



DEMOCRATIC AND POPULAR ALGERIAN  
REPUBLIC  
MINISTRY OF HIGHER EDUCATION AND  
SCIENTIFIC RESEARCH



ZIANE ACHOUR UNIVERSITY OF DJELFA  
FACULTY OF SCIENCE OF NATURE AND LIFE  
DEPARTMENT OF AGRONOMIC AND VETERINARY SCIENCES

THESIS

FOR THE OBTAINING OF THE THIRD CYCLE DOCTORATE (D-LMD) DEGREE IN  
AGRONOMIC SCIENCES OPTION: FOREST ECOLOGY

By

AIT OUAMER Yasmine

Theme

COMPARATIVE STUDY OF THE COMPONENTS OF THE PHYLLOSHERE OF  
TWO SPECIES FROM PISTACIA GENUS  
(*P. ATLANTICA* DESF. ET *P. LENTISCUS* L.).

Before the jury composed of:

M. Nedjimi Bouzid	Professor ( Djelfa University)	President
M <sup>me</sup> Belhadj Safia	Professor ( Djelfa University)	Thesis director
M. Oumouna Mustapha	Professor ( Medea University)	Thesis co-director
M <sup>me</sup> El Zerey-Belaskri Asma	M.C.A. (Oran University )	Examiner
M. Boutaiba Saad	M.C.A. (Djelfa University)	Examiner
M <sup>me</sup> Bencherif Karima	M.C.A. (Djelfa University)	Examiner

Defended on: March 2022



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE  
ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET  
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة زيان عاشور الجلفة  
UNIVERSITE ZIANE ACHOUR -DJELFA-  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
قسم العلوم الفلاحية والبيطرية  
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES ET VÉTÉRINAIRES

## THESE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
DOCTORAT DE TROISIÈME CYCLE (D-LMD) EN SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : ECOLOGIE FORESTIÈRE

Par  
AIT OUAMER Yasmine

### Thème

ETUDE COMPARATIVE DES COMPOSANTS DE LA PHYLLOSHERE  
DE DEUX ESPECES DU GENRE *PISTACIA* (*P. ATLANTICA* DESF. ET *P.*  
*LENTISCUS* L.).

Devant le jury composé de :

M. Nedjimi Bouzid	Professeur (Univ. Djelfa)	Président
M <sup>me</sup> Belhadj Safia	Professeure (Univ. Djelfa)	Directrice de Thèse
M. Oumouna Mustapha	Professeur (Univ. Medea)	Co-Directeur de Thèse
M <sup>me</sup> El Zerey-Belaskri Asma	M.C.A. (Univ. Oran I)	Examinatrice
M. Boutaiba Saad	M.C.A. (Univ. Djelfa)	Examineur
M <sup>me</sup> Bencherif Karima	M.C.A. (Univ. Djelfa)	Examinatrice

Soutenu le 08/03/2022

## Remerciements

*La thèse est une étape importante dans la vie d'un chercheur, on peut la comparer facilement au passage à l'âge adulte....elle représente notre maturité scientifique, cette étape fut pour moi l'une des plus marquante, avec pleins de rebondissements, de rencontres formidables, des moments de doutes, de colères et de joies souvent inexplicables. Pour cela je voudrais adresser mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à ce travail.*

*D'abord, je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Professeur Belhadj Safia pour avoir accepté de m'encadrer avec tous ce que ce terme renferme en travail, supervision et beaucoup de corrections, merci pour votre aide et votre disponibilité tout au long de cette période, nos sorties d'échantillonnages auront toujours un impact sur moi.*

*Toute ma gratitude au professeur Oumouna Mustapha, de m'avoir Co-encadrée, pour vous, je serais toujours cette étudiante de 1ere année biologie, qui vous doit énormément, merci d'avoir toujours été là, avec la même gentillesse à chaque fois, un soutien indéfectible qui ma encourager à dépasser mes incertitudes et aller au bout de ce projet.*

*Je tiens à remercier également Mr Mohamed Said Remdan, pour son aide précieuse, je lui dois ma formation en génétique et génomique, c'est ce genre de personne qu'on sait à l'avance qu'il nous tendra la main quelque soit l'intempérie, Merci également à Mr Brahim Rahmani pour la vérification de mes statistiques.*

*Mes remerciements vont également à toute l'équipe administrative de l'université de Djelfa pour le financement de mon stage à Bordeaux, une période qui m'a permis d'évoluer sur le plan scientifique et humain, ma sincère gratitude à toute l'équipe de BIOGECO de L'INRA, je remercie sincèrement Mme Corinne Vacher et Mr Thomas Fort et toute l'équipe du laboratoire qui m'a si bien orientée, encadrée et très chaleureusement accueillie, merci Gilles pour ta carte, Marta Benito Garzon pour les données World Clim, Martine pour les sacs de cilicagel, Elodie de m'avoir conduite au laboratoire chaque jour, de vous, je garderai toujours un magnifique souvenir.*

*Je remercie également les membres du jury, Pr Nedjimi Bouzid pour avoir accepté de présider le Jury ainsi que les examinateurs : Dr Belaskri Asma, Dr Boutaiba Saad et Dr Bencherif Karima pour m'avoir accordé leurs précieux temps pour lire et évaluer mon travail. A tout le personnel universitaire, spécialement, les enseignants et les doctorants de l'université de Ziane Achour à Djelfa, merci adorable Mouna, et ceux de Yahia Fares à Medea spécialement Amina, et à tous ceux qui m'ont aidé au laboratoire et sur terrain, a tous mes camarades et amis, Leila, Kamy, Randa, Rabia, Younes, Zaki et tant d'autres.*

*Je voudrais, également, remercier toute ma famille, Ma mère qui m'a toujours encouragée, mes frères et sœur pour leurs présence et leurs aide, merci boubou d'avoir fait beaucoup de route pour mon échantillonnage, merci Boukhalfa de m'avoir conduit à Djelfa si gentiment tant de fois, merci à toi Dahila, la meilleure tante au monde, d'avoir toujours cru en moi, merci de tout mon cœur pour votre amour, votre soutien de tous ces instants. Je ne remercierai jamais assez mon époux Azzedine qui fut pour moi l'épaule qui ne failli jamais, merci d'avoir supporté mon caractère fort difficile lors de la rédaction de cette thèse, d'avoir pris en charge nos enfants, merci d'être ce que tu es. Pour terminer, ma reconnaissance va également à toutes les personnes anonymes, qui ont contribué à améliorer et finaliser le contenu du présent travail.*

*Je ne peux dédier ce travail qu'à une seule personne.....à celui qui à fait de moi tout ce que je suis....à toi Papa (Paix à ton âme).*

*“Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements.”*

*Charles Darwin (Carnet de notes - 1838)*

## ***Abstract***

Fungi and bacteria constitute a large part of the components of the phyllosphere. These complex communities of microorganisms play a significant role from an agronomic and environmental point of view. However, their origins, their organization within their habitat, as well as the factors that influence their composition remain little known.

The main purpose of this research is first of all to understand the composition and dynamics of the phyllo-spherical habitat of pistachio species, *P atlantica* and *P lentiscus*, but also to identify the environmental and site factors that modulate this habitat. These elements will allow us to visualize the way in which these species coexist in order to design a theoretical model of biodiversity in this sphere.

To realise this , the bacteria and phyllospheric fungi were cultured and their organization into statistical sets were carried out. The Correlations between the number of fungi and bacteria, the surface of the leaf, the species studied and the aridity of the stations were also carried out, then, a metagenomic study of the fungal communities was effectuated in order to identify these species, to identify their roles and delimit the factors that modulate their composition.

Our results demonstrate that the composition and number of microorganisms are positively correlated with leaf area, species and aridity, there is a consistent link between the qualitative and quantitative aspect of phyllospheric components and their distribution in their habitats. The composition, diversity and richness of the phyllosphere of the lentisk pistachio tree and the atlas pistachio tree are therefore closely linked to the climatic zone and to the host species.

Key-words:

phyllosphere, aridity, *Pistacia atlantica*, *Pistacia lentiscus*, fungal communities, biodiversity

## ملخص

تشكل الفطريات والبكتيريا جزءًا كبيرًا من مكونات مجال الورقة. تلعب هذه المجتمعات المعقدة من الكائنات الحية الدقيقة دورًا وبيئية. رغم ذلك، فإن أصلهم، وتشكيلتهم داخل موطنهم، إضافة إلى العوامل التي تؤثر على تكوينهم مهمًا من ناحية زراعية لا تزال غير معروفة

الهدف من هذا البحث هو أولاً وقبل كل شيء فهم تكوين وديناميكيات موطن مجال الورقة لنوعين من الفستق، البطم الأطلسي و هذه العناصر تصور البطم العدسي، ولكن أيضاً تحديد العوامل المتعلقة بالبيئية والموقع التي تعدل هذا الموطن كما ستسمح لنا للقيام بذلك، تمت زراعة الطريقة التي تتعايش بها هذه الأنواع من أجل تصميم نموذج نظري للتنوع البيولوجي في هذا المجال بكتيريا وفطريات الموجودة في مجال الورقة وتم تنظيمها في مجموعات إحصائية. تم إجراء العلاقات المتبادلة بين عدد والبكتيريا وسطح الورقة والأنواع المدروسة وجفاف المحطات، ثم أجريت دراسة الجينومات الفطريات

المجتمعية الفطرية للتعرف على هذه الأنواع وعلى أدوارها وتحديد العوامل التي تعدل تكوينها

توضح نتائجنا أن تكوين الكائنات الدقيقة وعددها يرتبطان ارتباطاً إيجابياً بمساحة الأوراق والأنواع والجفاف، وهناك صلة لمكونات مجال الورقة وتوزيعها في موائلها. لذلك فإن تكوين وتنوع وثرء الغلاف النباتي ثابتة بين الجانب النوعي والكمي لشجرة البطم الأطلسي و البطم العدسي يرتبط ارتباطاً وثيقاً بالمنطقة المناخية وبالأنواع المضيفة لها.

الكلمات المفتاحية: مجال الورقة الجفاف البطم الأطلسي و البطم العدسي للتنوع البيولوجي،

## ***Résumé***

Les champignons et les bactéries représentent une grande partie des composants de la phyllosphère. ces communautés complexes de micro-organismes ont un rôle non-négligeable d'un point de vue agronomique et environnemental. Cependant leurs origines, leur organisation au sein de leur habitat, ainsi que les facteurs qui influencent leur composition demeurent peu connus.

L'objectif de cette recherche, est d'abord, de comprendre la composition et la dynamique de l'habitat phyllosphérique des de espèces de pistachiers, le *P atlantica* et le *P lentiscus*, mais aussi, de cerner les facteurs environnementaux et stationnels qui modulent cet habitat. Ces éléments nous permettront pouvoir visualiser la manière dont ces espèces cohabitent afin de concevoir un modèle théorique de la biodiversité sur cette sphère.

pour ce faire, une mise en cultures des bactéries et champignons phyllosphériques et leur organisation en ensembles statistiques ont été effectués. Des corrélations entre le nombre de champignons et de bactéries, la surface de la feuille, les espèces étudiées et l'aridité des stations ont été réalisées, ensuite, une étude metagénomique des communautés fongiques a été effectuée afin d'identifier ces espèces, cerner leurs rôles et délimiter les facteurs qui modulent leurs composition.

Nos résultats démontrent que la composition et le nombre de microorganismes sont corrélés positivement avec la surface foliaire, l'espèce et l'aridité, il existe un lien cohérent entre l'aspect qualitatif et quantitatif des composants phyllosphériques et leur distribution dans leurs habitat. La composition, la diversité et la richesse de la phyllosphère du pistachier lentisque et du pistachier de l'atlas sont alors étroitement liées à la zone climatique et à l'espèce hôte .

Mots clés:

phyllosphere, aridité, *Pistacia atlantica*, *Pistacia lentiscus*, communautés microbiennes, biodiversité

## Liste des figures

---

### Chapitre I: Synthèse bibliographique

Figure 1: Schéma d'une coupe transversale de feuille.	07
Figure 2: Structure tridimensionnelle de la phyllosphère par microscopie électronique à balayage.	08
Figure 3: la composition et rôles de la phyllosphère.	09
Figure 4: les facteurs biotiques et abiotiques responsables de la composition de la phyllosphère.	11
Figure 5: Cadre théorique de structuration des communautés microbiennes foliaires.	13
Figure 6: Illustration des trois types de réponses possibles des espèces face au changement climatique.	14
Figure 7: Estimation de la répartition des espèces dans les règnes du vivant.	16
Figure 8: Aire de répartition du genre <i>Pistacia</i> dans le monde.	19
Figure 9: Les espèces de genre <i>Pistacia</i> selon leurs feuilles.	20
Figure 10: Pistachier de l'Atlas.	21
Figure 11: Répartition du pistachier de l'Atlas en Algérie.	23
Figure 12: Aire de répartition de <i>Pistacia lentiscus</i> dans le bassin méditerranéen.	25
Figure 13 : Dogme central de la biologie moléculaire.	28
Figure 14: Arbre phylogénétique du monde vivant	29
Figure 15: Schéma synthétique de la méthodologie employée pour caractériser les communautés fongiques phyllosphériques.	31
Figure 16: Schéma de l'opéron ribosomal de l'ADN nucléaire des champignons.	32
Figure 17: Illustration du barcoding gap et du chevauchement.	33
Figure 18: Fonctionnement du séquençage haut débit avec la technique Illumina.	35
Figure 19: Comparaison entre les algorithmes d'alignements BLAST et Smith-Waterman.	38
Figure 20: Exemple de lecture d'un résultat BLAST.	39

### Chapitre II: Etude du milieu

Figure 21 : Localisation des sites d'échantillonnage.	42
Figure 22: images satellites des 6 stations.	43
Figure 23:Présentation des sites de la wilaya de Médéa.	44
Figure 24:Présentation du site de la wilaya de Djelfa.	46
Figure 25:Présentation du site de la wilaya de M'sila.	47
Figure 26 : Climatogramme d'Emberger pour les 6 stations d'échantillonnage	53
Figure 27: diagrammes Ombro-thermiques des six stations.	54
Figure 28:Analyse en composantes principales (A.C.P.) des données climatiques (2014).	54
Figure 29: Facteurs de séparation climatique entre les stations.	57



### **Chapitre III: Matériel et Méthodes**

Figure 30: Echantillonnage et méthodologie pour la partie microbiologique.	64
Figure 31: Plan de travail pour le séquençage d'ADN.	64
Figure 32: Méthodes utilisées pour la partie génomique.	65
Figure 33: Disposition des échantillons sur les plaques d'extraction.	66
Figure 34: Echantillons représentatifs de chaque station pour le séquençage d'ADN	68
Figure 35: Prétraitement des séquences et création de la table d'OTUs.	71
Figure 36: Fonctionnement de la requête BLAST.	73

### **Chapitre IV: Résultats et discussions**

Figure 37: Comparaison intra-spécifique et interspécifique de la surface foliaire (SF), du nombre de bactéries (NBACT) et du nombre de champignons (NFUN) entre les deux espèces de pistachiers étudiées.	82
Figure 38: Classification hiérarchique ascendante (C.A.H.) représentant les différents groupes de stations.	84
Figure 39: Analyse en composantes principales (ACP), montrant la répartition du nuage de points représentant les corrélations entre les différentes variables mesurées et les différents facteurs à l'origine de la variation.	85
Figure 40: Synthèse des résultats principaux de la partie 1, partie microbiologique.	89
Figure 41: Dissemblance de l'assemblage fongique de la phyllosphère entre six parcelles situées le long d'un gradient d'aridité représentant une mise à l'échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS).	91
Figure 42: Effet de la diversité, de la richesse et de l'équitabilité sur les trois zones climatiques (semi- aride pour Berroughia1, Berrouaghia 2 ; subhumide pour Harbil et Ouamri ; et aride pour Ain Oussera et El Hamel).	93
Figure 43: Abondance relative de chaque taxon fongique dans chaque échantillon, par ordres.	94
Figure 44: Abondance relative de chaque taxon fongique dans chaque échantillon par classes.	95
Figure 45: Exemple du résultat de la requête Blast pour l'OTU12.	100
Figure 46: Résultats de l'annotation des séquences inconnues.	103
Figure 47: Synthèse des résultats du tri des OTUs.	107
Figure 48: Identification des OTUs pathogènes du pistachier de l'Atlas, du pistachier lentisque et les ubiquitaires.	108
Figure 49: Exemple synthétique de la dynamique de l'habitat foliaire.	116

## Liste des tableaux

---

### Chapitre I: Bibliographie

Tableau1: Amorces utilisées en métabarcoding au cours de cette thèse.	34
---	----

### Chapitre II: Etude du milieu

Tableau 2:Corrections climatiques sur l'ensembles des stations.	49
Tableau 3:Caractéristiques climatiques des sites d'échantillonnage.	51
Tableau 4 :Types de climat selon De Martonne (1929) des stations d'étude.	52
Tableau 5 :Types de climat selon Emberger des stations d'étude.	53
Tableau 6: régimes saisonniers des différentes stations.	55

### Chapitre IV: Résultats et discussions

Tableau7: Statistiques descriptives pour les différentes variables mesurées pour les deux espèces étudiées, <i>P. atlantica</i> et <i>P. lentiscus</i> .	81
Tableau 8 :Analyse de la variance multifactorielle (ANOVA) des variables étudiées pour <i>P. atlantica</i> <i>P. lentiscus</i>	83
Tableau 9 :Analyse de la variance(ANOVA) montrant l'effet du site sur les variables mesurées pour les deux espèces étudiées.	83
Tableau10:Analyse permutacionnelle multivariée de la variance de la dissemblance compositionnelle entre les assemblages fongiques phyllosphériques le long d'un gradient d'aridité.	90
Tableau 11:Abondance relative à l'intérieur de chaque espèce pour les OTUs les plus représentatives.	98
Tableau 12: Les unités taxonomiques opérationnelles les plus exprimées dans la phyllosphère du pistachier de l'Atlas.	99
Tableau 13: les nouvelles OTU relatives au pistachier de l'Atlas	101
Tableau 14: Les unités taxonomiques Opérationnelles les plus exprimées dans la phyllosphère du pistachier lentisque.	104
Tableau 15: Présentation des OTU ubiquitaires avec leurs abondances dans chaque site	105
Tableau16: Identification des OTUs ubiquitaires	105
Tableau 17: Expression des OTU dans les localités de <i>P. atlantica</i> représentatives des OTU arides, semi-arides et subhumides.	106
Tableau 18: Expression des OTU dans les localités de <i>P. lentiscus</i> représentatives des OTU arides, semi-arides et subhumides .	106

## ***Table des matières***

---

### **Chapitre I: Synthèse bibliographique**

Partie 1: la phyllosphere et ses composants	06
1.1. Définitions et composition de la phyllosphère	06
1.2. Distribution des microbiomes sur la feuille	08
1.3. Rôle écologique des microorganismes de la phyllosphère	09
1.4. Origine de la phyllosphere	10
1.5. Facteurs responsables de la composition des communautés microbiennes	12
1.6. Le comportement microbien face aux changements climatiques	14
1.7. le règne des champignons	15
1.8. les champignons pathogènes	16
Partie 2: présentation des espèces étudiées	17
2.1. Présentation du genre <i>Pistacia</i>	17
2.1.1. Systémique	18
2.1.2. Aire de répartition	18
2.1.3. Caractéristiques botaniques	20
2.2. Le pistachier de l'atlas	21
2.2.1. Présentation de l'espèce	21
2.2.2. Systémique et aire de répartition	22
2.2.3. Caractéristiques botaniques	23
2.3. Le pistachier lentisque	24
2.3.1. Présentation de l'espèce	24
2.3.3. Aire de répartition	24
2.3.4. Caractéristiques botaniques	26
2.3.4. Comparaison entre les deux espèces de pistachiers	26
Partie 3: bioinformatique génomique	27
3.1. Découvertes et phylogénie	27
3.2. Méthodes de culture des champignons	30
3.2.1. Méthodes culture-dépendantes	30
3.2.2. Méthodes culture-indépendantes: Le métabarcoding:	30
3.2.2.1. Le barcode chez les champignons	32
3.3. Le séquençage d'ADN	34
3.4. bioinformatique	35
3.4.1. Les bases de données biologiques	36
3.4.2. L'annotation des génomes	37
3.4.3. Alignement des séquences : Le BLAST	37

### **Chapitre II: Etude du milieu**

II.1. Présentation de la zone d'étude	42
II.1.1. Présentation de la wilaya de Médéa	43
II.1.1.1. Station de Harbil	44
II.1.1.2. Station de Ouamri	45
II.1.1.3. Stations de Berrouaghia 1 et 2	45

II.1.2. Présentation de la wilaya de Djelfa	45
II.1.2.1. Station d'Ain Oussera	46
II.1.3. Présentation de la wilaya de M'sila	46
II.1.3.1. Station d'El Hamel	47
II.2. Etude climatique	48
II.2.1. Paramètres climatiques des sites d'études	48
II.2.2. indices climatiques étudiés	50
II.2.2.1. l'indice d'aridité de Martonne :	51
II.2.2.2. le quotient pluviométrique d'Emberger (Q <sub>2</sub> )	52
II.2.3. Diagramme Ombro-thermique	53
II.2.4. Pluviométrie et régime saisonnier	55
II.2.5. Données climatiques pour l'année de l'échantillonnage	55
II.2.6. Conclusion	57

## Chapitre III: Matériel et Méthodes

III.1. Echantillonnage	59
III.2. Etude microbiologique	60
III.2.1. Calcul de la surface foliaire	60
III.2.2. Préparations des feuilles et mise en culture des microorganismes	60
III.2.3. Analyses statistiques	63
III.3. Etude génomique des champignons	64
III .3.1. Découpe des feuilles	67
III .3.2. Extraction de l'ADN :	67
III .3.3. Amplification des barcodes par PCR :	69
III .3.4. séquençage d'ADN:	69
III .3.5. prétraitement des séquences	69
III .3.6. Organisation en OTUs	70
III.3.7. Taxonomie:	71
III .3.8. Statistiques	73
III.3.8.1. Etude des ensembles	74
III .3.8.1.1. Préparation de l'environnement de travail	74
III .3.8.1.2. Tri des OTUs	74
III .3.8.1.3. Raréfaction	74
III .3.8.1.4. Effet de l'espèce et de la zone climatique sur la composition des communautés fongiques foliaires	75
III .3.8.1.5. Représentation de la dissimilarité entre échantillons sur une NMDS	75
III .3.8.1.6. Effet de l'espèce et du site sur la diversité et la richesse des communautés fongiques foliaires.	75
III .3.8.1.7. Histogrammes taxonomiques par site et par espèce	76
III.3.8.2. Isolation des OTUs représentatifs	76
III.3.8.3. Identification par annotation génomique	77

## Chapitre IV: Résultats et discussions

IV.1. Résultats	80
-----------------	----

IV.1.1. Etude microbiologique :	80
IV.1.1.1. Statistiques descriptives	80
IV.1.1.2. Analyse de la variance multifactorielle (ANOVA)	82
IV.1.1.3. Classification ascendante hiérarchique (CAH)	83
IV.1.1.4. Analyse en composantes principales (ACP)	84
IV.1.1.5. Discussion	85
IV.1.2. Etude génomique des fungi	89
IV.1.2.1. Etude statistique de l'ensemble des OTUs	90
IV.1.2.1.1. Effet de l'espèce et de la zone climatique sur la composition des communautés fongiques foliaires	90
IV.1.2.1.2. Représentation de la dissimilarité entre échantillons sur NMDS	91
IV.1.2.1.3. Effet de l'espèce et du site sur la diversité, la richesse et l'équitabilité des communautés fongiques foliaires	92
A) La diversité	92
B) La richesse	92
C) L'équitabilité	92
IV.1.2.1.4. Histogrammes taxonomiques par site et par espèce	93
IV.1.2.2. Isolation des OTUs représentatifs	96
IV.1.2.2.1. vérification du témoin	97
IV.1.2.2.2. Présentation des OTUs les plus abondantes chez le pistachier de l'Atlas	97
IV.1.2.2.3. Identification des séquences inconnues	102
IV.1.2.2.4. Présentation des OTUs les plus abondantes chez le pistachier lentisque	103
IV.1.2.2.5. Isolation des OTUs ubiquitaires	104
IV.1.2.2.6. Isolation des OTUs relatifs au zones climatiques	105
IV.1.2.2.7. Isolation des OTUs pathogènes	107
IV.2. Discussions et hypothèses	108
IV.2.1. Composition fongique de la phyllosphere des deux espèces étudiées	108
IV.2.2. Facteurs qui modulent la composition fongique phyllosphérique	110
IV.2.2.1. Effet de l'espèce hôte	110
IV.2.2.2. Effet du site	112
IV.2.3. Symbiose au sein de l'habitat foliaire	114
IV.3. Similitudes entre les deux parties d'études	114
IV.3.1. Station de Berrouaghia 2 et réchauffement climatique ou pollution atmosphérique?	115
IV.4. illustration théorique de habitat phyllospherique	115
IV.5. perspectives	117
<b>Conclusion</b>	118
<b>Références bibliographiques</b>	118

## *Abréviations*

---

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment-Lengthpolymorphism
BLAST	Basic Local Aligement SearchTool
DDBJ	Dna Data Bank du Japon
ddNTP	didésoxyribonucléotides triphosphates
dNTP	désoxyribonucléotides triphosphates
EMBL	European Molecular Bioinformatics Laboratory
GLM	Modèle Linéaire Généralisé
ITS	Internal Transcribed Spacer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open Reading Frame
OTU	Unité Taxonomique Opérationnelle
PB	Paires de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIR	Protein Identification Ressource
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
SF	Surface Foliaire
SMS	Séquence Manipulation Suite
SOLID	Sequencing by Oligo Ligation Detection
SR	Système Racinaire
TFD	Ttanscription Factor Database
UNIPROT	Universal Protein Resource

## *Introduction*

---

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 (Vorkolt, 2012).

Il existe deux définitions de la phyllosphère dans la littérature, l'une désigne l'habitat fourni par l'ensemble des parties aériennes des plantes (Lindow & Brandl, 2003) et l'autre désigne seulement la partie foliaire des plantes (Jumpponen & Jones, 2009). 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 (Lindow & Brandl, 2003). 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 demeure mal connue. En premier lieu, les variations climatiques changeraient considérablement la structure et l'assemblage des microorganismes qui occupent la phyllosphère (Comptant, 2010). Il se pourrait, aussi, qu'elle soit liée à la génétique de l'espèce hôte (Cordier, 2012), en l'occurrence à tous ce qui caractérise ses traits foliaires comme les huiles essentielles et les phénols (Yadav, 2008), cas du pistachier lentisque qui présente d'importantes propriétés aromatiques et antioxydantes (Hemma et al., 2018).

Les microorganismes de la phyllosphère peuvent être soit épiphytes (vivant sur la surface des feuilles) (Inacio et al., 2002), soit endophytes (vivant à l'intérieur des tissus, dans les espaces intercellulaires des feuilles) (Arnold et al., 2000; Rodriguez et al., 2009). La distinction entre le statut d'endophyte ou d'épiphyte n'est pas évidente. En effet, certaines espèces microbiennes peuvent activement pénétrer les tissus de la feuille pour devenir endophytes (Viret et al., 1994; Wilson et al., 1999).

L'objectif principal de cette thèse, était d'abord de comprendre la composition et la dynamique de l'habitat phyllosphérique des deux espèces de pistachiers, en d'autres termes, la possibilité d'identifier ces espèces et connaître leurs rôles dans le fonctionnement de l'écosystème, mais aussi, de cerner les facteurs environnementaux et stationnels qui modulent cet habitat. Ces éléments devaient nous permettre de pouvoir visualiser la manière dont ces espèces

cohabitent afin de concevoir un modèle théorique d'une niche écologique représentative de cette sphère.

Notre hypothèse de départ, est que les microorganismes de la phyllosphère, sont soumis constamment à des facteurs environnementaux et stationnels qui peuvent moduler et influencer cet habitat.

Dans l'optique de mieux cerner ces théories, il fallait explorer deux éléments primordiaux, d'abord, la composition de l'habitat phyllosphérique des deux espèces de pistachiers en bactéries et en champignons, ensuite, les facteurs environnementaux et stationnels qui le modulent, plus précisément, l'effet du site d'échantillonnage et de l'espèce hôte sur la composition, la structure et l'assemblage des communautés de microorganismes phyllosphériques.

Pour tester notre hypothèse, nous avons pris pour modèle deux essences forestière et pré-forestière, un modèle idéal pour l'étude de la dynamique des communautés microbiennes, il s'agit de deux espèces de pistachiers : *Pistacia lentiscus* (le lentisque) et *Pistacia atlantica* (Pistachier de l'Atlas). Ces deux espèces appartenant au genre *Pistacia*, un genre particulier (de la famille des Anacardiaceae), qui de par sa dioécie et ses fleurs nues, peut constituer une famille à part: les Pistaciaceae (Gaussen et al., 1982).

Ces deux espèces sont différentes par le type de leurs feuillages : les feuilles du lentisque sont persistantes tandis que celles du pistachier de l'Atlas sont caduques. La structure de l'arbre n'est pas la même non plus, le pistachier de l'Atlas est un grand arbre alors que le lentisque se présente, plutôt, sous forme d'arbuste. Enfin, le pistachier de l'Atlas (sous espèce *atlantica*) est considérée par plusieurs auteurs (Zohary, 1952 ; Quezel et Santa, 1963 ; Alyafi, 1979 ; Monjauze, 1980 ; Ozenda, 1983 ; White, 1986 et Médail et Quezel, 2003) comme plus répandue et endémique de l'Afrique du Nord et préfère des milieux plus ou moins arides à semi-arides ; alors que le lentisque s'étend jusqu'aux milieux humides. Toutes ces différences présentent un grand intérêt certain pour cette étude comparative.

Les communautés bactériennes de la phyllosphère du pistachier lentisque ont, déjà, été étudiées, notamment par rapport à la composition des feuilles en huiles essentielles (Yadav 2008), mais aussi par rapport à l'interaction des facteurs chimiques avec les microorganismes (Yadav, 2005) et à leurs réactions face aux variations de l'écosystème (Vouku, 2012). Le profil



foliaire structural et chimique du lentisque reflète la taille des populations épiphytes, or de par son feuillage de forte teneur en phosphore (Yadav, 2005) et très aromatique, il compte beaucoup de colonies bactériennes qui se sont adapté à l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et l'utiliseraient, même, comme source de Carbone (Yadav, 2008). Même si une étude génétique a déjà ciblé le pistachier de l'atlas par l'estimation de la taille de son genome (El Zerey-Belaskri et al., 2018 ; Labdelli et al., 2020), sa phyllosphère n'a jamais été étudiée et demeure quant à elle une exclusivité.

Cette thèse gravite autour de plusieurs disciplines, l'écologie forestière, l'écologie des communautés et la génétique microbienne; elle est rédigée afin d'apporter des réponses à une série de questions pour mieux cerner la composition et la dynamique de la phyllosphère. Parmi ces réflexions, nous allons tenter de répondre aux questions suivantes:

- Quelle est la composition de la phyllosphère en bactéries et champignons?
- Existe-il une différence de cette composition entre les deux espèces de pistachiers?
- Les stations d'étude ainsi que le climat, ont-ils une influence significative sur la composition des microorganismes?
- Est-ce que la composition de la phyllosphère est due à l'apparentée génétique ou à l'environnement ?
- Comment ces espèces parviennent-elles à cohabiter?

Ce travail nous permettra de mettre en évidence les effets potentiels du changement climatique et de l'apparentée génétique sur la répartition des microorganismes (bactériens et fongiques) sur la surface foliaire des deux espèces de pistachiers.

Pour cela, nous avons choisi des stations d'échantillonnage hétérogènes, avec un gradient d'aridité croissant, pour les deux espèces. Nous avons fait en premier lieu une étude comparative de la composition phyllosphérique par la mise en culture des microorganismes (champignons et bactéries) et leurs organisations en ensembles statistiques, nous permettant ainsi d'établir les différences liées au climat et à l'espèce.

En deuxième lieu un séquençage d'ADN des communautés fongiques uniquement, et un alignement des séquences ont été réalisés afin d'estimer le niveau de diversité et caractériser les facteurs qui influent sur ces communautés, enfin une étude génomique et bioinformatique se sont imposées pour classer ces espèces fongiques et les répertorier sur les banques de gènes. L'identification des espèces nous a permis de connaître le rôle de ces champignons et par conséquent l'élaboration d'un modèle de niche écologique de l'habitat foliaire.

Cette thèse est subdivisée en quatre différents chapitres :

- en premier lieu, le chapitre 1 concerne une synthèse bibliographique, il est subdivisé en 3 grandes parties, la première définit la notion de la phyllosphère et ses différentes composantes; la deuxième présente les deux espèces étudiées, le pistachier lentisque et le pistachier de l'Atlas, tandis que la troisième partie décrit les outils bioinformatiques pour l'étude génomique des assemblages fongiques phyllosphériques ;
- le chapitre II est réservé à l'étude du milieu, notamment l'étude climatique des stations d'échantillonnage ;
- le troisième chapitre rapporte la méthodologie ainsi que la partie expérimentale nécessaire à ce travail ;
- le dernier chapitre expose les résultats enregistrés ainsi que leur discussion.

Enfin une conclusion viendra clôturer ce travail de recherche suivie de nos perspectives de recherches sur la thématique.

---

*Chapitre I*

*Synthèse bibliographique*

---

## **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

Dans le but d'entamer cette thèse, nous avons choisi de commencer par un premier chapitre qui englobe la bibliographie nécessaire à ce travail. Il est subdivisé en trois parties distinctes :

- la première partie : traite de la phyllosphère et ses composants ;
- la deuxième partie : nous renvoie à la présentation des espèces étudiées ;
- la troisième partie : s'intéresse aux notions de la bioinformatique génomique.

Nous allons commencer par la première partie qui lève le voile essentiellement sur la notion de la phyllosphère, sa définition, sa composition en microorganismes ainsi que la provenance de ces derniers afin de cerner son origine. On illustrera également les différents facteurs responsables de la répartition phyllosphérique. Cette partie sera clôturée par une synthèse sur la réaction des composants microbiens de la phyllosphère ainsi que leurs réponses aux différents stress environnementaux.

### **I. La phyllosphère et ses différents composants**

#### **I.1. Définition et composition de la phyllosphère**

Les microorganismes sont un groupe qui rassemble les bactéries, les archées et les eucaryotes microscopiques comme les champignons (Martiny et al., 2006), ces derniers se trouvent sur toutes les surfaces qui nous entourent y compris la surface des plantes. Ces interactions entre les microorganismes et les espèces hôtes ont donné naissance à un nouveau concept qui remet en cause la notion de l'individu, c'est l'holobionte, une notion qui évoque les associations étroites entre les microorganismes et l'hôte (Margulis, 1991).

La phyllosphère est, donc, la partie de la plante située au-dessus du niveau du sol (Bringel et al., 2015), dans la littérature on trouve, également, que cette dénomination ne concerne que la partie foliaire des plantes (Jumpponen et Jones, 2009) (Figure 1).

Les microorganismes de la phyllosphère sont nommés épiphytes ou endophytes selon leurs position sur la feuille, en effet les épiphytes se trouvent à la surface de, tandis que ceux vivants à l'intérieur des tissus, dans les espaces intercellulaires des feuilles sont nommés endophytes (Arnold et al., 2000; Rodriguez et al., 2009).

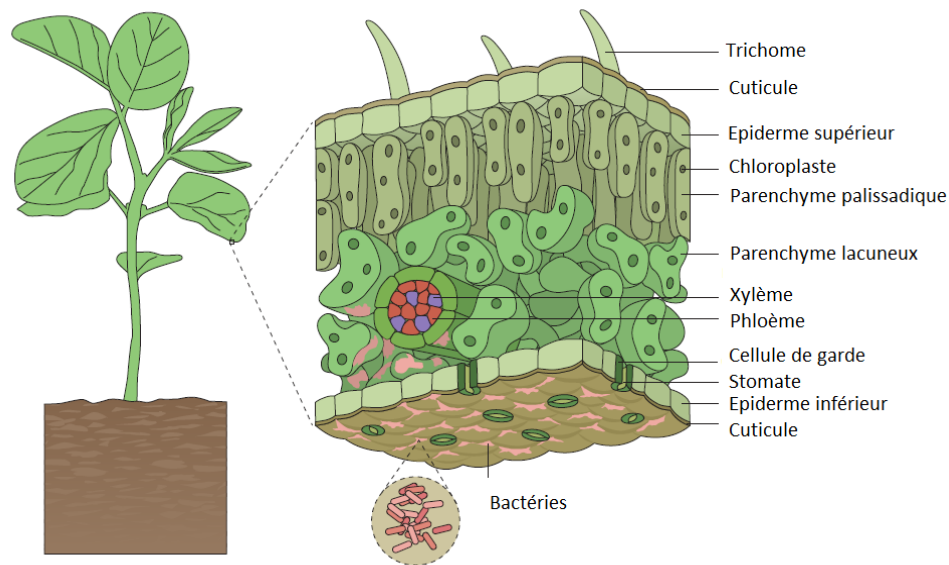


Figure 1: Schéma d'une coupe transversale d'une feuille (Vorholt, 2012).

Ce statut peut varier, car certains épiphytes peuvent pénétrer la feuille pour devenir des endophytes (Viret et al., 1994; Wilson et al., 1999). Ces feuilles et autres parties aériennes abritent en effet de nombreuses espèces bactériennes et fongiques sous forme de levures, de champignons filamenteux ou encore de spores en dormance (Lindow et Brandl, 2003), ces derniers forment le microbiote de la plante (Figure 2).

