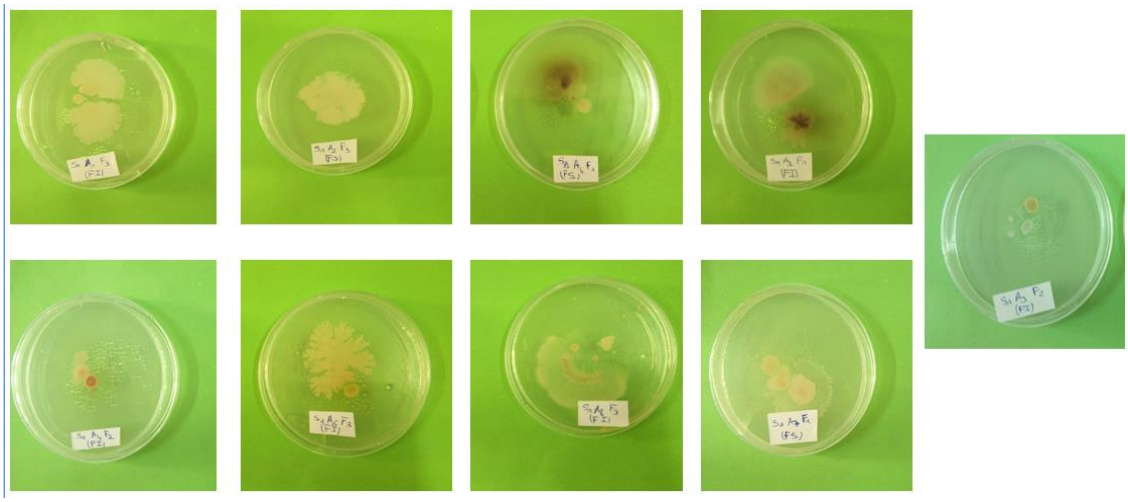


Figure 36 : Aspect des colonies bactériennes isolées des échantillons de Berrouaghia.

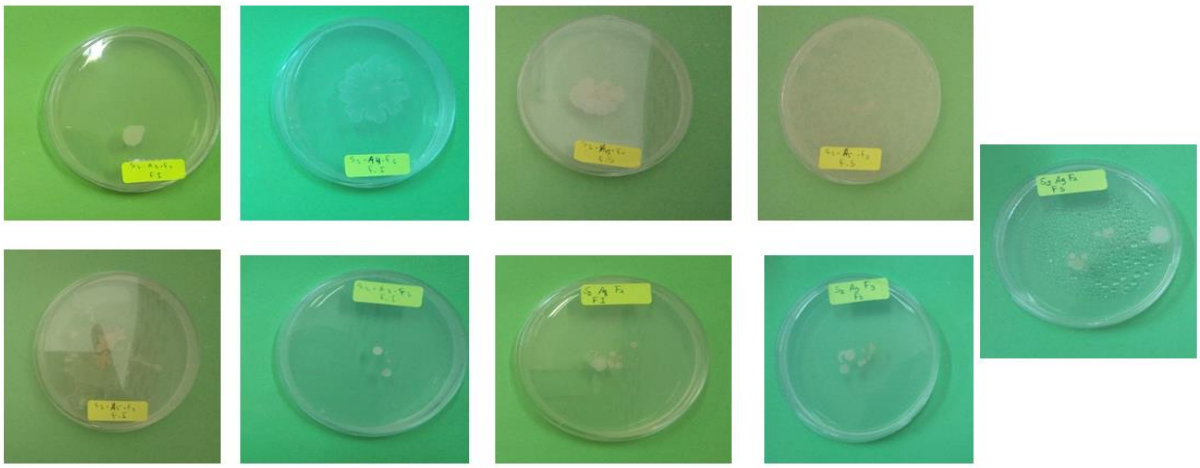


Figure 37 : Aspect des colonies bactériennes isolées des échantillons de Al Hamdania.

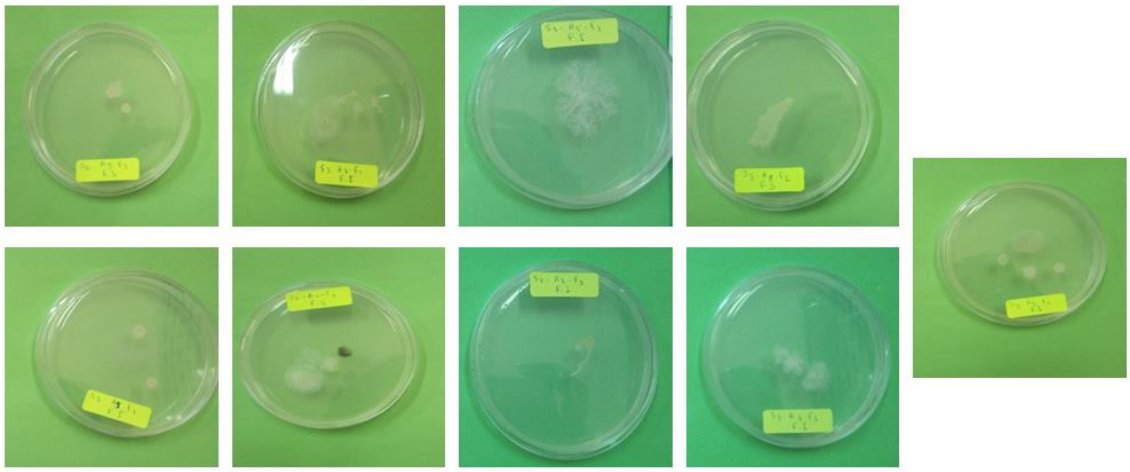


Figure 38 : Aspect des colonies bactériennes isolées des échantillons de Oued Harbil

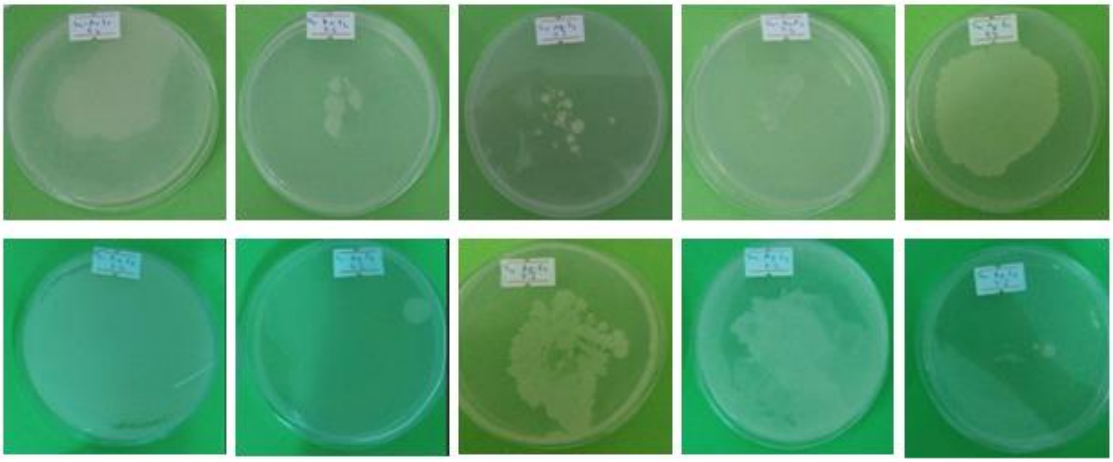


Figure 39 : Aspect des colonies bactériennes isolées des échantillons de Tamezguida

S : station d'étude. A : arbre. F : feuille. FS surface foliaire supérieure. FI : surface foliaire inférieure.

1-1-3-2. Caractérisation microscopique

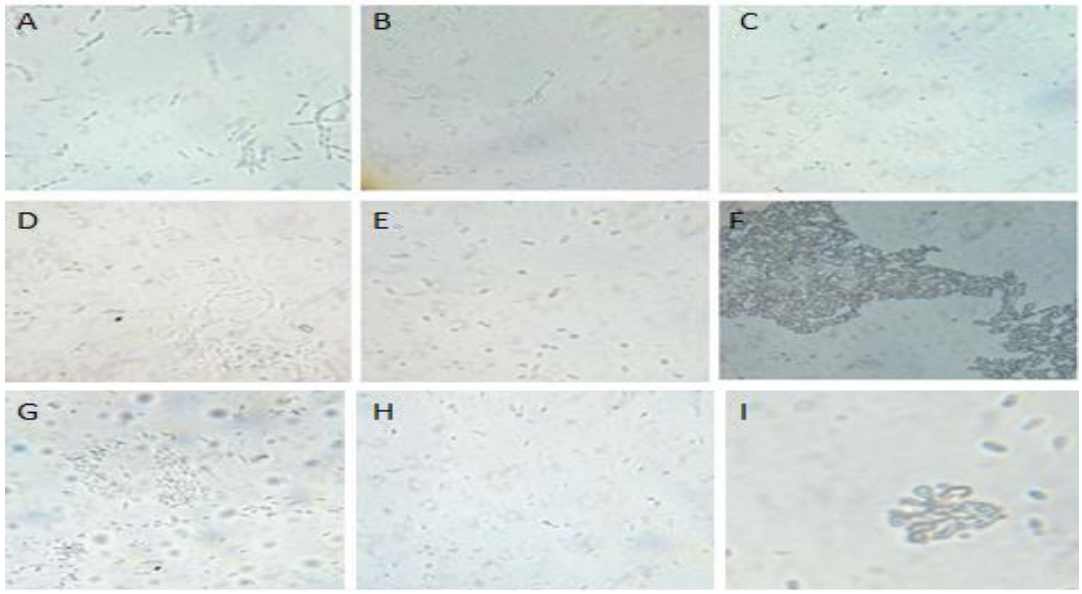


Figure 40 : Aspects morphologique cellulaire des cultures des isolats de la station Berrouaguia.

A :S1 A1 F3 (FI) B : S1 A2 F3 (FS) C: S1 A4 F1 (FS) D: S1 A2 F1 (FI) E: S1 A9 F2 (FI) F: S1 A7 F1 (FS) G: A1 A8 F3 (FI) H: S1 A6 F3 (FI) I: S1 A4 F2 (FI) .

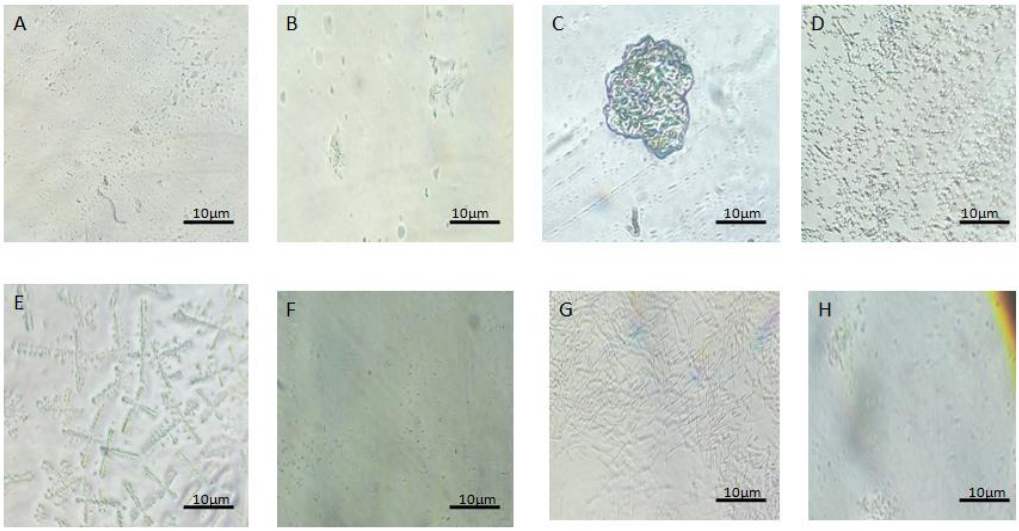


Figure 41 : Aspects morphologique cellulaire des cultures des isolats de la station El Hamdania.