La phyllosphère est, majoritairement, composée de bactéries, elles sont non pathogènes et appartiennent à quelques groupes phylogénétiques prédominants, y compris les classes des Alphaproteobacteria, des Gammaproteobacteria, les phylabacteroidetes et Actinobacteria (Vorholt, 2012). Les champignons également détectés dans la phyllosphère semblent être très divers. La surface foliaire couvre une proportion significative de la surface terrestre, estimée à  $6,410^8 \text{ km}^2$  (Yumlembam et al., 2016), fournissant ainsi un habitat d'une grande diversité de microorganismes ce qui apporte une contribution importante à la diversité microbienne (Ding et al., 2016), ces sphères ont été, par le passé, très mal connues à cause des moyens d'identification très restreints, mais avec l'avènement des nouvelles technologies, notamment le séquençage d'ADN en masse et la métagénomique (étude des génomes dans leurs environnements naturels) offre une meilleure compréhension de ces ensembles. Cette incroyable diversité est ainsi mieux

estimée. Vorholt (2012) a estimé que chaque cm<sup>2</sup> de feuille hébergerait entre 10<sup>6</sup> à 10<sup>7</sup> cellules bactériennes, Lambais et al. (2006) ont, quant à eux, estimé qu'il y aurait entre 2 et 13 millions d'espèces bactériennes distinctes qui coloniseraient les 20 000 plantes vasculaires des forêts atlantiques brésiliennes.

## I.2. Distribution des microbiomes sur la feuille

Les microorganismes de la phyllosphère se nichent dans des endroits bien spécifiques sur les feuilles, il se fait que les bactéries affectionnent particulièrement les jonctions de la paroi cellulaire épidermique (Behrendt et al., 1997), en particulier dans les sites protégés et confinés comme les rainures le long des nervures, les plis et les stomates ainsi que la base des trichomes et les cuticules, plus précisément dans les dépressions de ces dernières (Mansvelt et al., 1987; Mew et al., 1986) (Figure 2).

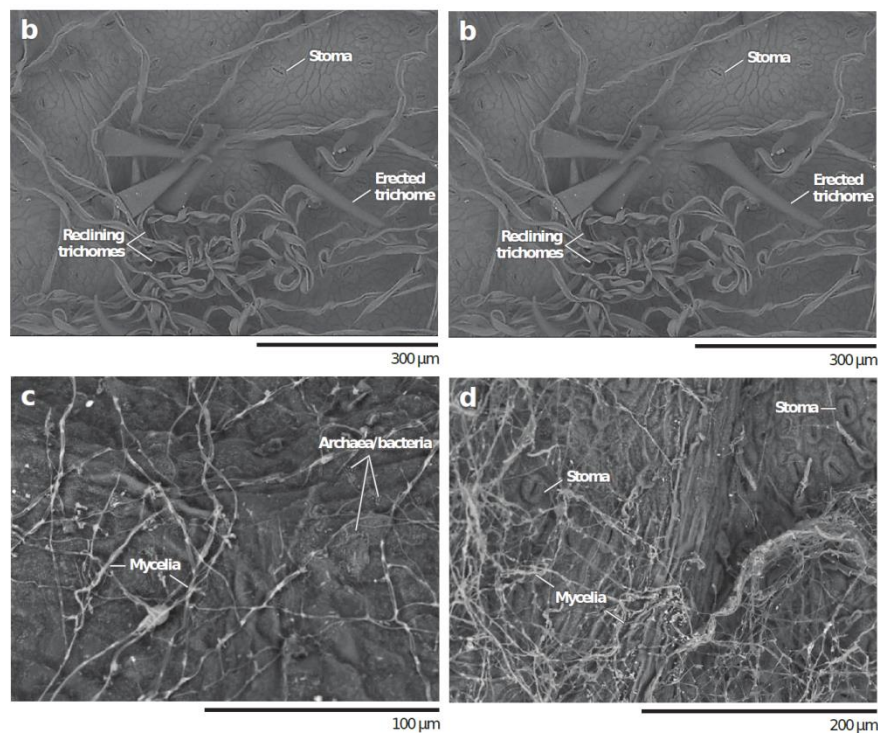


Figure 2: Structure tridimensionnelle de la phyllosphère par microscopie électronique à balayage. (a) Face supérieure d'une feuille de vigne (*Vitis vinifera* cv. *Neuburger*) colonisée par de l'Oïdium (*Erysiphe necator*). (b) Face inférieure d'une feuille de vigne (*V. vinifera* cv. *Welschriesling*), avec un stomate et deux types de trichomes. (c) Face supérieure d'une feuille de chêne (*Quercus robur*) colonisée par de l'oïdium (*Erysiphe* sp.). (d) Face inférieure de feuille de chêne (*Q. robur*), montrant plusieurs stomates partiellement couverts de mycelium. Source : Vacher et al. (2016).

En général les bactéries se trouvent en un plus grand nombre sur la surface inférieure des feuilles car cette dernière a une plus grande densité de stomates ou de trichomes, ou une couche cuticulaire plus mince (Beattie et al., 2002; Belhadj et al., 2008). Les microorganismes peuvent se produire individuellement sur la surface des feuilles, mais souvent, ils se produisent sous forme d'agrégats ; les populations bactériennes de la phyllosphère ont une distribution très variable au sein de leur habitat foliaire, tandis que les champignons filamenteux peuvent être mieux décrits par une distribution normale (Bringel, 2015). Dans la figure 2, on peut observer ces affinités que les champignons de la phyllosphère présentent au sein des surfaces de feuilles.

### I.3. Rôle écologique des microorganismes de la phyllosphère

Les microbiomes dans les différents hôtes sont vitaux, par exemple la flore du tube digestif chez l'humain (Shreiner et al., 2015), de même chez les végétaux, ces micro-organismes contribuent à de nombreuses fonctions essentielles, et leur absence affecterait significativement la vie sur la planète (Gilbert et Neufeld, 2014).

Ces petits êtres microscopiques influencent d'une manière considérable la vie des végétaux, ils ont plusieurs rôles (Figure 3), ils agissent comme moteurs de biodiversité (Bradley et al., 2008). Certaines espèces mutualistes améliorent la fitness de leur hôte en limitant les attaques d'insectes herbivores par la production d'alcaloïdes toxiques (Wilkinson et al., 2000).

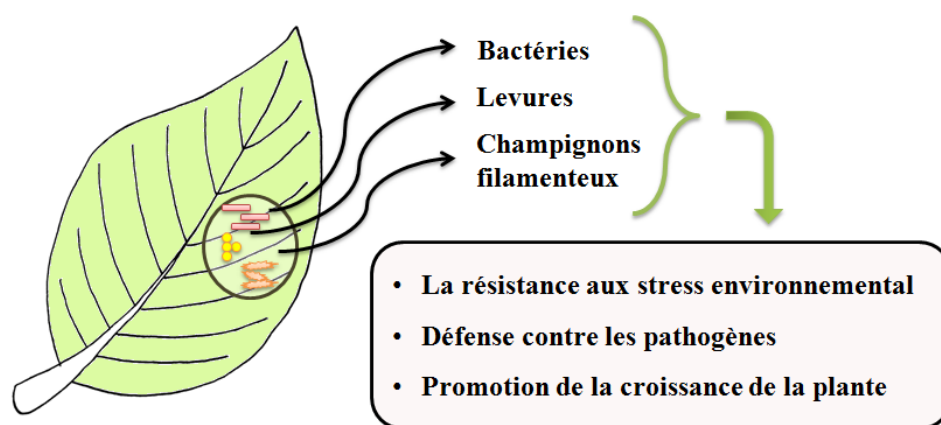


Figure 3 : Composition et rôles de la phyllosphère (original, 2020)

De plus en plus d'études mettent en évidence l'influence des champignons de la phyllosphère sur la fitness des plantes hôtes. Par exemple, les pathogènes diminuent la fitness de leur hôte (Gilbert, 2002; Newton et al., 2010) et agissent en limitant les infections par d'autres champignons pathogènes (Arnold et al., 2003), ou en augmentant la résistance aux stress environnementaux (Rodriguez et Redman, 2007).

Cette flore discrète a un grand rôle dans la promotion de la croissance de la plante hôte, en effet, le microbiome végétal est le déterminant clé de la croissance et de la gestion de la santé des plantes en modulant les processus physiologiques des plantes dans différentes conditions environnementales (Paramanatham et al., 2019). Les composants de la phyllosphère continuent à avoir un rôle même après que les feuilles tombent, ils sont considérés comme dégradateurs (décomposeurs) précoces de la litière forestière, participant ainsi au recyclage de la matière organique (Osono, 2006).

La résistance de la plante aux différents stress environnementaux est due en partie à ces microorganismes (Rodriguez et Redman, 2007), ils peuvent modifier les tolérances physiologiques d'une plante au climat (Cordier, 2012), et donc sa capacité à coloniser de nouveaux milieux ou à s'adapter à de nouvelles conditions environnementales. Par exemple, certaines associations complexes, impliquant un virus infectant un champignon mutualiste d'une plante, peuvent permettre à cette plante de survivre à des conditions extrêmes de température (65°C) durant plusieurs jours, alors que ni le champignon ni la plante ne le pourront seuls (Redman et al., 2002; Márquez et al., 2007).

#### **I.4. Origine de la phyllosphère**

Depuis plusieurs siècles, la pensée que l'air et les surfaces contiennent quelque chose de vivant était déjà établie; dès 1891, Aristote, malgré ses idées sur la théorie de la génération spontanée, avait supposé que la contagion de certaines maladies se faisait via quelque chose dans l'air, «*parce qu'il y a dans cet air quelque chose de morbide*». Plus tard, avec l'observation microscopique, cette théorie se confirme, l'air est donc remplie de microorganismes, c'est naturellement la première source des microorganismes de la phyllosphère, l'atmosphère est donc le premier fournisseur (Bulgarelli et al., 2013). Lors de leur arrivée sur la feuille, ceux-ci vont entrer en interaction avec les micro-organismes déjà installés, puis avec ceux qui viendront



s'établir par la suite (Lindow et Brandl, 2003). La transmission peut être verticale, des espèces microbiennes peuvent provenir des graines ou de l'environnement de la germination (Barret et al., 2015). C'est le cas de plusieurs champignons endophytes (Hodgson et al., 2014; Rodriguez et al., 2009). Les facteurs environnementaux tels que la pluie et le vent peuvent déposer les microorganismes sur les feuilles (Morris et al., 2008). Les animaux et les insectes ont aussi un grand impact sur la diversité phyllosphérique, ces acteurs permettent le transport de plusieurs microorganismes d'une plante à une autre (Osono, 2014). Les bactéries du sol peuvent aussi coloniser l'intérieur des racines et devenir endophytes dans les feuilles via le système vasculaire de la plante (Lamb et al., 1996). Il serait donc probable que la composition de la phyllosphère serait en fait la résultante de l'influence simultanée de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques (Figure 4).

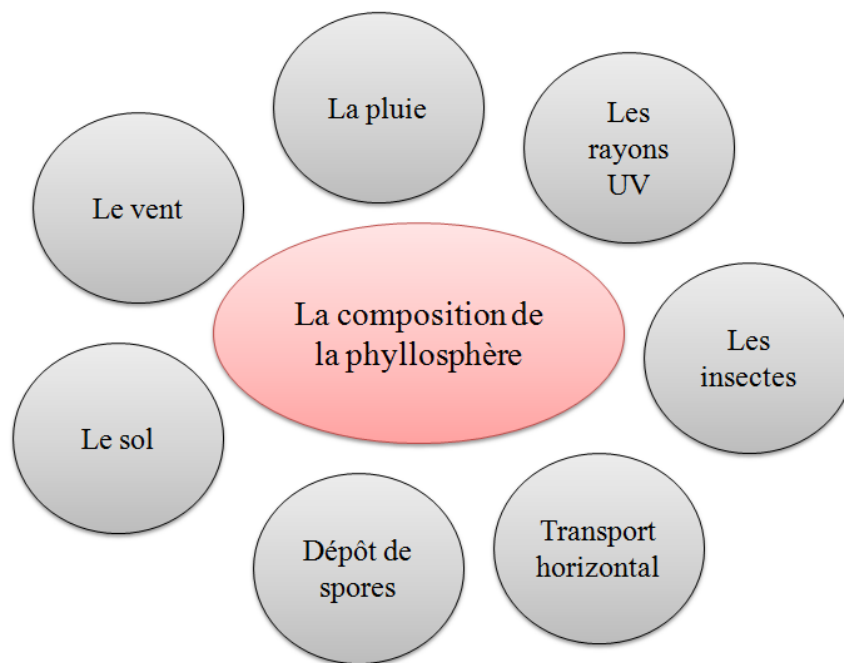


Figure 4 : Facteurs biotiques et abiotiques influençant la composition de la phyllosphère (original, 2020).

## **I.5. Facteurs responsables de la composition des communautés microbiennes**

Aussi vrai que la composition phyllosphérique a été déterminée chez certaines espèces, son origine ainsi que les facteurs qui influencent sa composition, restent mal connus.

La dispersion, qui est le mécanisme de l'arrivée des microorganismes sur les feuilles, reste soumise à plusieurs facteurs biotiques et abiotiques qui la modulent. Alors que l'air est considéré comme un vecteur passif de dispersion du microbiote foliaire (Womack et al., 2010), les variations climatiques telles que la température ou la pluviométrie changeraient considérablement la structure et l'assemblage de la phyllosphère (comptant, 2010). Les différentes saisons présentent aussi des variations dans la composition du microbiote foliaire (Barberán et al., 2014). Cette variation a également été montrée avec du pyroséquençage, avec plus d'un tiers des espèces dynamiques dans la saison et les deux autres tiers constants dans la saison (Jumpponen et Jones, 2009).

L'influence de la génétique de l'espèce hôte reste primordiale (Cordier, 2012), en l'occurrence à tout ce qui caractérise ses traits foliaires comme les huiles essentielles et les phénols (Yadav, 2008), c'est le cas, par exemple, du pistachier lentisque qui présente d'importantes propriétés aromatiques. Quand la dispersion se produit, les microorganismes foliaires ne restent pas statiques, ils sont en évolution constante. En effet, plusieurs mutations se produisent pour que ces espèces puissent faire face aux différents changements environnementaux, le taux de mutation est élevé car les micro-organismes sont soumis à de forts stress abiotiques favorisant les mutations, tels que les rayonnements UV ou des dérivés réactifs de l'oxygène (Vorholt, 2012).

Ces différents changements au sein des communautés microbiennes sont responsables de la diversification de celles-ci. Parfois, certaines mutations ne provoquent pas l'effet escompté, au lieu de permettre à l'espèce de subsister, elles provoquent tout à fait l'effet contraire, ces mutations stochastiques, conduisent à l'extinction des espèces, ou au contraire à leur expansion dans le milieu, modifiant en cascade la succession de la communauté (Maignien et al., 2014). On appelle cela la dérive écologique (Unterseher et al., 2011).

Selon Fort (2016), une rude sélection s'effectue au sein de ces structures de microorganismes, le moindre changement de conditions écologiques de l'habitat foliaire, caractérisé par le microclimat, la plante hôte et les interactions biotiques, peut alors conduire à une modification de la communauté microbienne foliaire.

Finalement, beaucoup de facteurs influenceraient les communautés microbiennes foliaires. L'effet de la dispersion, considéré comme essentiel à l'apport de la diversité microbienne à l'habitat foliaire, reste cependant peu connu, car beaucoup d'éléments environnementaux tels que les espèces avoisinantes, l'aridité du milieu ou même la composition du sol, pourraient influencer ces communautés. Ces différents mécanismes sont résumés dans la Figure 5.

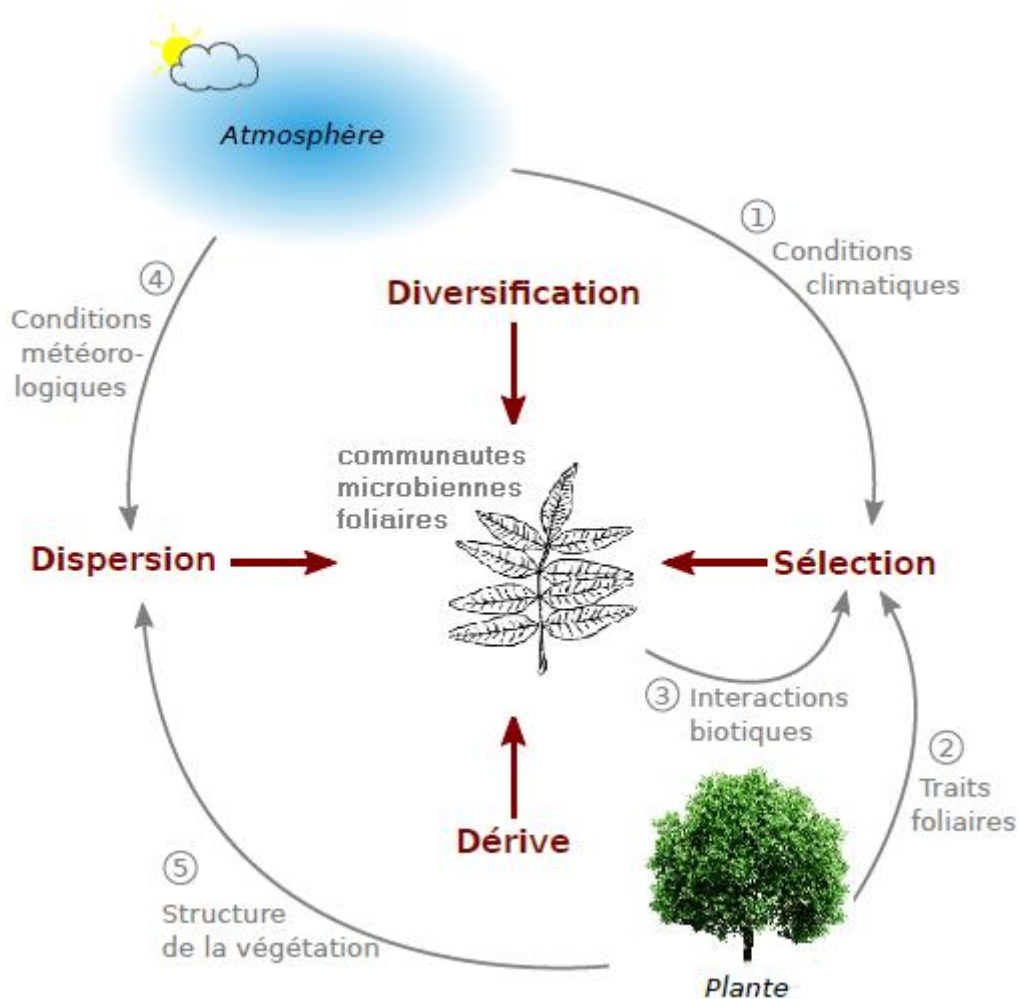


Figure 5 : Cadre théorique de structuration des communautés microbiennes foliaires. Celles-ci sont représentées à l'interface entre la plante et l'atmosphère. Les quatre processus éco-évolutifs sont présentés en rouge. Les effets de la plante et de l'atmosphère sur ces processus sont représentés par des flèches grises (modifié de Fort, 2016).

## 1.6. Comportement microbien face aux changements climatiques

Après avoir illustré les différents facteurs qui modulent la composition de la phyllosphère, il est très important de comprendre le comportement de ces microorganismes face à ces changements. Les réponses écologiques observées correspondent généralement à des modulations de distribution géographique et des changements de phénologie (Bellard et al., 2012).

En fait, ces petits êtres microscopiques réagissent de la même manière que le reste des êtres vivants en face d'une menace ou d'un changement quelconque. L'espèce tente, d'abord, de s'adapter à sa nouvelle condition dans la mesure du possible ; on remarque surtout sur le plan microbien des mutations, permettant à ces espèces d'acquérir des gènes de résistance, mais il arrive parfois qu'ils ne puissent pas s'adapter, la migration vers de nouveaux habitats se présente comme une excellente alternative. Enfin, si la migration ou l'adaptation sont impossibles ou trop lentes par rapport aux changements, la réponse sera de type extinction. Ces types de réponses ont été montrés pour une large gamme de groupes taxonomiques, incluant les plantes (Llorens et al., 2003; Lenoir et al., 2008), les oiseaux (Devictor et al., 2007) et le zooplancton (Beaugrand et al., 2013) (Figure 6).

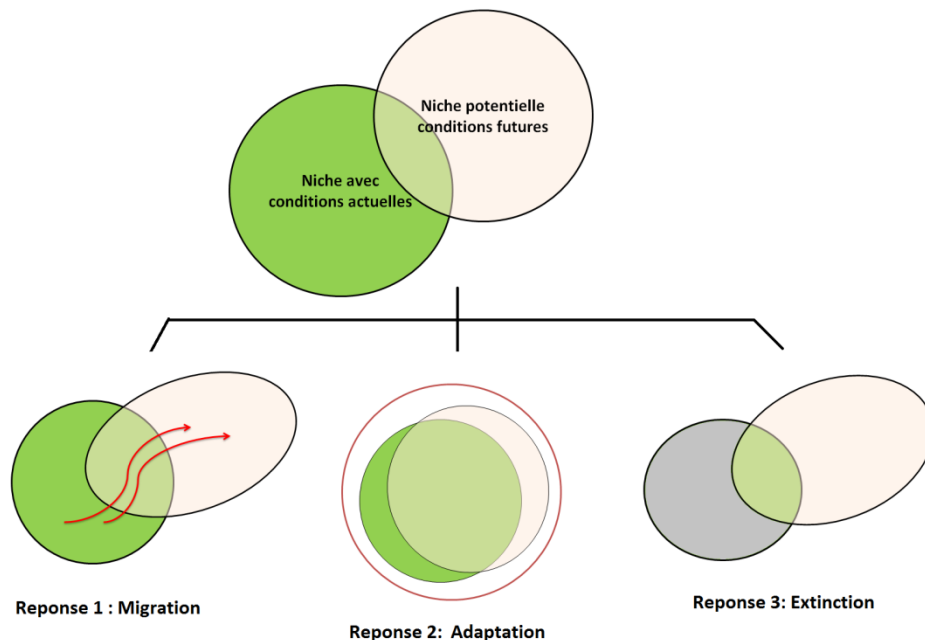


Figure 6: Illustration des trois types de réponses possibles des espèces, face au changement climatique (adapté de Cordier, 2012)

## 1.7. Le règne des champignons (les fungi)

La plus grande partie de ce travail concerne le règne des champignons, il est donc important de le décrire, en effet, comme de décrit la figure 7, parmi tous les organismes vivants, on estime que les champignons représentent le deuxième règne le plus riche en espèces de la biosphère, les insectes étant de loin le règne le plus riche (Purvis & Hector, 2000) (Figure 7).

Déjà en 1991, on estimait que ce règne regroupait 69 000 espèces en une dizaine de phylums, et dont la classification est régulièrement revue (Blackwell, 2011). mais ces estimations sont constamment revues à la hausse, les dernières, réalisées avec des estimations de diversité fongique issues des approches de métagénomique environnementale, varient entre 3,5 à 5,1 millions d'espèces (Cordier, 2012), ces outils ont permis la découverte de plusieurs nouvelles espèces, avec un rythme moyen de 1 300 espèces nouvelles décrites annuellement (Heitman et al., 2020).

Le règne des fungi, aussi appelés Mycota ou Mycètes ou fonge, constitue un taxon regroupant des organismes eucaryotes appelés communément champignons, le botaniste suédois Elias Magnus Fries (1794- 1878), dès ses premiers ouvrages en 1821 avait décrit que ce règne constitue un large groupe diversifié, depuis des organismes microscopiques, invisibles à l'œil nu, microchampignons unicellulaires (levures) ou pluricellulaires (moisissures), jusqu'aux champignons supérieurs.

La phyllosphère, à l'instar des autres sphères du vivant, regorge de fungi, c'est un habitat attractif pour les microorganismes en raison de l'abondance de nutriments et de stabilité relative de l'environnement. Les communautés fongiques présentes sur les feuilles sont dominées par le phylum des Ascomycètes à plus de 70% suivi par celui des Basidiomycètes à 10% (Kembel et al, 2014; Jia et al., 2018).

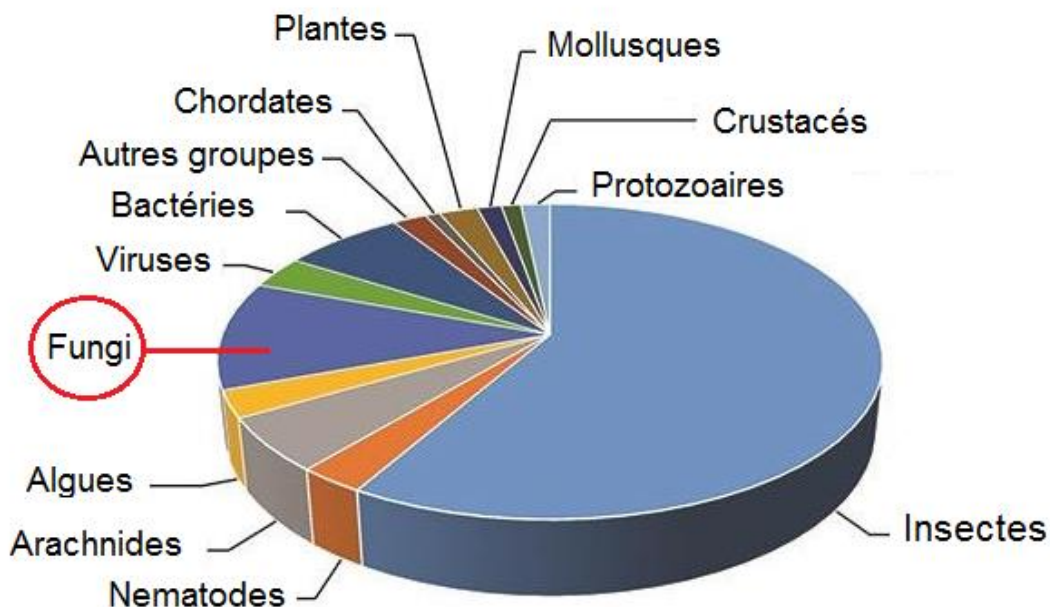


Figure 7: Estimation de la répartition des espèces dans les grands groupes du vivant (Purvis & Hector, 2000).

### I.8. Les champignons pathogènes

Aussi vrai que les espèces fongiques phyllosphériques peuvent être bénéfiques pour la plante, certains sont des bio-agresseurs responsables de plusieurs maladies des plantes. En effet, la plupart des champignons sont des saprophytes ; 10 000 espèces fongiques sont considérées comme phytopathogènes (Petit et al., 2019), elles sont responsables de plus de 70% des maladies des plantes cultivées (Deacon, 2005). Ce qui, en plus de nuire au végétal, cause des pertes économiques considérables (Arora et al., 2003).

Les champignons ont un cycle de vie compliqué, normalement avec une reproduction asexuée et sexuée qui implique la formation de différentes structures de reproduction. De plus, lors d'une maladie des plantes, les champignons produisent différents composants essentiels pour compléter le processus d'infection (enzymes, toxines, etc.) et sont appelés « facteurs de pathogénicité » (Fernandez-Acero et al., 2007).

Les études dans ce domaine ont répertorié plusieurs de ces espèces fongiques nuisibles, une recherche faite par des phytomycologues associés à la revue *Molecular Plant Pathology* a même classé les 10 espèces fongiques les plus phytopathogènes (Dean et al., 2012), la liste comprend, par ordre de classement :

1. *Magnaporthe oryzae* ;
2. *Botrytis cinerea* ;
3. *Puccinia* spp.;
4. *Fusarium graminearum* ;
5. *Fusarium oxysporum* ;
6. *Blumeria graminis* ;
7. *Mycosphaerellagraminicola*;
8. *Colletotrichum* spp.;
9. *Ustilago maydis* ;
10. *Melampsora lini*

## **2. Présentation des espèces étudiées**

Dans cette deuxième partie du chapitre, nous allons nous intéresser essentiellement aux espèces étudiées dans ce travail de recherche, à savoir *Pistacia atlantica* et *P. lentiscus*.

Afin de répondre aux questions sur la phyllosphère et ses modulations de composition et de comportement face aux changements climatiques et environnementaux, nous avons, donc, choisi d'étudier les composants phyllosphériques des deux espèces du genre *Pistacia* (le pistachier de l'Atlas et le pistachier lentisque). Le genre *Pistacia* sera présenté, en premier lieu, ensuite les deux espèces étudiées seront décrites séparément, d'un point de vue systématique et répartition géographique. Les caractéristiques botaniques seront également décrites.

### **2.1. Présentation du genre *Pistacia***

Le genre *Pistacia* regroupe plusieurs espèces d'arbres et d'arbustes, ces espèces végétales dicotylédones appartiennent à la famille des Anacardiacees (*sous-famille des Anacardioidées*), originaires des zones tempérées à tropicales du globe (principalement d'Asie et du pourtour méditerranéen) (Ozenda, 1983 ; Zohary, 1987).

En 2012, Al-Saghir et Porter ont décrit treize espèces dans le genre, qui sont divisées en deux sections monophylétiques :

- Section *Pistacia* : *P. atlantica*, *P. chinensis*, *P. eurycarpa*, *P. falcata*, *P. integerrima*, *P. khinjuk*, *P. mutica*, *P. palaestina*, *P. terebinthus* et *P. vera* ;
- Section *Lentiscus*: *P. aethiopica*, *P. lentiscus*, *P. mexicana*, *P. texana* et *P. weinmannifolia* et *P. vera*.

Cependant, la classification du genre *Pistacia* a subi de nombreux remaniements grâce à l'avènement des techniques de pointe et de nouvelles technologies, qui se basaient sur le profil ADN des chloroplastes (Belhadj, 2007; Al-Saghir et Porter, 2012). Anciennement classées en 4 sections par Zohary (1952), les espèces connaissent une nouvelle classification initiée par Parfitt et Badenes (1997) qui ont subdivisé le genre en deux sections (*Terebinthus* et *Lentiscus*). Grâce à des analyses phylogénétiques et aux techniques de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et de l'AFLP (Amplified Fragment-Length polymorphism), Perl-Traves (2002) et Katsiotis et al. (2003) ont mis en place deux grands groupes dans le genre: l'un contenant les espèces à feuillage persistant et le second les caducifoliées.

### 2.1.1. Systématique

Spichiger et al. (2000) a établi la plus récente des classifications concernant le genre *Pistacia* dans laquelle, le genre est classé dans la **Classe** des Dicotylédones, l'**Ordre** des Térébinthales et la **Famille** des *Anacardiaceae*. On note également que d'autres auteurs (Judd et al., 2002; Lieutaghi, 2004; Yaakobi et al., 2009 ; Dobignard et Chatelain, 2013) ont rapporté une classification remaniée au niveau de la **classe** (*Magnoliopsida*) et de l'**ordre** (*Sapindales*).

### 2.1.2. Aire de répartition

Dans le monde contemporain, ces espèces sont répandues à travers plusieurs continents, souvent sous forme de peuplements. Les pistachiers s'étendent du bassin méditerranéen jusqu'en Amérique centrale, en passant par de plus petits regroupements en désert d'Arabie, en Égypte et au Sahara algérien (Zohary, 1952 ; Monjauze, 1980 ; Belhadj, 2002 ; Yi et al., 2008) (Figure 8).



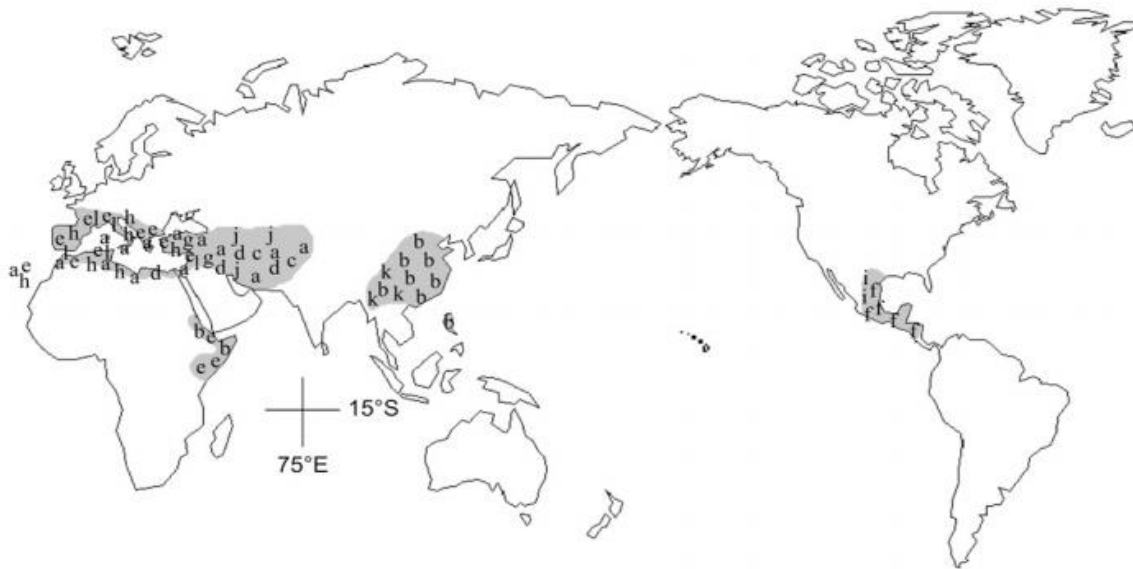


Figure 8: Aire de répartition du genre *Pistacia* dans le monde (D'après, Yi et al, 2008).  
 Sur cette carte sont illustrées 11 espèces de pistachiers ainsi qu'un hybride (a=*P.atlantica*, b=*P. chinensis*, c=*P. intergerrima*, d=*P. khinjuk*, e=*P. lentiscus*, f=*P. mexicana*, g=*P. palaestina*, h=*P. terebinthus*, i=*P. texana*, j=*P. vera*, k=*P. weinmannifolia*, l=*P. saportae*).

Zohary (1952) et Quézel Santa (1963) ont rapporté la présence en Algérie, de cinq espèces du genre *Pistacia*, en l'occurrence *P. lentiscus*, *P. terebinthus*, *P. atlantica*, *P. vera* et *Saportae* Burnat. Cette dernière est semblable à *P. lentiscus* mais à feuilles imparipennées et à inflorescences en grappe rameuse (Belhadj, 2007 ; Chehrit-Hacid, 2016).

Ces espèces sont réparties dans le Tell (pour *P. lentiscus*, où il participe à la strate arbustive des formations forestières du bassin de la Soummam et des zones semi-arides), sur le littoral (pour *P. terebinthus*, que l'on retrouve sous forme arbustive dans le bassin de la Soummam, le versant Nord du Djurdjura et dans le bassin d'El Ksour, le versant sud-ouest d'Ain Sefra), dans les régions semi-arides et arides (pour *P. atlantica*, souvent en association avec *Ziziphus lotus* et *Pinus halepensis*) (Belhadj, 2007).

### 2.1.3. Caractéristiques botaniques

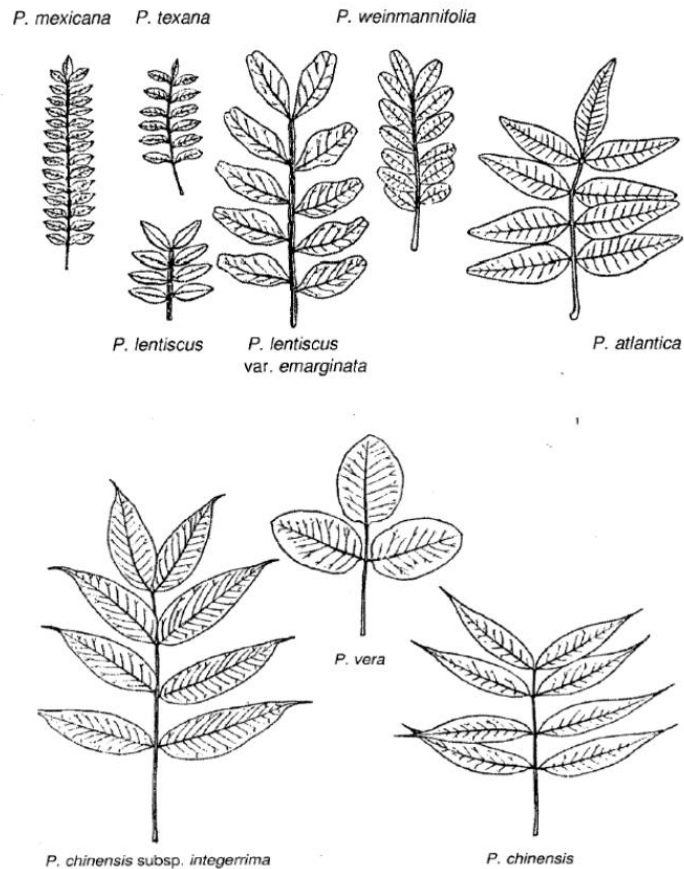


Figure 9: Morphologie des feuilles des différentes espèces de genre *Pistacia* (Zohary, 1952).

Pour l'identification des espèces du genre *Pistacia*, plusieurs critères sont pris en compte. Premièrement, le type de feuille est variable selon les différentes espèces, selon Zohary (1952), c'est un critère de base pour différencier les différentes espèces (Figure 9). Des feuilles alternes, persistantes ou caduques (cas du pistachier de l'Atlas ou du lentisque), pari- ou imparipennées, rarement trifoliées ou simples, membraneuses ou épaisses. Le nombre de folioles varie de 2 à 6 paires. Le rachis des feuilles et le pétiole sont parfois élargis et aplatis pour former une expansion verte comme une aile. La texture des folioles peut varier aussi, elle peut être fine ou épaisse, cas du lentisque mais aussi du lentisque (Belhadj, 2007).

## 2.2. Le pistachier de l'Atlas

### 2.2.1. Présentation de l'espèce

Le pistachier de l'Atlas (*P. atlantica* Desf.), ce grand arbre majestueux ne laisse pas indifférent (Figure 10), il fait partie des essences pré-forestières en déclin (Belhadj et al., 2008). Dans certaines stations mineures, et ayant été relativement protégées des pressions antropozoogènes, il peut frôler les 25m de hauteur avec un diamètre qui atteint parfois 2,5 m et jusqu'à 300ans de longévité (Spichiger et al., 2002; Belhadj, 2007). Sa cime est généralement hémisphérique et volumineuse (Zohary, 1952) et l'arbre peut couvrir jusqu'à 150 m<sup>2</sup> de terrain (Brichet, 1931).



Figure 10 : Aspect général du pistachier de l'Atlas (Original, station de Berrouaghia Mars 2021).

L'imposant Bétoum (Botma, Betouma ou Btouma) comme on l'appelle, en Arabe ou encore *Iggh* en Berbère (Belhadj, 2007; Benabderrahmane et al., 2009), est largement répandu en Afrique du Nord, il prospère dans les lits d'oueds et les dayas sous forme de peuplements vastes et clairsemés (Boudy, 1952; Zohary, 1954; Leutrech-Belerouci, 1981).

Le pistachier d'Atlas est connu pour être parmi les espèces qui ont une résistance aux contraintes édapho-climatiques; présent jusqu'aux portes du désert, il résiste aux vents forts ainsi qu'aux longues périodes de sécheresse des zones steppiques (Belhadj, 2007). Cette plasticité

attire l'attention sur la connaissance actuelle de cette essence et de son interaction avec le milieu dans un but de protection et de valorisation et de lutte contre la désertification. L'espèce est très peu exigeante du point de vue édaphique, elle s'accommode à une large gamme de sols: des terrains acides aux sols calcaires en Syrie, à l'exception des sols sablonneux (Boudy, 1955). L'espèce grandit bien dans l'argile ou les sols limoneux, bien qu'elle puisse se développer aussi sur les roches calcaires (Khaldi et Khoudja, 1996).

### **2.2.2. Systématique et aire de répartition**

Concernant les différentes variétés et/ou sous-espèces de *Pistacia atlantica*, les taxons sont difficilement différenciés par les caractères morphologiques foliaires uniquement ; cet unique représentant de la section Butmela (Zohary, 1952), reste sujet aux controverses quant à sa classification infra spécifique, puisque plusieurs spécimens peuvent présenter des caractères intermédiaires (Zohary, 1982 ; Yaltirik, 1967 ; Belhadj, 2011).

*P. atlantica* est l'une des espèces spontanées les plus répandues du genre. Il a longtemps occupé la région méditerranéenne, essentiellement présent au Maghreb, son aire de distribution est préférentiellement l'Afrique du Nord où il constitue les steppes arborées du bioclimat aride mais également les îles Canaries, la Lybie, Chypre et le Proche-Orient (Zohary, 1952; Quezel et Médail, 2003). La sous-espèce *atlantica* est quant à elle endémique du grand Maghreb (Zohary, 1996).

En Algérie, le bétoum se présente à l'état de groupements isolés. Il apparaît du Nord jusqu'aux régions sahariennes en passant par les hauts plateaux. Il se retrouve surtout sur l'Atlas saharien, dans le secteur du Sahara septentrional et en plein cœur du Hoggar, plus précisément dans les ravines et les zones d'épandage (Monjauze, 1965; Abdelkrim, 1985).

Dans le nord de l'Algérie, il est souvent dominant et associé aux espèces thermophiles épineuses méditerranéennes. Au sud, son association se limite au Jujubier, à l'Alfa, au Sparte et à l'Armoise (Benhassaini et al., 2007) (Figure 11).

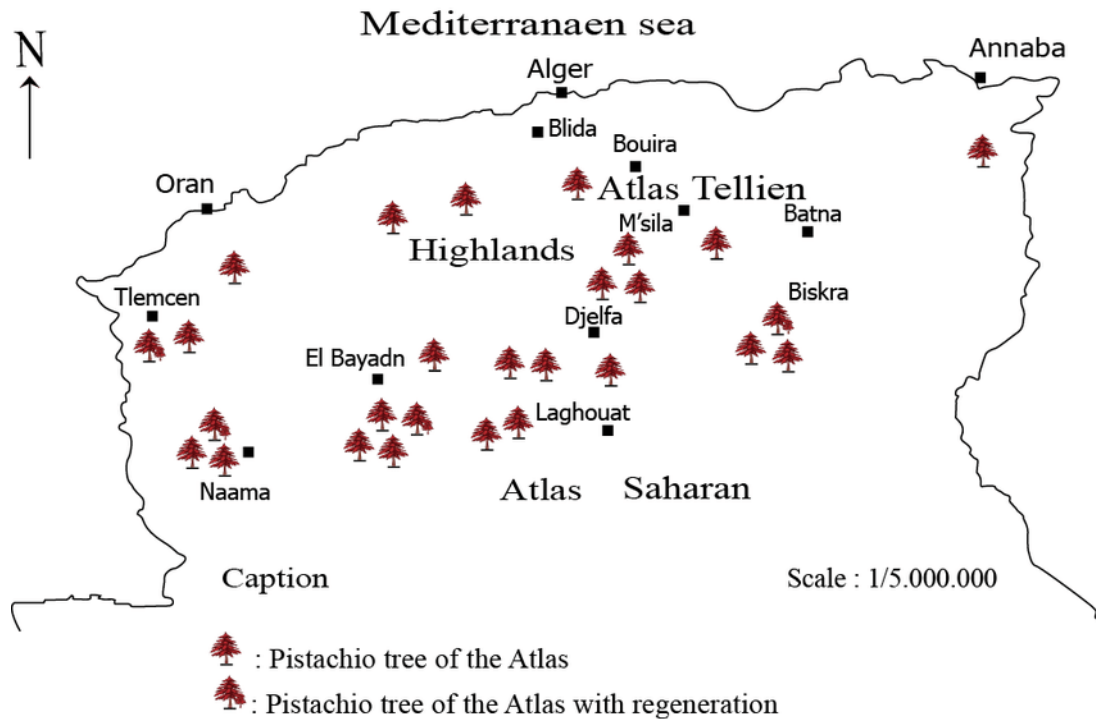


Figure 11: Répartition du pistachier de l'Atlas en Algérie (Chebouti, 2014)

### 2.2.3. Caractéristiques botaniques

En fait, la confusion taxonomique, qui plane autour du pistachier de l'Atlas, est due à la grande variabilité de ses caractères morphologiques (Belhadj et al., 2007a, 2007b, 2008, 2011; El Zerey-Belaskri et Benhassaini, 2016 ; Amara et al., 2020). Les feuilles de l'Atlas sont caduques, sessiles et imparipennées avec 7 à 11 folioles entières lancéolées similaires à celles de *P. lentiscus*, de 2,6 cm de longueur sur 0,5 à 1,5 cm de largeur. Leur couleur varie du vert foncé sur la face supérieure au vert clair sur la face inférieure (Monjauze, 1980; Belhadj, 2007 ; Chehrit, 2016). Zohary (1996), les décrit comme peu coriaces, quant à Ozenda, (1977), il décrit des feuilles à pétiole un peu ailé. Les feuilles présentent une grande variabilité inter et intra individuelle qui peut constituer un critère de classification infra-spécifique (Belhadj, 2007).

Le fruit du pistachier de l'Atlas est une drupe monosperme de 06 à 08 mm de long sur 05 à 06 mm de large, de couleur rouge qui vire au vert foncé une fois mature (Ozenda, 1977). En Algérie, on le nomme « Elkhodiri » ou « Godeim », en rapport avec la couleur vert foncé des drupes, à maturité (Belhadj, 2007). Cependant, ces graines présentent un taux faible de germination et une croissance lente durant les premières années.

Les fleurs sont unisexuées; de couleur rose ; la floraison a lieu avant le développement végétatif. Les fleurs mâles sont groupées en inflorescences composées. Elles ont tendance à fleurir avant les fleurs femelles (protandrie) (Spichiger et al., 2002; Rezaeyan et al., 2009).

Le système racinaire (SR) du pistachier de l'Atlas est très puissant, c'est l'un de ses plus grands atouts pour l'adaptation dans les sols calcaires et salins, cette espèce constitue d'ailleurs un matériel prometteur pour la valorisation des sols salins (Merbah et al., 2021), lui permettant ainsi une meilleure résistance à la sécheresse, il est d'ailleurs préconisé comme porte-greffe pour le pistachier vrai faisant de ce dernier un arbre très vigoureux (Maaruf, 1997). Ce SR, évolue avec l'âge des individus, les plus jeunes ont des racines plus ramifiées pour mieux puiser l'eau du sol, tandis que les sujets adultes présentent une architecture racinaire de plus en plus profonde; en fait, la circonférence racinaire se développe avec l'âge, cela confère au pistachier de l'Atlas un meilleur ancrage et une meilleure stabilité de la partie aérienne devenue de plus en plus volumineuse (Limane, 2009).

## **2.3. Le pistachier lentisque**

### **2.3.1. Présentation de l'espèce**

L'arbre au mastic ou Lentisque en français, puise son appellation dans le latin (*Lentus*) ce qui veut dire visqueux en référence à sa sève qui est utilisée pour la réalisation d'une gomme à odeur (Spichiger et al., 2002; Dahmani, 2011). Il est nommé, également, *Amaday*, *Imidekh* ou *Tidikth* en berbère et *Dharw* ou *Derou* en arabe (Belhadj, 2007; Doghbage, 2011). L'arbre à mastic est un arbuste buissonnant sclérophylle et dioïque. Sa hauteur est de 5 à 6 m mais peut atteindre 8m dans certaines conditions (Flexas et al., 2001).

C'est une espèce indifférente aux propriétés physico-chimiques du sol mais préfère des sols à faible concentration en phosphore et potassium conjugués avec des concentrations différentes en carbonates de calcium et en azote (Dogan et al., 2003).

### **2.3.2. Aire de répartition**

Le pistachier lentisque préfère les variantes chaudes et tempérées des bioclimats semi-arides, subhumides et même humides. C'est ce qui explique sa présence sur tout le pourtour du bassin méditerranéen ; cette essence forestière est caractéristique du paysage de la méditerranée

(Figure 12). Cet arbuste est prédominant dans les écosystèmes extrêmes du bassin méditerranéen, notamment dans les régions ensoleillées à basse altitude, et constitue, avec les myrtes et les cistes, d'immenses broussailles appelées maquis, c'est ce qu'on appelle une espèce thermophile. L'espèce s'étend jusqu'au Nord-Est de l'Afrique et de l'île de Madère, à l'intérieur de la péninsule ibérique, dans des aires ombragées, évitant des endroits à hiver froid. En Algérie, il 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 (Zohary, 1952; Boudy, 1955; ALSaghir, 2006; Bhourri et al., 2010 ; Abdelwahed et al., 2014).

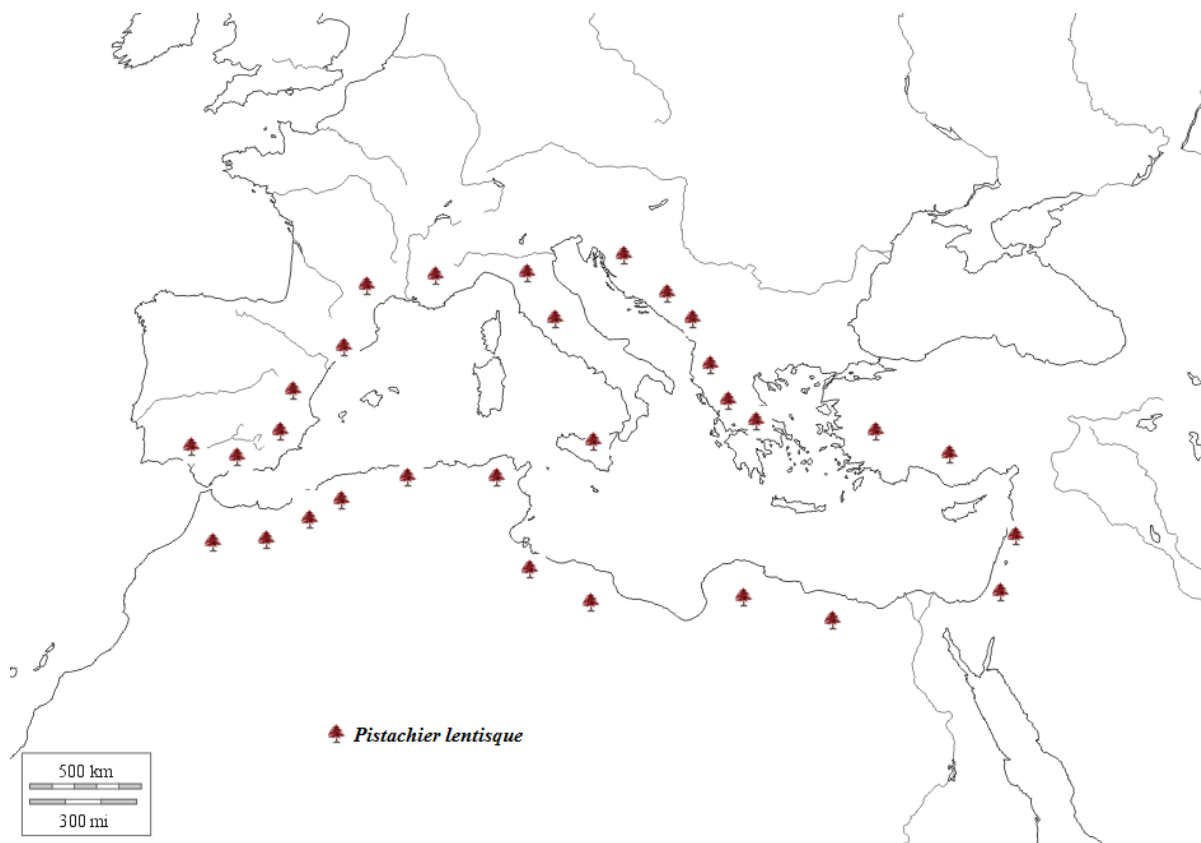


Figure 12 : Aire de répartition de *Pistacia lentiscus* dans le bassin méditerranéen (Adapté de AL-Saghir, 2006).

### **2.3.3. Caractères botaniques**

Le lentisque est un arbrisseau résineux de 1 à 3m de hauteur. Il se distingue des deux autres espèces de pistachiers méditerranéens, notamment du térébinthe par ses feuilles ayant un nombre, paire, de folioles. Les feuilles sont composées, paripennées à pétiole étroitement ailé, 6 à 12 folioles petites (nombre paire) disposées en 2 rangs, coriaces, sans poils, luisantes en dessus, pâles et mates en dessous, son feuillage est persistant et restent fonctionnelles pendant plusieurs années. Les fleurs du lentisque sont petites, verdâtres en grappes spiciformes, latérales, denses, pédicelles et bractéoles très courts, calice petit, brun, dioïques (organes unisexués des mâles et des femelles situés sur des pieds différents). La floraison s'étale d'avril à juin, et la pollinisation se fait par le vent, quant aux drupes, elles sont petites de forme ovoïde, apiculées au sommet, presque sèches, d'abord rouges puis noires à maturité qui fructifient généralement en novembre (Zohary, 1952; Rameau et al., 2008).

### **2.3.4. Comparaison entre les deux espèces de pistachiers**

Aussi vrai que les deux espèces étudiées font partie du genre *Pistacia* L., le pistachier de l'Atlas et le pistachier lentisque ne sont pas aussi similaires, il existe en effet plusieurs différences morphologiques et écologiques entre ces deux espèces.

D'abord la structure de l'arbre n'est pas la même, comme désigné dans les caractéristiques morphologiques, le lentisque est, plus communément, un arbuste tandis que le pistachier de l'Atlas est un grand arbre. Le lentisque a un feuillage persistant, ses feuilles sont composées, alternées et paripennées. Les folioles sont de formes lancéolées dont le nombre est compris entre 2 à 6 paires tandis que le feuillage du pistachier de l'Atlas est caduc, Chez cette espèce, les feuilles sont composées imparipennées, renfermant 3 à 4 paires ou 3 à 5 paires de folioles (Monjauze, 1980).

L'aire de répartition des deux espèces n'est pas la même n'en plus, le pistachier de l'Atlas est une espèce des régions forestières subtropicales de l'ancienne zone méditerranéenne (Quézel et Santa, 1963), mais la sous espèce étudiée, *Pistacia atlantica* ssp. *atlantica* est endémique pour le grand Maghreb, et présente une répartition plus ou moins discontinue dans la région des dayas et des zones semi-arides et arides de la steppe algérienne (Quézel et Santa, 1963 ; Monjauze,



1980 ; Belhadj, 2007). Le lentisque par contre, s'étend sur tout le bassin méditerranéen (Zohary, 1996), et occupe des zones plus ou moins arrosées, plus commun dans les formations forestières.

En fait cette répartition géographique dépend fortement de la résistance de chaque espèce aux conditions environnementales, par exemple, le lentisque n'est présent généralement qu'à basse altitude, ne dépassant pas les 400m. Le pistachier de l'Atlas par contre, peut se retrouver sur une large gamme altitudinale, de 300 à 2500m d'altitude (Zohary, 1996). En Algérie, il peut se développer jusqu'à 2000m d'altitude dans les montagnes sèches (Atlas Saharien) (Monjauze, 1980 ; Quézel et Santa, 1963).

Les étages bioclimatiques se chevauchent pour les deux espèces, le pistachier de l'Atlas préfère les milieux arides, tandis que le lentisque se trouve plus sur les milieux tempérés (Monjauze, 1980). Le pistachier de l'Atlas est en effet une espèce d'une grande amplitude écologique, et d'une plasticité remarquable, cette espèce peut être présente jusqu'au Hoggar, preuve de sa grande adaptation pour les milieux arides (Monjauze, 1980 ; Berrichi et al., 2017), il est présent spontanément sous diverses conditions écologiques.

### **3. Bioinformatique génomique**

Ce travail sur la phyllosphère des pistachiers, de l'Atlas et du lentisque, a été réalisé en deux parties : la première consistait en une étude microbiologique des colonies bactériennes et fongiques ; la seconde consiste en une étude génomique des champignons phyllosphériques uniquement. Pour cette dernière, on a fait appel aux nouveaux outils d'identification des génomes.

En effet, ce volet de la thèse a nécessité un séquençage des espèces fongiques suivi par une étude taxonomique pour l'identification de ces derniers, il est donc important, de présenter dans cette partie de la bibliographie, les méthodes génomiques ainsi que tout le pipeline bioinformatique nécessaire à ce genre d'étude metagénomique, du barcoding, jusqu'à l'annotation des génomes, toute une nouvelle discipline sera décrite.

#### **3.1. Découvertes et phylogénie**

Pour pouvoir identifier un champignon, il faut d'abord comprendre le concept même de l'espèce chez les microorganismes, Ernst Mayr dans son ouvrage sur la systématique et l'origine des espèces en 1947 la définit comme telle:

« Une espèce est une population ou un ensemble de populations dont les individus peuvent effectivement ou potentiellement se reproduire entre eux et engendrer une descendance viable et féconde, dans des conditions naturelles. »

Selon Hausdorf (2011), même si l'espèce constitue l'unité la plus importante en biologie, la définition du terme est encore soumise à controverse. Avant l'avènement des outils de biologie moléculaire, les critères morphologiques, ont été le seul moyen de classer les espèces. C'est la définition même du concept d'espèce phénétique, autrement dit, seuls les critères phénotypiques étaient pris en compte. Darwin (1964), fut le précurseur de cette méthode de classification, ses premières esquisses d'arbre de vie remontraient à son premier ouvrage sur l'origine des espèces, cependant, cette méthode de classification ne reflète pas forcément les relations évolutives phylogénétiques. La méthode de reproduction est un critère primordial dans la classification, contrairement aux espèces dont la reproduction est sexuée, les microorganismes se reproduisent d'une manière asexuée rendant ainsi la tâche de leur identification plus complexe (Rosselló-Mora, 2001), d'autant plus que pour certains champignons, les caractères phénotypiques sont difficiles à déceler, la biologie moléculaire simplifie dans ce cas l'identification, la phylogénétique présente alors une option de choix, car cette discipline tient compte des gènes, plus précisément, des séquences consensus ou conservées qui représentent à elles seules l'identité d'une espèce. Cette discipline a été initiée avec l'énoncé du dogme central en 1958 par Francis Crick (Crick, 1958) (Figure 13) 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 alors opérés en biologie.

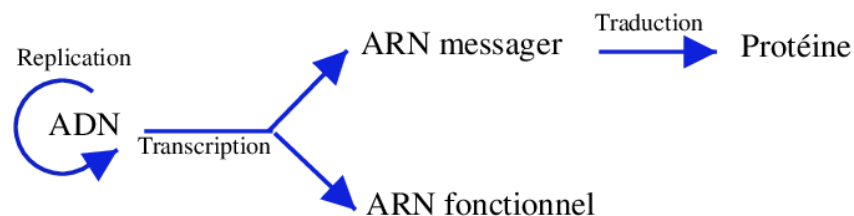


Figure 13 : Dogme central de la biologie moléculaire énoncé par Crick (1958).

En 1977, grâce à une analyse des ARN ribosomique 16s, des scientifiques dirigés par le microbiologiste américain Carle Woese annoncent la découverte d'une nouvelle forme de vie qui bouleverse les fondements de la taxinomie biologique, ils révèlent que les systèmes vivants représentent l'une des trois lignées de descendance autochtones: (1) les **Eubactéries**, comprenant toutes les bactéries typiques; (2) les **Archaeobactéries**, contenant des bactéries méthanogènes; et (3) les **Eucaryotes**, maintenant représentés dans la composante cytoplasmique des cellules eucaryotes (Woese, 1977). Cette dernière lignée abrite le règne des Fungi (Figure 14).

En 2015, grâce à des chercheurs en bioinformatique évolutionnaire, une nouvelle classification a été introduite, ils ont dressé un nouvel arbre de la vie où les Virus sont les descendants d'une lignée de protocellules distinctes et constituent une branche du vivant à part entière, aux côtés des Archées, des Bactéries et des Eucaryotes (Ikonicoff, 2015).

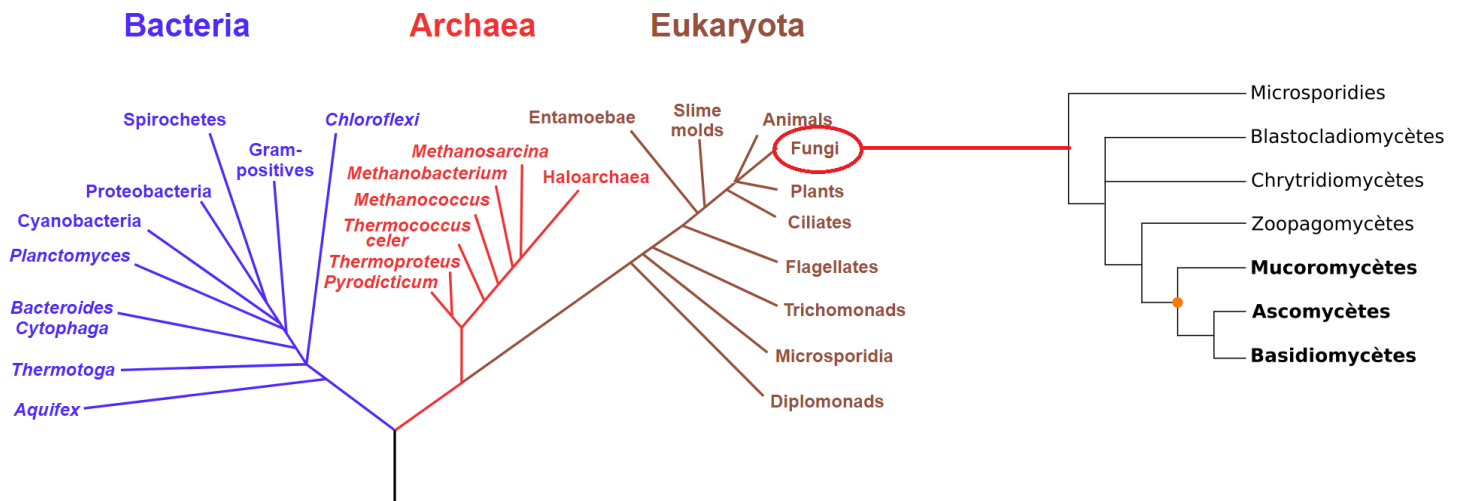


Figure 14: Arbre phylogénétique du monde vivant d'après Woese et al. (1990)

## **3.2. Méthodes de culture des champignons**

### **3.2.1. Méthodes de culture-dépendantes**

Pour l'étude des communautés microbiennes, des méthodes de culture microbiologiques telle que la mise en culture dans un milieu nutritif, sont depuis longtemps utilisées, elles sont appelées "méthodes de culture dépendantes", plusieurs études consacrées aux champignons associés aux plantes ont été réalisées par isolement sur milieu de culture. L'avantage majeur d'obtenir des cultures pures de champignon, en plus de pouvoir formellement décrire des traits phénotypiques, est de pouvoir directement étudier l'effet de traitements expérimentaux (Cordier, 2012). Cependant, ces méthodes ont montré des limites quant à la précision de l'identification des organismes, près de 99% des espèces microbiennes ne sont pas cultivables en milieu nutritif, et ne peuvent, donc, être détectées par ces méthodes (Müller & Ruppel, 2014), or, dans une étude comme la nôtre, basée sur des facteurs climatiques et environnementaux différents, il est impossible de recréer artificiellement les conditions dans lesquelles les champignons se développent. Ces approches peuvent également fausser les résultats de la richesse spécifique des communautés par exemple, car dans un milieu de culture, l'accès aux ressources nutritives n'est pas le même que dans leurs habitats d'origine, par conséquent, toutes les notions de compétition et de symbiose entre les microorganismes sont négligées.

### **3.2.2. Méthodes de culture-indépendantes: le métabarcoding**

Pour l'étude d'un organisme dans son milieu naturel, de nouvelles méthodes dites de culture-indépendantes sont utilisées, comme leur nom l'indique, elles ne se basent pas sur la mise en culture, mais sur un principe génétique révolutionnaire, elles cibleraient, alors, les séquences consensus pour départager les espèces. Ces méthodes constituent une approche métagénomique pour l'estimation du niveau de la diversité.

Le métabarcoding, une de ces techniques en plein essor, a été employée pour la première fois dans une étude sur l'agent responsable de la Malaria (*Plasmodium falciparum*). Elle consiste en l'usage d'un gène hypervariable pour identifier les différentes lignées d'une espèce et de mener ainsi des études de génétique des populations et d'épidémiologie (Arnot et al., 1993), cette méthode préconise l'usage d'un marqueur génétique standard court pour identifier un organisme au niveau spécifique. Ceci offre un moyen simple et rapide d'identification des espèces. 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 (Hebert et al., 2003; Valentini et al., 2009). La plus simple définition du barcode, reste celle de Cordier (2012), elle décrit le barcode idéal comme étant un gène orthologue (présent chez toutes les espèces), court (moins de 1000 pb), facilement amplifiable par PCR et ayant surtout un niveau de variabilité interspécifique minimal supérieur au niveau maximal de variabilité intraspécifique, en d'autres termes, il faut une partie du génome très stable chez l'ensemble des champignons, mais assez variable à l'intérieur pour permettre de différencier les espèces.

La caractérisation des microorganismes suit tout un processus, d'abord, à partir d'un échantillon environnemental, cas d'une feuille de pistachier dans notre étude, est extrait l'ADN total ou l'ADN environnemental (Taberlet et al., 2012) c'est pour cela qu'on l'appelle "méta" barcode, ce suffixe fait référence à une étude menée directement au sein de l'environnement sans passer par une culture *in vitro*. Ensuite un "barcode" spécifique à l'ensemble du groupe d'espèces ciblées, mais variable entre les espèces est amplifié par PCR puis séquencé ; le séquençage de ces organismes permet de connaître avec exactitude l'espèce à laquelle ils appartiennent (Müller & Ruppel, 2014). Par des méthodes de séquençage haut débit, les séquences obtenues sont partitionnées en Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs); chaque OTU est enfin comparée à une base de données afin d'obtenir une assignation taxonomique (Fort, 2016). Ce processus est résumé dans la figure 15.

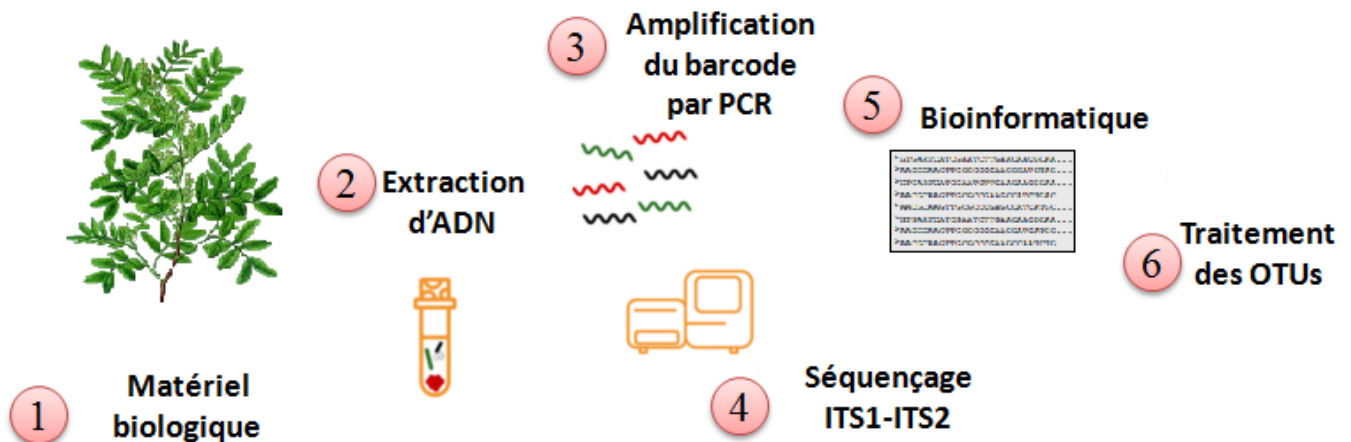


Figure 15: Schéma synthétique de la méthodologie employée pour caractériser les communautés fongiques phyllosphériques (Original, 2020).

### 3.2.2.1. Le barcode chez les champignons

Chercher à identifier une espèce avec un barcode, est une recherche avec un seul critère commun de sélection, il est important que ce dernier soit bien choisi, cela est très possible mais une limite pourrait venir à l'esprit, et si ce caractère n'était pas assez sélectif, n'est-il pas plus judicieux d'utiliser dans ce cas un double critère. Lors de travaux précédents (White et al., 1990 ; Gardes et Bruns, 1993), le barcode "ITS" (internal transcribed spacer) a déjà été utilisé chez les champignons et qui par conséquent, est très bien représenté dans les bases de données de séquences. De plus, l'ITS présente un excellent pouvoir discriminant entre les espèces (Schoch et al., 2012; Tedersoo et al., 2015; Fort, 2016).

L'utilisation de l'ADNr (ADN ribosomal), est très répandue dans les études de la diversité génétique des communautés de champignons. Il en existe deux types, l'ADNr mitochondrial et l'ADNr nucléaire ; le premier est plus utilisé pour les champignons mycorrhiziens, tandis que le second comprend des régions codantes pour les ARNr (18S, 5.8S, 28S et 5S) relativement bien conservées avec les fameux espaceurs ITS. Ces deux types d'ADNr sont plus utilisés pour les champignons de la phyllosphère. La région ITS est maintenant largement utilisée comme « code-barre » génétique pour caractériser la diversité des champignons (Nguyen, 2008). Une illustration de l'ITS est représentée dans la Figure 16.



Figure 16: 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 (adapté de Cordier, 2012).

Il est important de citer que ces fragments d'ADNr sont amplifiés naturellement au sein des génomes des différents microorganismes, il ya des organismes qui possèdent plusieurs copies, ce nombre peut différer au sein des isolats d'une même espèce (Jumpponen et al., 2017), ceci dit, il ya en plus d'une identification qualitative, une identification quantitative.

Les barres-codes ont également été utilisés pour l'analyse génétique et phylogéographique des populations, l'identification des proies dans le contenu intestinal, la détection d'espèces

envahissantes, la médecine légale, et la sécurité des fruits de mer. De manière plus controversée, les codes à barres ont été utilisés pour délimiter les limites des espèces, révéler des espèces cryptiques et découvrir de nouvelles espèces (Bucklin et al., 2011).

Cependant, la plus grande limite de l'utilisation des barres-codes, reste le chevauchement inter et intraspécifique, c'est à dire, qu'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 (Valentini et al., 2009). On appelle la distance génétique de ces séquences entre les espèces "Barcoding gap", ce seuil de délimitation est en effet bien plus souvent un chevauchement qu'une vraie séparation (Figure 17).

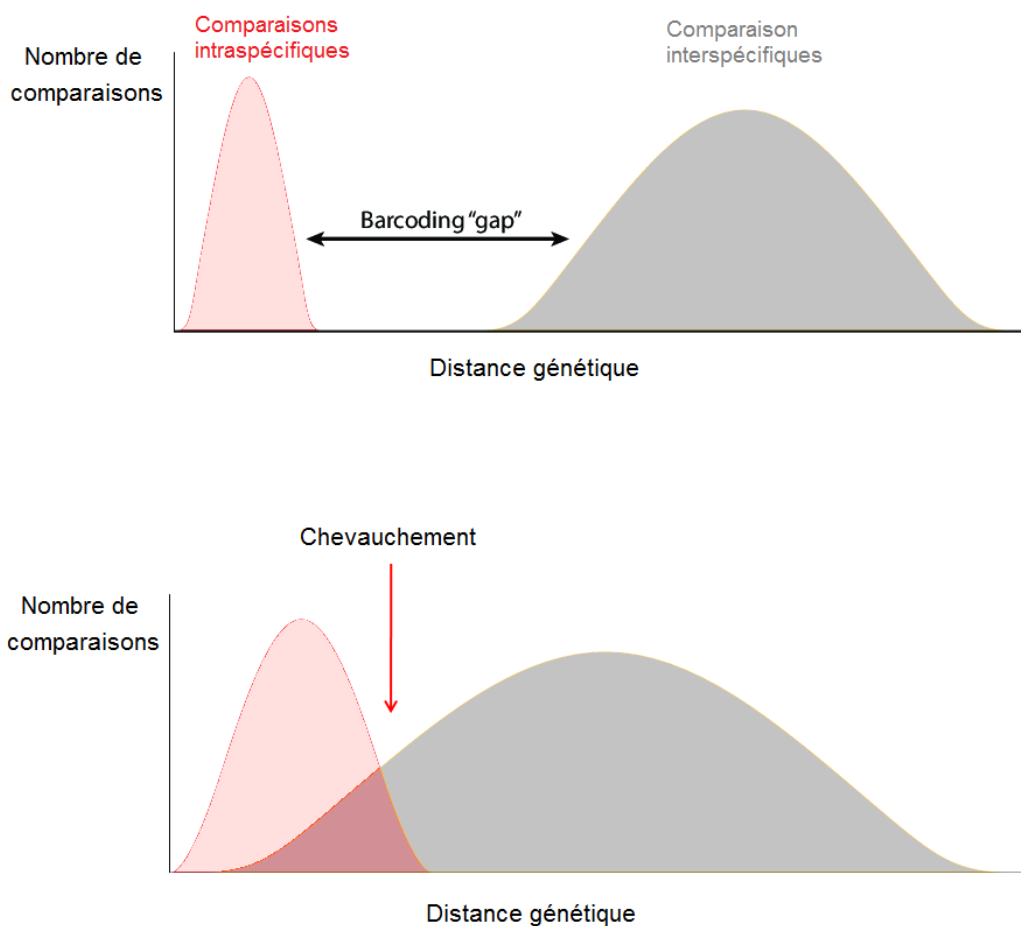


Figure 17: Illustration du barcoding gap et du chevauchement (adapté de Meyer & Paulay, 2005).

Pour pallier aux problèmes liés à ce chevauchement, utiliser une double amorce s'avère être un choix très judicieux, par exemple la séquence ITS1 est aussi présente chez les eucaryotes, des fragments de l'espèce hôte (un fragment de la feuille par exemple pour les études phyllosphériques) peuvent donc se confondre avec les séquences fongiques, pour cela, Fort dans ses travaux (Fort, 2016), a testé trois jeux de données avec trois couples d'amorces (fITS7-ITS4, fITS7-ITS4 et ITS1-ITS2), les deux premières combinaisons présentaient un taux important de séquences non fongiques, pas très sélectives donc, tandis que le dernier couple d'amorces ITS1/ITS2 avoisinait les 100% de séquences fongiques. Plusieurs combinaisons de ces séquences sont donc possibles, les plus utilisées sont représentées dans le tableau 1.

Barcode	Amorce	Sens	Séquence (5'- 3')
ITS1	ITS1F	direct	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS1	ITS2	indirect	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS2	fITS7	direct	GTGARTCATCGAATCTTG
ITS2	ITS4	indirect	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Tableau 1: Amorces ITS utilisées en métabarcoding (Fort, 2016).

### 3.3. Le séquençage de l'ADN

Après l'amplification des séquences par PCR, le séquençage de ces petites parties du génome est effectué, il sert à déterminer la séquence nucléotidique, c'est-à-dire l'ordonnement des nucléotides d'ADN cible, dans notre étude il s'agit des séquences ITS1/ITS2. Le séquençage d'ADN est basé sur le même principe que celui de la PCR, sauf que le mélange réactionnel contient en plus des dNTP, des ddNTP, didésoxyribonucléotides triphosphates (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Il ya en fait plusieurs types de séquençages haut débit, les plus communs sont le pyroséquençage (Roche 454), le séquençage par synthèse (Illumina), le séquençage par ligation (SOLiD) et le séquençage par ion semi-conducteur (Ion Torrent) (Goodwin et al., 2016 ; Heather & Chain, 2016).

Dans cette étude nous avons utilisé le séquençage par synthèse (Illumina). Cette technique présente deux grands avantages, elle est rapide et moins couteuse. On pourrait expliquer cela par un principe innovateur, si l'on pouvait comparer le séquençage d'ADN à un



grand puzzle avec des milliers de petites pièces à assembler dans le but d'identifier une photographie, en somme, l'ancienne méthode consistait à assembler toutes les pièces pour avoir le résultat, cela prend énormément de temps, les nouvelles méthodes, par contre, rassemblent juste de petites parties caractéristiques du puzzle, une vue d'ensemble de celles-ci permet d'identifier la photographie plus rapidement avec un résultat tout aussi correct. Le plus grand avantage du séquençage, est qu'il donne accès aux séquences, pour faire des identifications d'espèces, ou pour accéder à la composition phylogénétique d'une communauté et tester des hypothèses sur les facteurs écologiques impliqués dans l'assemblage de cette communauté (Cavender-Bares et al., 2009 ; Morlon et al., 2011). Cette méthode de séquençage consiste d'abord en une fragmentation de l'ADN en petits fragments (méthode shotgun), ensuite, n'étant pas obligé de séquencer tous les fragments, des amorces spécifiques sont utilisées, le séquençage ne s'effectuera donc que sur de petites parties du génome (Figure 18).