A: S2 A2 F1 FI. B: S2 A4 F2 FI. C: S2 A5 F1 FS. D: S2 A5 F3 FI.

E: S2 A7 F3 FI. F: S2 A8 F1 FI. G: S2 A9 F1 FS 3 H: S2 A9 F3 FS.

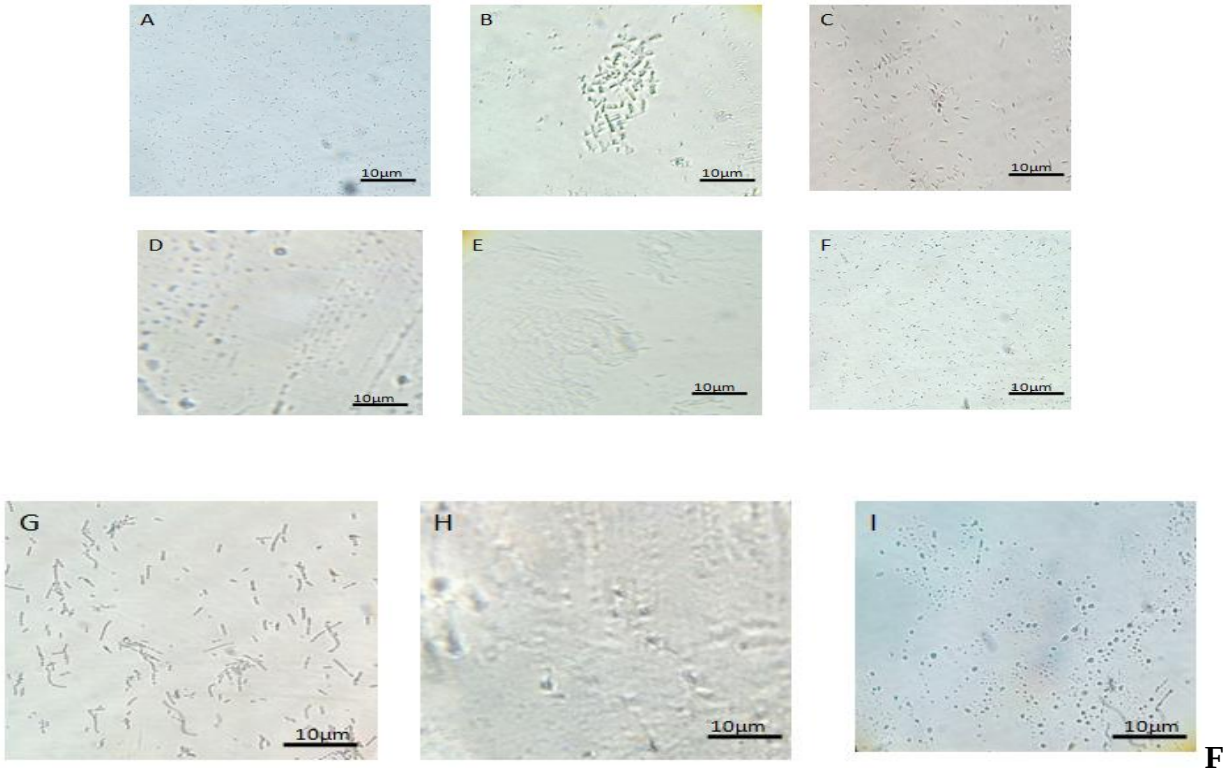


Figure 42 : Aspects morphologique cellulaire des cultures des isolats de station d'Oued Harbil

A: S3 A3 F3 FI. B: S3 A4 F1 FS. C: S3 A5 F3 FI. D: S3 A5 F3 FI MILIEU.

E: S3 A7 F1 FI F: S3 A7 F2 FI. G: S3 A8 F2 FS. H: S3 A9 F1 FI 2.

I: S3 A9 F3 FS.

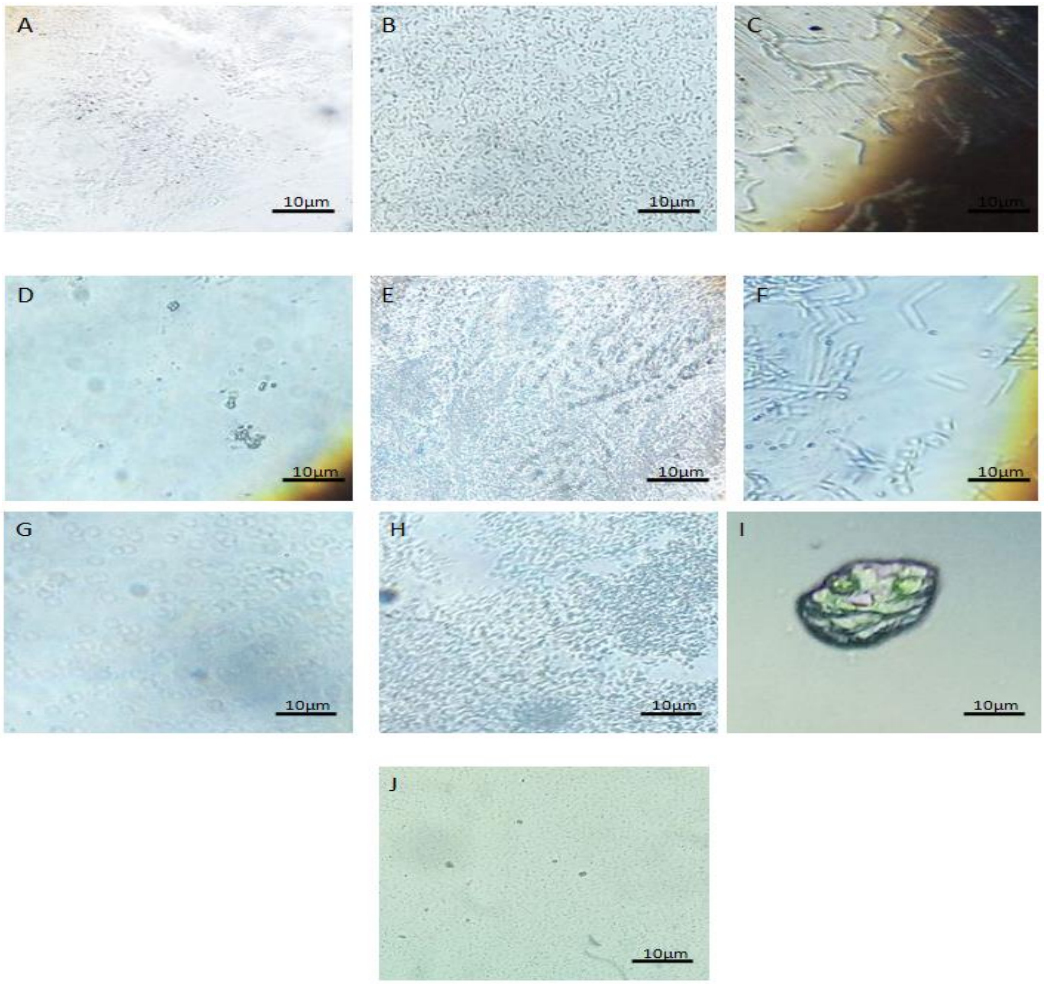


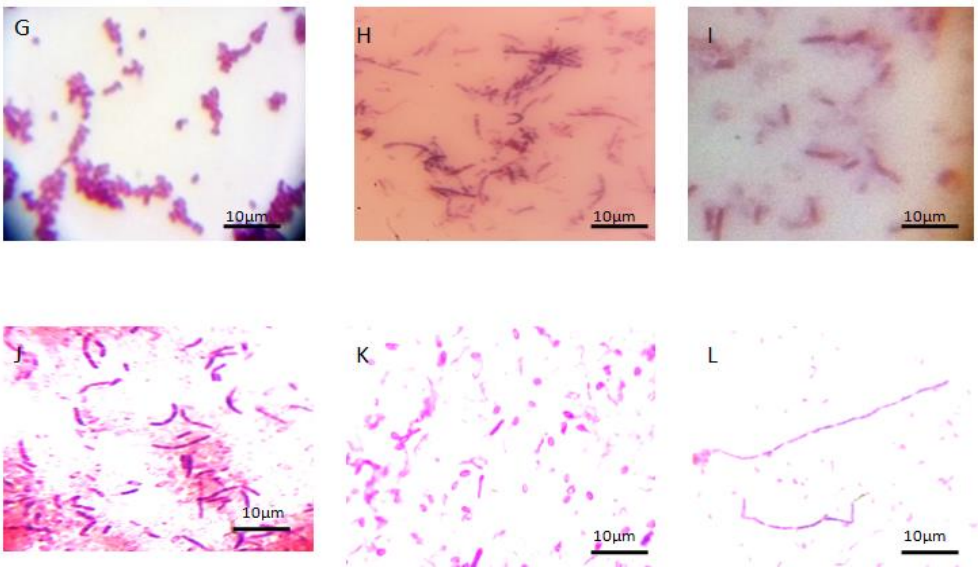
Figure 43 : Aspects morphologique cellulaire des cultures des isolats de station de Tamezguida.

A: S4 A1 F1 FS. B: S4 A1 F2 FS. C: S4 A1 F2 FI. D: S4 A4 F3 FS.

E: S4 A6 F1 FI. F: S4 A7 F3 FI. G: S4 A7 F3 FS. H: S4 A8 F1 FI.

I: S4 A9F2 FS. J: S4 A9 F3 FI.

1-1-3-3. Caractérisation physiologie et le Gram :



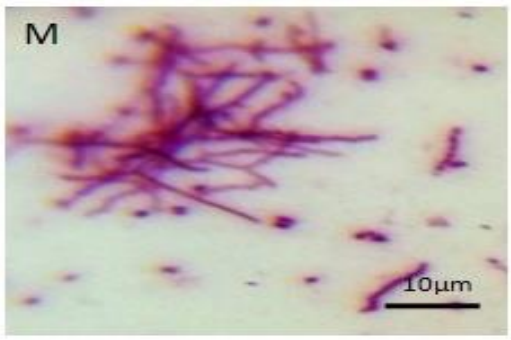


Figure 37 : le mode d'association et le Gram des cellules de les isolats de station de Berrouaghia.