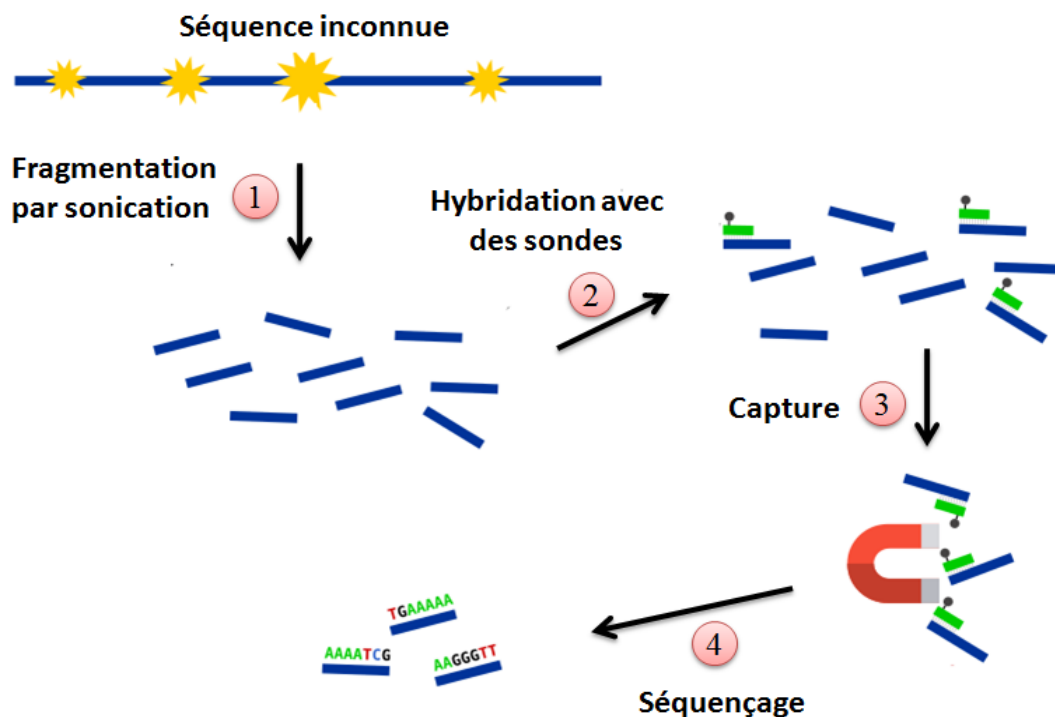


Figure 18: fonctionnement du séquençage haut débit avec la technique Illumina (Original, 2020)

### 3.4. Bioinformatique

À la fin d'un séquençage d'ADN, les résultats bruts de l'ensemble des séquences sont sauvegardés dans un fichier nommé "Fastq", la chimie laisse alors place à la bioinformatique,

mais le travail est très loin d'être fini, en effet, il n'y a que des petits fragments de quelques paires de bases avec le défi d'identifier une espèce inconnue. On appelle ce processus "l'annotation génomique".

La bioinformatique se base sur deux grands principes, le premier est que, toute information existante, est répertoriée dans des bases de données, classées avec minutie dans des banques en ligne. Ce sont des bibliothèques géantes qui regroupent toutes les recherches faites à ce jour. Le deuxième principe, est un panel d'outils nécessaires aux traitements de ce flux d'informations. Avec des séquences inconnues et toutes ces informations établies, une méthode logique s'impose, en fait, pour identifier quelque chose d'inconnu, il faut le comparer à ce qui existe déjà, c'est de cette logique qu'apparaît un procédé qu'on appelle "l'alignement des séquences".

Dans cette partie, nous allons expliquer ces méthodes bioinformatiques, car elles ouvrent droit à tout un travail de recherche à partir d'un ordinateur et une connexion internet, c'est ce qui constitue la recherche « *in silico* », par analogie avec *in vitro* .

### **3.4.1. Les bases de données biologiques**

L'avènement des banques de données biologiques s'est fait en parallèle avec les avancées scientifiques sur le séquençage des génomes, il fallait trouver une solution à tout ce flux d'informations. Les banques biologiques se sont divisées en deux types, les banques généralistes et les banques spécialistes, subdivisées selon la nature des données en des banques nucléiques et des banques protéiques. C'est au début des années 80 que les premières banques de séquences sont apparues sous l'initiative de quelques équipes comme celle du Professeur Grantham à Lyon (Grantham et al., 1981). Très rapidement, la collecte et la gestion des données ont nécessité une organisation plus conséquente. Ainsi, plusieurs bases de données commencent à émerger. Trois grandes banques nucléiques généralistes ont été créées à peu près à la même période, elles sont les pionnières de la description des caractéristiques biologiques qui accompagnent les séquences. D'abord, la banque nucléique européenne EMBL, parallèlement, une banque nucléique américaine nommée GenBank a été créée (Bilofsky et al., 1986), elle se trouve actuellement sur NCBI (National Center for Biotechnology Information). La troisième est la banque japonaise DDBJ (Dna Data Bank du Japon). Au même moment, avec toutes ces données génomiques, la protéomique prend son essor, des banques protéiques sont alors apparues, les plus connues sont :

la Protein Identification Ressource (PIR-NBRF) (George et al., 1988) et la Swissprot qui a été constituée à l'Université de Genève à partir de 1986 (Bairoch et Boeckmann, 1993 et 1994).

Devant la croissance quasi exponentielle des données et l'hétérogénéité des séquences contenues dans les principales bases de séquences généralistes, d'autres bases spécialisées sont apparues. Elles tournent autour d'une thématique biologique spécifique, c'est comme des petites bibliothèques qui puisent leurs données dans les grandes bibliothèques afin de mieux organiser les résultats. On note quelques-unes comme les bases à motifs nucléiques tels que la base de facteurs de transcription TFD dédiée aux facteurs de transcription eucaryotes, et les bases à motifs protéiques tels que PROSITE et BLOCK (Henikoff et al., 2000).

### **3.4.2. l'annotation des génomes**

La génomique est composée de plusieurs volets complémentaires : la génomique structurale, la génomique fonctionnelle, la transcriptomique et la protéomique.

La génomique structurale analyse la structure des gènes tandis que la génomique fonctionnelle analyse les fonctions de ces derniers, elle inclut l'analyse du transcriptome et du protéome. L'annotation d'un génome, d'un transcriptome, d'un protéome, ou d'un métabolome, consiste à documenter de la manière la plus exhaustive les informations issues de ces disciplines. Devant les différents outils disponibles pour l'étude des génomes, nous avons utilisé ceux qui sont disponibles gratuitement en ligne et qui ne nécessitent pas un matériel informatique spécial. Le principe de l'annotation réside dans la comparaison d'une séquence inconnue, à toutes les séquences déjà connues et répertoriées dans les banques, avec des séquences communes ou déjà étudiées, un simple alignement sur BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est suffisant pour identifier l'espèce (Altschul et al., 1990). Mais parfois avec de nouvelles séquences, il est nécessaire de passer par une annotation manuelle pour identifier l'espèce et la répertorier dans les banques de gènes.

### **3.4.3. Alignement des séquences : Le BLAST**

Le premier alignement de séquences fut celui de "Smith-Waterman", c'est un [algorithme](#), d'[alignement de séquences](#), utilisé notamment en [bioinformatique](#), il a été inventé par [F. Smith](#) et [Michael S. Waterman](#) en [1981](#). Cet algorithme cherche à optimiser l'alignement de deux séquences biologiques, elles sont traitées comme des caractères. Le pourcentage de

similitude est appelé score, cependant plus le score est élevé et plus la correspondance est correcte. Cette méthode compare la séquence entière sur toute sa longueur, de la 1re paire de bases jusqu'à la dernière, le résultat est garanti mais cette méthode reste trop lente, en fait, la comparaison d'une seule séquence contre tout UNIPROT peut prendre jusqu'a 5 jours tandis qu'avec le BLAST, la même opération ne prend que 20 secondes.

On peut expliquer cette grande différence de temps de comparaison par un principe très ingénieux que l'algorithme de BLAST a adopté. C'est une méthode de recherche [heuristique](#). Les régions similaires entre deux ou plusieurs [séquences](#) de [nucléotides](#) ou d'[acides aminés](#) sont établies, mais contrairement à la méthode Smith-Waterman, BLAST ne compare pas la séquence sur toute sa longueur, il choisit deux régions courtes de longueur K séparées par une distance D, le score dépendra de ces trois paramètres (Figure 19). La probabilité que deux séquences aient ces critères en commun et ne soient pas homologues est très infimes, d'ailleurs le score calculé par les deux algorithmes reste le même ([Dardel](#) et [Képès](#), 2000).

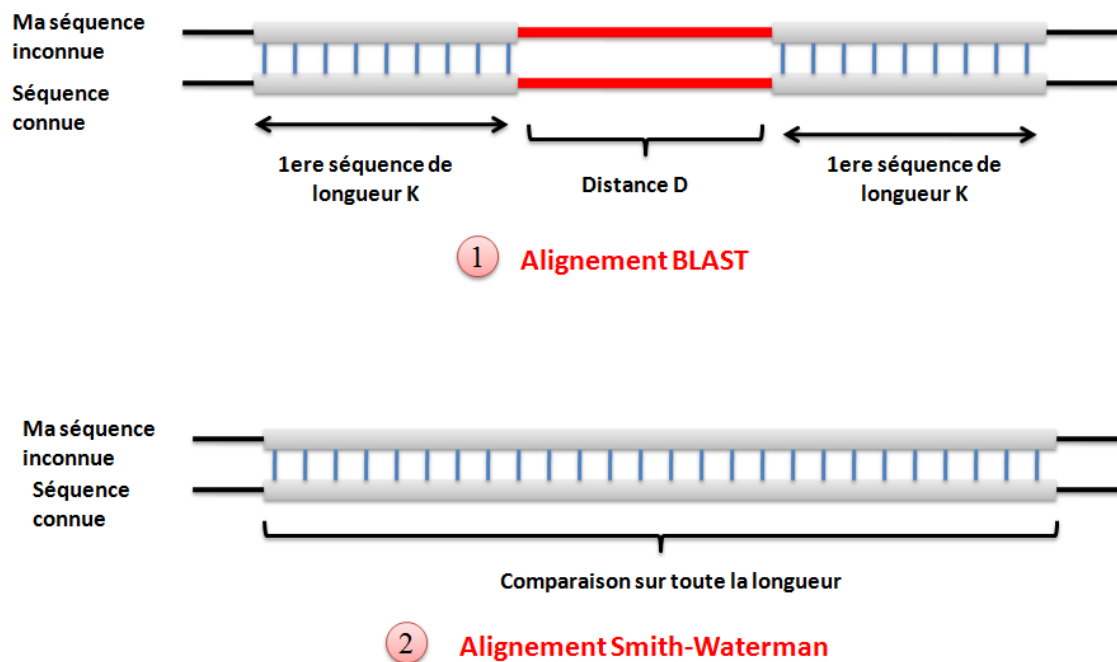


Figure 19: Comparaison entre les algorithmes d'alignements BLAST et Smith-Whaterman (Original, 2020)

La méthode BLAST peut comparer une séquence inconnue à toutes les séquences UNIPROT avec un résultat qui atteint les 500 homologues, si cette inconnue a déjà été étudiée auparavant, c'est impossible de passer à côté de l'espèce correspondante. La Figure 20 explique la lecture d'un résultat sur BLAST.

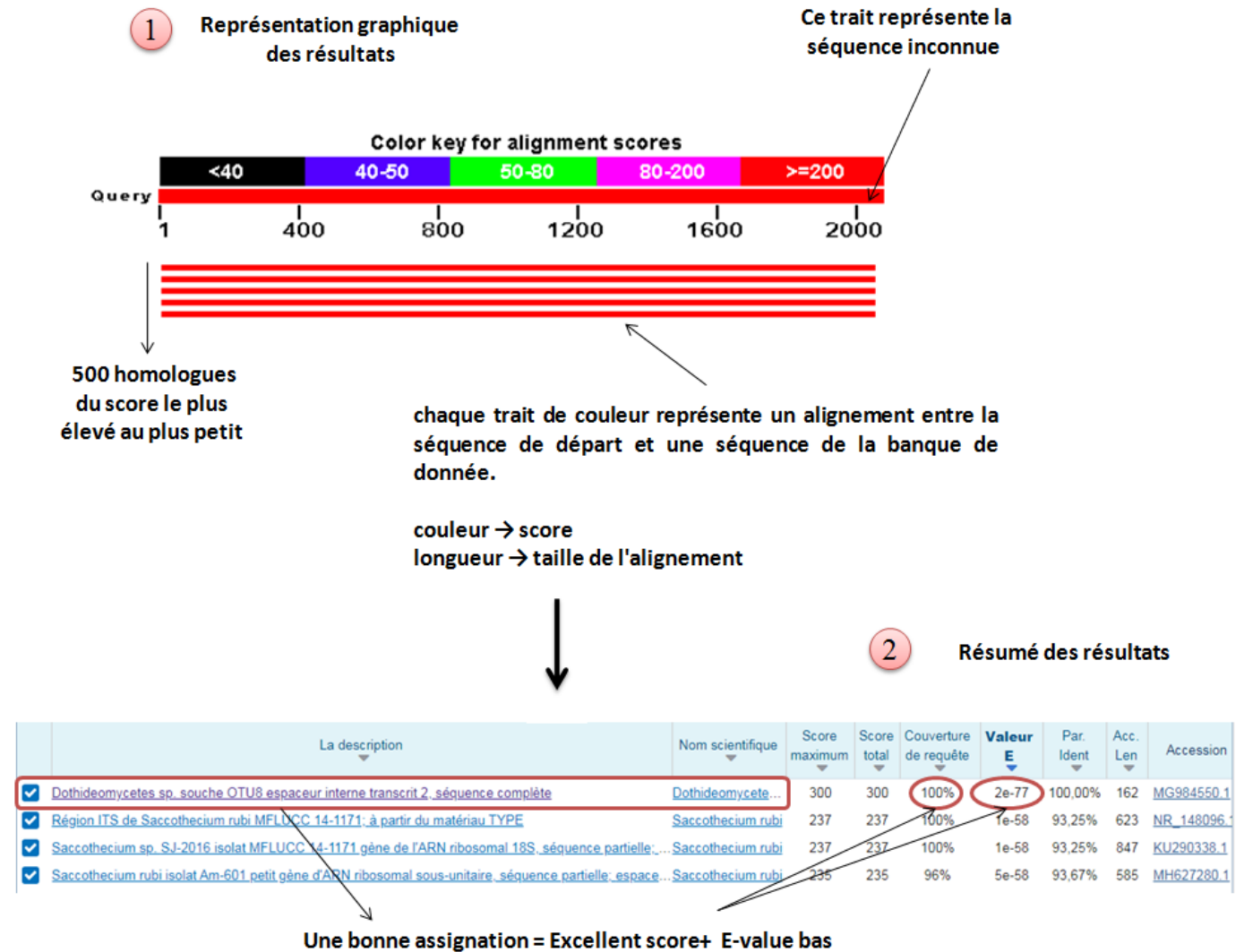


Figure 20: Exemple de lecture d'un résultat BLAST (Original, 2020)

Lors de la lecture d'un résultat sur BLAST, deux paramètres sont immédiatement pris en compte, le premier est le score, qui indique le degré de similitude, plus il est élevé et plus la

séquence inconnue ressemble à la séquence obtenue. Le deuxième paramètre, c'est le paramètre le plus informatif, il s'agit de la "e-value", elle nous informe quant au risque si nous considérons la similarité comme significative. La "e-value" est liée au concept de risque de faux positifs : le risque de considérer comme significatif un résultat qui ne l'est pas, plus la "e-value" est faible, plus l'alignement est significatif. Cependant, la décision finale repose aussi sur une inspection visuelle du résultat par l'expérimentateur.

Il arrive parfois que le BLAST ne donne aucun résultat, cela veut dire que parmi toutes les séquences existantes, aucune ne correspond à la séquence inconnue, en d'autres termes, cet organisme est complètement inconnu des bases de données, il est primordial dans ce cas, de les introduire dans les bases de données comme étant une nouveauté, le plus souvent sur la base internationale GENBANK. La plupart des revues exigent que les séquences d'ADN et d'acides aminés cités dans les articles soient soumises à un référentiel de séquences publiques (DDBJ/ENA/Genbank-INSDC) dans le cadre du processus de publication. Un numéro d'accession est donc attribué à chacune des séquences soumises ([Dardel](#) et [Képès](#), 2000).

---

***Chapitre II***  
***Etude du milieu***

---

## II.1. Présentation de la zone d'étude

Pour aborder la composition de la phyllosphère, et étudier les interactions environnementales et stationnelles qui peuvent moduler la dynamique des communautés fongiques et bactériennes de cette sphère, il est primordial d'étudier le milieu de vie de ces espèces, avec toutes ses composantes biotiques et abiotiques.

Pour ce faire, nous avons choisi des stations avec différentes conditions climatiques, nous avons, en effet, échantillonné sur six différents sites répartis sur trois wilayas : Médéa avec quatre stations (Ouamri, Harbil, Berroughia 1 et Berrouaghia 2), Djelfa (Ain Oussera) et M'sila (El hamel) (Figure 21).

Trois sites d'échantillonnage ont donc, été sélectionnés pour chacune des deux espèces, ces sites sont définis par des conditions climatiques différentes (2 sites dans l'aride et quatre autres dans le subhumide). La figure 22 montre des images satellites, elles proviennent de Google Earth (2016), ces images représentent les sites d'échantillonnage, on peut voir la répartition éloignée des pieds de pistachier de l'Atlas et les arbustes de pistachier lentisque, on reconnaît aussi le changement du paysage selon l'aridité du site.

Dans ce chapitre nous allons présenter ces sites d'études un par un ainsi qu'une étude et une synthèse bioclimatique de ces derniers.

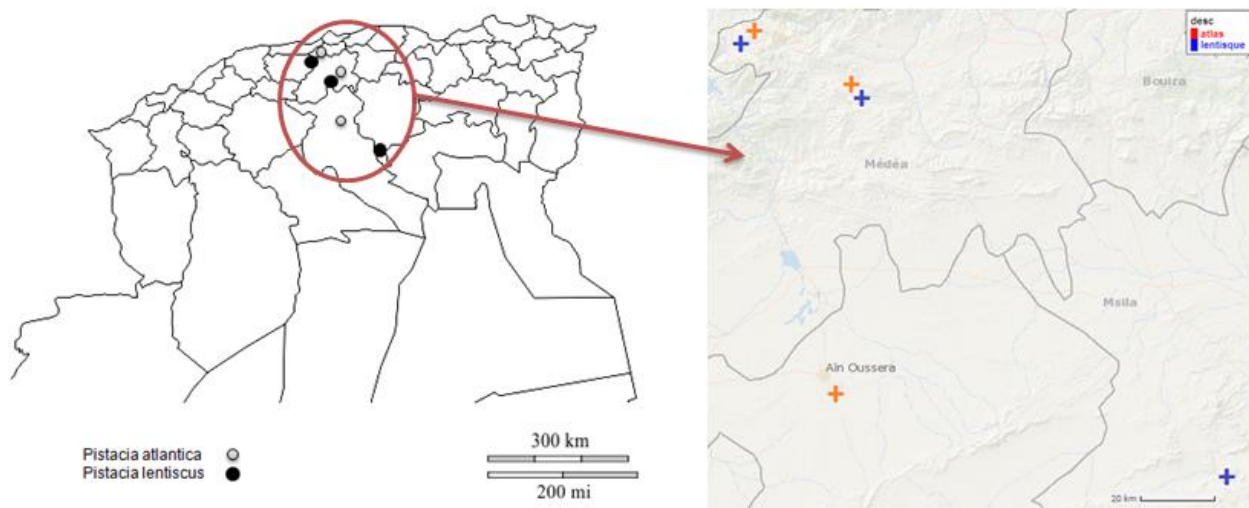


Figure 21: Localisation des sites d'échantillonnage  
(GPS visualizer : [file:///C:/Users/AMAZON/Downloads/carte\\_des\\_sites\\_avec\\_legende.html](file:///C:/Users/AMAZON/Downloads/carte_des_sites_avec_legende.html))





Figure 22: Images satellites des 6 stations d'échantillonnage

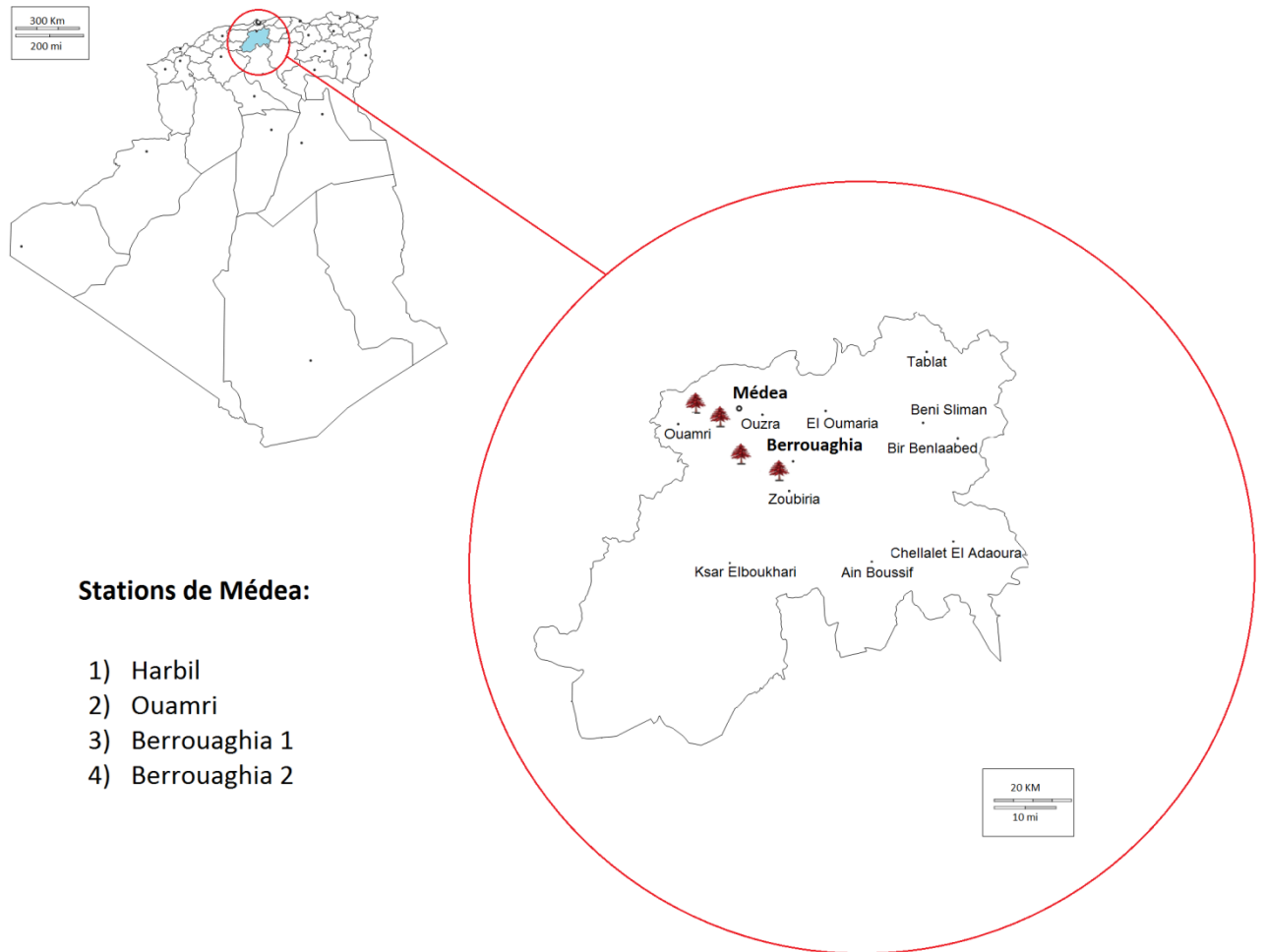
### II.1.1. Présentation de la wilaya de Médéa

La wilaya de Médéa est située à 40 km au sud de Blida, à 88 km au sud de la capitale Alger, avec 981m d'altitude en moyenne, et une superficie de 8716 km<sup>2</sup>. Les coordonnées géographiques de Wilaya de Medea sont : Latitude 36.08333 et Longitude 3. C'est une ville de montagne de l'Atlas tellien, située dans une dépression entre le massif de l'Ouarsenis au Sud et de l'Atlas blidéen au Nord

La région de Médéa est régie par un climat méditerranéen caractérisé par l'alternance d'une saison sèche avec une saison froide, humide et pluvieuse. Les pluies sont importantes en automne et en hiver.

Médéa dispose d'une superficie forestière estimée à 161320 hectares, comprenant principalement le pin d'Alep, le chêne-liège et le chêne vert. En plus de cette richesse en arbres forestiers, on retrouve également différentes variétés de plantes et d'arbustes aux vertus médicinales. Parmi ces plantes, nous citons le Romarin, le Frêne, la Bruyère et l'Eucalyptus (D.G.F., 2015).

Quatre sur six de nos stations d'échantillonnage se situent dans cette wilaya (Figure 23), à savoir Harbil, Ouamri, Berrouaghia1, Berrouaghia2, il est donc important de décrire chacune des stations.



**Stations de Médéa:**

- 1) Harbil
- 2) Ouamri
- 3) Berrouaghia 1
- 4) Berrouaghia 2

Figure 23: Situation des sites d'échantillonnage de la wilaya de Médéa

**II.1.1.1. Station de Harbil**

La station de Harbil est une petite localité de 60 km<sup>2</sup> qui se trouve à 11,2 km du chef-lieu de Médéa, elle est à 292m d'altitude. La commune est située dans le tell central algérien dans l'Atlas tellien dans l'Atlas blidéen à environ 90 km au sud-ouest d'Alger.

Nous avons réalisé l'échantillonnage du **pistachier lentisque** sur un terrain en pente aux abords de la nationale 18.

### **II.1.1.2. Station de Ouamri**

Toujours sur la N18, vers Hanacha, se trouve notre deuxième station de Médéa à 412m d'altitude, l'échantillonnage a été réalisé sur une petite colline à 6,5km de la station de Harbil, sur de petits peuplements de **pistachier de l'Atlas**.

La localité de Ouamri est une petite commune, pas très lointaine de Oued Harbil, elle est située sur les monts de Dahra. Elle se tient entre Médéa et Khemis Meliana, 24 km vers l'ouest et à environ une centaine de km d'Alger et d'environ 30 km au nord-ouest de Berrouaghia.

Ouamri est à environ 740m d'altitude. C'est une région agricole avec d'abondantes sources d'eau naturelle. Sa surface agricole totale est de 17 450 hectares dont 12 392 ha utiles.

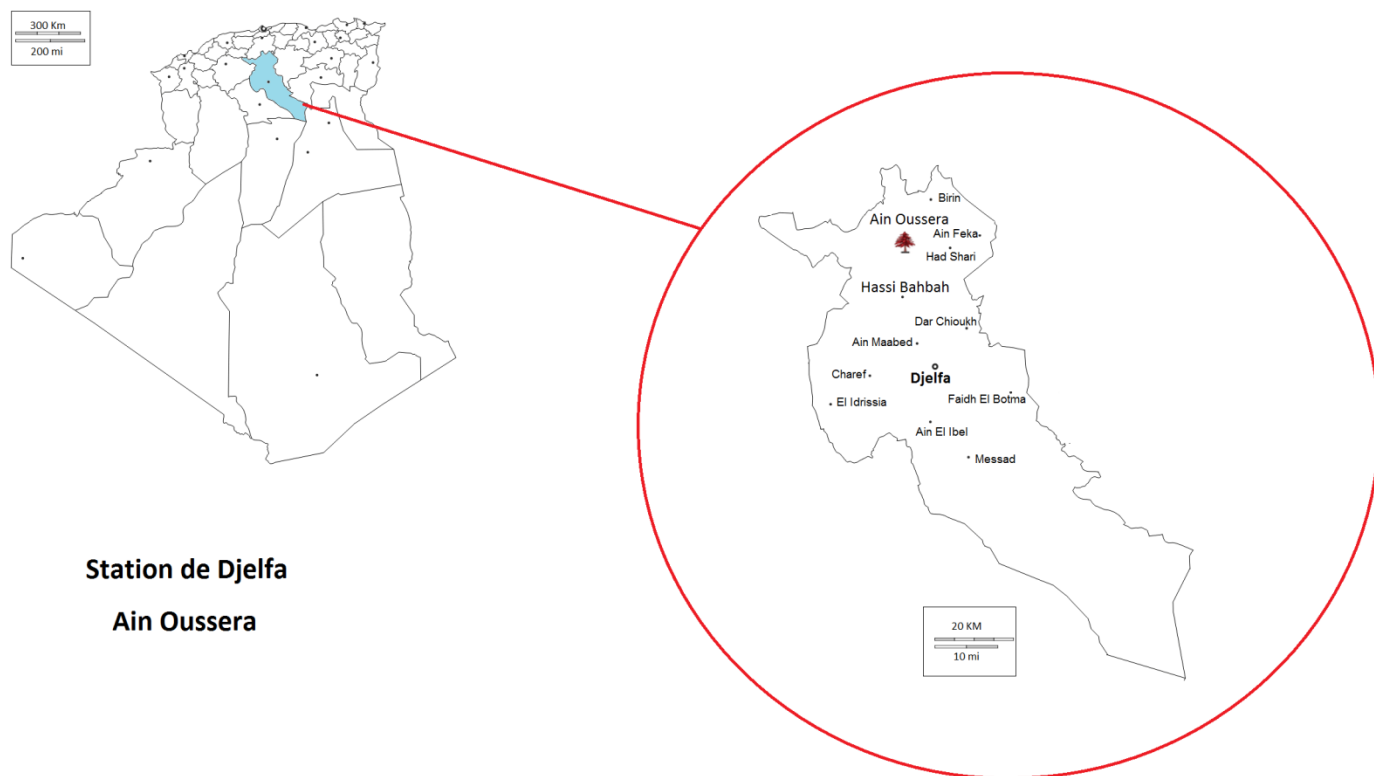
### **II.1.1.3. Stations de Berrouaghia 1 et 2**

Deux de nos sites se trouvent à Berrouaghia, nous les avons nommé 1 et 2 pour les différencier. Le premier site, Berrouaghia 1, se trouve à l'entrée nord de Berrouaghia par la N18 à 869 m d'altitude, sur un champ plat à proximité de la route se trouve plusieurs individus de ***P. atlantica***. Le deuxième site, nommé Berrouaghia 2, se trouve à 15,4km du premier site, il concerne l'échantillonnage de ***P. lentiscus***, il se trouve à la sortie de Berrouaghia aux abords de la nationale N1 à 897m d'altitude.

Berrouaghia est une commune de la wilaya de Médéa, elle est située dans la région du Tell au nord-ouest de la Wilaya de Médéa, à environ 90 km au sud-ouest d'Alger et à 18 km au sud-est de Médéa, elle est à 939m d'altitude, c'est une ville de montagne de l'Atlas tellien, située dans une dépression entre l'Atlas blidéen au nord et le massif d'Ouarsenis au sud qui forme, dans l'extrême sud-est de la commune, les monts de Bibans.

### **II.1.2. Présentation de la wilaya de Djelfa**

Djelfa est située dans les hauts plateaux, dans la partie centrale de l'Algérie du Nord à égale distance de ses frontières Est et Ouest. Elle est située à 300 km au sud d'Alger, à 110 km au Nord de Laghouat et 80 km au Sud-ouest de Boussaâda. Elle est comprise entre 2° et 5° de longitude Est et entre 33° et 35° de latitude Nord. La région de Djelfa occupe, à 1200 mètres d'altitude, une large dépression dans les monts des Ouled Naïl. Elle se caractérise par des reliefs relativement élevés. Notre station d'échantillonnage se trouve dans la commune de Ain Oussera (Figure 24).



**Station de Djelfa**  
**Ain Oussera**

Figure 24: Localisation du site de la wilaya de Djelfa

### II.1.2.1. Stations de Ain Oussera:

Notre site d'échantillonnage concerne le **pistachier de l'Atlas**, il se trouve plus précisément dans la plaine de Boucedraia située à 10 km au sud de Ain- Ouassara, sur un terrain plat, à 725m d'altitude. La population de pistachier de l'Atlas est limitée à l'est par la route nationale N°1, l'oued Boucedraia la contourne à l'ouest, au sud par Hassi El Oussif, et au nord par Aïn-Ouessara.

### II.1.3. Présentation de la wilaya de M'sila :

M'sila une wilaya qui se situe dans la partie centrale de l'Algérie du Nord, elle fait partie de la région des "Hauts Plateaux Centre", avec Djelfa et Laghouat. Elle se trouve entre les deux grandes chaînes de montagne, que sont l'Atlas tellien et l'Atlas saharien, les Coordonnées géographiques de M'Sila, Latitude: 35.7019, Longitude: 4.54697. C'est une wilaya

principalement agropastorale, les principales agglomérations sont M'sila, Boussaâda, Sidi aïssa et Ain Elmaleh, elle compte un domaine forestier d'une superficie de 139 734 ha, à laquelle s'ajoute une importante nappe alfatière évaluée à plus de 200000 ha. Localisé essentiellement sur les massifs montagneux du Sud/Est (Monts des Ouled Naïl) et aussi sur les Monts du Hodna, le couvert forestier est constitué principalement de pin d'Alep, espèce la plus dominante. Les espèces secondaires sont le genévrier de phoenicie, le genévrier oxycèdre et le chêne vert (P.A.W., 2009). Notre dernière station d'échantillonnage concerne le pistachier **lentisque**, elle se trouve à El Hamel sur le sud ouest de la wilaya de M'sila à 757m d'altitude (Figure 25).

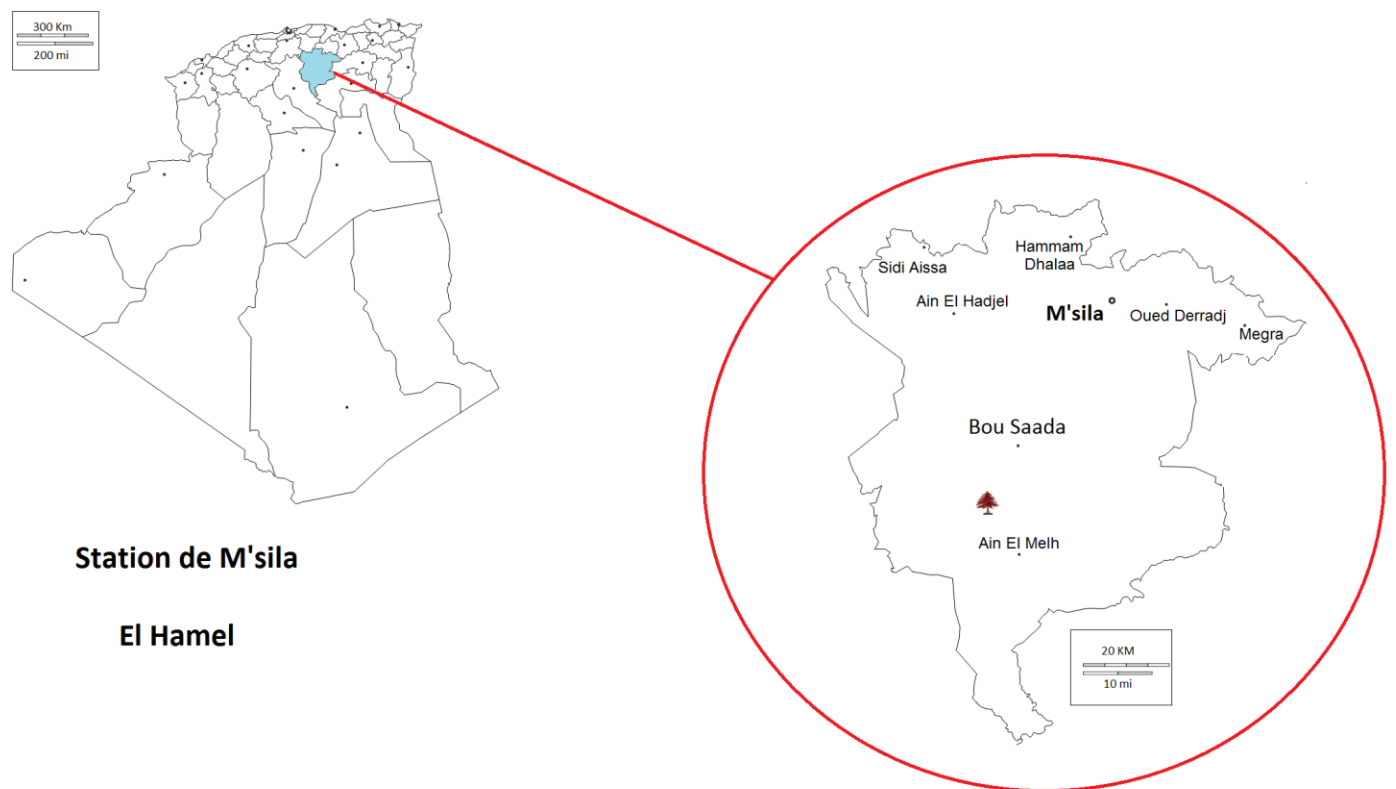


Figure 25:Présentation du site de la wilaya de M'sila

### I.1.3.1. Présentation du site d'El Hamel

El Hamel est une petite ville du nord de l'Algérie. Elle se situe à quelque 10 km au sud-ouest de Boussaâda, sur la route nationale 89 reliant celle-ci à Ain El Maleh, dans la Wilaya de M'sila. Notre site se trouve à proximité de la nationale 46 en venant de Boussaâda, sur un terrain en pente.

## **II.2. Synthèse climatique**

Notre recherche sur la phyllosphère se base sur une comparaison de ses microorganismes, en partie, par rapport à leurs habitats, il est donc important de faire une étude bioclimatique des différents sites d'échantillonnage. Nous allons d'abord présenter une vue d'ensemble, en étudiant les étages bioclimatiques de chaque site, en se basant sur les données climatiques des périodes entre 1992 et 2015 pour les sites de Médéa et de Djelfa et entre 2004 et 2013 pour le site de M'sila. Les données (température et pluviométrie) nous ont été fournies par l'ONM (office nationale métrologique) de chacune des 3 wilayas concernées.

En deuxième lieu, une étude climatique de l'année de l'échantillonnage, en l'occurrence l'année 2014, sera présentée, car les microorganismes, comme nous allons le prouver par la suite, sont très sensibles aux variations à l'échelle annuelle voire même saisonnière.

### **II.2.1. Paramètres climatiques des sites d'étude**

Pour caractériser le type climatique des différents sites, nous avons d'abord effectué des corrections sur les données brutes fournies par l'ONM, elles se font par rapport à un gradient altitudinal.

Seltzer (1946), dans son étude sur le climat d'Algérie, préconise les gradients suivants : 0,7°C de diminution pour tous les 100 m de dénivellation pour les maxima (M), et 0,45°C pour tous les 100 m pour les minima (m), pour les températures. Concernant la pluviométrie, plusieurs auteurs, comme Seltzer (1946), Le Houérou, (1974) ont noté l'existence d'une relation linéaire entre les précipitations et l'altitude.

Plus l'altitude est élevée, plus les précipitations augmentent. Ainsi, Seltzer (1946) propose une augmentation de 50mm pour 100m de dénivelée.

Dans le tableau 2 sont notées, les différentes corrections effectuées pour les 6 stations à partir des différences altitudinales entre nos stations et les stations de l'ONM ; on note que l'altitude de ces dernières est de 1030m pour Médéa, 1178m pour Djelfa et 459m pour M'sila.

Tableau 2: Corrections climatiques mensuelles pour l'ensemble des stations avec (P) pour pluviométrie, avec (M) représentant la moyenne des maxima des températures du mois le plus chaud, (m) la moyenne des minima des températures du mois le plus froid

STATION		J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
<b>Medea (ONM)</b>	P	103	91,3	69,5	71	57	9,7	3,7	8	37	53	96	93	Total 693
	M	9,3	9,8	13,5	16	21	27	32	<b>32</b>	26	21	14	10	
	M	<b>4</b>	4,1	6,6	8,6	13	18	21	21	17	13	8	5	
<b>Ouamri</b>	P	71,5	63,4	48,3	49	39	6,7	2,6	6	26	37	67	65	Total 481
	M	13,6	14,1	17,8	21	26	32	36	<b>36</b>	30	25	18	15	
	M	<b>7,34</b>	7,44	9,94	12	16	21	25	25	20	17	11	9	
<b>Berrouaghia 1</b>	P	92,2	81,8	62,3	63	51	8,7	3,3	7	33	48	86	84	Total 621
	M	10,4	10,9	14,6	17	23	28	33	<b>33</b>	27	22	15	11	
	M	<b>4,72</b>	4,82	7,32	9,3	14	18	22	22	17	14	9	6	
<b>Harbil</b>	P	78,5	69,7	53,1	54	43	7,4	2,8	6	28	41	74	71	Total 529
	M	12,4	12,9	16,6	19	24	30	<b>35</b>	35	29	24	17	13	
	M	<b>5,97</b>	6,07	8,57	11	15	20	23	23	19	15	10	7	
<b>Berrouaghia 2</b>	P	94,4	83,8	63,8	65	52	8,9	3,4	8	34	49	88	86	Total 636
	M	10,2	10,7	14,4	17	22	28	<b>33</b>	32	27	22	15	11	
	M	<b>7,94</b>	8,04	10,5	13	17	22	25	25	21	17	12	9	
<b>Djelfa (ONM)</b>	P	28,8	34	26	30,1	29	16	9,6	23	34	27,6	25	26,2	Total 308
	M	10	10	15	17,3	24	30	34	<b>34</b>	27	21,3	14	10,8	
	M	<b>0,2</b>	1,8	3	6,1	11	16	19	19	14	9,8	5	1,7	
<b>Ain Oussera</b>	P	16,6	19	15	17,3	16	9,2	5,5	13	20	15,86	14	15,1	Total 177
	M	13,2	13	18	20,49	27	33	37	<b>37</b>	30	24,49	18	14	
	M	<b>2,25</b>	3,8	5	8,148	13	18	21	21	16	11,85	7	3,75	
<b>M'sila (ONM)</b>	P	9,2	15	15	28,52	23	8,1	6,4	6	31	22,96	15	10,2	Total 191
	M	14,9	16	21	24,54	30	35	<b>40</b>	39	33	27,25	19	15,1	
	M	<b>3,96</b>	4,7	7	11,71	17	20	25	21	16	15	9	5,01	
<b>El Hamel</b>	P	16,4	27	27	50,71	41	14	11	11	55	40,82	27	18,1	Total 340
	M	12,9	14	19	22,46	28	33	<b>38</b>	37	30	25,17	17	13,1	
	M	<b>2,62</b>	3,4	6	10,37	15	19	23	19	14	13,66	7	3,67	

## II.2.2. Indices climatiques étudiés

Ayant pour objectif de séparer nos stations d'étude selon leurs différentes variations climatiques nous avons commencé par définir leurs zones climatiques respectives, pour cela, nous avons calculé deux indices climatiques :

- le premier est le quotient pluviothermique ( $Q_3$ ) avec la nouvelle formule de Stewart (1969), une formule simplifiée du quotient d'Emberger qui sert à définir les cinq différents types de climats méditerranéens, depuis le plus aride, jusqu'à celui de haute montagne ;
- Quant au deuxième indice climatique, il s'agit de l'indice d'aridité de De Martonne (I), c'est un indicateur utile pour caractériser le phénomène d'aridité. Ces valeurs nous ont permis de classer nos sites d'échantillonnage selon les différents étages bioclimatiques.

A ces deux indices, l'étude du diagramme ombro-thermique de Bagnouls et Gaussen est ajoutée.

Chaque site a été géo-référencé et les coordonnées GPS ont été tiré de Google map. L'altitude quant à elle, a été tirée de free map tool (recherche d'élévation). Toutes ces informations sont renseignées sur le tableau 3.

De même, l'habitat qui représente l'espèce qui cohabite le plus avec notre espèce modèle, cas du jujubier sauvage (*Ziziphus lotus*) pour le pistachier de l'Atlas, et l'olivier sauvage, l'oléastre (*Olea europaea* ssp. *sylvestris*) pour le lentisque.

Concernant l'altitude, on peut observer 3 zones dans le même gradient altitudinal, la première regroupe les stations d'Ouamri et Harbil avec 412m et 592m d'altitude, la deuxième zone concerne les deux stations de Berrouaghia 1 et 2 avec respectivement 869m et 897m, enfin la troisième zone qui regroupe la station d'Ain Oussera à 723m et la station d'El Hamel à 757m (Tableau 3).



Tableau 3: Caractéristiques climatiques des sites d'échantillonnage

Espèce	Site	Coordonnées géographiques	Habitat	P (mm)	Altitude (m)	Q <sub>3</sub>	I
	Ouamri (Médéa)	36.239839 2.675606	<i>Ziziphus lotus</i>	481	800	57,56	16,44
<b>Pistachier de l'Atlas</b>	Berrouaghia 1 (Médéa)	36.150544 2.938524	<i>Ziziphus lotus</i>	621	970	75,31	20,03
	Ain oussera (Djelfa)	35.360076 2.950004	<i>Ziziphus lotus</i>	177	700	17,43	6,58
<b>Lentisque</b>	Harbil (Médéa)	36.225656 2.651917	<i>Olea europaea</i>	529	790	62,50	19
	Berrouaghia 2 (Médéa)	36.300604 2.784959	<i>Olea europaea</i>	636	550	87,25	22,9
	Elhamel (Msila)	35.166639 4.114610	<i>Olea europaea</i>	340	762	32,96	12,19

### II.2.2.1. Indice d'aridité de De Martonne

En se basant sur des considérations essentiellement géographiques, De Martonne (1929) définit l'indice d'aridité (**I**) en se basant sur la combinaison de régime thermique et hygrométrique selon la formule suivante :

$$I = P / T + 10$$

**P** : Précipitation moyenne annuelle en (mm);

**T** : Température moyenne annuelle en (°C).

Selon De Martonne, le type de climat est défini par la valeur de l'indice (I), le tableau 4 représente ces différents types climatiques des différents sites d'échantillonnage.

Tableau 4 :Types de climat selon De Martonne (1929) des stations d'étude

Station	Pluviométrie (P) (mm)	Température moyenne annuelle (°C)	Indice de De Martonne	Climat*
Médéa (ONM)	693	15,48	27,20	Sub-humide
Ouamri	481	19,29	16,44	Semi-aride
Harbil	529	17,98	19	Semi-aride
Berrouaghia 1	621	16,48	20,03	Sub-humide
Berrouaghia 2	636	17,89	22,09	Sub-humide
Djelfa (ONM)	307,7	14,67	12,47	Semi-aride
Ain Oussera	177	17,28	6,58	Aride
M'sila (ONM)	191,45	19,6	6,48	Aride
El Hamel	340	17,98	12,19	Semi-aride

\* : $5 < I < 10$ , Aride;  $10 < I < 20$ , Semi-aride;  $20 < I < 30$  Sub-humide.

### II.2.2.2. Quotient pluviométrique d'Emberger ( $Q_2$ )

Pour caractériser le type climatique des différents sites, le quotient pluviométrique ( $Q_2$ ) introduit par Emberger (1955) est calculé selon la formule  $Q_2 = 2000P/M^2 - m^2$ , avec (M) représentant la moyenne des maxima des températures du mois le plus chaud, (m) la moyenne des minima des températures du mois le plus froid et (P) la quantité annuelle moyenne de précipitations.

Pour l'Algérie et le Maroc, on préfère la formule simplifiée de Stewart (1969) définie comme suit :  $Q_3 = 3, P/M - m$

3,43: Constante relative à la région : Algérie-Maroc ;

P : Précipitations totales annuelles en mm;

M : Moyenne des maxima du mois le plus chaud en  $^{\circ}C$  ;

m: Moyenne des minima du mois le plus froid en  $^{\circ}C$ .

Nous avons calculé ce quotient avec les variables climatiques, la température et les précipitations, avec la formule de Stewart. La figure 26, illustre ces étages bioclimatiques.

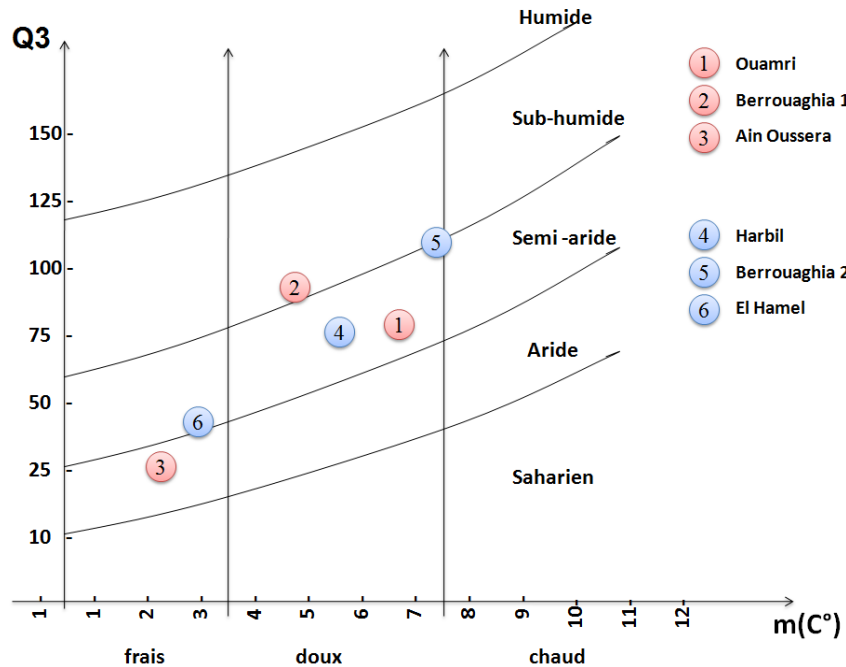


Figure 26 : Climatogramme d'Emberger pour les stations (Original, 2021)

Tableau 5 : Types de climat selon Emberger des stations d'étude

Station	m (°C)	Q <sub>3</sub>	Etage Climatique
Médéa (ONM)	4	85,81	Sub-humide à hiver doux
Ouamri	7,35	57,56	Semi-aride à hiver doux
Harbil	5,97	62,50	Semi-aride à hiver doux
Berrouaghia 1	4,72	75,31	Sub-humide à hiver doux
Berrouaghia 2	7,94	87,25	Sub-humide à hiver doux
Djelfa (ONM)	0,2	31,04	Semi-aride à hiver frais
Ain Oussera	2,25	17,34	Aride à hiver frais
M'sila (ONM)	3,96	17,99	Saharien à hiver doux
El Hamel	2,62	32,96	Semi-aride à hiver frais

### II.2.3.. Diagramme ombro-thermique de Bagnouls et Gaussen

Selon Bagnouls et Gaussen (1957), un mois sec est, biologiquement, défini comme un mois où le total mensuel des précipitations (P), exprimées en mm, est égal ou inférieur au double de la température moyenne mensuelle (T°C). Pour déterminer la suite successive des mois secs,

ces auteurs ont proposé l'établissement du diagramme Ombro-thermique. Ce diagramme fait apparaître deux périodes bien délimitées: une période sèche et une période humide.

La figure 27 représente les diagrammes ombro-thermiques des six stations. On remarque que la période de sécheresse s'étend de la moitié du mois d'avril jusqu'à la mi- septembre pour les deux stations de Harbil et Ouamri ; pour les deux stations de Berrouaghia 1 et 2, elle s'étend de mai à octobre. La station d'Ain Oussera affiche la période sèche la plus longue, de février jusqu'à décembre. Et enfin la station d'El Hamel a une période sèche de mai à septembre.

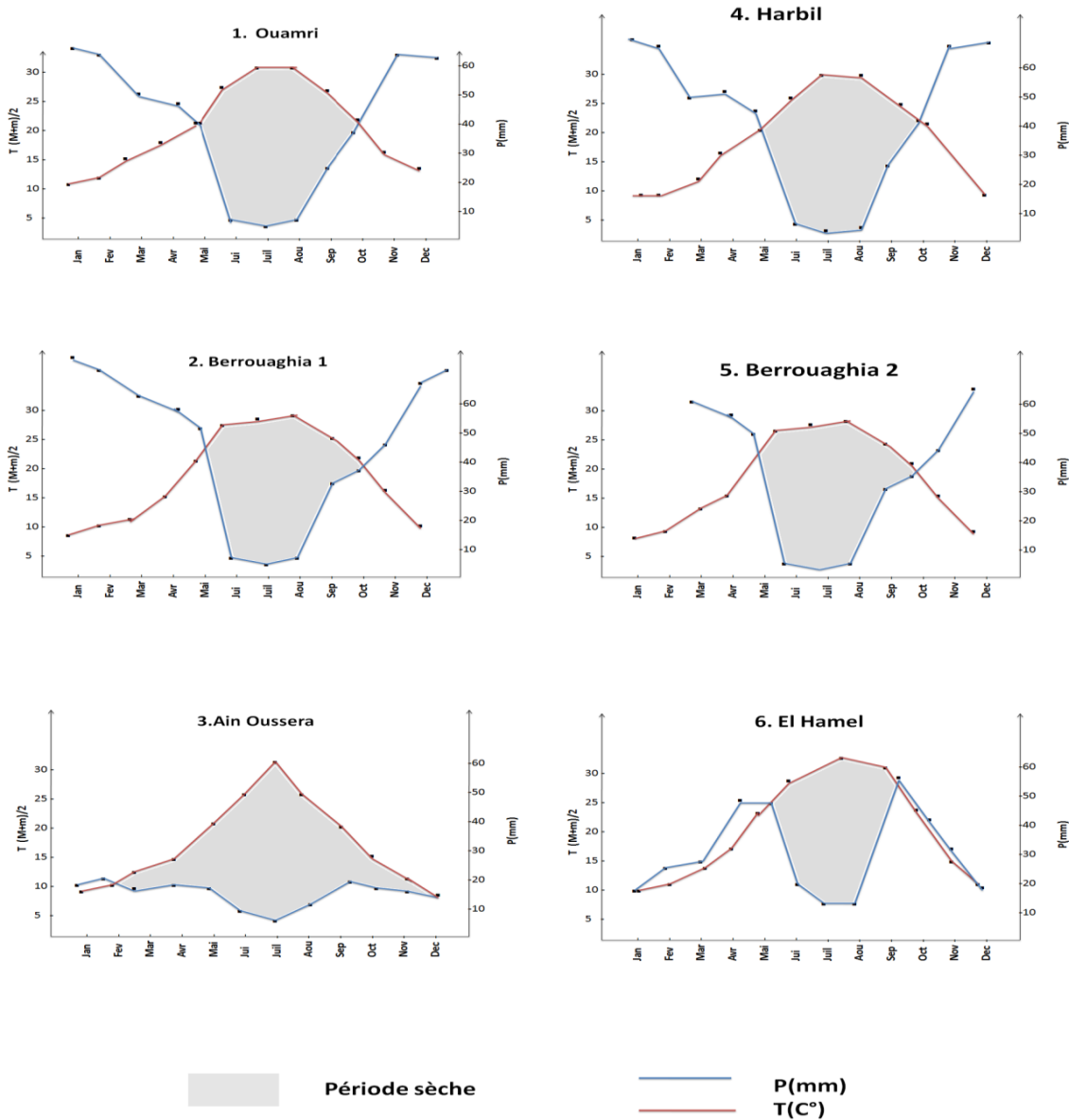


Figure 27: Diagramme Ombro-thermique de Bagnouls et Gausson des six stations d'étude

## II.2.4.Pluviométrie et régime saisonnier

Le régime saisonnier est en relation étroite avec la pluviométrie, en effet, on le détermine avec le pourcentage des précipitations de chaque saison (H pour Hiver, P pour Printemps, E pour Eté et A pour Automne). Dans le tableau 6, on a illustré les régimes saisonniers de nos stations d'échantillonnage ainsi que les stations de références de l'ONM.

Toutes nos stations présentent un régime saisonnier de type HAPE excepté la station d'El Hamel qui reçoit plus de précipitations au printemps qu'en hiver, de ce fait, elle présente un régime saisonnier PAEH.

Tableau 6: Régimes saisonniers des différentes stations étudiées

Précipitations saisonnières (%)	Hiver	Printemps	Eté	Automne	Régime saisonnier
Médéa	41.5	28,41%	15,69%	26,96%	HPAE
Ouamri	38,04%	19,66%	7,18%	35,09%	HAPE
Harbil	38,08%	19,75%	6,96%	35,19%	HAPE
Berrouaghia1	38,09%	19,78%	6,98%	35,14%	HAPE
Berrouaghia 2	38,03%	19,78%	7,13%	35,04%	HAPE
Djelfa	28,76%	27,42%	15,69%	28,11%	HAPE
Ain Oussera	28,65%	24,07%	21,80%	25,46%	HAPE
M'sila	17,97%	35,10%	10,86%	36,06%	APHE
El Hamel	20,76%	31,18%	22,71%	25,34%	PAEH

## II.2.5.Données climatiques pour l'année de l'échantillonnage :

L'échantillonnage a été réalisé durant l'année 2014, à la même période pour toutes les stations afin d'éviter toute fluctuation importante ou changement de saisons qui risquerait d'interférer avec nos résultats. La sensibilité des microorganismes aux variations climatiques est très grande, cependant, il est très important de séparer nos différents sites selon les variables climatiques de l'année de la collecte des échantillons. Pour cela, des données climatiques ont été obtenues à partir des données brutes de Worldclim (<http://www.worldclim.org/>) (Hijmans et al., 2005). Les données brutes ont été téléchargées à partir du carré numéro 16, cette partie du globe concerne l'Algérie, ces données concordaient exactement avec ceux de l'ONM. Par la suite, une Analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée avec 19 variables climatiques "bio"\* (Figure 28) grâce au logiciel R.

Evidemment, nous avons voulu savoir quels sont les facteurs principaux responsables de cette démarcation, nous avons alors calculé l'indice d'aridité de De Martonne et performé une deuxième ACP (Figure 29), cette dernière fait ressortir deux facteurs, l'indice d'aridité I et l'écart des températures avec un impact de 7,4% et 28%, respectivement.

### **II.2.6. Conclusion**

On peut mentionner clairement que cette ACP (Figure 29), sépare nos 6 stations en 3 zones, comme le gradient altitudinal, et l'étude climatique précédente, notamment par les deux indices, le  $Q_3$  d'Emberger et l'indice d'aridité « I » de De Martonne dans les tableaux 5 et 6, respectivement. Les deux stations de Harbil et Ouamri sont toutes les deux dans l'étage bioclimatique semi-aride, leurs élévations sont avoisinantes, les deux autres stations de Berrouaghia 1 et 2 sont toutes les deux dans un climat sub-humide avec des élévations similaires, enfin la station d'Ain Oussera se situe dans un climat aride tandis que celle d'El Hamel est juste à la limite, entre l'aride inférieur et le semi-aride (Figure 26 ).

Grâce à cette synthèse climatique, on distingue clairement 3 groupes ou zones climatiques, à l'intérieur de chacune d'elles 2 sites, un pour le pistachier de l'Atlas et un autre pour le pistachier lentisque.

---

# *Chapitre III*

## *Matériel & méthodes*

---

Dans ce travail de recherche, nous avons abordé la composition de la phyllosphère de nos deux espèces de pistachier étudiées (le lentisque et le pistachier de l'Atlas), dans deux parties bien distinctes :

- la première partie consiste en une étude microbiologique des champignons et des bactéries phyllosphériques par la mise en culture de ces microorganismes et leur organisation en ensembles statistiques, elle sera nommée **partie microbiologique** ;

- la deuxième partie est une **étude génomique** suivie d'un traitement bioinformatique puis statistique des communautés fongiques seulement, car nécessitant des techniques de séquençage haut débit, ce volet a été réalisé à l'étranger, nous avons eu la chance d'avoir un financement de l'université de Djelfa, et devant un choix d'ordre financier, il nous paraissait évident de faire l'identification fongique car elle est très difficile à mettre au point par les méthodes microbiologiques. Cette partie s'est déroulée en un 1 mois et demi dans l'équipe de génétique et écologie de l'UMR (BIOGECO) sur le site de l'INRA Pierroton (Bordeaux, France).

Donc on commencera ce chapitre par la méthode d'échantillonnage qui est la même pour les deux parties, ensuite nous aborderons la méthodologie de chaque partie séparément.

### **III.1.Echantillonnage**

Avant de faire nos sorties d'échantillonnage sur le terrain, il était primordial de penser au meilleur moyen pour transporter le matériel récolté (des feuilles), on a d'abord pensé à les envelopper dans du papier avant de les mettre dans une glacière, mais on risquait des contaminations, ces dernières pouvaient fausser les résultats, nous nous sommes fait livrer alors, des sachets de silicagel préparés et envoyés par la poste par l'UMR de BIOGECO, il y avait assez pour les deux parties, microbiologique (pour la mise en culture des bactéries et des champignons) et génomique (pour la partie fongique), ces sacs en plastique stériles contenaient suffisamment de gel de silice (10ml) pour un séchage rapide et une excellente conservation des échantillons.

Les échantillons destinés à l'étude microbiologique ont été traités dans la semaine, tandis que les sachets de silicagel de la partie génomique furent envoyés au laboratoire le 05/01/2015 via l'agence UPS et conservés jusqu'au traitement.

De septembre à octobre 2014, nous avons échantillonné sur six différents sites répartis sur trois wilayas: Médéa (Ouamri, Harbil, Berroughia1 et Berrouaghia 2), Djelfa (Ain Oussera) et M'sila (Elhamel), en effet, trois sites d'échantillonnage ont été sélectionnés pour chacune des deux espèces, ces sites, comme démontré dans le chapitre précédent (ref., Chap. II), sont définis par des conditions climatiques différentes.

Cependant, pour chacune des deux parties, neuf (9) arbres par station ont été échantillonnés. Sur chaque arbre 3 feuilles ont été prélevées, autour de l'arbre, à partir de trois



branches situées à 3 m au-dessus du sol pour *P. atlantica* et à 1 m pour *P. lentiscus*. Un total de 324 échantillons, 162 pour la partie microbiologique et autant pour la partie génomique.

## **III.2. Etude microbiologique**

### **III.2.1. Calcul de la surface foliaire**

La surface des feuilles récoltées est mesurée grâce au logiciel Mesurim (20-04-13). Ces mesures se sont faites sous le bec benzène juste avant la mise en culture afin d'éviter toute contamination.

Les feuilles sont photographiées, dans un premier temps, sur une surface blanche, ensuite les photographies sont transférées sur le logiciel Mesurim qui calcule la surface de tout objet sans forme géométrique précise en cm<sup>2</sup>. Ceci nous a permis de faire une comparaison entre les feuilles des différentes stations, déterminant ainsi avec exactitude la surface de l'habitat des microorganismes phyllosphériques.

### **III.2.2. Préparations des feuilles et mise en culture des microorganismes**

Les échantillons sont traités et mis en culture, en général, le même jour de l'échantillonnage, au plus tard le lendemain. Des boîtes de Pétri contenant deux milieux de culture, un avec de la gélose nutritive pour les bactéries et l'autre avec le milieu Sabouraud pour les champignons, ont été préalablement préparées en coulant entre 15 et 20ml de milieu de culture fondu au bain-marie et conservées au réfrigérateur pour une période n'excédant pas une semaine. Dans le but de limiter les contaminations, deux répliques ont été effectuées pour chaque échantillon, soit un total de 324 boîtes pour la culture des bactéries et autant pour la culture des fungi avec des boîtes vides en guise de témoins négatifs pour chaque site (846 boîtes, au total).

Les méthodes de culture sont nombreuses, parmi les techniques fréquemment employées, on trouve l'ensemencement d'une souche sur une boîte de Pétri, il s'agit de placer l'échantillon à la surface ou à l'intérieur d'une gélose nutritive; avant de faire cette partie du travail, nous avons testé 3 méthodes : la première consistait en un prélèvement par écouvillonnage, la deuxième quant à elle consistait à tapoter la surface de la feuille sur la gélose (des deux faces), et la troisième par un rinçage des feuilles à l'eau distillée, la solution obtenue est par la suite étalée sur la boîte de Pétri (Mokhtar, 2010).

La première méthode fut immédiatement écartée car elle ne pouvait pas prélever la totalité des microorganismes, la deuxième méthode était prometteuse, mais elle requerrait plus de manipulation des échantillons et donc un risque plus accru de contaminations. Nous avons finalement opté pour la troisième méthode. C'était la meilleure en matière de résultats.

Les feuilles étaient rincées individuellement dans un flacon de 100ml d'eau distillée stérile, les flacons sont soigneusement agités pendant 10mn au vortex, dans la zone stérile créée par le bec benzène, et à partir de chaque flacon correspondant à chaque échantillon, un (01) ml de la solution est prélevé à l'aide d'une pipette graduée stérile. Deux boîtes de Pétri, pour chaque échantillon sont ainsi préparées, avec deux répliques (2 avec de la gélose nutritive pour la culture des bactéries et 2 autres avec du milieu Sabouraud pour la culture de champignons). L'ensemble est mis en culture pendant 48h à 24°C, pour les bactéries et 3 jours à 37°C, pour les champignons. Des boîtes de Pétri témoin (sans solutions) sont préparées pour chaque station pour détecter les contaminations (Mokhtar, 2010; Yumlembam et al., 2016).

Un dénombrement des colonies sur chaque boîte, s'ensuit après l'écoulement de la période d'incubation. Toute la méthodologie est résumée dans la figure 30. Les variables étudiées dans cette partie microbiologique sont le nombre de bactéries, le nombre de champignons et la surface foliaire

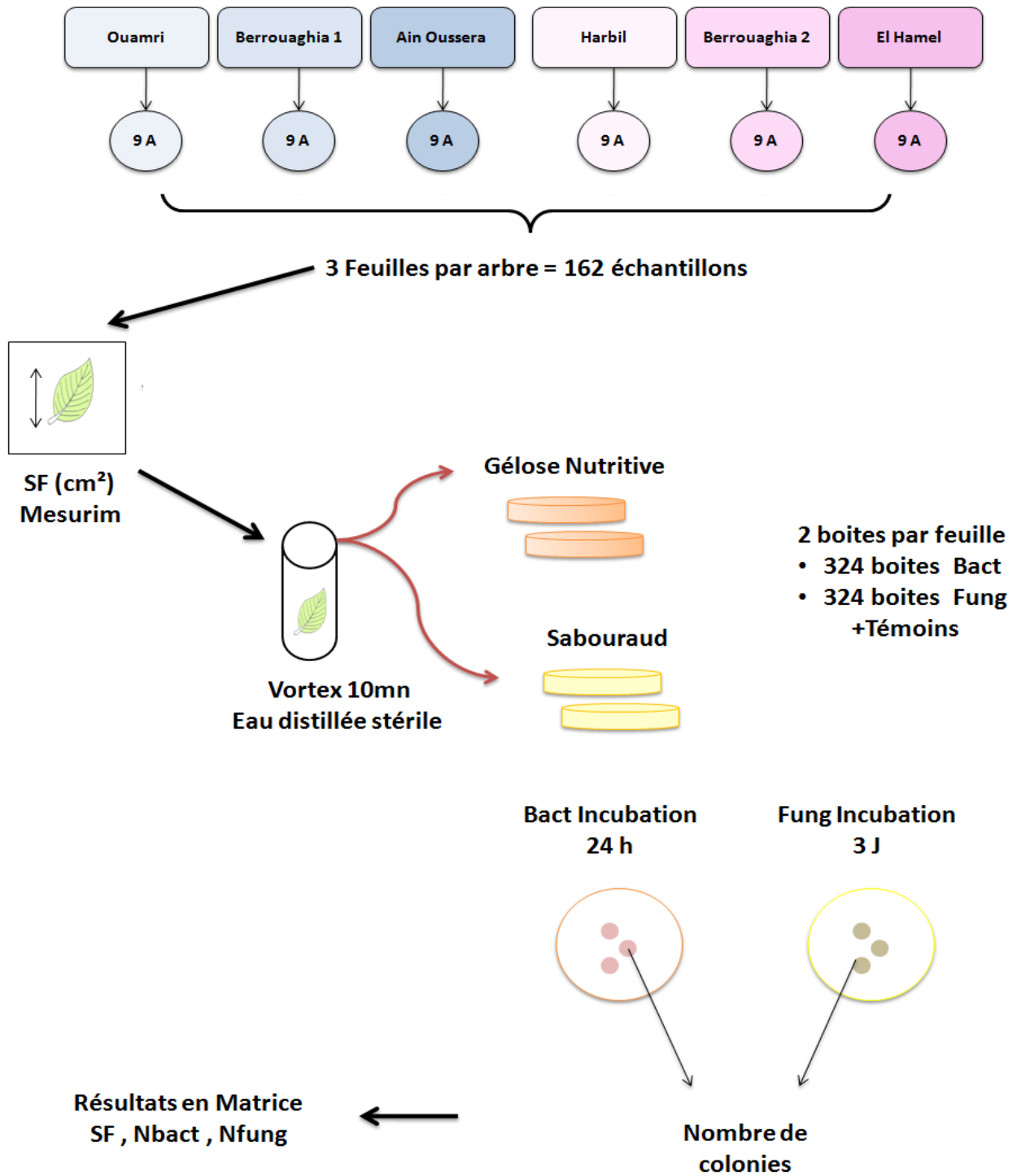


Figure 30: Echantillonnage et méthodologie pour la partie microbiologique (SF pour surface foliaire, BACT pour bactéries et FUNG pour champignons)

### III.2.3. Analyses statistiques

Les données ont d'abord été organisées en matrice afin de permettre une première comparaison entre le nombre de bactéries et celui des champignons de la phyllosphère, des deux espèces étudiées.

Cette matrice contenait des variables climatiques, tels que, la pluviométrie, la température et l'altitude des stations, avec trois variables mesurées, il s'agit de la surface foliaire (SF), du nombre de bactéries (NBACT) et du nombre de champignons (NFUN).

Le logiciel STATISTICA Version 8 est ensuite utilisé pour effectuer les corrélations entre le nombre de microorganismes, les espèces, la surface foliaire et les données climatiques, afin de déterminer leur organisation au sein de leur communauté, pour cela une analyse de la variance multifactorielle ANOVA a été performée. Par la suite, une classification ascendante hiérarchique (CAH) a été réalisée pour cerner le seuil des différences entre les sites, suivie d'une analyse en composantes principales (ACP) afin de déterminer les facteurs responsables de ces démarcations. Pour cela nous allons détailler les méthodes statistiques effectuées une à une.

- **Test de normalité:** D'abord, on a démarré notre partie statistique par des tests de normalité ; une courbe gaussienne a été effectuée pour toutes nos variables. Cette étape est primordiale pour déterminer que nos échantillons sont statistiquement suffisants pour une étude statistique.
- **Statistiques descriptives:** Des statistiques descriptives élémentaires ont été calculées pour toutes les variables de tous les sites et pour chacune des espèces étudiées (moyenne, minimum, maximum et écart-type). Cette étape est, en effet, très importante pour la description de nos données.
- **Analyse de la variance multifactorielle (ANOVA):** En statistiques, l'analyse de la variance (ou ANOVA pour analysis of variance en anglais), est un ensemble de modèles statistiques utilisés pour vérifier si les moyennes des groupes proviennent d'une même population. On a effectué cette analyse pour l'effet du site, de l'espèce et les deux au même temps. Ensuite, on a étudié l'effet du site sur les trois variables NBACT, NFUN et SF à l'intérieur de chaque espèce, séparément.
- **Classification ascendante hiérarchique (CAH):** L'objectif de cette étude étant de voir si nos variables se regroupaient au tour d'un groupe donné, l'espèce ou l'étage bioclimatique dans notre cas, une méthode de clustering est la plus adéquate.

- **Analyse en composantes principales (ACP):** L'analyse en composantes principales (ACP) a été appliquée pour les variables quantitatives notamment le nombre de bactéries, le nombre de champignons et la surface foliaire avec les variables environnementales.

### III.3. Etude génomique des champignons

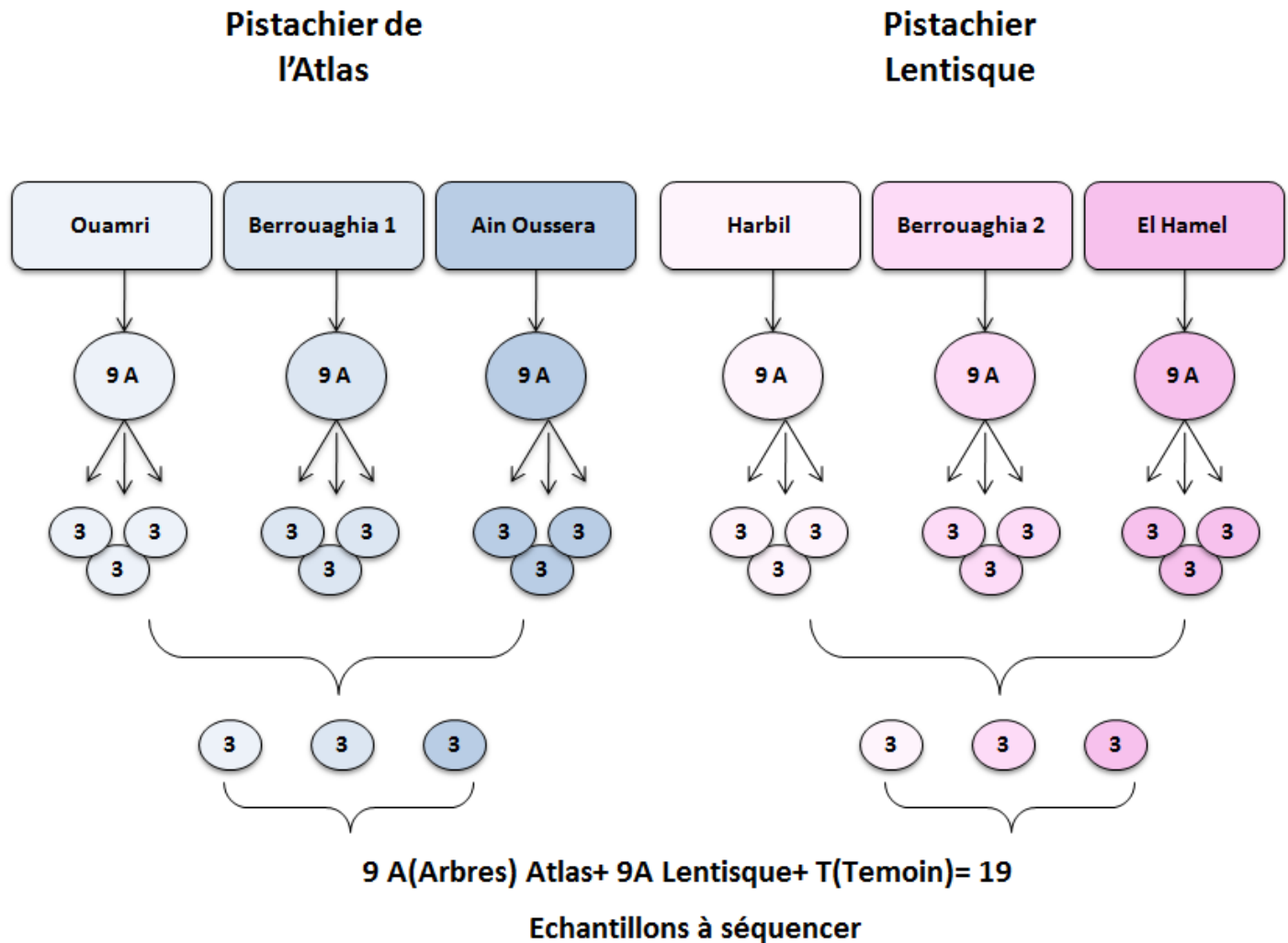


Figure 31: Plan de travail pour le séquençage d'ADN (Original, 2020)

Dans cette deuxième partie, nous utilisons des techniques de séquençage haut débit pour caractériser les différences entre les communautés fongiques, leur composition et leur structure.