A: S1 A1 F3 (FI). B: S1 A1 F3 (FS). C: S1 A2 F1 (FI). D: S1 A2 F1 (FI).
E: S1 A2 F3 (FS). F: S1 A2 F3 (FS). G: S1 A4 F1 (FS). H: S1 A4 F1 (FS).
I: S1 A4 F2 (FI). J: S1 A6 F3 (FI). K: S1 A7 F1 (FS). L: S1 A8 F3 (FI).
M: S1 A9 F2 (FI).

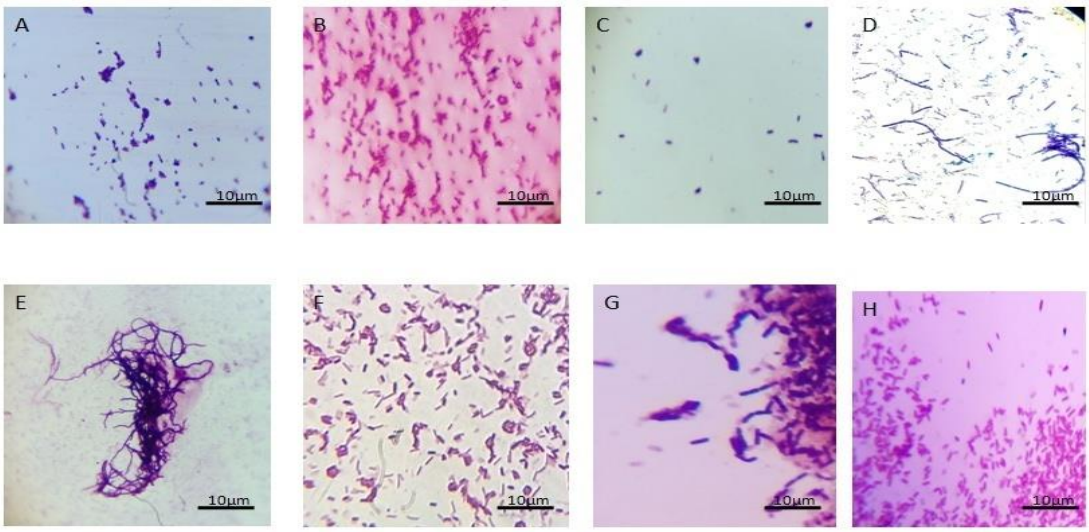


Figure 38 : le mode d'association et le Gram des cellules de les isolats de station de El Hamdania.

A: S2 A2 F1 FI. B: S2 A4 F2 FI. C: S2 A5 F1 FS. D: S2 A5 F3 FI.
E: S2 A7 F3 FI. F: S2 A8 F1 FI. G: S2 A9 F1 FS 3 H: S2 A9 F3 FS.

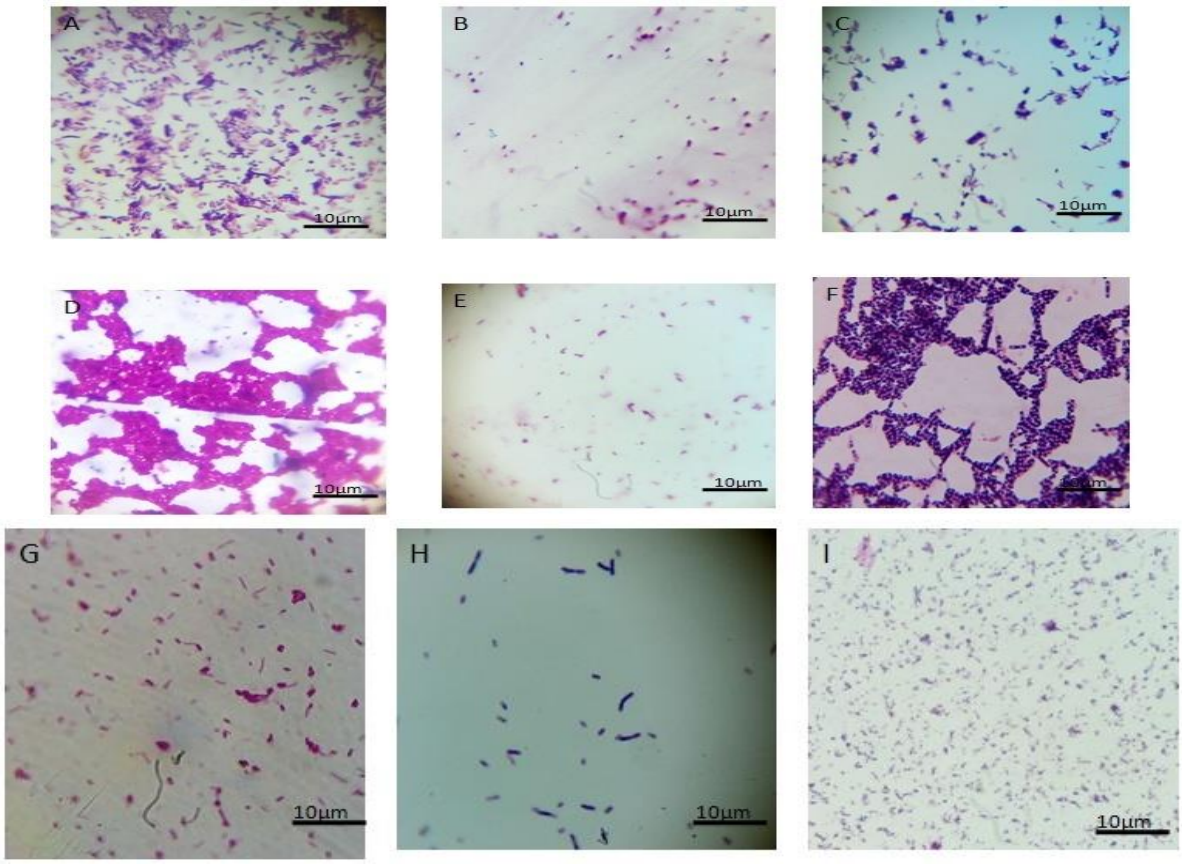


Figure 39: le mode d'association et le Gram des cellules de les isolats de station de Oued Harbil.

A: S3 A3 F3 FI. B: S3 A4 F1 FS. C: S3 A5 F3 FI. D: S3 A5 F3 FI MILIEU E: S3 A7 F1 FI F: S3 A7 F2 FI. G: S3 A8 F2 FS. H: S3 A9 F1 FI 1. I: S3 A9 F1 FI 2. J: S3 A9 F3 FS.

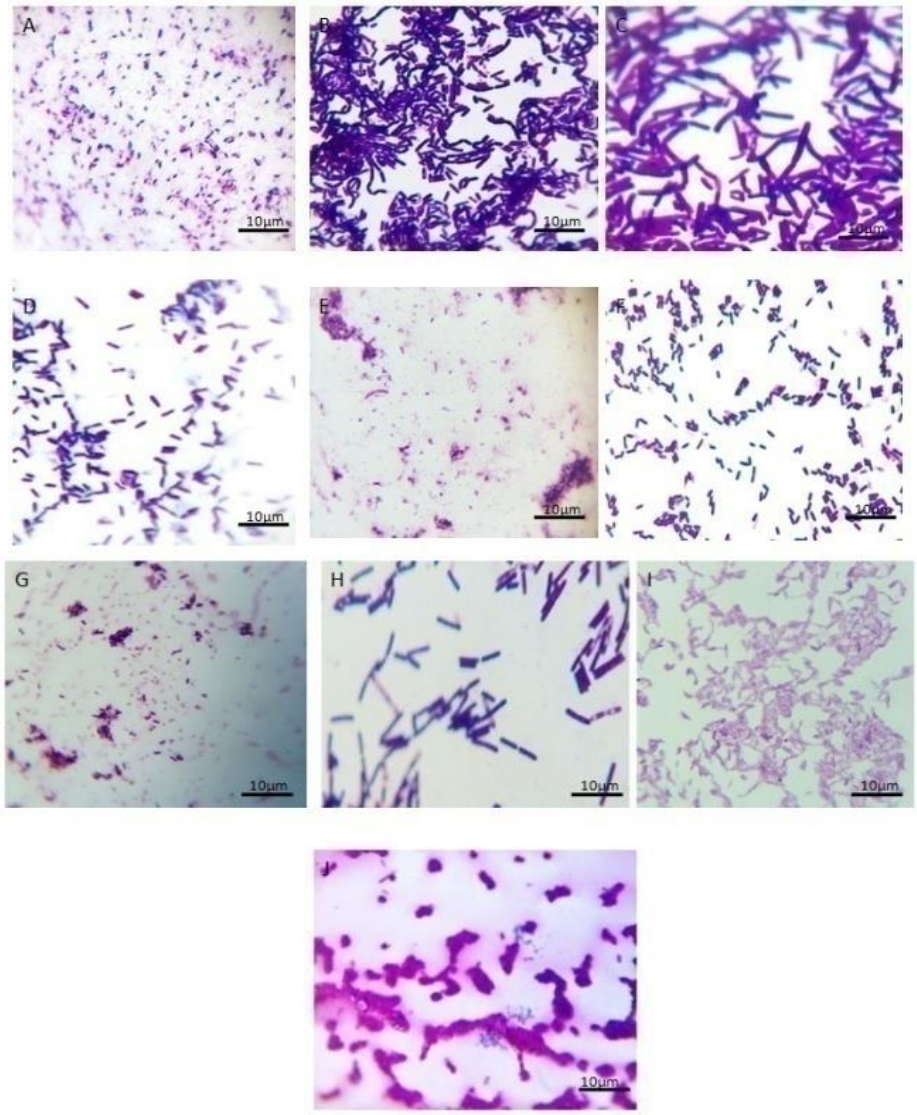


Figure 40 : le mode d'association et le Gram des cellules de les isolats de station de Tamezguida.

A: S4 A1 F1 FS. B: S4 A1 F2 FS. C: S4 A1 F2 FI. D: S4 A4 F3 FS.

E: S4 A6 F1 FI. F: S4 A7 F3 FI. G: S4 A7 F3 FS. H: S4 A8 F1 FI.

I: S4 A9F2 FS. J: S4 A9 F3 FI.

Les résultats de l'étude des aspects macroscopique et microscopique ont a permis de mettre en évidence 24 souches appartenant à différentes Bacillus, 5 souches correspondent à des Streptocoques, et 6 souches correspondants à des coccobacilles.

Tableau 06: Les caractères des isolats bactériens.