Ces techniques ont permis l'utilisation en routine de procédures d'identification des microorganismes de différents types d'habitat, y compris la phyllosphère.

L'étude bioinformatique, notamment l'alignement des séquences, nous permettra d'estimer le niveau de diversité et les variations qu'elle peut présenter, ainsi qu'à répertorier les nouvelles espèces propres à la phyllosphère du pistachier. On aspire par ces techniques pouvoir déterminer, en premier lieu, leur composition, l'effet potentiel de l'espèce hôte, le climat et le degré d'aridité sur les champignons de la phyllosphère.

Nous avons au total 162 échantillons, correspondant aux 3 répliques des 9 arbres des 6 stations, en contrepartie, 19 puits sont disponibles pour le séquençage de l'ADN. Pour cela, nous avons élaboré un plan de travail nous permettant, ainsi, de représenter chaque station avec trois répliques. Le schéma ci-dessus est représentatif du traitement des échantillons au fur et à mesure de l'avancement du travail (Figure 31).

Pour pouvoir lever le voile sur la composition et l'organisation de la phyllosphère du pistachier en champignons, nous allons passer par plusieurs étapes : de la découpe des feuilles jusqu'à l'organisation des résultats en ensembles statistiques. Toutes ces manipulations sont résumées dans la figure 32.

Avant de commencer toute manipulation, nous avons d'abord élaboré un plan pour chaque plaque d'extraction d'ADN. En effet, les plaques d'extraction contiennent 96 puits (8×12), pour cela nous avons planifié la disposition de nos échantillons sur ces plaques, 2 au total pour 162 échantillons avec 4 puits vides pour servir de témoins négatifs.

Nous avons considéré X (station), Y (arbre), Z (réplica), et les deux lettres A et L (pour Atlas et pour lentisque, respectivement). **A111** correspond par exemple au premier réplica du premier arbre du pistachier de l'Atlas (Figure 33).

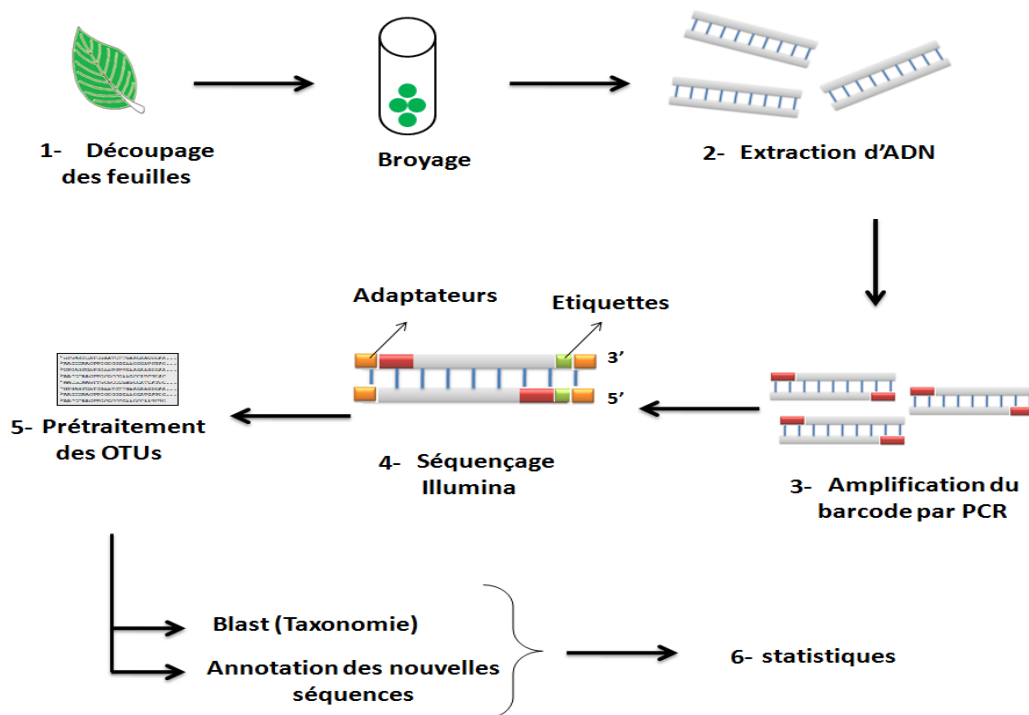


Figure 32: Méthodes utilisées pour la partie génomique (Original, 2020)

### III.3.1. Découpe des feuilles

Contrairement à la première étude microbiologique, cette partie ne prend pas en considération la surface totale de la feuille. En effet, pour l'extraction de l'ADN, on utilise un faible volume d'échantillon, chacun correspond à un petit disque foliaire de 4mm de diamètre.

Nous avons, alors, sorti les feuilles des sachets de silicagel pour les découper avec un pioncent de 4mm de diamètre, ces découpes ont été réalisées à l'aide d'un emporte pièce, stérilisé à l'alcool et à la flamme entre deux échantillons. Ces manipulations se sont déroulées sous une hotte en milieu stérile. Le protocole a été élaboré par Thomas Fort, chercheur à Biogeco (Fort, 2016) un plan détaillé sera présenté en annexes.

Après le découpage des feuilles en petits disques, des billes métalliques ont été mise dans les tubes pour permettre le broyage de ces dernières par ultrasons, c'est un moyen efficace de micro-broyage de particules par voie humide, cette étape permet d'avoir l'ADN des champignons endophytes et épiphytes.

Dans ce genre d'études, l'hygiène est d'une importance capitale car, la caractérisation des communautés fongiques par métabarcoding et séquençage haut débit implique de prendre de nombreuses précautions lors de l'échantillonnage et de la manipulation. En effet, de l'ADN fongique contaminant peut provenir de notre peau, d'outils mal nettoyés ou du matériel de stockage (Galan et al., 2016; Nguyen et al., 2015). Cependant, toutes les manipulations ont été faites dans un poste de sécurité microbiologique (PSM), 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.

Nous avons utilisé deux plaques de 96 puits, exactement comme celles de l'extraction d'ADN, avec le même plan de distribution tout au long du processus, elles contenaient nos 162 échantillons, plus 3 puits vides comme témoins négatifs (Figure 33).

### **III.3.2. Extraction de l'ADN**

Notre ADN a été extrait à l'aide du plant minikit DNeasy de QIAGEN. Ce kit, déjà utilisé, auparavant, dans de multiples études (Cordier et al., 2012 ; Coince et al., 2014; Fort, 2016) permet d'obtenir un ADN extrait de bonne qualité. Le protocole détaillé de l'extraction est présenté en annexes.

Cette partie a été réalisée également sous PSM (un poste de sécurité microbiologique), car des expériences similaires, auparavant réalisées sous hotte chimique (Sorbonne), ont noté que les témoins négatifs contenaient de nombreuses séquences. Selon Fort (2016), la cause des contaminations réside dans le fait que la hotte chimique est caractérisée par un flux vertical ascendant, pouvant augmenter le risque de contaminations croisées entre les différents échantillons tandis que la PSM à flux d'air vertical, descendant. A l'issue du séquençage, les témoins contenaient en effet une quantité très infime, voir négligeable de séquences.

L'extraction de l'ensemble des échantillons a été réalisée, mais pour le séquençage d'ADN seulement 19 puits étaient disponibles (Figure 31), il fallait faire un choix pour les échantillons à séquencer, nous avons opté pour un pool d'échantillons (Figure 34), nous avons pris les trois premiers échantillons de chaque station et nous avons mélangé leurs trois répliques respectifs, donc finalement chaque station a été représenté par 9 échantillons, 3 par tube ; les témoins ont été également mélangés dans le 19eme puits.



### **III.3.3. Amplification des barcodes par PCR**

Une fois l'extraction d'ADN réalisée, il fallait amplifier les barcodes par la bridge PCR, comme cité dans la bibliographie, le choix du barcode est crucial, l'étude des communautés fongiques foliaires implique inévitablement la présence d'ADN végétal dans les échantillons. Comme l'ITS est un locus présent chez tous les Eucaryotes, l'amplification d'ADN végétal est possible mais doit être limitée afin d'obtenir un maximum de séquences fongiques, pour cela nous avons choisit un couple d'amorce ITS1/ITS2 (Tableau 1).

### **III.3.4. séquençage d'ADN**

Dans cette étude, nous avons séquéncé nos 19 échantillons par la méthode Illumina, suite à l'extraction de l'ADN, et à l'amplification du barcode par PCR, en utilisant les amorces choisies du couple ITS/ITS2, des étiquettes sont ajoutées à chaque séquence (Figure 32). Ces étiquettes ou tags sont de courtes séquences de nucléotides connues, synthétisées artificiellement, de sorte qu'elles diffèrent entre les échantillons, leur rôle permet de connaître l'échantillon auquel appartient chaque séquence. Tous les échantillons sont, ensuite, séquencés ensemble.

Des adaptateurs Illumina, courtes séquences de nucléotides spécifiques à la méthode, sont ensuite ajoutés aux séquences. On procède alors à une seconde amplification, par Bridge PCR.

### **III.3.5. prétraitement des séquences**

L'extraction de l'ADN a été réalisée à BIOGECO, mais la PCR ainsi que le séquençage ont été confiés à l'entreprise de séquençage LGC Genomics. Un fichier des séquences brutes nous a été remis, un prétraitement bioinformatique été impératif pour pouvoir passer à l'étude taxonomique. On doit cette méthode à Mr Fort performée en 2016, à Biogeco.

La première des choses à faire était de relier chaque ADN à un échantillon. Les séquences ont d'abord été démultiplexées, c'est à dire qu'elles ont été regroupées par étiquette similaire, et donc par échantillon. Le logiciel Illumina bcl2fastq a été utilisé, ensuite toutes les étiquettes ont été filtrées, si une étiquette s'avère être manquante ou défectueuse, la séquence est supprimée.

Lors du séquençage, des adaptateurs et des amorces ont été rajoutés ; il fallait les couper pour retrouver nos séquences. Cependant, les adaptateurs TruSeq Illumina ont été coupés pour

chaque séquence. Toute séquence de longueur inférieure à 100 nucléotides a été supprimée ainsi que les séquences dont les amorces présentaient plus de trois mismatches avec l'amorce initiale.

Une fois les séquences débarrassées des étiquettes, des amorces et des adaptateurs, elles ont été combinées aux brins complémentaires par le logiciel BB Merge. Enfin, le Fungal ITS Extractor a été utilisé pour enlever les régions en amont et en aval des ITS, ces fameuses régions conservées qui entouraient le domaine hyper variable.

### III.3.6. Organisation en OTUs

Suite au prétraitement, le fichier obtenu contient toutes les séquences issues des échantillons, des milliers de séquences simultanément, il fallait une méthode pour les organiser en OTUs. En biologie, une Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU), est une définition utilisée pour regrouper des individus phylogénétiquement proches, cela veut dire qu'il fallait organiser toutes ces séquences selon les différentes espèces correspondantes.

D'abord les séquences ont été regroupées dans un seul fichier selon leurs échantillons d'appartenance (neufs pour le pistachier de l'Atlas et autant pour le pistachier lentisque avec trois échantillons pour chaque station). Ensuite, le clustering des séquences, selon leurs groupes taxonomiques en OTUs, a été effectué par la méthode UPARSE implémentée dans USEARCH, se basant sur un taux de similarité de 97% entre les séquences (Edgar, 2013). En effet, toutes les séquences similaires ont été mises dans le même groupe d'OTU, obtenant ainsi l'abondance de chaque OTU au sein de nos 18 groupes correspondant à nos échantillons plus le 19ème qui représente l'ensemble des témoins négatifs.

Il arrive que des séquences ne soient présentes qu'en un seul exemplaire, on les appelle les *Singleton*, celles-ci ont été supprimées. Le séquençage de communautés artificielles a montré que conserver les singletons augmentait considérablement le nombre total d'OTUs, sans améliorer la qualité du jeu de données final (Flynn et al., 2015).

Dans UPARSE, une méthode de génération de clusters (OTU) à partir de lectures de séquençage de nouvelle génération de gènes marqueurs tels que l'ARNr 16S et la région ITS fongique (Edgar, 2013), il ya un algorithme de détection de chimères "de novo", c'est des petites séquences ou fragments qui s'hybrident entre eux, et qui finalement appartiennent à plusieurs espèces ; notre matrice fut débarrassée de ces dernières grâce à cet outil. Enfin, notre table d'OTUs a été créée avec USEARCH, dans cette matrice, pour chaque échantillon, est indiqué le

nombre de séquences associées à chaque OTU. Cette méthode de traitement est résumée dans la figure 35.

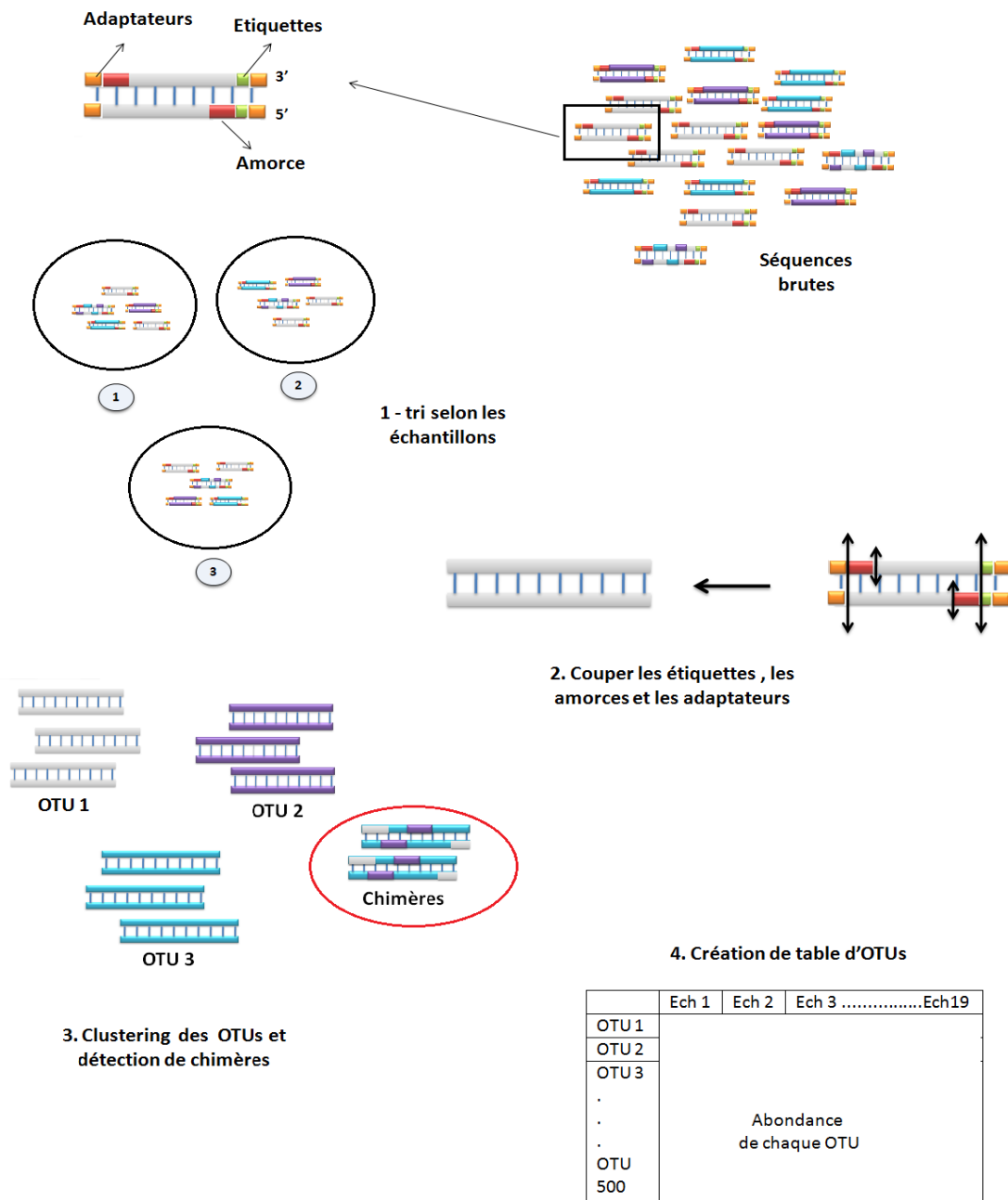


Figure 35: Prétraitement des séquences et création de la table d'OTUs (originale, 2020)

### III.3.7. Taxonomie

Tout ADN renferme l'empreinte de son appartenance; une traçabilité qui nous mène avec certitude vers l'origine de chaque gène. Cela est possible grâce à de petites séquences appelées

les séquences consensus. Comme déjà mentionné dans la bibliographie, tous les logiciels d'assignation taxonomique reposent sur une méthode heuristique de recherche. En effet, ces parties importantes du gène sont utilisées afin de remonter à un homologue connu.

En biologie moléculaire, les séquences homologues sont deux ou plusieurs séquences nucléotidiques partageant une origine évolutive commune. Cette dernière devrait logiquement présenter les mêmes séquences consensus. Afin d'effectuer notre recherche taxonomique sur l'ensemble des OTUs, plus de 500 dans notre étude, il nous fallait un outil performant. Nous avons d'abord pensé à faire cette recherche sur la base fongique UNITE, cette base les a naturellement assigné à des champignons, c'était logique après avoir utilisé des barcodes ITS, mais il y avait un risque, aussi infime soit-il, que des séquences végétales se soient glissées parmi nos résultats, alors, pour plus de fiabilité nous avons opté pour une assignation sur BLAST, en utilisant cette interface en ligne, nous avons comparé nos séquences à la base génomique internationale GENBANK. Nous avons, alors, soumis toutes les séquences en une seule requête sur BLAST. Cet outil nous confère les assignations taxonomiques précises grâce à un alignement multiple de chaque OTU à toutes les séquences homologues existant sur GENBANK, c'est comme avoir toutes les recherches faites auparavant sur les mêmes séquences que la nôtre à portée de main. Cependant, pour filtrer ce grand flux d'informations, deux variables très importantes sont utilisées par BLAST: premièrement, « **le score** » qui indique le degré de similitude, il se base sur les pourcentages d'identité et de recouvrement entre la séquence de l'OTU et chaque assignation, permettant d'identifier l'assignation taxonomique la plus probable. Deuxièmement, la « **E-value** » qui exprime le degré de l'erreur statistique. L'homologue idéal présente alors un score élevé et une E-value basse.

Faire une assignation collective représente un gain de temps considérable, cependant, il est important de mentionner que pour les séquences présentant un score similaire, une des deux est choisie arbitrairement comme homologue. Cette méthode ne pose pas de problèmes pour les séquences très répandues, elle serait en effet reconnue parmi plusieurs recherches similaires. Cependant, pour les OTUs nouvelles ou peu communes, cette méthode ne peut s'appliquer, pour cela nous avons effectué une assignation individuelle pour les OTUs caractéristiques de notre étude. Une par une, la vérification des résultats manuellement était plus sûre. De cette manière une lignée taxonomique complète a été rajoutée à notre matrice pour chaque OTU. Le fonctionnement de la requête BLAST est expliquée dans la figure 36.

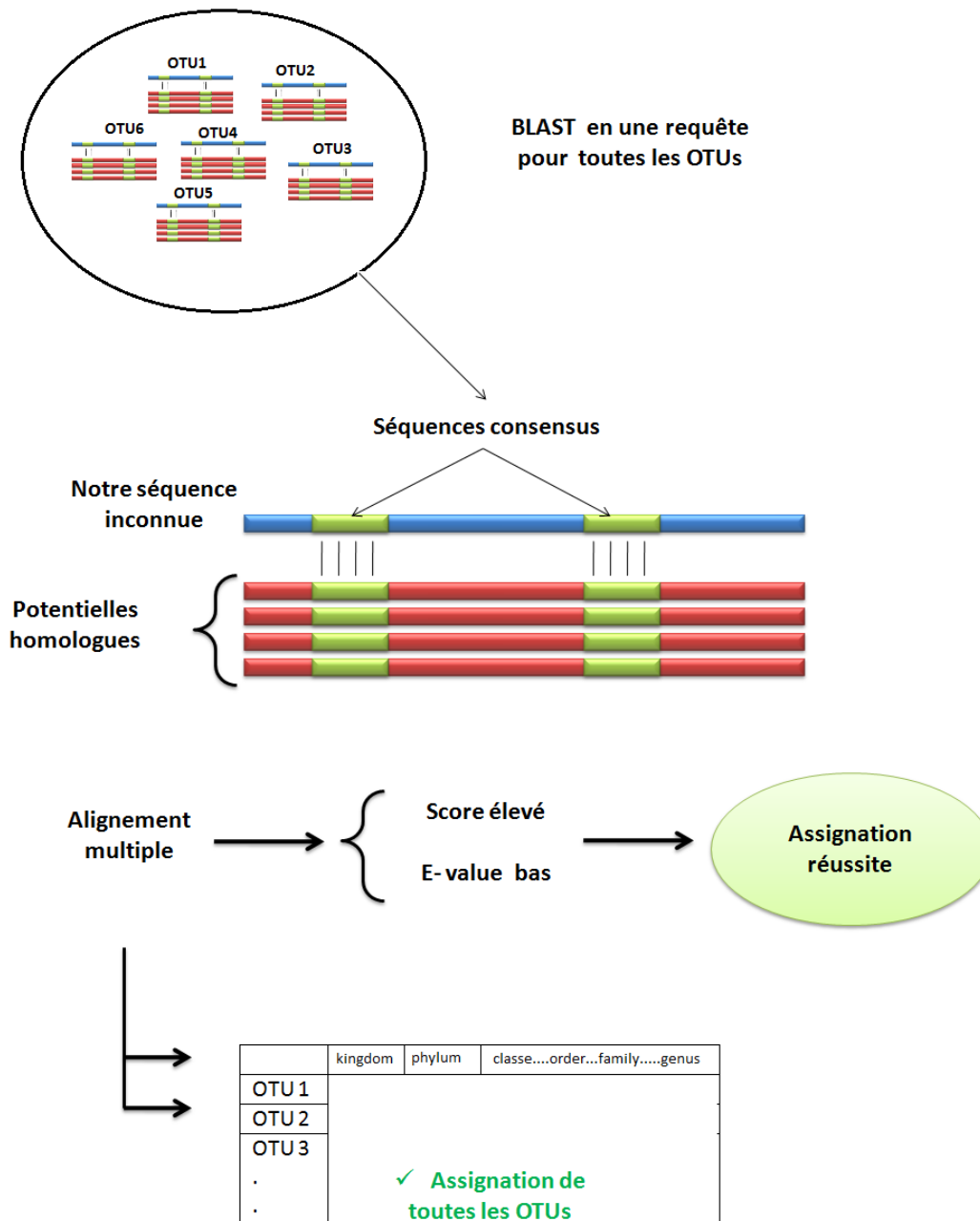


Figure 36 : Fonctionnement de la requête BLAST (Originale, 2020)

### V.3.8. Statistiques

La taxonomie de chaque OTU obtenue, notre matrice est désormais prête pour une étude biostatistique. Cette étude s'est effectuée en deux volets; d'abord, une étude sur l'ensemble des

OTUs, pour définir les affinités relatives à nos espèces et aux bioclimats, ensuite, une isolation des OTUs représentatives pour cerner les espèces fongiques responsables de ces démarcations.

Pour l'étude des ensembles, nous avons utilisé le package "vegan" du logiciel R ainsi que plusieurs bibliothèques. Notre script dans son intégralité sera présenté en annexes.

### **III.3.8.1. Etude des ensembles**

#### **III.3.8.1.1.Préparation de l'environnement de travail**

Pour commencer, nous avons préparé l'environnement de travail en chargeant sur R notre matrice ainsi que les variables climatiques issues de world Clim, du carré numéro 16 qui représente l'Algérie. Nous avons, alors, deux jeux de données : la table d'OTUs et les variables climatiques. Nous avons, par la suite, fusionné les deux jeux avec la fonction "merge". Tous les échantillons ont été ensuite renommés avec les noms des stations.

#### **III.3.8.1.2.Tri des OTUs**

Aussi vrai que notre matrice semblait complète, il y avait quelques remaniements pour que le résultat soit le plus fiable possible. Un tri des OTUs était cependant nécessaire, d'abord, il fallait effacer le 19eme échantillon correspondant aux témoins, c'était quelques séquences issues du milieu du laboratoire, ou même, peut-être, des autres échantillons. Elles n'étaient que 13 séquences, inférieures à 2%, ce nombre est insignifiant par rapport au total des OTUs, de cette manière, toutes les séquences présentes correspondaient à l'un des 18 échantillons issus des 6 stations.

Ensuite, toutes les OTUs assignées à du pistachier (contamination de la plante), ou autres qui ne correspondaient pas à des champignons ont été également supprimées de la matrice.

Les assignations pour lesquelles la confiance est inférieure à 80% ont été remplacées par "Unidentified" (non identifiés), on ne pouvait pas les supprimer car la phyllosphère du pistachier étant mal connue, renfermait beaucoup de nouvelles séquences fongiques inconnues des bases de données.

#### **III.3.8.1.3.Raréfaction :**

A ce stade, l'abondance de chaque OTU était fortement variable, cela veut dire que ces champignons ne sont pas présents de la même manière au sein de nos échantillons, cela est

probablement due aux différences relatives au site ou à l'espèce. Le nombre de séquences par échantillon est très différent. Pour éviter des biais liés à cette différence, on raréfie la table d'OTUs, cela permettait de ramener l'abondance de chaque OTU à un même seuil. De cette manière l'expression des OTUs était significative.

Nous avons choisi de faire 100 raréfactions de la table d'OTUs, en utilisant un nombre de séquences au seuil légèrement inférieur au nombre de séquences du plus petit échantillon. Pour chaque raréfaction, nous avons calculé les indices de diversité alpha et beta qui nous intéressaient, soit la richesse, la diversité de Shannon.

#### **III.3.8.1.4. Effet de l'espèce et de la zone climatique sur la composition des communautés fongiques foliaires**

Suite à la raréfaction, nos données sont prêtes à être utilisées, la première approche statistique consistait en une PERMANOVA "Permutational multivariate analysis of variance". Cette analyse multivariée a été utilisée sur les matrices de dissimilarités. Pour cela, nous avons utilisé la fonction "Adonis", c'est une technique utilisée en écologie pour expliquer les effets des communautés avec des variables environnementales. Son objectif est semblable à celui de l'analyse multivariée de la variance (MANOVA).

#### **III.3.8.1.5. Représentation de la dissimilarité entre échantillons sur une NMDS**

La dissimilarité entre les échantillons a été testée par une NMDS, c'est une MDS "Multidimensional Scaling" non métrique, elle a été performée par la fonction "Meta MDS" du package "vegan" du logiciel R. Pour cet algorithme, seul compte l'ordre entre les dissimilarités. Autrement dit cette NMDS ne doit pas essayer de reproduire les dissimilarités, mais seulement la relation d'ordre entre ces dernières.

#### **III.3.8.1.6. Effet de l'espèce et du site sur la diversité et la richesse des communautés fongiques foliaires**

Après avoir étudié l'effet de l'espèce et du site sur la composition fongique de la phyllosphère du pistachier, il était intéressant d'aborder cet effet sur la diversité et la richesse de ces communautés, chacune, séparément. Pour ces deux études, nous avons effectué des GLM avec la fonction "attach". En statistiques, le modèle linéaire généralisé (MLG) souvent connu

sous les initiales anglaises GLM, est une généralisation souple de la régression linéaire. Le GLM généralise la régression linéaire en permettant au modèle linéaire d'être relié à la variable réponse via une fonction lien et en autorisant l'amplitude de la variance de chaque mesure d'être une fonction de sa valeur prévue.

#### **III.3.8.1.7. Histogrammes taxonomiques par site et par espèce**

Pour visualiser l'abondance relative de chaque taxon pour chaque échantillon, nous avons réalisé un histogramme qui regroupe les 18 échantillons des six sites d'échantillonnage avec les taxons les plus répandus. Dans cette étude, nous avons utilisé la fonction "data taxo".

#### **III.3.8.2. Isolation des OTUs représentatifs**

Après avoir étudié les effets relatifs au site et à l'espèce par une étude des ensembles, il était primordial de mettre un nom et un nombre sur ces espèces fongiques caractéristiques de chaque espèce, de chaque bioclimat et parfois propres à une seule station.

Telle une empreinte environnementale, nous avons arpenté cette piste pour cerner ces espèces, pour ce faire, nous avons procédé par un tri des abondances relatives à chaque espèce. Nous avons classé les échantillons, sur notre matrice, par ordre décroissant, obtenant ainsi les espèces fongiques les plus présentes sur nos échantillons. Nous avons, ensuite, enlevé les OTUs communes aux deux espèces, elles représentaient les espèces relatives au genre *Pistacia*, ou bien des fungi ubiquitaires, de cette manière les OTUs propres à chaque espèce ont été cernées.

Ensuite, nous avons classé ces OTUs selon l'abondance relative à chaque site, en regroupant les 3 répliques, nous avons ainsi pu visualiser tous les fungi propres à chaque station, nous détenons, ainsi, les OTUs recensables des démarcations dues à l'espèce et au site.

Cependant, nombre de ces OTUs représentatifs de notre étude s'avèrent être non identifiées auparavant, la recherche sur GENBANK les a classées comme inconnues, c'était parce que il n'y avait pas d'étude génomique sur ces espèces et ces bioclimats, elles représentaient peut-être de nouvelles espèces fongiques à identifier et à répertorier, pour en être sûrs, nous avons fait une identification génomique suivie d'une soumission des nouvelles espèces sur GENBANK.



### **III.3.8.3. Identification par annotation génomique**

Devant une séquence inconnue ou non assignée, nous nous retrouvons devant quelques paires de bases qui doivent impérativement livrer leurs secrets, ce n'est pas comme si nous avions une culture sur une boîte de Pétri, nous devons donc procéder d'une manière différente, nous avons, en vérité, pisté ces séquences selon un plan bien établi, pour chercher si ces espèces ont déjà été étudiées nous avons fait une annotation génomique sur ces OTUs, c'est une démarche précise à faire, afin de mettre un nom sur ces espèces.

En fait, ces séquences au nombre de 15 au total, sont passées au filtre du BLAST sans aucune assignation. Ce que nous savons déjà, c'est qu'il s'agit forcément de champignons, vu que notre barcode ITS a déjà fait ses preuves, il s'agit plus précisément d'espèces fongiques de la phyllosphère des deux espèces de pistachiers, nous savons même de quel pistachier il s'agit, grâce au tri des OTUs. En revanche nous ignorons totalement l'affiliation taxonomique de ces espèces.

Plusieurs possibilités s'offrent à nous, d'abord, il se pourrait qu'on n'ait pas cherché dans toutes les banques, quoique GENBANK regroupe la majorité des séquences nucléotidiques connues jusqu'alors. Ensuite ça pourrait être notre outil de recherche, nous avons fait l'ensemble des assignations en une seule requête d'une manière automatique. On devait absolument chercher l'information manuellement et plus méticuleusement. Il se pourrait aussi que ces séquences soient totalement inconnues de la communauté scientifique, c'était de notre devoir dans ce cas d'introduire cette information avec une soumission des résultats sur GENBANK.

Au début nous avons cherché manuellement dans les banques avec une requête BLAST individuelle pour chaque OTUs, nous avons scruté par la suite toutes les possibilités qui s'offraient à nous, nous avons pu de cette manière connaître le taxon de quelques OTUs qui étaient présents dans des recherches sur le pistachier, le manipulateur les a assigné comme étant un ADN végétal, dans ce cas nous avons rectifié l'information en assignant ces séquences comme champignons phyllosphériques.

Même avec cette fouille minutieuse, il restait 4 séquences à qui on n'avait trouvé aucune trace, avant de les soumettre, nous avons procédé à une dernière identification, nous avons procédé de sorte à tout remettre en question, même notre barcode ITS, il avait une possibilité qu'une recherche ait été faite sur ces séquences, mais autant que protéines. Alors, tout a été repris dès le début, nous avons vérifié d'abord qu'il s'agissait de séquences codantes, pour cela une

recherche d'ORF (open Reading frame ou cadre ouvert de lecture) a été faite avec le module ORF Finder du logiciel SMS (séquence manipulation suite). Ensuite, nous avons fait la traduction en protéines avec le même logiciel, une recherche des domaines protéiques éventuels a été faite sur INTERPRO avec une recherche sur les bases PFAM et PROSITE séparément, et une autre recherche avec BLASTp (protéine), cette fois. De cette manière, nous avons cherché partout sur les banques génomiques, protéiques et même sur des domaines protéiques.

Suite à toutes ces méthodes, une soumission a été faite afin d'introduire nos séquences inconnues sur le portail de GENBANK.

---

*Chapitre IV*

*Résultats & discussion*

---

Suite à la présentation des différentes méthodes de travail ainsi que le matériel que nous avons utilisé pour cette thèse, nous allons dans ce quatrième chapitre, présenter les résultats de nos travaux ainsi que la discussion de ces derniers, des perspectives de recherches et une conclusion générale viendrons clôturer ce travail. Le chapitre précédent (réf. Chap III.) a été divisé en deux grandes parties, la première est une étude microbiologique des communautés fongiques et bactériennes de la phyllosphère, tandis que la deuxième partie est une étude génomique et bioinformatique des champignons phyllosphériques. Nous avons alors suivi le même plan dans ce chapitre concernant l'interprétation des résultats en présentant chaque partie séparément, suite à cela, nous présenterons les résultats d'une dernière partie concernant l'identification des champignons pathologique pour chaque espèce.

## **IV.1.Résultats**

### **IV.1.1. Etude microbiologique**

#### **IV.1.1.1. Statistiques descriptives**

Nous avons choisi d'entamer les résultats de cette première partie par une description des variables mesurées. Une étude statistique a été donc performée et les variables mesurées suivent une courbe gaussienne à distribution normale. Les statistiques descriptives, notamment la moyenne, les valeurs minimales (min) et maximales (max) ainsi que l'écart type (E.T.) ont été calculées, elles sont présentées dans le tableau ci-dessus (Tableau 7).

Dans la figure 37, on a illustré une comparaison des surfaces foliaires, du nombre de bactéries et du nombre de champignons entre les 6 stations. La première variable mesurée fut la surface foliaire (S.F), on remarque que cette variable diffère selon les deux espèces, en effet les stations du pistachier de l'Atlas (en bleu) affichent des feuilles plus grandes d'une moyenne de 4,25cm<sup>2</sup> contre une moyenne de 1,21cm<sup>2</sup>. On remarque, aussi, que cette variable augmente dans les sites arides, notamment Ain Oussera avec une moyenne de 4,34cm<sup>2</sup> et 1,37cm<sup>2</sup> pour le site d'El Hamel (Figure 37A, Tableau 7). Concernant le nombre de colonies bactériennes (NBACT), celui-ci, varie fortement entre les deux espèces étudiées. En effet, le pistachier de l'Atlas enregistre plus de colonies que le pistachier lentisque, soit 10 colonies par échantillon (soit la surface de la boîte de Petri), contre 7, en moyenne. Cette différence est considérable aussi entre les différents sites, on enregistre environ 12 colonies pour Ain Oussera et 9 colonies pour le site

d'El Hamel, c'est plus élevé que la moyenne si on compare par rapport aux autres stations (Figure 37B).

Enfin, notre dernière variable mesurée, le nombre de colonies fongiques (NFUN) de la phyllosphère, celui-ci est également très variable entre les deux espèces ; il est plus élevé pour le pistachier de l'Atlas d'une moyenne de 6 espèces par échantillon (la surface de la boîte de Petri) contre une moyenne de 3,5 espèces pour les échantillons du lentisque. De même, les stations arides détiennent le plus grand nombre, avec 8 colonies, en moyenne pour le pistachier de l'Atlas (station d'Ain Oussera) et 4 pour le lentisque (station d'El Hamel) (Figure 37C). On remarque, également, que le nombre de bactéries est plus élevé que le nombre de champignons, pour les deux espèces de pistachiers et les stations d'échantillonnage, avec une moyenne de 8 colonies bactériennes contre 5 colonies fongiques.

Tableau 7: Statistiques descriptives pour les différentes variables mesurées pour les deux espèces étudiées, *P. atlantica* et *P. lentiscus*.

<b>Espèce</b>	<b>Sites</b>	<b>Variables</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>E.T.</b>
<i>P. atlantica</i>	Ouamri	SF(cm <sup>2</sup> )	4,22	3,32	5,67	0,68
		NBACT	8,07	4,00	19,00	3,19
		NFUN	5,04	2,00	9,00	1,97
	Berrouaghia 1	SF(cm <sup>2</sup> )	4,18	3,45	5,59	0,61
		NBACT	8,70	4,00	13,00	2,54
		NFUN	4,59	2,00	8,00	1,74
	Ain Oussera	SF(cm <sup>2</sup> )	4,34	3,19	5,49	0,75
		NBACT	12,37	5,00	19,00	3,89
		NFUN	8,18	3,00	13,00	2,45
<i>P. lentiscus</i>	Harbil	SF(cm <sup>2</sup> )	1,21	0,39	3,02	0,81
		NBACT	6,11	1,00	10,00	2,15
		NFUN	3,30	0,00	6,00	1,45
	Berrouaghia 2	SF(cm <sup>2</sup> )	1,28	0,30	3,67	1,00
		NBACT	5,81	3,00	10,00	1,98
		NFUN	3,22	1,00	6,00	1,50
	El Hamel	SF(cm <sup>2</sup> )	1,37	0,31	4,60	1,20
		NBACT	9,52	5,00	15,00	2,90
		NFUN	4,30	1,00	7,00	1,66

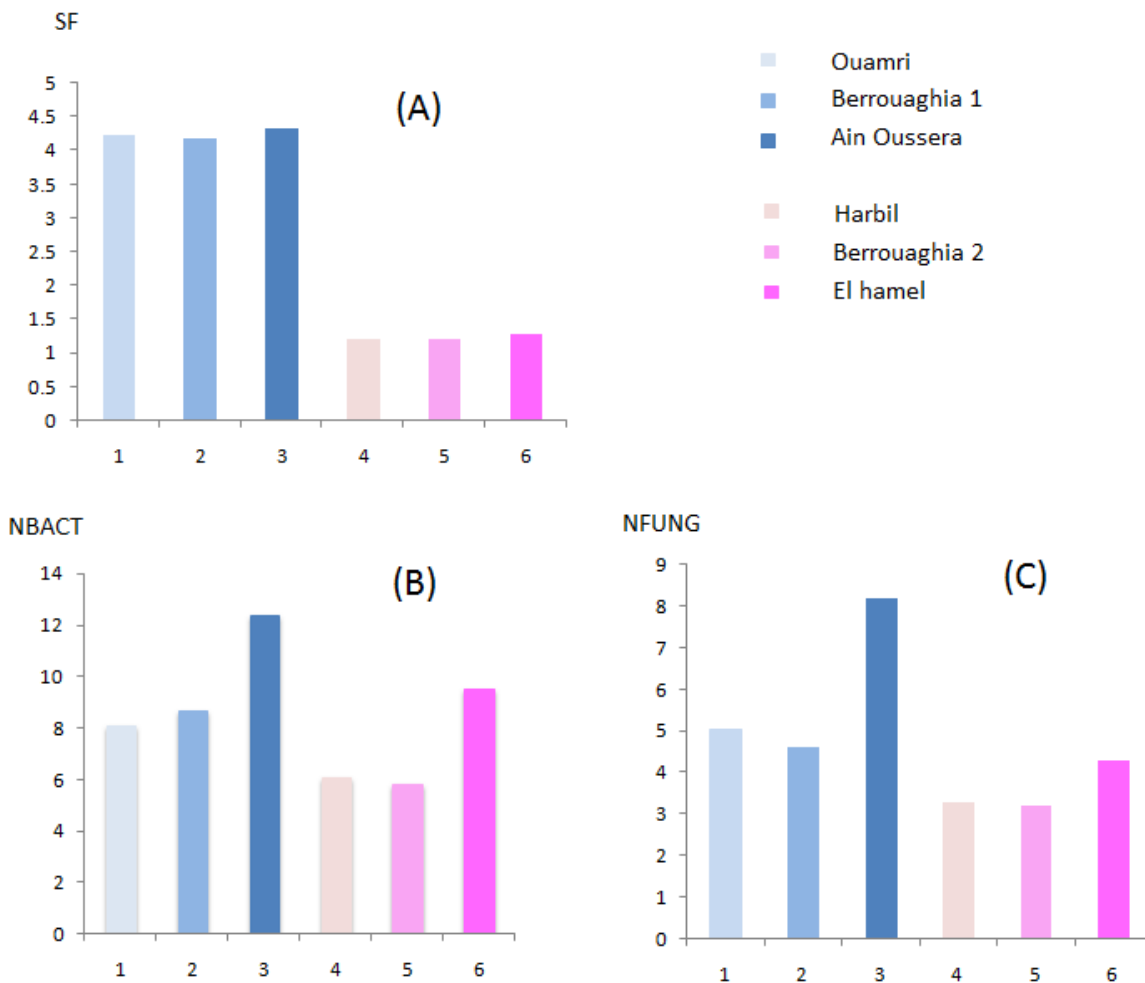


Figure 37: Comparaison intra-spécifique et interspécifique de la surface foliaire (SF en (cm<sup>2</sup>)), du nombre de bactéries (NBACT), et du nombre de champignons (NFUN) sur la surface de la boîte de Pétri, entre les deux espèces de pistachiers étudiées.

#### IV.1.1.2. Analyse de la variance multifactorielle (ANOVA):

Suite à la description générale des résultats, nous avons effectué une ANOVA multifactorielle. Dans le tableau 8, on présente les résultats de cette analyse pour l'effet du site, de l'espèce et de l'interaction des deux facteurs. Ensuite, par la même analyse, l'effet du site sur les trois variables NBACT, NFUN, SF à l'intérieur de chaque espèce séparément a été étudié (Tableau 9).

Tableau 8 : Analyse de la variance multifactorielle (ANOVA) des variables étudiées pour *P. atlantica* et *P. lentiscus*

<b>Variables mesurées</b>	<b>Effet du site</b>	<b>Effet de l'espèce</b>	<b>Effet de l'espèce x site</b>
<b>NBACT</b>	0,0000...***	0,0000...***	0,0000...***
<b>NFUN</b>	0,0000...***	0,00**	0,0000...***
<b>SF</b>	0,00**	0,00**	0,91NS

Tableau 9 : Analyse de la variance(ANOVA) montrant l'effet du site sur les variables mesurées pour les deux espèces étudiées.

<b>Espèce</b>	<b>Variables mesurées</b>	<b>Effet du site</b>
<b>Pistachier de l'Atlas</b>	NBACT	0,0000...***
	NFUN	0,0000...***
	SF	0.59NS
<b>Pistachier lentisque</b>	NBACT	0,0000...***
	NFUN	0,0000...***
	SF	0,85NS

L'ANOVA nous a permis d'évaluer l'effet du site, de l'espèce ainsi que l'interaction de ces deux facteurs sur les trois variables mesurées (NBACT, NFUN et SF), la différence a été calculée au seuil de signification  $p < 0,001$ . On note une différence très hautement significative ( $p < 0,001$ ) entre les sites d'échantillonnage et les deux espèces étudiées pour les trois variables mesurées (S.F, NBACT et NFUN). Pour l'effet site, une différence significative a été enregistrée pour NBACT et NFUN, quant à S.F, elle reste non influencée par le site. Cependant, pour l'interaction des deux facteurs (site x espèce), les résultats obtenus montrent que la densité des microorganismes phyllosphériques (NBACT et NFUN) est significativement différente. Par contre, aucune différence significative n'a été enregistrée pour SF (Tableau 8).

### **VI.1.1.3. Classification ascendante hiérarchique (CAH)**

L'objectif principal de cette étude était de relier la composition de la phyllosphère aux différents sites d'échantillonnage, de ce fait, une classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) représentant les groupes de stations s'avère très démonstrative. En effet, on remarque dans la figure 38, que 2 groupes de stations se démarquent clairement, isolant les stations les plus arides, El Hamel et Ain Oussera, du reste des stations. Ensuite, dans la deuxième ramification de l'arbre de probabilité, deux autres groupes se forment, regroupant les deux stations de Berrouaghia 1 et

2 qui se trouvent toutes les deux dans l'étage bioclimatique semi-aride, et les stations d'Ouamri et Harbil qui se trouvent sur l'étage subhumide.

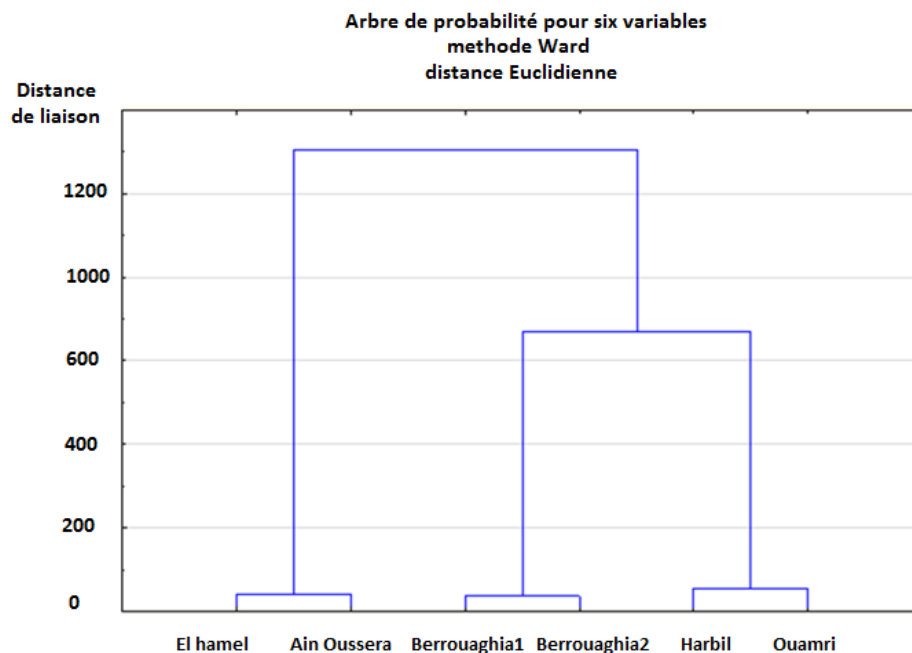


Figure 38: Classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) représentant les différents groupes de stations

#### IV.1.1.4. Analyse en composantes principales (ACP)

Une analyse en composantes principales (ACP) a été appliquée pour les variables quantitatives (NBACT, NFUN et SF) avec les différentes variables environnementales telles que la pluviométrie (PM), la température moyenne (TM) et l'altitude (ALT).

Les trois sites du pistachier de l'Atlas sont représentés en rouge avec 1, 2 et 3 pour les stations d'Ouamri, Berrouaghia1 et Ain Oussera, respectivement; tandis que les sites du pistachier lentisque sont en noir avec 4, 5 et 6 pour les sites de Harbil, Berrouaghia2 et El Hamel, respectivement (Figure 39). En effet, pour mieux cerner les variables discriminantes, cette ACP était nécessaire pour compléter les résultats de cette première partie, de cette manière les différents groupes de stations sont départagés.



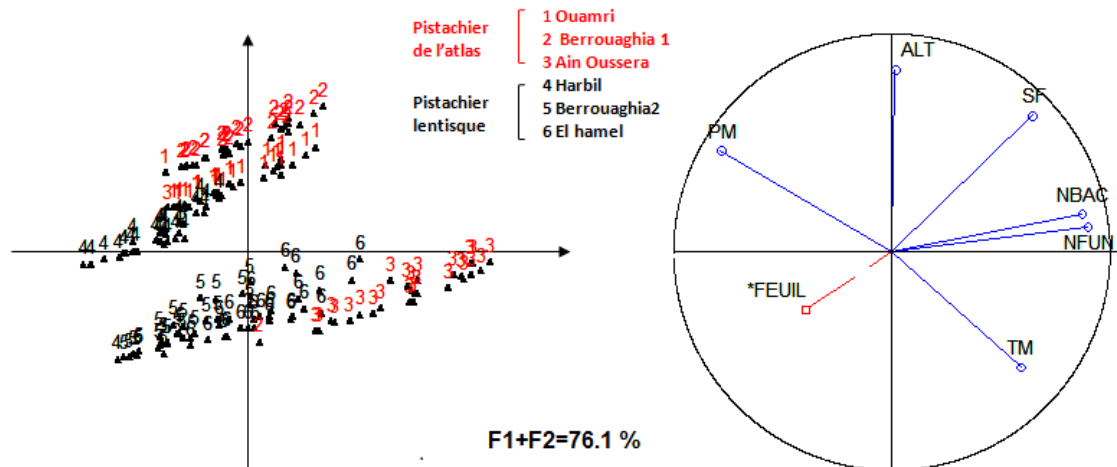


Figure 39: Analyse en composantes principales (ACP), montrant la répartition du nuage de points représentant les corrélations entre les différentes variables mesurées et les différents facteurs à l'origine de la variation.

Le cercle de corrélation (à droite), regroupe l'ensemble des facteurs responsables de ces démarcations, il a été réalisé à partir des variables inhérentes à l'espèce, la provenance en corrélations avec les différentes variables climatiques et stationnelles. La distribution (à gauche), affiche un nuage de points regroupant deux groupes principaux de stations, avec un premier groupe de sites 1,2 et 4 qui représentent les stations d'Ouamri et Harbil (semi-aride) et la station de Berrouaghia 1 qui se trouve dans la limite inférieure entre le subhumide et le semi-aride (Figure 24). Le deuxième groupe rassemble les sites 3,5 et 6 avec les deux stations les plus arides Ain Oussera et El Hamel vers le bas, plus en haut la deuxième station de Berrouaghia qui se situe également dans le subhumide dans sa limite inférieure avec le semi-aride.

Les sites se regroupent, selon l'affinité génétique et l'affinité climatique des sites. En effet, dans un premier lieu on distingue clairement le regroupement des individus autour du nuage qui définit les deux espèces. Dans un second temps, les individus appartenant aux stations arides (Ain Oussera et El Hamel) ont tendance à se regrouper et à se rapprocher.

#### IV.1.1.5. Discussion de la partie 1

Les microorganismes présents dans les différentes sphères, ont toujours joué un rôle clé dans l'environnement, ils sont modulés par plusieurs facteurs. Dans cette partie de la thèse, on

voulait comprendre la manière dont certains facteurs, liés aux espèces hôtes et aux environnements, puissent influencer sur une de ces sphères, plus précisément la phyllosphère.

La phyllosphère abrite en effet plusieurs microorganismes, aussi petite semble elle, la surface des feuilles reste un habitat très important, si on additionne l'ensemble des feuilles sur l'échelle terrestre, la phyllosphère peut couvrir une proportion significative du globe estimée à  $6,410^8$  km<sup>2</sup> (Yumlembam et al., 2016). Cet habitat contient une très grande diversité en microorganismes ce qui apporte une contribution importante à la diversité microbienne (Ding et al., 2016). Ces microorganismes, qu'ils soient endophytes ou épiphytes, sont, en général, très bénéfiques pour les plantes; ils jouent un rôle primordial dans l'organisation des écosystèmes (Morris et al., 2002), en effet ils peuvent, par exemple, aider à atténuer les stress abiotiques tels que la sécheresse ce qui les rend, particulièrement, attractifs par rapport à l'adaptation au changement climatique, il se fait que les plantes s'adaptent mieux à leurs environnements grâce à ces êtres microscopiques (Jorgensen et al., 2020). En dehors des rôles d'adaptation aux milieux, ils ont une grande contribution dans la croissance des plantes, par exemple les champignons endophytes contribuent aux mécanismes de production d'hormones de croissance végétale et l'acquisition de nutriments (Frank et al., 2017).

Pour cette partie, nous avons étudié l'influence du site et de l'espèce sur trois variables mesurées. En premier lieu sur la surface foliaire, qui est un trait mesurable et qui représente la surface de notre habitat phyllosphérique, ensuite sur le nombre de bactéries et le nombre de champignons, situés sur cette même phyllosphère. Pour bien observer ces démarcations, nous avons choisi des sites différents d'un point de vue climatique et stationnelle, dans le deuxième chapitre nous avons mis en évidence selon une synthèse détaillée, l'étage bioclimatique correspondant à chaque site, nous avons alors 3 grandes zones, chacune contient deux sites, un pour chaque espèce étudiée, le pistachier lentisque et le pistachier de l'Atlas. Les deux premiers sites Ouamri et Harbil se situent dans le semi-aride, ensuite les deux sites de Berrouaghia 1 et 2 dans le subhumide, dans leur limite inférieure avec le semi-aride et enfin les deux sites les plus arides, El Hamel et Ain Oussera. La surface foliaire est légèrement plus grande dans les stations les plus arides (Ain Oussera et El Hamel), pour les deux espèces de pistachiers, ceci pourrait être le résultat d'une adaptation de la plante à son milieu (Figure 37A). Le plus souvent, les plantes, confrontées à de grandes chaleurs, auraient plus tendance à réduire leur surface aérienne, paradoxalement, plusieurs études (Belhadj, 2007; Doghbage, 2020) ont montré que les

dimensions des folioles des deux espèces peuvent augmenter avec l'aridité. Il faut dire que contrairement au lentisque, qui est un arbuste avec des feuilles persistantes, les feuilles du pistachier de l'Atlas sont caduques, elles sont influencées par les facteurs climatiques annuels, tels que la pluviométrie ou la température. En fait, on pourrait également attribuer cette augmentation aux autres facteurs stationnels tels que l'altitude. Cette dernière s'avère déterminante pour la taille des feuilles (Belhadj et al., 2007; Benabdallah et al., 2015). El Zerey-Belaskri et al. (2016) ont souligné une corrélation importante entre les paramètres climatiques et la morphologie des feuilles du pistachier de l'Atlas échantillonnées dans l'ouest du pays. Concernant la comparaison des surfaces foliaires entre les deux espèces, ce facteur s'avère très hétérogène, en effet le pistachier de l'Atlas présente des feuilles plus grandes que celles du lentisque. C'est une caractéristique génétique propre aux espèces du genre *Pistacia*, plusieurs études morphologiques ont souligné cette différence (Zohary, 1952; Alyafi, 1979; Monjauze, 1980; Doghbage, 2012; 2020).

Le nombre de microorganismes sur les feuilles est très significatif pour l'espèce et le site, (Figure 38), les composants de la phyllosphère seraient donc fort liés à leurs plante hôte (Ding et al., 2016), cela pourrait être en relation avec les propriétés aromatiques de l'arbre, tels que les huiles essentielles (Yadav, 2005), la couche de cire ainsi que la teneur en chlorophylle constituent une source de variation déterminante pour la densité des microorganismes sur la surface foliaire également (Arturo et al., 2012). Cette affinité pour l'espèce, pourrait s'expliquer par le phénomène de dispersion (Fort, 2016), en fait certains de ces microorganismes, notamment quelques endophytes, proviennent de la transmission verticale des graines ou de l'environnement de la germination (Barret et al., 2015), elles appartiennent alors à l'espèce depuis le commencement. Les deux espèces de pistachiers, présentent un grand nombre de bactéries et de champignons d'une moyenne de 8 espèces par feuille pour les bactéries et 5 espèces pour les champignons, un nombre considérable ; par comparaison, une étude menée sur 56 plantes non cultivées a enregistré un nombre maximal de 4 colonies bactériennes par feuille (Yumlembam et al., 2016). Ce nombre reste très hétérogène entre les deux espèces, la phyllosphère du pistachier de l'Atlas est plus riche que celle du lentisque, cela pourrait être relatif à la surface de ses feuilles nettement plus importante, elles pourraient effectivement mettre à la disposition des microorganismes plus de place et plus de substances nutritives. Selon certaines études (Arnold et al., 2003, 2005), le poids de la feuille, traduit par une plus grande surface foliaire, augmenterait

la richesse des microorganismes phyllosphériques. Les microorganismes sont une partie très importante des écosystèmes, ils sont aussi très liés à leurs habitats. Nos résultats démontrent un effet très significatif du site pour les bactéries et les champignons des deux espèces de pistachiers (Figure 39). Nos sites d'échantillonnage présentent des différences climatiques et stationnelles, qui pourraient être à l'origine de ces affinités qu'ont certains microorganismes phyllosphériques avec leurs habitats. Les variations de l'habitat, indépendamment les uns des autres, sont tous responsables de la modulation de la composition de la phyllosphère, les microorganismes en général, sont très sensibles aux changements, c'est pour ça qu'on les utilise parfois comme empreinte environnementale, par exemple, plusieurs études sur les champignons du sol ont tiré les mêmes conclusions, cependant la feuille aurait un effet de sélection beaucoup plus fort que la racine (Zhiquan et al, 2019).

Concernant les facteurs stationnels, les espèces de microorganismes qui cohabitent avec nos modèles d'étude, sont d'une importance capitale, car certains microorganismes pourraient migrer avec le vent ou bien les insectes d'une espèce à une autre dans le même milieu (Fort, 2016). D'un autre point de vue, l'altitude du site constitue un facteur de sélection déjà établi auparavant (Cordier, 2012). Les facteurs climatiques, tels que la pluviométrie ou la température, ont tendance à augmenter la richesse de la phyllosphère, il a été établi que les microorganismes des feuilles sont numériquement plus importants dans les régions tempérées (Morris et al., 2002). Cette sensibilité se traduit même pour les saisons d'une même année, en effet les variations saisonnières en pluie et en température affecteraient la distribution des endophytes foliaires (Jumpponen et al., 2009; Ding et al., 2016). Ces deux facteurs ensemble, déterminent l'aridité d'une station, cette dernière est en corrélation positive avec le nombre de microorganismes, elle avantagerait la densité de la phyllosphère, c'est peut-être une manière pour l'espèce de s'adapter à son milieu, par exemple, pour survivre aux milieux les plus ingrats ; les racines des sites arides, présentent un taux de mycorhization plus élevé et un nombre plus élevé des champignons du sol (Bouabdelli, 2019). Ces microorganismes sont un moyen de lutte pour les plantes contre la sécheresse, avec plusieurs mécanismes pour conserver l'eau, ils peuvent en effet augmenter la teneur en eau par unité de masse foliaire, la sécheresse aurait donc un grand impact sur la richesse des microorganismes au sein de leurs habitats (Arnold et al., 2007). Enfin, à la lumière de ces résultats, nous avons dressé un schéma qui résume ces hypothèses. La figure 40, illustre

en effet, l'ensemble des facteurs relatifs à l'habitat et à l'espèce hôte qui peuvent influencer la composition des microorganismes foliaire en bactéries et en champignons.

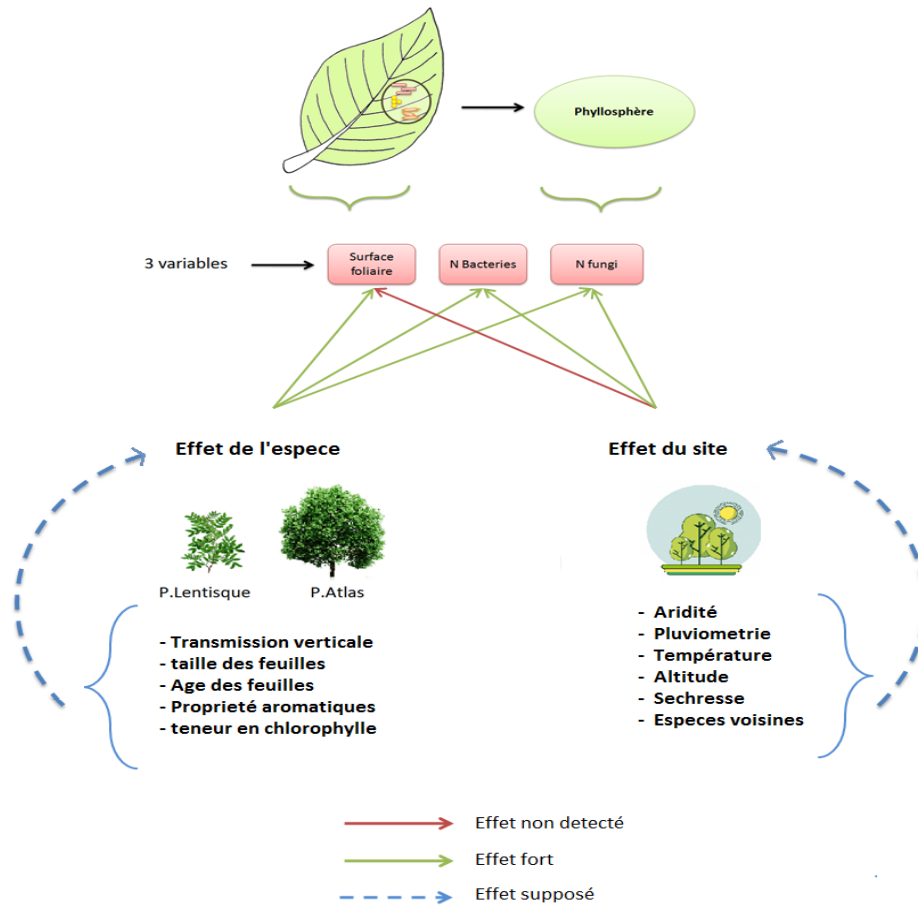


Figure 40: Synthèse des résultats principaux de la partie microbiologique (Original, 2020)

## IV.2. Etude génomique des fungi

Dans cette seconde partie, nous allons présenter les résultats de l'étude génomique sur la table d'OTUs qui résulte du séquençage Illumina, cette matrice a été préalablement prétraitée par des logiciels bioinformatiques (Figure 35), elle est désormais débarrassée des étiquettes, amorces, adaptateurs, chimères ainsi que toutes les contaminations pouvant provenir du séquençage des gènes ou de l'environnement de travail. Dans le même sillage que la partie précédente, les résultats seront divisés en deux parties, d'abord une étude statistique de l'ensemble des OTUs, ensuite une étude sélective et taxonomique pour cerner les OTUs responsables des différentes démarcations ainsi qu'une étude d'identification génomique des

nouvelles séquences obtenues. Une liste des champignons pathogènes sera dressée pour chaque espèce avec une illustration d'un model théorique de la phyllosphère du pistachier. Enfin, nous allons discuter ces résultats afin de comprendre la composition, l'organisation ainsi que la distribution de la phyllosphère des deux espèces de pistachier. Pour cette partie, nous avons utilisé les données climatiques de l'année d'échantillonnage (2014), car les fungi endophytes et épiphytes sont très sensibles aux variations, même saisonnières, cependant, comme le stipule notre conclusion de la synthèse climatique dans le chapitre 4, cette étude annuelle a divisé nos stations exactement de la même manière que l'étude bioclimatique sur plusieurs années, soit trois grandes zones de stations, Ouamri et Harbil, les deux sites de Berrouaghia et les deux sites les plus arides, Ain Oussera et El Hamel (Figure 27).

#### IV.1.2.1. Etude statistique de l'ensemble des OTUs

Pour cette étude d'ensemble, nous avons utilisé le package "Vegan" du logiciel R avec plusieurs bibliothèques, sur une matrice raréfiée 100fois, il est important de mentionné que notre jeu de données contient en totalité **1259183** séquences assignées à **520** OTUs.

#### VI.1.2.1.1. Effet de l'espèce et de la zone climatique sur la composition des communautés fongiques foliaires

Pour cerner l'effet de l'espèce et du site sur la composition fongique de la phyllosphère, on présentera en premier, les résultats d'une PERMANOVA. Cette analyse multivariée a été utilisée sur les matrices de dissimilarités. La différence a été calculée au seuil de signification  $p < 0,001$ , elle a été réalisée afin d'étudier individuellement, l'effet du site et de l'espèce sur l'ensemble des OTUs sur les sites d'échantillonnage. Un effet hautement significatif de l'espèce et très significatif du site a été enregistré (Tableau 10).

Tableau 10: Analyse permutatonnelle multivariée de la variance de la dissemblance compositionnelle entre les assemblages fongiques phyllosphériques le long d'un gradient d'aridité.

Source	Df	Somme de sequences	F
Espèces ( <i>P. atlantica</i> x <i>P. lentiscus</i> )	1	0,9064	0,001***
Site × <i>P. atlantica</i>	2	1,1761	0,006**
Site × <i>P. lentiscus</i>	2	1,9677	0,008**

#### **IV.1.2.1.2. Représentation de la dissimilarité entre échantillons sur une NMDS**

En deuxième lieu, nous avons dans la figure 41, une dissemblance de l'assemblage fongique de la phyllosphère entre les six sites d'échantillonnage représentant une mise à l'échelle multidimensionnelle non métrique (le triangle représente le pistachier de l'Atlas, le cercle le pistachier lentisque et le code couleur est pour les trois zones climatiques, le vert pour le subhumide, le bleu pour le semi-aride et le rouge pour les sites les plus arides). Cette NMDS divise clairement les deux espèces en deux ellipsoïdes (de droite vers la gauche), les sites sont séparés de bas en haut, avec les sites les plus arides, Ain Oussera et El Hamel qui se rapprochent; les sites de Berrouaghia 1 et 2, Ouamri et El Hamel se regroupent plus en bas sur la figure. De plus, on remarque quelques individus du site Berrouaghia 2 qui se sont glissés parmi les sites arides .

#### **IV.1.2.1.3. Effet de l'espèce et du site sur la diversité, la richesse et l'équitabilité des communautés fongiques foliaires**

Après avoir cerné les facteurs qui modulent la composition de la phyllosphère, il est important d'étudier les notions de la biodiversité, en effet, on ne peut pas évoquer la notion de l'espèce sans parler des concepts de diversité, de richesse et d'équitabilité. Ces notions définissent la manière dont les espèces sont présentes au sein de leurs habitats ainsi que leur distribution à l'intérieur de ce dernier, d'où l'importance de cette analyse.

##### **IV.1.2.1.3.1. La diversité**

La diversité est reflétée par le nombre d'espèces présentes sur la feuille, pour notre étude on compte exactement 520 OTUs sans redondance, nous avons étudié ce facteur par un "GLM", modèle linéaire généralisé (Figure 42A) avec une analyse de variance présentée dans la Figure 42D, la différence a été calculée au seuil de signification  $p < 0,001$ . La matrice de dissimilarité montre que la diversité fongique au sein de nos bioclimats est fortement significative ( $p = 0,0013$ ), il y a donc un effet du site concernant la richesse fongique de la phyllosphère des deux espèces de pistachiers, parallèlement, elle reste plutôt homogène à l'intérieur de la même espèce , c'est à dire que la richesse est hétérogène entre les 3 zones climatiques mais elle reste plutôt similaire au sein d'une même espèce, il n'y a pas donc d'effet de l'espèce sur la diversité.

#### **IV.1.2.1.3.2. La richesse**

La richesse, ou comme on l'appelle également "la diversité alpha", est une autre mesure de la biodiversité, elle renvoie au nombre total des microorganismes dans leur habitat, c'est-à-dire le nombre total des OTUs avec leurs répétitions respectives, on a en effet plus de 500 OTUs avec une abondance qui peut atteindre 143602 par échantillon. Effectivement, le nombre total des OTUs séquencées avec les répétitions est très grand, cette même analyse 'GLM et ANOVA' nous a permis de connaître les facteurs qui modulent cette diversité, ici également, la zone climatique définit plus la diversité que l'espèce hôte, l'effet de l'espèce est plutôt non significatif (Figure 42C, 42D).

#### **IV.1.2.1.3.3. L'équitabilité**

L'équitabilité des espèces est une autre notion de l'écologie évolutive, c'est un moyen de mesurer la biodiversité. Elle reflète la distribution plus ou moins égale des OTUs au sein des échantillons. En effet, elle renseigne sur l'abondance relative des différentes espèces ou la proportion des individus en leur sein. Dans la figure 42B, un GLM qui représente cette variable concernant nos trois zones climatiques, en association avec les résultats de l'ANOVA (Figure 42D), on déduit un très fort effet du site ( $P=0,0011$ ), l'équitabilité est donc très liée à la zone climatique, elle est cependant non significative au sein de l'espèce.

Figure 42: Effet de la diversité, de la richesse et de l'équitabilité sur les trois zones climatiques (semi- aride pour Berrouaghia1, Berrouaghia 2 ; subhumide pour Harbil et Ouamri ; et aride pour Ain Oussera et El hamel).

#### **IV.1.2.1.4. Histogrammes taxonomiques par site et par espèce**

En premier lieu, un histogramme taxonomique a été effectué, cette analyse a pris en considération la proportion de séquences de chaque ordre de champignons, et ceci pour chaque échantillon, nous en avons, en tout, 18 avec trois répétitions pour chaque site, avec « A » pour le pistachier de l'Atlas, « L » pour le pistachier lentisque, et les chiffres 1, 2, 3 pour les trois zones climatiques respectives.



Pour ce premier histogramme, nous avons, représenté en rouge, l'ensemble des Ascomycètes et quelques champignons non identifiés qui sont en petit nombre par rapport au reste des OTUs, la raison de la couleur similaire des deux groupes (Ascomycètes et non identifiés) est que les couleurs des histogrammes taxonomiques sont attribuées aux groupes similaires par dégradation de couleurs, il se fait que les champignons avec moins de 80% d'assignation ont été classés comme non identifiés, cependant selon la base fongique UNITE, la plupart appartenait aux Ascomycètes, c'était la seule information que nous avons pu obtenir (Ascomycètes non identifiés). Nous allons par la suite faire une identification de ces derniers qui consolidera cette assignation.

Les Ascomycètes sont donc majoritaires dans la composition de la phyllosphère des deux pistachiers avec quelques OTUs appartenant aux ordres des Glomeromycètes, Chitridiomycètes et Basidiomycètes (Figure 43). Pour une meilleure visibilité des démarcations établies lors des parties précédentes, au niveau taxonomique, nous avons fait un deuxième histogramme taxonomique, mais cette fois avec l'abondance relative de chaque taxon fongique dans chaque échantillon par classes.

A première vue, on peut relever une démarcation dans le code couleur attribué à chaque taxon entre les deux espèces de pistachier, la phyllosphère du pistachier de l'Atlas est plus riche en Eurotiomycètes, Dothideimycètes et Cystobasidiomycètes tandis que le lentisque compte plus de Saccharomycètes et de Pezizomycètes dans sa composition en champignons phyllosphériques (Figure 44).

#### **IV.1.2.2. Isolation des OTUs représentatifs**

A la lumière de ces résultats, nous savons, désormais, quels sont les facteurs climatiques, stationnels ainsi que les variantes de la biodiversité qui modulent la composition de la phyllosphère des espèces étudiées ; grâce aux histogrammes taxonomiques, nous avons une idée des grands taxons qu'abritent ces sphères, cependant, il est impératif d'aller plus loin en isolant les OTUs responsables de ces affinités. Pour cela, nous allons présenter les résultats de l'étude sélective et taxonomique des OTUs. En fait, notre matrice présente un nombre astronomique de

séquences, soit, un total de **1259183** séquences nucléotidiques, ce grand nombre présente des champignons qui peuvent parfois appartenir à la même espèce, à partir de ce principe, nous avons regroupé chaque séquence qui présente la même assignation taxonomique à un seuil de 80% de similitude dans une seule OTU.

Les séquences brutes obtenues avec le séquençage Illumina ont nécessité un traitement bioinformatique afin d'obtenir la table d'OTUs finale. Dans ce travail, des barcodes des régions ITS ont été utilisés, donc on sait déjà qu'il s'agit de champignons. La séquence consensus de chaque OTU a ensuite été confrontée à une base de données afin de l'assigner à un taxon connu. On a d'abord pensé à comparer ces données à la principale base de données fongique UNITE (Abarenkov et al., 2010), mais étant une base fongique, on risquait de voir quelques séquences d'origine végétale s'immiscer dans notre liste de champignons, on a donc utilisé l'interface en ligne BLAST sur la base de données internationale de séquences nucléotidiques GenBank (Madden, 2013).

Grâce à l'assignation sur BLAST, nous avons pu organiser ce nombre en exactement **520 OTUs**, avec à l'intérieur, le nombre exacte de répétitions, ou d'abondance relative à chaque taxon. Ces dernières n'incluent pas les contaminations dues au séquençage. En effet, notre matrice a été préalablement purifiée (Figure 33). Pour chacune des OTUs, en plus de l'abondance, nous avons la séquence nucléotidique correspondante au fragment ITS, c'est grâce à ces dernières que nous allons percer le mystère des OTUs non identifiées par la première requête de BLAST.

Les résultats précédents gravitent autour de deux grands axes, la zone climatique et l'espèce hôte, pour cela nous allons d'abord présenter les OTUs caractéristiques de chaque espèce et de toutes les stations séparément. Ensuite, on présentera les OTUs ubiquitaires, et enfin, une isolation de quelques champignons pathogènes du pistachier recensé grâce à cette étude taxonomique.

#### **IV.1.2.2.1.vérification du témoin**

Avant de commencer, il est important de citer le nombre total de séquences dans notre 19eme échantillon, répétitions inclus, qui représente la somme des trois puits de témoins négatifs, elles sont au nombre **13**, un nombre infiniment petit par rapport aux **1259183** séquences

obtenues, c'est une preuve que nos manipulations se sont déroulées dans des conditions d'hygiène parfaites grâce aux manipulations sous PSM.

#### **IV.1.2.2.2. Présentation des OTUs les plus abondantes chez le pistachier de l'Atlas**

Tout d'abord, les OTUs sont classées d'une manière ascendante de 1 à 520 par la valeur de l'abondance relative de chaque taxon. Pour cerner les unités taxonomiques opérationnelles caractéristiques de chaque espèce, nous avons séparé la matrice pour les deux espèces de pistachiers, les OTUs les plus abondantes ont été isolées, ensuite, nous avons mis de côté les OTUs ubiquitaires, de cette manière elles sont propres à la phyllosphère de chaque espèce.

En raison du grand nombre de séquences, nous avons pris un seuil minimum de 600 pour l'abondance de chaque taxon, les OTUs les plus représentatives pour les deux espèces, avec leurs abondances respectives, sont présentées dans le tableau 11. Dans ce tableau, nous avons sélectionné les OTUs avec une somme totale de l'abondance relative à chaque taxon, c'est à dire, que ce nombre représente le minimum de séquences totales de la même OTU, distribué dans nos échantillons.

La somme de l'abondance est calculée pour chacune des espèces, ce tableau relève une démarcation claire entre la richesse de la phyllosphère du pistachier lentisque et celle du pistachier de l'Atlas, par exemple les OTUs 10, 18, 31, 33 et 165 sont carrément au nombre de 0 pour l'une des espèces, tandis que les OTUs 1 et 2 affichent des valeurs 100 fois plus importantes dans une espèce par rapport à l'autre. Ces séquences sont alors hautement spécifiques aux espèces hôtes.


Concernant la phyllosphère du pistachier de l'Atlas, nous avons obtenu de notre matrice les 18 OTUs qui figurent dans le tableau 11, elles sont très liées cette espèce, ce sont bien celles-ci qui sont en partie responsables de l'affinité pour l'espèce hôte. La phyllosphère du pistachier de l'Atlas n'a jamais fait l'objet d'une identification génomique, pour cela, beaucoup de ces espèces s'avèrent être nouvelles et totalement inconnues des banques génomiques.

Le tableau 12 regroupe les résultats de l'assignation taxonomique des fungi liés au *P. atlantica*. Ce tableau contient toutes les informations nécessaires pour reconnaître et classer une séquence dans une base de données nucléotidique, d'abord, la première case indique le numéro de l'OTU, c'est-à-dire son classement dans notre matrice, de 1 à 520 selon l'abondance.