La station	Les souches	La mobilité	Gram	Catalase	Oxydase
Oued Harbil	S3 A5 F3 FI	immobiles	Bacille +	positive	
	S3 A9 F1 FI 2	immobiles	Diplobacille -	Positive	
	S3 A3 F3 FI	immobiles	Streptobacille +	Positive	
	S3 A5 F3 FI	immobiles	Bacilles +	Négative	
	S3 A9 F3 FS	immobiles	Bacilles +	Négative	Positive
	S3 A7 F1 FI	Mobiles	Bacilles +	Négative	
	S3 A8 F2 FS	immobiles	Bacille -	Positive	
El Hamdania	S2 A2 F1 FI	immobiles	Palisade +	Négative	
	S2 A9 F3 FS	immobiles	Bacilles +	Positive	
	S2 A8 F1 FI	immobiles	Streptocoque +	Positive	
	S2 A4 F2 FI	immobiles	Diplobacille -	Négative	Négative
	S2 A5 F1 FS	immobiles	Diplobacille +	Positive	
	S2 A5 F3 FI	immobiles	Streptocoque +	Négative	
	S2 A7 F3 FI	immobiles	Spirohète +	Négative	
	S2 A9 F1 FS 3	immobiles	Bacilles +	Positive	
Berrouaghia	S1 A6 F3 FI	immobiles	Streptobacille +	Négative	
	S1 A4 F2 FI A1 A8 F3 FI	Immobiles	Streptocoques +	Négative Négative	

		Immobiles	Coccobacilles -		
	S1 A7 F1 FS	immobiles	Streptobacilles +	Positive	Negative
	S1 A2 F1 FI	immobiles	Coccobacilles -	Positive	
	S1 A2 F3 FS	immobiles	Streptocoque +	Négative	
	S1 A9 F2 FI	immobiles	Coques -	Négative	
	S1 A1 F3 FI	mobiles	Bacilles-	Positive	
	S1 A4 F1 FS	mobiles	Coccobacilles -	Positive	
Tamezguida	S4 A1 F1 FS	Immobile	Cocobacilles +	Positive	
	S4 A6 F1 FI	Immobile	Cocobacille +	Positive	
	S4 A1 F2 FI	Immobile	Streptobacill +	Positive	
	S4 A4 F3 FS	Immobile	Palissade +	Positive	
	S4 A1 F1 FS	Immobile	Cocobacille -	Positive	
	S4 A7 F3 FI	Immobile	bacille -	Positive	
	S4 A1 F2 FS	Immobile	Palissade +	Positive	
	S4 A7 F3 FS	Immobile	Bacille -	Positive	

	A8 F1 FI	Immobile	Palissade -	Positive	
	A9 F2 FS	Immobile	Palissade -	Positive	
	A9 F3 FI	Mobiles	Staphylocoque -	Positive	

1-1-3-4. Les résultats de l'étude des aspects biochimique :

Les méthodes de caractérisation bactériologiques décrites ont permis une identification préliminaire des isolats cités. (S3 A9 F1 FI, S2 A5 F3 FI, S2 A5 F3 FI, et S2 A4 F2 FI).

Les résultats obtenus par les galeries constituent le profil biochimique de la souche et servent à son identification à l'aide du logiciel d'identification, qui nous a permis de mettre en évidence différentes souches bactériennes des genres : *Pseudomonas sp*, Paenibacillus, des *micrococus lenteus*, *Proteus vulgaris*, et *Vibrio fluvialis*



Figure 41 : Résultat du test des galeries biochimique des quatre souches sélectionnées.

1-2. Identification génotypique des séquences fongique

Pour déterminer la composition et la structure des assemblages fongiques phyllosphérique du pistachier lentisque *Pistacia lentiscus* selon l'élévation. Nous avons choisi des stations d'échantillonnage tout au long d'un gradient d'élévation croissant sur la wilaya de Médéa. Le fait d'avoir pris que deux stations sur quatre est due a la disponibilité des données de séquençage de ces deux stations seulement.

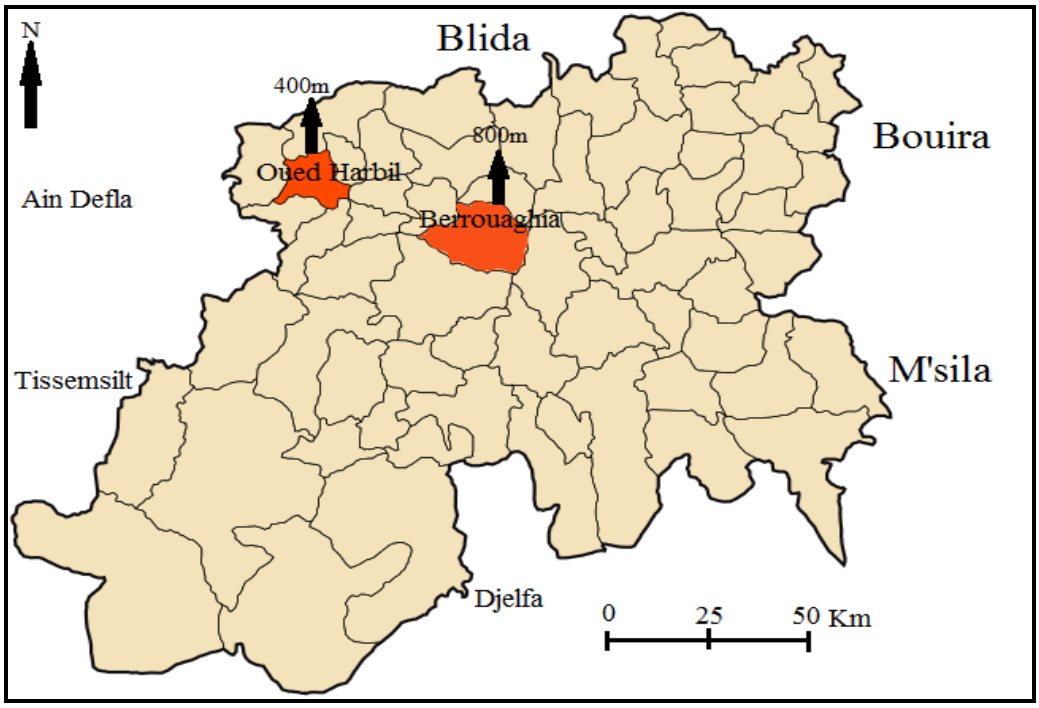


Figure : les deux stations d'étude (Oued Harbil et Berrouaghia).

1-2-1. Résultat du traitement des OTUs :

Après le traitement statistique des 521 OTUs de deux stations, nous avons estimé le niveau de diversité et l'influence sur ces communautés.

1-2-1-1. la diversité des assemblages fongiques

Tableau 07: les OTUs les plus abondants dans chaque station.

OTU_ID	Berrouaghia	Oued Harbil
OTU_15	**1393**	0
OTU_2	**82210**	**133401**
OTU_21	**435**	0
OTU_232	**2923**	**1962**
OTU_3	**15061**	543
OTU_4	**23572**	**30433**
OTU_6	**5584**	0
OTU_7	**547**	0
OTU_9	**1664**	457
OTU_97	0	**544**

Le traitement statistique montré que les OTUs 15, 21, 3, 6, 7, 9 sont propres à la station Berrouaghia à altitude 800m et OTU 97 est propre a la station Oued Harbil à 400m. Et les OTUs 2, 232, 4 sont propres à l'espèce *Pistacia lentiscus.*

1-2-1-2. ANOVA

Tableau 08: La variance ANOVA entre l'élévation et l'espèce.

Source	Df	Sums of sqs	F
Elevation × *P. lentiscus*	2	1,9677	0,008***

Le résultat de notre analyse de la variance ANOVA est très significatif avec un taux de p de 0.008.

1-2-1-3. Annotation des séquences fongiques :

Nous nos sommes intéressés aux OTUs les plus significatif et non assigné que nous avons annoté avec les étapes précédemment cité.

Tableau 09: l'identification des OTUs les olus significatifs.

P. Lentiscus.L

OTU	identification
2	Non assigné
3	Non assigné
4	
6	
7	
9	
15	
21	
97	Non assigné
232	

Le résultat de l'annotation des OTUs non assigné obtenus sont des arbres phylogéniques :

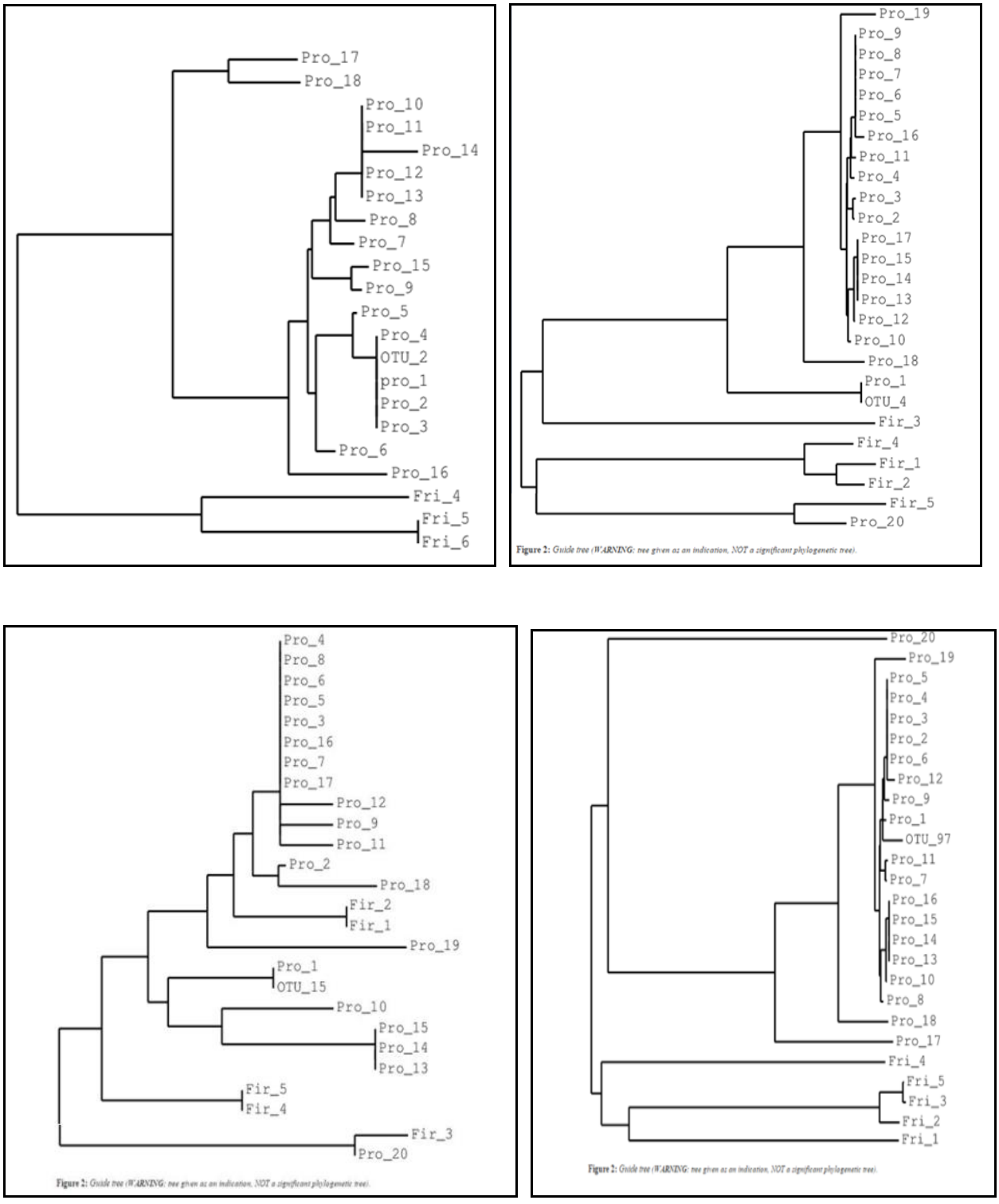


Figure 42 : Les arbres phylogéniques des OTUs les plus significatifs.

Tableau 10 : Résultat de l'annotation les OTUs étudié.

OTUs	LOCUS	GeneBank	Journal	Identification BLAST
OTU_2	MF136541 525 bp DNA linear PLN 27-MAY-2017	MF136541.1	Submitted (19-MAY-2017) Entomology and Plant Pathology, University of Tennessee, 2505 E.J. Chapman Dr., Knoxville, TN 37996, USA	*Aureobasidium sp.*
OTU_3	MF136541 525 bp DNA linear PLN 27-MAY-2017	MF136541.1	Submitted (19-MAY-2017) Entomology and Plant Pathology, University of Tennessee, 2505 E.J. Chapman Dr., Knoxville, TN 37996, USA	*Aureobasidium pullulans*
OTU_4	EF193083 657 bp DNA linear PLN 03-JUN-2008	EF193083.1	Submitted (18-DEC-2006) Southwestern China Wild Species Bank, Kunming Insititute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650204, P.R. China	*Anacardiaceae; Pistacia.*
OTU_6	KT824245 1647 bp DNA linear PLN 09-NOV-2015	KT824245.1	Submitted (22-SEP-2015) Plant Pathology, University of Tehran, Daneshkadeh Street, Karaj, Alborz 31587-77871, Iran	*Endoconidioma populi*
OTU_7	MF072539 566 bp DNA	MF072539.1	Submitted (08-MAY-2017) Department of Studies in Botany,	*AscochytaAscochyta rabiei*

	linear PLN 14-MAY-2017		University of Mysore, Manasagangotri, Mysore, Karnataka 570 006, India	
OTU_9	KY438230 509 bp DNA linear PLN 30-MAY-2017	KY438230.1	Submitted (15-DEC-2016) Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione animale e la Sicurezza alimentare, Universita degli Studi di Milano, Via Annibale Grasselli, 7, Milano 20137, Italy	*Cladosporium cladosporioides*
OTU_15	KU314995 517 bp DNA linear PLN 31-MAY-2016	KU314995.1	Submitted (14-DEC-2015) Life Science and System Biology, University of Turin, Via Mattioli 25, Turin, TO 30100, Italia	*Ochrocladosporium frigidarii*
OTU_21	HQ432993 919 bp DNA linear ENV 15-JUL-2014	HQ432993.1	Submitted (22-OCT-2010) School of Natural Resources & Environment, University of Michigan, 440 Church St, Ann Arbor, MI 48109, USA	*Fungi*; environmental samples.
OTU_97	KT956136 703 bp DNA linear PLN 12-APR-2016	KT956136.1	Submitted (23-OCT-2015) Departament de Botanica, Universitat de Valencia, Av. Dr. Moliner, 50, Burjassot, Valencia E-46100, Spain	*Leucosporidium*.
OTU_232	KX249734 542 bp	KX249734.1	Submitted (16-MAY-2016) Faculty of	*Aureobasidium pullulans*

	DNA linear PLN 01-FEB-2017		Pharmacy, AinShams University, Khalifa El-Maamon st, Abbasiya sq., Cairo 11566, Egypt	

L'analyse taxonomique montre que les isolats de la phyllosphère de pistachier lentisque en fonction de leur sites d'études (altitudes déférentes) ont une biodiversité des espèces fongique. Pour les OTUs 232 et 3 les genres Aureobasidium sont les plus abondantes dans la station de berrouaghia à 800m, et pour les OTUs 97 et 2 ce sont des genres de Leucosporidium et se trouvent principalement dans la station Oued Harbil.

Nous avons remarqué que la plus part des espèces fongique annoté sont des divisions Ascomycota et Basidiomycota.

Pour l'OTU 4 nous avons remarqué que l'organisme est *Anacardiaceae; Pistacia,* ça pourrait être en séquençant les feuilles de l'arbre, ces champignons ont était considérés comme un morceau de la feuille et répertoriés comme tel. Car avec la technique du barcoding nous avons réellement isolé les champignons des morceaux de feuilles , cette information sera communiqué aux banque de gènes a fin de répertorier ces espèces autant que fungis phyllosphériques .

2- Discussion

Dans cette étude nous avons comparé les composants phyllospheriques bactéries et champignons du pistachier lentisque selon un gradient altitudinal croissant, nous avons organisé ce travail en deux parties, la première ciblai a étudier les communautés bactériennes dans quatre stations, la deuxième par contre ciblai un traitement des résultats de séquençage brute effectué préalablement sur deux de nos stations toujours avec une différence en altitude.

L'analyse des résultats de notre travail montre que de nombreux facteurs déterminent la diversité et la structure des communautés bactériennes et fongiques de la phyllosphère du pistachier lentisque. Les variations dans les conditions biotiques et abiotiques, tels que l'élévation, Les conditions climatiques, génèrent une variation spatiale dans les communautés des microorganismes phyllosphériques.

Les résultats des analyses statistiques montrent que le nombre de bactéries dénombrées par surface de feuille varie significativement en fonction de l'élévation cela a été confirmé grâce à une corrélation. La station qui représente le plus grand nombre de bactérie est celle de Tamzghuida avec une élévation de 1000m, suivit par la station Berroughia d'une élévation de 800m, donc c'est une relation de corrélation positive, plus on va vers une élévation plus élevée plus le nombre de bactéries augmente. Sauf qu'au cours de notre étude nous avons constaté que dans la station Oued Harbil avec une élévation de 400m a un nombre de bactéries presque équivalant à celui de la station Al Hamdania avec une élévation de 560m. Et c'est la que d'autres facteurs rentrent en vigueur aussi, Tmoy et Pr moy eux aussi agissent positivement sur le nombre de bactéries, il existe une corrélation positives du nombre de bactéries en fonction de ces facteurs.

Le nombre de bactéries varié également en fonction des surfaces foliaire, notre teste de corrélation démontre une corrélation positive, car plus la surface foliaire est plus grande plus le nombre de bactéries est plus important.

Il existe une différence mais pas très importante entre le nombre de bactéries des deux faces supérieures et inférieurs, donc on ne peut pas confirmé avec certitude que c'est un facteur décisive du nombre de bactérie.

Ainsi le nombre des communautés bactériennes est intimement lier aux caractéristiques climatiques de la station, l'altitude et la surface de la feuille qui constitue un microclimat pour ces assemblages.

Suite à toutes ces analyses nous avons effectué une Anova qui c'est révélé très significatif. l'Anova a un seul facteur vient confirmer nos résultats avec un p très significatif pour le site et l'élévation ainsi que pour la surface foliaire.

Puis nous avons fais un test d'ACP ou le cercle des corrélations nous a permis de confirmé que les deux facteurs de pluviométrie moyenne et altitude représentent les deux facteurs les plus importants qui ont différenciées nos ensembles. Et qui ont un grand rôle dans l'organisation des assemblages bactériens de la phyllosphère, ces résultats nous ont poussé à isoler les espèces que nous avons observé par l'étude macroscopique, microscopique et enfin par l'étude bioiochimique.

Les résultats de l'étude des aspects macroscopique et microscopique ont a permis de mettre en évidence des souches appartenant à différentes Bacillus, des souches correspondent à des Streptocoques, et des souches correspondants à des coccobacilles. Mais pour avoir une classification plus précise, l'identification repose sur le profil biochimique de la bactérie à l'aide de galerie biochimique. Cette technique nous a permis de caractérisé quatre souches, avec des profiles biochimiques qui nous ont permis une identification à l'aide du logiciel d'identification. Des souches bactériennes des genres : *Pseudomonas sp, Paenibacillus sp,* des *micrococus lenteus, Proteus vulgaris,* et *Vibrio fluvialis*

Certaines de ces souches semblent parfois être propres à certaines conditions ou exigences environnementales tel est le cas de la bactérie *Paenibacillus sp*, qu'on a pu retrouvée au niveau des deux stations : Oued Harbil, Tamezghuida ; toutes deux se caractérisent par le fait que ce sont des régions loin de pollution et de sédentarité.

Les résultats obtenus montrent une similitude avec d'autres résultat précédent ou la position taxonomique d'un groupe de souches isolées de la La phyllosphère des graminées d'herbe avec une comparaison de la séquences de gènes d'ARNr 16S, a permis d'identifiées les souches *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas costantinii*. Et une espèce nouvelle pour laquelle Le nom *Pseudomonas lurida sp*.

D'autres travaux aussi indiquent que les espèces qu'on retrouve généralement au niveau de la phyllosphère sont : l'espèce type du genre *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que l'espèce *P. fluorescens, P. putida et P. chlororaphis* ; avec une prédominance de l'espèce *P. fluorescens.* Les espèces de *Pseudomonas* se répartissent de manière aléatoire par rapport aux biotopes.

Nos résultats de traitements statistiques des séquences fongiques étudiées, montres que certains des assemblages fongiques sont affecté par le gradient d'élévation croissant, et d'autre sont des assemblages spécifiques à la phyllosphère de Pistacia lentiscus.

l'étude des OTUS DES champignons a démontrer une forte corrélation entre ces communautés et l'altitude , une Anova a été performé a fin de cerner ces affinités , un p très significatif a été également observé , nous avons par la suite isoler les espèces de fungi les plus liée à l'espèce et a chacune des stations individuellement , pour cela 10 OTU ont été étudiés 4 d'entre elles sont non assigné dans les banques , un travail d'annotation génomique s'est avérer nécessaire pour répertorié ces espèces.

A partir de l'annotation des séquences fongiques les plus significatifs (10 OTUs), on a montré que les séquences fongiques de la phyllosphère de pistachier lentisque en fonction de leurs altitudes déférentes ont une richesse et biodiversité fongique. Le résultat de l'identification des séquences est l'identification du champignon *Aureobasidium pullulans* dans les deux stations ce qui ne permis de déduire donc que ce champignon est propre à l'espèce.

Pour l'OTU 4 nous avons remarqué que l'organisme identifier est *Anacardiaceae; Pistacia,* ça pourrait être en séquençant les feuilles de l'arbre, ces champignons ont était considérés comme un morceau de la feuille et répertoriés comme tel.

Pour terminer, l'analyse des résultats de notre travail montre que de nombreux facteurs déterminent la diversité et la structure des communautés fongiques de la phyllosphère du pistachier lentisque. Les variations dans les conditions abiotiques, avec gradients environnementaux, tels que l'élévation génèrent une variation spatiale dans les communautés des fongiques phyllosphériques.

Conclusion

La phyllosphère présente de nombreuses caractéristiques qui en font un excellent habitat pour étudier l'écologie microbienne.

Les feuilles sont propres et les microbes peuvent être observés directement sur les feuilles, ce qui permet d'utiliser de puissantes nouvelles techniques microscopiques pour mesurer l'identité microbienne, l'activité et l'expression des gènes.

Pour tester les modèles de comportement microbien, nous avons choisi les microorganismes de la phyllosphere du pistachier lentisque.

L'organisation des composants de la phyllosphère dans les feuilles de Pistacia lentiscus, leur répartition et leur densité sont homogènes. Les bactéries sont numériquement supérieures aux champignons. Le nombre de colonies est corrélé à la surface de la feuille, il existe une corrélation significative entre le nombre de bactéries, le nombre de champignons et la surface foliaire avec le site et l'espèce, l'élévation du site a un impact important dans la composition de la Phyllosphère.

Il est à conclure que la composition des assemblages bactériens et fongiques, de la phyllosphère de pistachier lentisque, varient considérablement en fonction de l'espèce et du site, l'élévation reste un facteur dominant de la séparation de ces assemblages. Une telle différence dans la composition de la phyllosphère de Pistacia lentiscus est très liée à l'espèce et à l'élévation du site d'échantillonnage, la distance géographique entre les sites reste une étude factorielle en perspective. Ainsi, la microbiologie de la phyllosphère a beaucoup à offrir dans le domaine de l'écologie microbienne et promet de contribuer à l'environnement.

Reference

[1] Leveau, J.H.J. and Lindow, S.E. (2001) Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. PNAS 98, 3446–3453.

[2] Whipps, J. M., et al. "Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype." *Journal of Applied Microbiology* 105.6 (2008): 1744-1755. [10] Kadivar, H., & Stapleton, A. E. (2003). Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity. *Microbial Ecology*, *45*(4), 353-361.

[3] Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental microbiology*, *12*(9), 2385-2397.

[4] Kembel, S. W., O'Connor, T. K., Arnold, H. K., Hubbell, S. P., Wright, S. J., & Green, J. L. (2014). Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(38), 13715-13720.

[5] Osono, T. (2006). Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal of Microbiology*, *52*(8), 701-716.

[6] Sun, C., Taylor, T. N., Na, Y., Li, T., & Krings, M. (2015). Unusual preservation of a microthyriaceous fungus (Ascomycota) on Sphenobaiera (ginkgophyte foliage) from the Middle Jurassic of China. *Review of Palaeobotany and Palynology*, *223*, 21-30.

[7] Müller, T., & Ruppel, S. (2014). Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS microbiology ecology*, *87*(1), 2-17.

[8] Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S. W., & Sa, T. M. (2009). Methylobacterium phyllosphaerae sp. nov., a pink-pigmented, facultative methylotroph from the phyllosphere of rice. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *59*(1), 22-27.

[9] Xie, W. Y., Su, J. Q., & Zhu, Y. G. (2015). Phyllosphere bacterial community of floating macrophytes in paddy soil environments as revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Applied and environmental microbiology*, *81*(2), 522-532.

[10] Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and environmental microbiology*, *69*(4), 1875-1883.

[11] Bringel, Françoise, and Ivan Couée. "Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics." *Frontiers in microbiology* 6 (2015): 486.

[12] Nadalig, T., Haque, M. F. U., Roselli, S., Schaller, H., Bringel, F., & Vuilleumier, S. (2011). Detection and isolation of chloromethane-degrading bacteria from the Arabidopsis thaliana phyllosphere, and characterization of chloromethane utilization genes. *FEMS microbiology ecology*, *77*(2), 438-448.

[13] Kembel, S. W., O'Connor, T. K., Arnold, H. K., Hubbell, S. P., Wright, S. J., & Green, J. L. (2014). Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(38), 13715-13720.

[14] Davey, M. L., Nybakken, L., Kauserud, H., & Ohlson, M. (2009). Fungal biomass associated with the phyllosphere of bryophytes and vascular plants. *mycological research*, *113*(11), 1254-1260.

[15] Ottesen, A. R., Gorham, S., Pettengill, J. B., Rideout, S., Evans, P., & Brown, E. (2015). The impact of systemic and copper pesticide applications on the phyllosphere microflora of tomatoes. *Journal of the Science of Fo*[16] Osono, T., & Mori, A. (2003). Colonization of Japanese beech leaves by phyllosphere fungi. Mycoscience, 44(6), 437-441.

[16]Aleklett, K., Hart, M., & Shade, A. (2014). The microbial ecology of flowers: an emerging frontier in phyllosphere research 1. *Botany*, *92*(4), 253-266.

[17] Kinkel, L.L. (1997) Microbial population dynamics on leaves. *Annu Rev Phytopathol* 35, 327 347.

[18] Vokou, D., Vareli, K., Zarali, E., Karamanoli, K., Constantinidou, H. I. A., Monokrousos, N., ... & Sainis, I. (2012). Exploring biodiversity in the bacterial community of the Mediterranean phyllo sphere and its relationship with airborne bacteria. *Microbial ecology*, *64*(3), 714-724.

[19] Bringel, F., & Couée, I. (2015). Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. *Frontiers in microbiology*, *6*, 486.

[20] Zak, J. C. (2002). Implications of a leaf surface habitat for fungal community structure and function. *Phyllosphere Microbiology. APS, St. Paul, MN*, 299-315.

[21] Hirano, S. S., & Upper, C. D. (1989). Diel variation in population size and ice nucleation activity of Pseudomonas syringae on snap bean leaflets. *Applied and environmental microbiology*, *55*(3), 623-630.

[22] Fonseca, A., & Inácio, J. (2006). Phylloplane yeasts. In *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (pp. 263-301). Springer Berlin Heidelberg.

[23] Cordier, Tristan. Structure des assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers et effet potentiel du changement climatique. Diss. UNIVERSITE BORDEAUX 1, 2012.

[24] Studholme, D. J., Kemen, E., MacLean, D., Schornack, S., Aritua, V., Thwaites, R., ... & Jones, J. D. (2010). Genome-wide sequencing data reveals virulence factors implicated in banana Xanthomonas wilt. *FEMS microbiology letters*, *310*(2), 182-192.

[25] Suslow, T. V. (2002). Production practices affecting the potential for persistent contamination of plants by microbial foodborne pathogens. *Phyllosphere microbiology. APS Press, St. Paul, Minn*, 241-256.

[26] Martins, G., Lauga, B., Miot-Sertier, C., Mercier, A., Lonvaud, A., Soulas, M. L., ... & Masneuf-Pomarède, I. (2013). Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations. *Plos one*, *8*(8), e73013.

[27] Whipps, J., Hand, P., Pink, D., & Bending, G. D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(6), 1744-1755.

[28] Beattie, G.A. (2002) Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms. In Phyllosphere Microbiology ed. Lindow, S.E., Hecht-Poinar, E.I. and Elliott, V.J. pp. 3–26 St. Paul, USA: APS Press.

[29] Behrendt, U., Müller, T., & Seyfarth, W. (1997). The influence of extensification in grassland management on the populations of micro-organisms in the phyllosphere of grasses. *Microbiological Research*, *152*(1), 75-85.

[30] Mansvelt, E. L., & Hattingh, M. J. (1987). Scanning electron microscopy of colonization of pear leaves by Pseudomonas syringae pv. syringae. *Canadian journal of botany*, *65*(12), 2517-2522.

[31]Mew, T. W., & Cruz, C. V. (1986). Epiphytic colonization of host and non-host plants by phytopathogenic bacteria. *Microbiology of the phyllosphere/edited by NJ Fokkema and J. van den Heuvel*.

[32] Whipps, J., Hand, P., Pink, D., & Bending, G. D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(6), 1744-1755.

[33] Murty, M. G. (1984). Phyllosphere of cotton as a habitat for diazotrophic microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, *48*(4), 713-718.

[34] Yadav, R. K. P., Karamanoli, K., & Vokou, D. (2011). Bacterial populations on the phyllosphere of Mediterranean plants: influence of leaf age and leaf surface. *Frontiers of Agriculture in China*, *5*(1), 60-63.

[35] Jumpponen, A., & Jones, K. L. (2009). Massively parallel 454 sequencing indicateshyperdiverse fungal communities in temperate Quercus macrocarpa phyllosphere. *New Phytologist*, *184*(2), 438-448.

[36] Davey, M. L., Nybakken, L., Kauserud, H., & Ohlson, M. (2009). Fungal biomass associated with the phyllosphere of bryophytes and vascular plants. *mycological research*, *113*(11), 1254-1260.

[37] Osono, T. (2007). Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (Cornus stolonifera) in British Columbia. Mycoscience, 48(1), 47-52.

[38] Stapleton, A. E., & Simmons, S. J. (2006). Plant control of phyllosphere diversity: genotype interactions with ultraviolet-B radiation. *Microbial ecology of the aerial plant surface*, 223-238.

[39] Sundin, G. W. (2002). Ultraviolet radiation on leaves: its influence on microbial communities and their adaptations. *Phyllosphere microbiology*, 27-41.

[40] Müller, Thomas, and Silke Ruppel. "Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology." *FEMS microbiology ecology* 87.1 (2014): 2-17.

[41] Bunster, L., Fokkema, N.J. and Schippers, B. (1989) Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1340–1345.

[42] Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G. and Kroppenstedt, R.M. (2005) Plant–microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytol* **166**, 589–594.

[43] Müller, T., & Ruppel, S. (2014). Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS microbiology ecology*, *87*(1), 2-17.

[44] Hutchison, M.L., Tester, M.A. and Gross, D.C. (1995) Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant pathogen interaction. *Molec Plant–Microb Interact* **8**, 610–620.

[45] Preston, G.M., Bertrand, N. and Rainey, P.B. (2001) Type III secretion in plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Mol Microbiol* **41**, 999–1014.

[46] Dahmani, W. (2011). Etude de la variabilité morphologique du pistachier de l'Atlas (Pistacia atlantica Desf.) dans les zones steppiques de la région de Tiaret. *Mémoire de*

magistère. Spécialité Biodiversité végétale méditerranéenne de l'Algérie occidentale. Option: valorisation, conservation et restauration. Faculté des sciences université d'Oran. 139p.

[47] El Naggar, S. M., & Abdel-Hafez, S. I. I. (2007). Pollen morphology, leaf surfaces, mycobiota diversity and leaf spots of three species of Zygophyllum growing along Cairo-Suez desert road, Eastern (Arabian) desert in Egypt. *Feddes Repertorium*, *118*(1-2), 38-45.

[48] Wang, B., Yeun, L. H., Xue, J. Y., Liu, Y., Ané, J. M., & Qiu, Y. L. (2010). Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytologist*, *186*(2), 514-525.

[49] Lee, K. H., Munusamy, M., Kim, C. W., Lee, H. S., Selvaraj, P., & Sa, T. (2004). Isolation and characterization of the IAA producing Methylotrophic bacteria from phyllosphere of rice cultivars (Oryza sativa L.). *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, *37*(4), 235-244.

[50] Fiss, M., Kucheryava, N., Schönherr, J., Kollar, A., Arnold, G., & Auling, G. (2000). Isolation and characterization of epiphytic fungi from the phyllosphere of apple as potential biocontrol agents against apple scab (Venturis inaequalis)/Isolierung und Charakterisierung von epiphytischen Pilzen aus der Phyllosphäre von Äpfeln zur biologischen Bekämpfung des Apfelschorferregers Venturia inaequalis. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 1-11.

[51] Dugast, S. (1986). La pince et le soufflet: deux techniques de forge: traditionnelles au Nord-Togo. *Journal des africanistes*, *56*(2), 29-53.

[52] Therrien, J., Dore, A., Gersony, W., Iserin, L., Liberthson, R., Meijboom, F. & Somerville, J. (2001). CCS Consensus Conference 2001 update: recommendations for the management of adults with congenital heart disease. Part I. *The Canadian journal of cardiology*, *17*(9), 940-959.

[53]Moss, I., & Poletti, S. (1987). The gravitational field of a superconducting cosmic string. *Physics Letters B*, *199*(1), 34-36.

[54] Lanjouw, J. (Ed.). (1966). *International code of botanical nomenclature* (Vol. 46). International Bureau for Plant Taxonomy andNomenclature, International Association for Plant Taxonomy.

[55] Walbaum, R., François, P., Farriaux, J. P., Woillez, M., Belot, E., & Delassus, G. (1978). Un cas de rétinoblastome bilatéral avec monosomie 13 partielle (q12→ q14). *Human Genetics*, *44*(2), 219-226.

[56] Alcaraz C., 1983. La tétraclinaie sur terra rossa en sous étage sub humide inferieur chaud en Oranie (Ouest algérien). Ecol. Medit., 9(2), 109-135 (28p).

[57] Anonyme., 2000. Rapport national sur l'état et l'avenir de l'environnement. Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Alger. 253 p.

[58] Saadoun S.N., 2002. Types stomatiques du genre Pistacia : Pistacia atlantica Desf. ssp. Atlantica et Pistacia lentiscus L. Natural Resources Laboratory, Cité des 300 Logements, Bt. F2, No. 183, Boukhalfa, Tizi-Ouzou, Algérie. Options Méditerranéennes, Série A, N°63. P 371.

[59] Belhadj, S., 2000. Les pistacheraies algériennes: Etat actuel et dégradation, Centre Universitaire de Djelfa, Algérie. 108 p.

[60] Larcher W., 1981. Low temperature effects on mediterranean sclerophylls : An unconventional viewpoint.In : Components of productivity of mediterranean regions. Basic and applied aspects. 259-266 (8p).

[61] Benmehdi H., Hasnaoui O., Benali O., Salhi F., 2012. Phytochemical investigation of leaves and fruits extracts of Chamaerops humilis L. J. Mater. Environ. Sci. 3 (2) 320-237 (17p).

[62] Dogan Y., Baslar S., Aydin H., Huseyin Mert H., 2003. A study of the soil-plant interactions of Pistacia lentiscus L. distributed in the western Anatolian part of Turkey. Dokuz Eylül University. Acta Bot. Croat. 62 (2), 73-88 (16 p).

[63] Quezel P., 1981. Floristic composition and phytosociological structure of sclerophyllous matorral around the Mediterranean. Mediterranean type scrublands.

[64] Botanica, T. (2014). Le réseau de la botanique francophone. *Association Tela Botanica, Montpellier, France. En ligne [URL] http://www. tela-botanica. org/(consulté le 17 mai 2014)*.

[65] Hale, L. R., & Hoffmann, A. A. (1990). Mitochondrial DNA polymorphism and cytoplasmic incompatibility in natural populations of Drosophila simulans. *Evolution*, *44*(5), 1383-1386.

[66] Dubois, T. (2012). *Etude du système de communication cellulaire NprR-NprX au sein du groupe Bacillus cereus* (Doctoral dissertation, AgroParisTech).

[67] Koné, D., Badou, O. J., Bomisso, E. L., Camara, B., & Ake, S. (2009). Activités in vitro de différents fongicides sur la croissance chez mycosphaerella fijiensis var. difformis stover et dickson, cladosporium musae morelet et deightoniella torulosa (Syd.) ellis, parasites isolés de la phyllosphère des bananiers en Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus Biologies*, *332*(5), 448-455.

[68] Therrien, J., Dore, A., Gersony, W., Iserin, L., Liberthson, R., Meijboom, F., ... & Somerville, J. (2001). CCS Consensus Conference 2001 update: recommendations for the management of adults with congenital heart disease. Part I. *The Canadian journal of cardiology*, *17*(9), 940-959.

[69] Grau, U., Möller, J., & Gunnarsson, J. I. (1988). A new concept of counselling: A systemic approach for counselling coaches in team sports. *Applied Psychology*, *37*(1), 65-83.

[70] Unal, G., Yezzi, A., & Krim, H. (2005). Information-theoretic active polygons for unsupervised texture segmentation. *International Journal of Computer Vision*, *62*(3), 199-220.

[71] Holmes, D. R., Liao, S., Parks, W. C., & Hompson, R. W. (1995). Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. *Journal of vascular surgery*, *21*(5), 761-772.

[72] Polat, S., Özdemir, N., Soylu, M., Mete, U., Ünlügenç, Z., & Kaya, M. (1999). Ultrastructural effects of topical beta-adrenergic antagonists and an alpha-adrenergic agonist on the rabbit cornea. *Ophthalmologica*, *213*(3), 183-188.

[73] Worm, B., Barbier, E. B., Beaumont, N., Duffy, J. E., Folke, C., Halpern, B. S., ... & Sala, E. (2006). Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *science*, *314*(5800), 787-790.

[74] Thompson, I. P., Bailey, M. J., Fenlon, J. S., Fermor, T. R., Lilley, A. K., Lynch, J. M., ... & Whipps, J. M. (1993). Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (Beta vulgaris). *Plant and Soil*, *150*(2), 177-191.

[75] Dinner, A. R., Blackburn, G. M., & Karplus, M. (2001). Uracil-DNA glycosylase acts by substrate autocatalysis. *Nature*, *413*(6857), 752-755.

[76] Stray-Pedersen, S. (1970). Vascular responses induced by drugs and by vagal stimulation in the swimbladder of the eel, Anguilla vulgaris. *Comparative and general pharmacology*, *1*(3), 358-364.

[77] Laplace, G. (1973). Le cyclothème ombrothermique. *Dialektikê. Cahiers de Typologie Analytique Coarraze*, 21-31.

[78] Emberger, L. (1955). *Une classification biogéographique des climats*.

[79] Sánchez, E., Palomino-Morales, R. J., Ortego-Centeno, N., Jiménez-Alonso, J., González-Gay, M. A., López-Nevot, M. A., ... & D'alfonso, S. (2009). Identification of a new putative functional IL18 gene variant through an association study in systemic lupus erythematosus. *Human molecular genetics*, *18*(19), 3739-3748.

[80] benyoucef, m. (2014). *le bassin cretace du guir (sud-ouest algerien): caracterisations litho-biostratigraphiques, sedimentologiques & paleogeographiques* (doctoral dissertation).

[81] Gravie, E. I. (1986). Genus Pediococcus. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, *2*, 1075-1079.

[82] Kuraishi, Y., Satoh, M., & Takagi, H. (1987). The descending noradrenergic system and analgesia. In *Neurotransmitters and pain control* (pp. 101-128). Karger Publishers.

[83] Guiraud, R. (1998). Mesozoic rifting and basin inversion along the northern African Tethyan margin: an overview. *Geological Society, London, Special Publications*, *132*(1), 217-229.

[84] Boulé, N. G., Haddad, E., Kenny, G. P., Wells, G. A., & Sigal, R. J. (2001). Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *Jama*, *286*(10), 1218-1227.

[85] Aad, G., Abajyan, T., Abbott, B., Abdallah, J., Khalek, S. A., Abdelalim, A. A., ... & AbouZeid, O. S. (2012). Observation of a new particle in the search for the Standard Model Higgs boson with the ATLAS detector at the LHC. *Physics Letters B*, *716*(1), 1-29.

[86] Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin*, *2*, 185-9.

[87] Saginur, R. A. P. H. A. E. L., Clecner, B., Portnoy, J. O. S. E. P. H., & Mendelson, J. A. C. K. (1982). Superoxol (catalase) test for identification of Neisseria gonorrhoeae. *Journal of clinical microbiology*, *15*(3), 475-477.

[88] Bon, C., Bon, V., Vaudoyer, F., Roubille, M., & Pichot, J. (2002). Détection rapide de l'insulin-like growth factor-binding protein-1 dans les sécrétions cervico-vaginales: comparaison avec le test à la diamine-oxydase pour le diagnostic de la rupture prématurée des membranes. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, *17*(6), 387-394.

[89] Baldellon, C., & Mégraud, F. (1985, March). Stomatococcus mucilaginosus: caracteres culturaux et biochimiques de 100 souches isolées de la sphere ORL. In *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie* (Vol. 136, No. 2, pp. 213-226). Elsevier Masson.

[90] Thomson, S., Buck, E., Petti, F., Griffin, G., Brown, E., Ramnarine, N., ... & Haley, J. D. (2005). Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non–small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. *Cancer research*, *65*(20), 9455-9462.

[91] Snead, L. L., Nozawa, T., Katoh, Y., Byun, T. S., Kondo, S., & Petti, D. A. (2007). Handbook of SiC properties for fuel performance modeling. *Journal of nuclear materials*, *371*(1), 329-377.

[92] Zhang, J., & Madden, T. L. (1997). PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Research*, *7*(6), 649-656.

[93] Palleroni, N. J. (1984). Pseudomonas. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.

[94] Osono, T. (2007). Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (Cornus stolonifera) in British Columbia. Mycoscience, 48(1), 47-52.

[95] Jacques, M. A., Josi, K., Darrasse, A., & Samson, R. (2005). Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli var. fuscans is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Applied and environmental microbiology*, *71*(4), 2008-2015.

[96] Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Fabreguettes, O., Desprez-Loustau, M. L., & Vacher, C. (2012). The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (Fagus sylvatica) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytologist*, *196*(2), 510-519.

[97] Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J. M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Camacho, M., Caviedes, M. A., ... & Rodríguez-Llorente, I. D. (2017). Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte Arthrocnemum macrostachyum salt tolerance. *Plant Biology*, *19*(2), 249-256.

[98] Liu, J., Rivas, F. V., Wohlschlegel, J., Yates, J. R., Parker, R., & Hannon, G. J. (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nature cell biology*, *7*(12), 1261-1266.

[99] Gu, L., Bai, Z., Jin, B., Hu, Q., Wang, H., Zhuang, G., & Zhang, H. (2010). Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, *22*(1), 134-141.

[100] Gorsky, L. D., Koop, D. R., & Coon, M. J. (1984). On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(11), 6812-6817.

[101] Krätke, S. (2002). Die globale Vernetzung von Medienzentren. Zur Diversität von Geographien der Globalisierung. *Geographische Zeitschrift*, 103-123.

[102]Jackson, E.F., Echlin, H.L. and Jackson, C.R. (2006) Changes in the phyllosphere community of the resurrection fern, Polypodium polypodioides, associated with rainfall and wetting. FEMS Microbiol Ecol 58, 236–246.

[103] http://210.242.211.31/servlet/Identify?action=prepareNew&stripId=3

[104] http://210.242.211.31/servlet/Identify?action=prepareNew&stripId=1

[105] http://210.242.211.31/servlet/Identify?action=prepareNew&stripId=5

[106] http://210.242.211.31/servlet/Identify?action=prepareNew&stripId=10

[107] http://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--M%C3%A9d%C3%A9a--Ouamri--Oued-Harbil
[108]http://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--M%C3%A9d%C3%A9a--Berrouaghia--Berrouaghia
[107]http://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--M%C3%A9d%C3%A9a--M%C3%A9d%C3%A9a-Tamesguida
[108] http://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--M%C3%A9d%C3%A9a--Ouzera--El-Hamdania

Annexe

- Diagramme ombrothermique de Gaussen et Bagnouls

La représentation de ce diagramme (fig. 14) consiste à porter sur le même graphique les variations des températures et les précipitations portées sur deux axes parallèles en fonction du temps, dont l'échelle est " 2 mm = 1°C ". Bagnouls et Gausen considèrent " un mois sec est celui où le total mensuel des précipitations (mm) est inférieur ou égal à deux fois la valeur de température moyenne mensuelle exprimé en °C " c'est-à-dire " $P \leq 2\ T$ ". Le diagramme ainsi obtenu (fig. 14) permet de visualiser la saison sèche où la courbe des températures passe au dessus de celle des précipitations. Ce mode de représentation permet de comparer mois par mois le rapport p/2T et de calculer donc la durée et l'intensité de la période.

- Climagramme d'EMBERGER

Emberger (1955) ses t'intéressant aux extrêmes thermiques M et m entre les quelles se déroule la période végétative et qui peuvent constituer des seuils écologiques pour les différentes espèces végétales, il a établi pour la région méditerranéenne et il a défini par la formule suivante: Q2 = 1000P (M+m)/2 (M-m)

- ✓ Où : P : Moyenne des précipitations annuelles en mm
- ✓ M : Moyenne des Maximas du mois le plus chaud en ° K
- ✓ m : Moyenne des minimas du mois le plus froid en ° K

- Les sites d'échantillonnages (logiciel MAPINFO)

Mapinfo est un logiciel permettant d'exploiter un système d'information géographique (SIG).un logiciel SIG permet l'acquisition, le stockage, la mise à jour, la manipulation, et le traitement de données géographique ; de plus, il permet de faire de la cartographie et de l'analyse spatiale de façon précise en fonction de l'échelle désirée. Il est librement téléchargeable à l'adresse

http://www.01net.com/telecharger/windows/Loisirs/geographie_et_voyage/fiches/122314.html

- Mesures biométriques (logiciel MESUEIM

Utilisation du logiciel Mesurim pour mesurer la superficie de la tache d'huile. Cet excellent outil a été réalisé par un professeur de SVT de l'académie d'Amiens : il est librement téléchargeable à l'adresse :http://www.ac-amiens.fr/pedagogie/svt/info/logiciels/Mesurim2/Telecharge.htm
Ouvrir une image Dans « outils » cliquer sur « schéma » Avec le « crayon » délimiter la zone de son choix La remplir avec une couleur quelconque grâce au « pot de peinture » Dans « fichier »

cliquer sur « transférer » Dans « image » cliquer sur « délimiter des zones » Avec la souris tracer un trait sur la zone colorée puis cliquer sur « OK » Il apparait la surface et le pourcentage de la surface totale (et entre parenthèses la surface réelle si une échelle a été choisie au préalable) N.B. pour avoir la surface réelle, il faut qu'une échelle soit définie au préalable. Dans « image » cliquer sur « créer / modifier échelle » Cliquer sur « échelle à définir » Repérer sur la photo par un trait fait à la souris d'une longueur connue ou facile à mesurer (la longueur de la coquille photographiée par exemple) Ecrire dans les cases l'unité et la longueur réelle du segment tracé. Cliquer sur « transférer l'échelle » Cliquer sur «enregistrer dans le fichier » Désormais au % de la surface, la surface réelle apparaîtra entre parenthèses.

- Méthode d'isolement (composition le milieu nutritif GN)

Une gélose nutritive est un substrat de laboratoire utilisé entre autre pour la microbiologie.
Il s'agit d'une préparation liquide qui se gélifie grâce à l'agar à température ambiante.
On verse cette préparation dans des boites de pétri qui sont alors mises en incubation après que la souche à développer aie été placé sur le milieu.
1 Litre d'eau
20 grammes d'agar-agar
20 grammes d'extrait de malt
2 grammes de levures

- La technique de séquençage (protocole)

1- Principes de la méthode :

Découpage de disques de feuilles, dans le but d'étudier les communautés microbiennes de la phyllosphère.

Manipuler sous PSM, avec blouse et cheveux attachés si nécessaire. Afin d'éviter au maximum les contaminations, les mains doivent être lavées à l'alcool (ou autre solution désinfectante), et les échantillons doivent être manipulés avec des pinces.

2- Matériel :

Pour 96 échantillons (soit une plaque) :

- 2 « plaques d'extraction » (supports bleus avec couvercle)
- 12 barrettes de 8 puits d'extraction
- 12 barrettes de bouchons ou 1 plaque de bouchons
- 196 billes en inox
- Emporte-pièces circulaire de 8mm de diamètre + poussoir

- Papier filtre stérile
- Pinces de dissection (droites et brucelles)
- Portoir à pinces
- Pot d'alcool et couvercle
- Bec bunsen électrique
- Plan de plaque
- Stylo
- Marqueur
- Cuillère
- Pince à lamelle (embouts plats)

Préparation du matériel :

1. Stériliser à l'autoclave les barrettes de puits d'extraction, les billes, et le papier filtre.
2. Nettoyer la PSM à l'alcool, y disposer tout le matérielet enclencher les UVs2x15min.
3. Numéroter le dernier puit de chaque barrette de 1 à 12 (sur le côté). Numéroter la plaque.
4. Désinfecter les pinces, la cuillère, le poinçon et le poussoir à l'alcool et à la flamme.
5. Insérer une bille dans chaque puit, en utilisant la cuillère et la pince à lamelle.

Découpage des feuilles :

6. Sortir la première barrette, et la disposer dans le support vide.
7. Sortir une feuille d'un sac d'échantillonnage, et la disposer sur un morceau de papier filtre.
8. En utilisant le poinçon, réaliser 4 disques dans la feuille :
    - En réaliser 2 de chaque côté de la nervure centrale
    - Éviter les bords
    - Éviter les nervures principales
    - Lorsqu'il y a plusieurs feuilles dans le sac, n'en poinçonner qu'une seule. Si aucune n'est assez grande, utiliser 2 feuilles et réaliser 2 disque dans chacune d'entre elle.
9. Utiliser le poussoir et/ou les pinces pour insérer les disques dans le puit correspondant.

10. Remettre la feuille poinçonnée dans son sac d'échantillonnage, éventuellement avec le papier filtre utilisé comme support.
11. Désinfecter les pinces, le poinçon et le poussoir à l'alcool et à la flamme.
12. Recommencer à l'étape 7 pour l'échantillon suivant. Lorsque la première barrette est pleine, la ranger dans son support et sortir la barrette suivante.

NB : ne pas oublier d'insérer des témoins négatifs.

Fin de plaque :

13. Une fois la plaque pleine, insérer une nouvelle bille dans chaque puits.
14. Fermer la plaque en utilisant les bouchons
15. Congeler à -80°C.

3- extraction d'ADN :

L'extraction d'ADN a été faite sur l'ensemble des échantillons découpées, selon un nouveau plant de plaque, Nous avons laissé des puits vide, trois par plaques , pour qu'ils nous servent de blanc pour notre étude.

4- Préparation du matériel :

- Le kit DNeasy 96 plant kit peut se conserver à température de la pièce pendant une année.
- Pour plus d'information vous pouvez aller sur le site www.qiagen.com/handbooks
- Ce protocole est pour deux plaques de 96 échantillons de tissus végétaux.
- Prévoir deux poubelles : une liquide et une solide.
- C'est très important de changer les bouchons jaunes 96 par des bouchons de 8 transparents pour éviter les contaminations au moment de l'ouverture.
- On fait toutes les centrifugations à température de la pièce.

5- Préliminaire protocole extraction

- Mettre tout d'abord la solution **AP1** à chauffer a 65° pendant minimum 20 mn.
- Ajouter l'éthanol 96% aux solutions AW1 et AW2
- Préparer la solution de lyse juste avant utilisation :
    - **90ml AP1 + 225 µl RNase A+225 µl Reagent DX**

Broyage des feuilles et extraction d'ADN:

1. Mettre 50 mg maximum (4 disques) de matériel végétal dans chaque tube avec deux billes d'inox une par dessus et l'autre par dessous l'échantillon.

2. Broyer une première fois les échantillons sans solution de lyse pendant 1min30s et centrifuger pendant 30s a (6000rpm).
3. Mettre 400 µl de solution de lyse dans chaque tube après avoir enlevé les bouchons délicatement et les avoir numérotés (pipette multi canons 1000µl 8 canons en deux fois)
4. Reprendre d'autres bouchons.
5. Refaire le broyage pendant 1min30s, ensuite échanger les plaques pour encore 1min30s de broyage (1500 rpm).
6. Centrifuger pendant 30s pour enlever la mousse formée (6000rpm).
7. Rajouter 130 µl de la solution de lavage P3 (pipette multi canons 300µl), reprendre de nouveaux bouchons (rack de 8).
8. Agiter vigoureusement les plaques de haut en bas à la main pendant 15 s ,bien maintenir le couvercle ensuite centrifuger pendant 1min30s.
9. Mettre les plaques a -20°C pendant 10mn.
10. Centrifuger 5mn (6000rpm).
11. Remettre de nouvelles plaques, les numéroter, jeter les bouchons et transférer 400µl du surnageant de chaque tubes délicatement sans prendre du broyat (régler la multi canon à 200 µl et le faire en deux fois).
12. Rajouter 600µl de solution de lavage AW1 et refermer bien les nouveaux bouchons.
13. Agiter vigoureusement les plaques de haut en bas a la main pendant 15 s ensuite centrifuger pendant 30s.
14. Placer les deux plaques DNeasy 96 numérotées et marquées sur les S-Blocks.
15. Enlever les bouchons délicatement car le tube est plein et transférer 1ml de chaque échantillon dans les nouvelles plaques (500µl en deux fois) et fermer au film autocollant.
16. Centrifuger pendant 4mn, et si tout n'est pas descendu on refait encore 4mn.
17. Vider les S-Blocks dans le bidonB.
18. Ajouter 800µl de la deuxième solution de lavage AW2 a chaque tube.
19. Centrifuger 15mn (6000 rpm) sans renfermer les plaques pour bien sécher les membranes.
20. Mettre les plaques DNeasy 96 sur les microtubes RS rack élution (les boites transparentes bleues), bien marquer dessus car c'est les boites définitives.
21. Ajouter 100µl de la solution d'élution, fermer au film autocollant, laisser 1 mn à température de la pièce puis centrifuger pendant 2 mn (6000rpm)

22. Répéter l’étape précédente (20) .
23. Récupérer les 200µl d’ADN et bien fermé avec les bouchons beiges (rack de 8) et jeter les plaques DNeasy 96.
24. Conserver l’ADN a -80° C.