Deuxièmement, le numéro d'accèsion de GenBank, pour l'obtenir, toute séquence a requis une étude individuelle ainsi qu'une soumission de la séquence sur le portail de la base, suite à la soumission de toutes ces OTUs en mars 2018, et l'acceptation de l'introduction de ces séquences sur GenBank, des numéros d'accèsions nous ont été fournis, ce code est une nouvelle étiquette que ces OTUs porteront désormais sur les bases de données, il suffit de rentrer ce dernier sur la base pour avoir toutes les informations relatives à la séquence ainsi que le protocole expérimental de l'étude (Figure 45).

>OTU12  
 CACCACTCAAGCATTGCTTGGTATTAGGCACTCGTCCGTCCTCGTGGCGGGCGGGCCTCAAACCTTC  
 GGCGAAGTCACACCGGCTTTGGGCGCAGTAGAATCATCTTAAACGCTCTGTGAGTCCGGTCTGAGTCTT  
 TTGCCGCGAAAGATTCTACGAATCATTTTTTAAAGG

Requête sur BLAST n



Numéro d'accèsion fournis par GenBank  
 Avec un lien pour toutes les informations  
 sur l'étude

**Isolat de champignon non cultivé OTU12 espaceur interne transcrit 2, séquence partielle**  
 ID de séquence: [MG992007.1](#) Longueur: 175 Nombre de correspondances: 1

Gamme 1: 1 à 175 [GenBank](#) [Graphics](#) [Prochain match](#) [Match précédent](#)

But	Attendre	Identités	Lacunes	Brin
324 bits (175)	1e-84	175/175 (100%)	0/175 (0%)	Plus / Plus

```

Requête 1 CACCACTCAAGCATTGCTTGGTATTAGGCACTCGTCCGTCCTCGTGGCGGGCGGGCCTC 60
Sbjct 1 CACCACTCAAGCATTGCTTGGTATTAGGCACTCGTCCGTCCTCGTGGCGGGCGGGCCTC 60
Requête 61 AAAACCTTCGGCGAAGTCACACCGGCTTTGGGCGCAGTAGAATCATCTTAAACGCTCTGT 120
Sbjct 61 AAAACCTTCGGCGAAGTCACACCGGCTTTGGGCGCAGTAGAATCATCTTAAACGCTCTGT 120
Requête 121 GAGTCCGGTCGAGTCTTTTCCCGCGAAAGATTCTACGAATCA tttttt AAAGG 175
Sbjct 121 GAGTCCGGTCGAGTCTTTTCCCGCGAAAGATTCTACGAATCATTTTTTAAAGG 175
  
```

Figure 45: Exemple du résultat de la requête Blast pour l'OTU12 (Originale, 2020)

La troisième case affiche le numéro d'accèsion de la correspondance la plus proche, c'est-à-dire, que cette séquence est celle qui se rapproche le plus de la notre, avec un pourcentage de 100% pour la majorité de nos séquences, cette valeur est mentionnée dans la quatrième case, elle reflète le degré de similitude, en d'autres termes "le score". La cinquième case, est celle de l'assignation taxonomique de cette séquence qui ressemble à 100% à la notre, suite à un algorithme d'alignement multiple de séquences, de cette manière on peut conférer le même nom

à notre séquence au début inconnue. Enfin, la sixième case représente les références bibliographiques de la correspondance la plus proche, en effet chaque soumission sur GenBank, suite à l'attribution du numéro d'accession, affiche systématiquement les références des auteurs de la recherche correspondante. Cela permet d'avoir une traçabilité des recherches scientifiques sur le web.

Dans le tableau 13, il ya 9 OTUs non assignées par la première requête de BLAST. Il s'agit des OTUs 14, 11, 12, 19, 18, 22, 31, 28 et 29. Pour assigner ces derniers, nous avons fait une recherche approfondie sur BLAST n (nucléotidique) avec une requête individuelle, nous avons pu obtenir des assignations pour toutes les séquences à part les OTUs 12, 19, 22, 28, 29 et 30 (Tableau 13).

#### **IV.1.2.2.4. Présentation des OTUs les plus abondantes chez le pistachier lentisque**

Nous avons effectué la même étude avec le pistachier lentisque, les résultats de l'assignation taxonomique sont présentés dans le tableau 14, néanmoins, pour cette espèce également on a eu recours à une assignation individuelle concernant l'OTU 16, ce dernier résultat est également présenté dans le même tableau.

Cependant l'OTU 32 demeure inconnue, pour cette séquence, nous avons effectué une annotation génomique, mais la seule information que les différentes banques nous ont fournie est qu'il s'agit d'un Ascomycète, c'est probablement une espèce nouvelle de champignon qui est propre au lentisque algérien (Figure 45). Par ces études taxonomiques, nous avons identifié l'ensemble de nos séquences relatives aux deux espèces de pistachiers, mais on note que les 3 premières OTUs ont été assignées par des études précédentes comme étant un ADN végétal, étant sûrs de la sélection des barcodes ITS utilisées, nous pensons que ces études ont dû confondre ces champignons au cours d'une étude foliaire, nous avons, alors, également apporté cette information au portail de GenBank, quelques études les ont également assimilé à des séquences fongiques, elles demeurent probablement de nouvelles espèces fongiques très liées à nos espèces avec une abondance qui dépasse les 100000 séquences pour chacune d'entre elles.

l'OTU1 est spécifique du pistachier de l'Atlas, l'OTU2 est très liée au lentisque tandis que l'OTU3 est ubiquitaire du genre.

#### IV.1.2.2.5. Isolation des OTUs ubiquitaires

La présence d'OTUs ubiquitaires peut avoir plusieurs explications, elles sont très liées aux espèces de pistachier étudiées, nous les avons relevé grâce à une étude de l'abondance relative de chaque taxon chez les deux espèces, avec un seuil minimum de 600 pour l'abondance. Les résultats de cette recherche font ressortir sept OTUs ubiquitaires, il s'agit des OTU3, OTU6, OTU7, OTU232, OTU9, OTU17 et OTU13. Le tableau 15 présente ces OTUs avec leurs abondances relatives au sein de chaque site. Nous les avons identifiées grâce à une recherche d'assignation individuelle pour chacune d'elles, les résultats sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 15: Présentation des OTU ubiquitaires avec leurs abondances dans chaque site

	Ouamri	Berrouaghia1	Ain Oussera	Harbil	Berrouaghia2	El Hamel
<b>OTU_3</b>	93899	13164	20	15061	468	597
<b>OTU_6</b>	10	1166	228	5584	4706	13042
<b>OTU_7</b>	1790	8330	3348	547	502	2690
<b>OTU_232</b>	2384	7020	2	2923	197	94
<b>OTU_9</b>	2123	1586	177	1664	694	876
<b>OTU_17</b>	72	447	329	309	961	373
<b>OTU_13</b>	32	84	403	159	19	1530

Tableau 16: Identification des OTUs ubiquitaires

OTU Ubiquitaires	Assignation taxonomique
	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	<i>Endoconidioma</i> sp.
	<i>Ascochyta rabiei</i>
	<i>Aureobasidium</i> sp.
	<i>Cladosporium</i>
	<i>Sacrothecium sepincola</i>
	<i>Dothiorella</i>

#### IV.1.2.2.6. Isolation des OTUs relatifs aux zones climatiques

Pour cette partie, nous avons également procédé par espèce, les OTUs relatives à chaque site ont été isolées de cette manière, d'abord les abondances relatives aux OTUs des trois sites du pistachier de l'Atlas seront présentées dans le tableau 17, ensuite le tableau 18 englobera ceux des stations du pistachier lentisque.

Tout comme pour l'espèce hôte, la zone climatique présente de grandes affinités avec la composition de la phyllosphère au sein de chaque espèce. Concernant les trois sites du pistachier de l'Atlas, on note que les OTUs 22 et 29 sont très spécifiques du site semi-aride d'Ouamri, les OTUs 19, 20, 26, 165 et 30 sont caractéristiques du site subhumide de Berrouaghia tandis que les OTUs 18, 31, 33 et 28 sont très liées au site aride d'Ain Oussera.

Cependant, on remarque la présence de certains OTUs (8, 14, 11, 22, 38, 25) sur les deux sites subhumide et semi-aride seulement, sans jamais relever aucune présence commune de ces OTUs entre le site aride et les autres sites. Pour les sites du pistachier lentisque, on relève plusieurs OTUs caractéristiques du site le plus aride, El Hamel (OTU16, 18, 24, 37 et 47), et un champignon pour le site semi-aride de Harbil, il s'agit de l'OTU15.

Tableau 17: Expression des OTU dans les localités de *P. atlantica* représentatives des OTU arides, semi-arides et subhumides.

OTU	Ouamri	Berrouaghia1	AinOussera	OTU	Ouamri	Berrouaghia1	AinOussera
8	3038	3401	1	26	5	1024	0
14	3340	1612	0	22	21	841	0
11	934	2869	34	38	424	261	0
19	8	2004	0	25	18	646	1
20	20	1849	0	33	0	0	665
18	2	2	1618	165	21	628	10
26	5	1024	0	30	3	592	0
22	21	841	0	28	0	0	591
31	0	0	767	29	457	65	55

Tableau 18: Expression des OTU dans les localités de *P. lentiscus* représentatives des OTU arides, semi-arides et subhumides.

OTU	Harbil	Berrouaghia2	El Hamel	OTU	Harbil	Berrouaghia2	El Hamel
15	1393	0	449	34	78	9	849
16	333	6	1306	37	0	0	422

17	309	39	1074	47	21	1	385
----	-----	----	------	----	----	---	-----

Pour synthétiser les résultats de l'isolation des OTUs représentatives de l'espèce hôte et de la zone climatique, ainsi que les espèces ubiquitaires, nous avons résumé l'ensemble de ces informations dans la figure 47. En effet à partir d'un ensemble de 520 OTUs, certaines séquences sont en partie responsables de l'affinité des composants fongiques de la phyllosphère pour l'espèce hôte et la zone climatique, identifiées par des requêtes individuelles de BLAST, ces dernières restent hautement spécifiques.

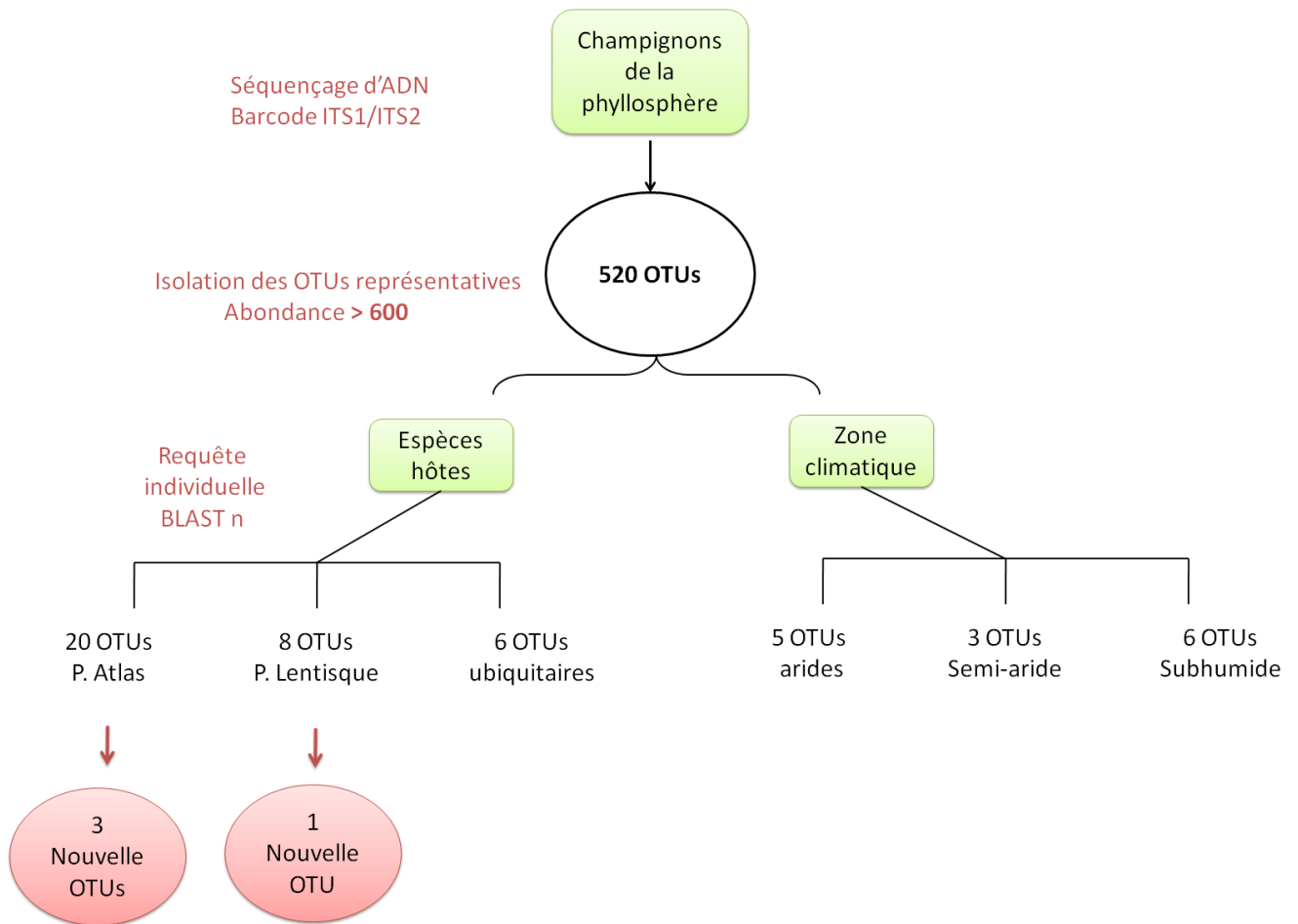


Figure 47 : Synthèse des résultats du tri des OTUs (Originale, 2020)



#### **IV.1.2.2.7. Isolation des OTUs pathogènes:**

Aussi vrai que les champignons de la phyllosphère sont bénéfiques pour la plante, ils sont en partie aussi connues pour être des bio-agresseurs et pathogènes des végétaux, en écologie évolutive il est primordial de connaître ces espèces afin de pallier aux pathologies que ces derniers provoquent. Pour définir les phytopathogènes liées à nos espèces de pistachiers, nous avons fait une recherche taxonomique sur les OTUs les plus abondantes, au sein de chaque espèce et des deux au même temps, les résultats de ces recherches sont présentés dans la figure 48.

### **IV.2. Discussions et hypothèses**

Dans ce travail de recherche, nous nous sommes intéressé à l'une des sphères microbiennes les plus importantes et abondantes à l'échelle terrestre, la phyllosphère abrite des communautés très complexes de microorganismes, nous avons mené des recherches pour connaître la composition de ces petites niches biologiques sur deux espèces de pistachier, le lentisque et le pistachier de l'Atlas. Cette composition est très diversifiée et fortement modulable par différents facteurs, nous allons, donc, discuter de la manière dont ces espèces arrivent à cohabiter et leurs relations complexes et parfois pathogène avec leurs hôte.

#### **IV.2.1. Composition fongique de la phyllosphere des deux espèces étudiées**

Les feuilles du genre *Pistacia* abritent de petits êtres microscopiques, endophytes et épiphytes. Dans cette partie de la thèse, nous avons traité ces deux aspects des champignons de la phyllosphère des deux espèces de pistachiers étudiées. D'abord, la phyllosphère de nos deux espèces est très abondante, elle peut atteindre un nombre de séquences très important, par exemple, notre premier échantillon de la première OTU contenait 143602 séquences fongiques sur un morceau de feuille de 4 mm de diamètre, tandis qu'une étude comparative entre plusieurs espèces hôtes dans le bassin méditerranéen affiche un nombre maximum de l'abondance relative de 233 espèces par échantillon (Vokou et al., 2019). De même, la nature de l'échantillon peut donner un résultat très différent. Les feuilles, par exemple, portent plus de microorganismes que les racines; une étude sur la rhizosphère de plusieurs plantes affiche un maximum de 23 séquences par échantillon (Hamad et al., 2018). De prime abord, la composition fongique de la phyllosphère des deux espèces de pistachiers est très riche et diversifiée, cependant elle se réunie

autour d'un ordre majoritaire par rapport aux autres, en effet, ces champignons appartiennent essentiellement aux Ascomycètes (Figure 43), les quelques Basidiomycètes relevés s'avèrent être des parasites, telle que la levure pigmentée *Rhodothorula* sp. (OTU38), ou bien d'origine environnementale comme *Cryptococcuschernovii* sp. (OTU 47). Cette dernière OTU s'avère être une nouvelle espèce de levure fibrobasiidiée spéciale des milieux extrêmes, une étude l'a isolé de la réserve de biosphère de Prioksko-terrasny en Russie (Wladyslav et al., 2006). Ce genre d'espèce pourrait être parfait comme une empreinte environnementale des milieux arides, elle est présente avec 385 séquences dans la station d'El Hamel contre une abondance relative de 21 séquences pour le reste des échantillons.

Le pistachier de l'Atlas rassemble un grand nombre de champignons rares ou non identifiés, en effet sa phyllosphère est très peu connue, nous avons alors dressé une liste caractéristique de la composition phyllosphérique de cette espèce (Tableaux 12 et 13). Plusieurs de ces champignons s'avèrent être des endophytes tels que les OTU20, 17 et 24. Ce pistachier est une espèce protégée, pour sa sauvegarde il est primordial de cerner les différentes maladies qui peuvent la détériorer, dans ce travail, nous avons isolé plusieurs champignons pathogènes du pistachier de l'Atlas (Figure 48), ils peuvent être responsables de plusieurs maladies, essentiellement des endophytes, ils attaquent la plante depuis l'intérieur des tissus (Kirschner et al., 2018) tel que *Peyronellaea glomerata* (OTU165) et *Pseudocercospora* sp. (OTU10), ces agents pathogènes détériorent les feuilles de l'arbre.

La composition fongique du pistachier lentisque, quant à elle, compte un grand nombre d'Ascomycètes, dont plusieurs endophytes originaires du sol, qui ont colonisé les feuilles par transmission verticale telle que *Cryptococcuschernovii* sp. (OTU 46). Le lentisque compte plusieurs pathogènes aussi (Figure 48), *Sydowiapolyspora* sp. (OTU37) est un champignon pathogène très rare relevé sur les conifères (Lazarevic et al., 2020), c'est la première étude qui lie au lentisque ; *Pseudoseptoriaobscura* sp. (OTU16) est un champignon rare endophyte originaire du sol qui est responsable des taches noires sur les feuilles (Verkeley et al., 2013).

Les champignons ubiquitaires aux deux espèces peuvent être caractéristiques du genre *Pistacia*, on note que quelques-unes sont spéciales des essences forestières c'est le cas de l'OTU3 *Aureobasidium pullulans*. Une étude comparative entre les cultures agricoles et les arbres forestiers l'a répertorié comme une empreinte des milieux forestiers (Castaneda et al., 2018). Quelques-unes causent des pathologies pour l'homme, ce sont de grands allergènes, cas de

*Aureobasidium* sp. (OTU 232), ce dernier est retrouvé dans les zones tempérées d'une moyenne de 762 d'abondance, cité dans une étude sur les plantes méditerranéennes (Pereira et al., 2002), tandis qu'il est présent avec une abondance relative moyenne de 6854 séquences sur nos échantillons. Certains de ces fungi ubiquitaires sont très intéressants pour l'espèce hôte, cas de l'OTU17, *Saccolobium sepincola* qui s'avère être un inhibiteur des bactéries pathogènes (Dubois et al., 1982), pouvant ainsi être à l'origine d'une certaine résistance vis-à-vis des conditions défavorables du milieu.

#### **IV.2.2. Facteurs qui modulent la composition fongique phyllosphérique**

Nous avons déjà remarqué que les microorganismes de la phyllosphère sont très sensibles aux variations, qu'elles soient environnementales, stationnelles ou caractéristiques de l'espèce hôte. Nos résultats illustrent l'impact que ces différents facteurs ont sur cette composition complexe.

##### **IV.2.2.1. Effet de l'espèce hôte**

Dans un premier temps, les résultats de l'étude des OTUs en ensembles statistiques a démontré une grande affinité des champignons de la phyllosphère pour leurs espèces hôtes, effectivement la PERMANOVA (Tableau 10) affiche un effet très significatif de l'espèce hôte ( $p=0,001^{***}$ ). La dissemblance de l'assemblage fongique de la phyllosphère entre les six stations représentant une mise à l'échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS) a également séparé les deux espèces par deux ellipsoïdes (Figure 41). Enfin, l'histogramme de l'abondance relative de chaque taxon fongique dans chaque échantillon par classes (Figure 44) démontre une séparation visuelle entre la composition des deux espèces de pistachiers, ces résultats convergent vers une grande influence de l'espèce hôte sur l'ensemble des champignons de la phyllosphère des deux espèces. Dans un second temps, l'identification taxonomique des espèces fongiques, ont permis de mettre un nom sur ces OTUs caractéristiques des espèces et de comprendre la manière dont l'espèce hôte influence sa composition fongique phyllosphérique. De prime abord, l'origine même de la phyllosphère est très liée à cette notion, plusieurs de nos OTUs sont originaires du sol, cas de l'OTU 20 (*Querciphoma* sp.), elle est spécifique au pistachier de l'Atlas, c'est un champignon endophyte qui provient d'une transmission verticale (Madani et al., 2019), c'est-à-dire qu'il a accompagné l'espèce hôte depuis son stade germinale ce qui explique sa grande affinité

pour cette dernière, l'OTU 16 (*Pseudoseptoriaobscura* sp.) est également originaire du sol, c'est une espèce propre au lentisque, ce champignon est doté d'un grand pouvoir d'adaptation au substrat (Verkely et al., 2013). Il se lierait donc instinctivement à son espèce hôte. Les propriétés aromatiques de la plante sont, en grande partie, responsables de ce lien que le champignon créé avec son hôte. Par exemple l'OTU 15 (*Hyalodendriella* sp.), est un champignon omniprésent sur les feuilles du lentisque avec une abondance qui atteint les 1390 séquences par échantillon, cette espèce s'avère être dotée d'une grande activité antimicrobienne, en effet, cet Ascomycète endophyte permettrait l'extraction d'un principe actif appelé "benzopyranone" (Xiangjie et al., 2012). Ces champignons endophytes qui habitent les feuilles des plantes hôtes sont des sources nouvelles et riches de produits naturels bioactifs qui comprennent des alcaloïdes, des amines, des amides, des stéroïdes, des terpénoïdes, des isocoumarines, des quinines, des flavonoïdes, des phénylpropanoïdes, des lignanes, des phénols, des aliphatiques (Aly et al., 2010; Kharwar et al., 2011).

Dans une étude de Kembel et al. (2014), il est démontré que l'identité taxonomique des plantes hôtes expliquait plus de la moitié de la variation de la composition de la communauté fongique sur tous les arbres, et de nombreux traits fonctionnels reliés à la morphologie des feuilles, à la chimie des feuilles ainsi qu'à la croissance et à la mortalité de la plante sont significativement associées à la structure de la communauté fongique. L'espèce hôte s'avère donc être d'une grande influence sur la composition fongique phyllosphérique, la distance génétique entre arbres expliquerait mieux la structure des assemblages fongiques que la distance géographique, nos résultats suggèrent un effet significatif du génotype de l'hôte sur les assemblages fongiques associés, ce qui est en accord avec d'autres études en génétique des communautés (Bailey et al., 2009; Cordier, 2012).

#### **IV.2.2.2. Effet du site**

Les sites d'échantillonnage de cette étude diffèrent par leurs caractéristiques climatiques et stationnelles, cette hétérogénéité impacte fortement sur les assemblages fongiques de la phyllosphère des deux espèces de pistachiers. L'étude statistique de l'ensemble des OTUs démontre que les champignons affichent, indépendamment de l'influence de l'espèce hôte, une grande affinité pour la zone d'étude. La PERMANOVA (Tableau 10) indique qu'il existe un effet très significatif du site à l'intérieur de chaque espèce ( $p= 0,006^{**}$  pour le pistachier de

l'Atlas,  $p=0,008^{**}$  pour le pistachier lentisque). L'NMDS, quant à elle, départage les deux sites arides d'Ain Oussera et El Hamel des autres sites d'échantillonnage (Figure 41). La biodiversité au sein de cette sphère est également très influencée par le milieu, c'est-à-dire que la répartition des champignons sur la feuille dépend fortement de la zone d'étude, il ya un effet de la diversité et de l'équitabilité des champignons phyllosphériques sur les trois zones climatiques, la richesse demeure très peu variable au sein des différents sites ( $p=0,014$ ) (Figure 42). Une étude sur l'impact du réchauffement climatique sur les communautés fongiques des milieux forestiers a démontré qu'à l'inverse de la richesse, la composition des communautés fongiques montre une dépendance claire aux contraintes climatiques (Coince, 2013).

L'étude taxonomique nous renseigne plus clairement sur cette affinité, il y aurait des OTUs très caractéristiques aux sites, les OTUs 8, 14 et 11 sont par exemple très liées aux sites des étages bioclimatiques subhumides et semi-arides (Tableau16), tandis que les OTUs 16, 17, 37 et 47 sont caractéristiques de la zone aride, quelques-unes sont spécifiques à un site en particulier, telles que OTU 20 et 26 qui se trouvent seulement sur le site de Berrouaghia1 (Tableau 17). Globalement, la majorité de nos OTUs appartiennent aux Ascomycètes, ce règne serait plus sensible aux variations climatiques que les Basidiomycètes (Coince, 2013). L'origine de ces microorganismes pourrait fournir une explication à cette affinité pour le site, l'OTU 23 (*Alternariaalternata* sp.) est l'un des mycètes les plus communs de la flore fongique aéroportée, ses spores sont transportées par l'air en provenance des espèces avoisinantes (Abdel-Hafez et al., 1986), la distance entre ces espèces influencerait la composition fongique sur les feuilles (Fort, 2016), la transmission horizontale serait donc très dépendante du site. Cordier (2012) a beaucoup étudié la relation des champignons de la phyllosphère des arbres forestiers avec l'élévation, ce facteur s'avère fort déterminant pour la composition fongique ainsi que la distribution de ces derniers sur les feuilles. Cependant, il en résulte que la température apparaît comme la variable climatique la plus explicative le long d'un gradient altitudinal (Cordier, 2012), les structures paysagères telles que les lisières ou l'hétérogénéité du paysage influenceraient également la migration et la dispersion de nombreuses espèces fongiques (Fort, 2016). Les endophytes sont plus liés aux espèces hôtes tandis que les épiphytes peuvent être originaires de l'environnement avoisinant, pourtant dans une étude sur la phyllosphère de *Pegarum Harmala* dans dayate Aiat de Laghouat, les quotients de similitude (SQ) obtenus indiquent une forte similitude entre les communautés épiphytes et endophytes des feuilles de cette espèce. Cela est dû aux conditions

environnementales et climatiques que subissent les feuilles (Ouzid et al., 2018). Nous avons, également, étudié l'effet de la zone climatique selon un gradient d'aridité, cette notion dépend fortement de la température et la pluviométrie. La température est un des principaux facteurs climatiques pilotant le développement des champignons foliaires, elle influencerait, plus particulièrement, les champignons pathogènes (Cordier, 2012), cependant cette température n'est pas la même à l'intérieur des feuilles, la notion de "Body Température" pourrait expliquer la résistance de certaines espèces fongiques à des températures extrêmes (Bernard, 2012). Concernant la pluviométrie, tout comme pour la température, les champignons requièrent des conditions très particulières d'humidité atmosphérique pour se développer, généralement la colonisation des endophytes augmente en été durant la saison sèche (Helander et al., 1994). Coince (2013) dans sa thèse sur l'étude des champignons des milieux forestiers a démontré que les précipitations annuelles étaient fortement et inversement corrélées avec la composition fongique. En plus de son impact sur la croissance des espèces fongiques, la pluie s'avère être un facteur important de la dispersion de ces dernières (Fort, 2016), les gouttelettes peuvent déposer les microorganismes sur les feuilles, d'ailleurs les pluies estivales peuvent modifier la composition de la phyllosphère, d'où les variations de saisonnalité au sein de ces communautés (Cordier, 2012). Cependant, c'est la combinaison des deux facteurs, pluviométrie et température, qui procure les conditions optimales pour la survie des microorganismes ; dans une étude sur *Sclerotinia sclerotiorum* sur les pétales de Canola, le taux de croissance de ce champignon phyllosphérique a significativement augmenté dans des conditions d'humidité élevée pendant 24h à 20°C- 22°C (Bom et al., 2000). En effet, les champignons en dépit de leur grand pouvoir d'adaptation restent des êtres très exigeants, *Alternaria* par exemple requiert une quantité d'eau libre minimale ( $A_w$ ) variant entre 0,85mm et 0,88mm selon les espèces. Il peut croître à des températures de 2°C à 32°C (Samson et al., 2004), toutes ces exigences peuvent moduler la composition de la phyllosphère selon les conditions climatiques.

#### **IV.2.3. Symbiose au sein de l'habitat foliaire**

Les résultats de cette étude fongique sur la phyllosphère des deux espèces de pistachiers, nous renseignent énormément sur la manière dont ces microorganismes cohabitent, d'abord, on a isolé plusieurs champignons pathogènes au sein de cette sphère, ubiquitistes et pour chaque espèce séparément (Figure 48). Ces pathogènes sont parfois très présents avec une abondance qui peut dépasser les 10000 individus de la même espèce sur une surface 4mm<sup>2</sup> de la feuille,

cependant, en dépit de leurs pathogénicité, leurs présence sur les feuilles ne causaient pas de dommages apparents, leurs pathogénicité serait inhibé au sein de cette sphère, ces espèces seraient en fait contrôlées par d'autres microorganismes, par exemple l'OTU8 (*Saccothecium* sp.), une nouvelle espèce fongique très liée au pistachier de l'Atlas, a figuré dans une étude sur *Erwina amylovora* (un pathogène responsable des brûlures sur les feuilles), notre OTU 8 serait un bio-contrôleur de ce champignon pathogène (Khoury et al., 2020), c'est le cas aussi pour l'OTU 17 (*Saccothecium spincola*), affilié au pistachier lentisque. Ces résultats nous mènent vers une théorie tres intéressante, le traitement des microorganismes parasites pourrait se faire avec des méthodes naturelles issus des relations symbiotiques. L'OTU 24 (*Coniothyrium* sp.), un champignon de la phyllosphère du pistachier de l'Atlas, a été également identifié comme un agent de lutte biologique contre les pathogènes, c'est un bioremediateur potentiel de divers polluants carbonés, azotés ou phosphorés (Verkeley et al., 2004). De cette manière, les champignons censés être nocifs pour la plante arrivent à cohabiter sans causer de désagréments, ils interviennent une fois la feuille morte, lors de la dégradation de la litière forestière (Osono, 2002). En effet, ils jouent des rôles importants dans la décomposition de composants structuraux tel que la cellulose, les dynamiques nutritionnelles et l'accumulation de la matière organique du sol (Osono, 2006).

### **IV.3. Similitudes entre les deux parties d'études**

Les deux parties étudiées au cours de cette thèse sont complètement indépendantes, avec deux approches méthodologiques complètement différentes, mais elles suivent le même gradient d'aridité, nous avons en effet échantillonné sur les mêmes sites, cependant l'étude microbiologique présente beaucoup de similitudes avec l'étude génomique, premièrement les analyses de variances qui démontrent un fort effet du site et de l'espèce sur ces communautés phyllosphériques (Tableaux 9A et 10). Si l'on regarde de près l'ACP (Figure 39) de l'étude statistique de la première partie et l'NMDS (Figure 41), on remarque qu'elles convergent vers les mêmes résultats, voir une séparation des sites les plus arides des autres sites, avec le rapprochement du site de Berrouaghia 2 de ces deux sites, qui se situe à la limite inférieure du semi-aride (Figure 27).

#### **IV.3.1. Station de Berrouaghia 2 et réchauffement climatique ou pollution atmosphérique?**

A seulement 15,4km du premier site de Berrouaghia1, ce deuxième site de Berrouaghia 2 se rapproche des sites arides dans les résultats des deux études menées au cours de cette thèse. Géographiquement, situé plus au sud, mais plus proche des 3 autres sites de Médéa (Figure 23), cependant la composition de la phyllosphère pour les deux espèces étudiées au sein de ce site, présente des similitudes avec celles des sites les plus arides d'Ain Oussera et d'El Hamel. Cela pourrait s'expliquer par le changement climatique qui fait glisser cette région vers le semi-aride. On pourrait également penser que cette similitude dans la composition fongique phyllosphérique, est due à une lutte contre la pollution atmosphérique, en effet, cette station se situe à proximité d'une route nationale très fréquentée, nous avons cité des références dans les chapitres précédents faisant état de l'effet bioremediateurs de ces microorganismes. Enfin, pour comprendre pourquoi ce site, en particulier, présente tant de similitudes avec les zones arides, une étude comparative entre les deux sites de Berrouaghia est prévue en perspective.

#### **IV.4. Illustration théorique de l'habitat phyllosphérique**

Pour finaliser ce travail sur la phyllosphère du pistachier, il est intéressant d'organiser ces résultats en un modèle théorique de l'habitat phyllosphérique, nous avons étudié la composition de la phyllosphère ainsi que sa dynamique, dans cette dernière figure (Figure 49), plusieurs théories concernant l'organisation des microorganismes phyllosphériques ainsi que les facteurs qui modulent cette sphère seront émises, d'abord concernant les facteurs qui modulent l'habitat foliaire, ensuite l'origine de ces microorganismes, et enfin la manière dont ces êtres microscopiques cohabitent .



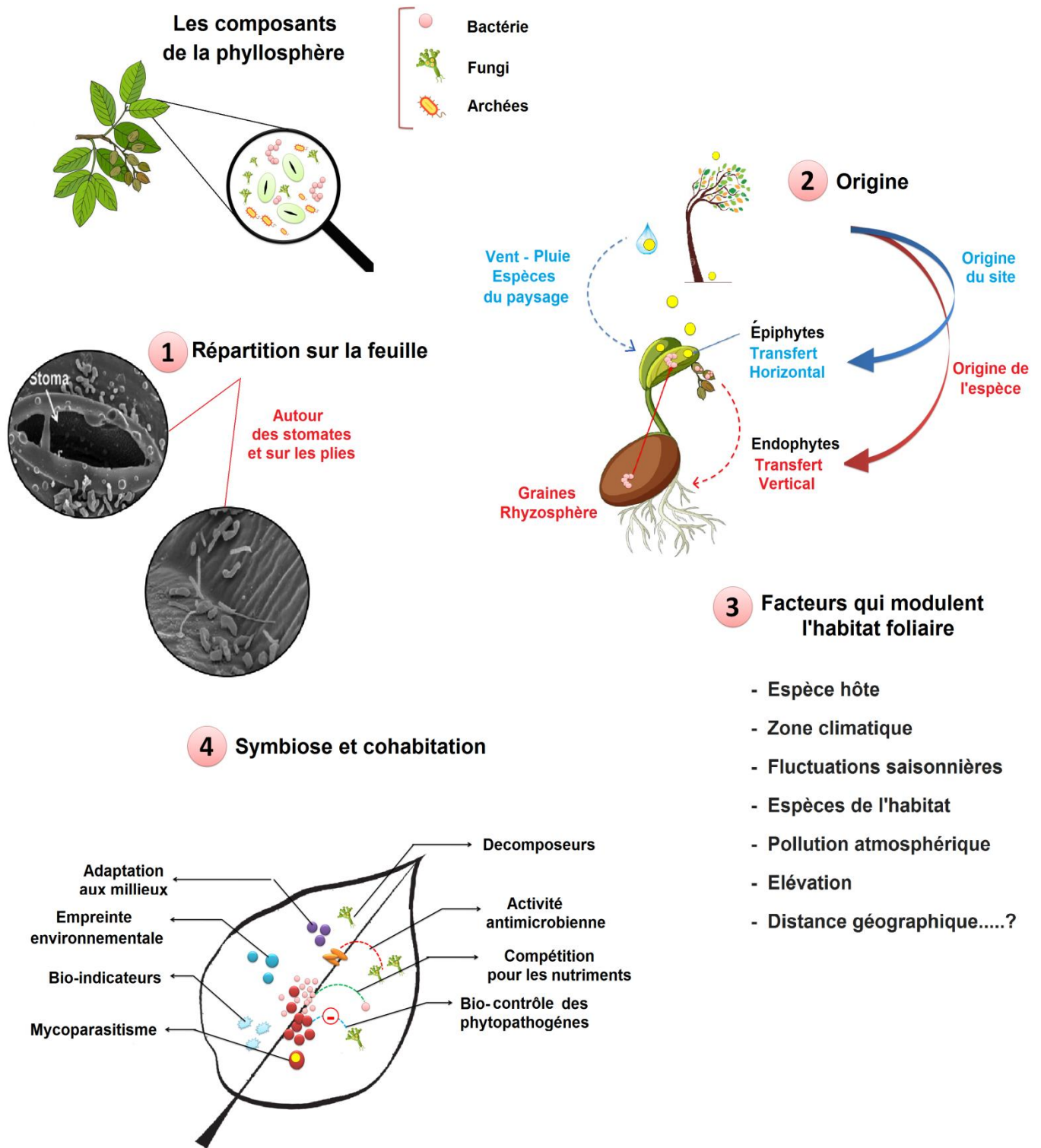


Figure 49: modèle théorique de la dynamique de l'habitat foliaire (Originale,2021)

#### **IV.5. perspectives**

Dans cette thèse, nous avons abordé une sphère microbienne très importante, la phyllosphère de deux espèces de pistachiers, ces deux espèces forestière et pré-forestière sont très importantes d'un point de vue médicinale et environnementale, mais pas seulement. Cette étude nous a également, éclairé, sur le comportement microbien au sein de cet habitat particulier de différents points de vues, depuis son origine jusqu'aux facteurs qui modulent sa composition. Nous avons en effet visualisé en partie la manière dont ces êtres microscopiques cohabitent en dépit de leurs différences, certains sont fort pathogènes et pourtant ils parviennent à vivre en symbiose avec les autres composants de l'habitat sans nuire à l'espèce hôte, ces conclusions nous ont ouverts d'autres perspectives d'études.

Il serait intéressant de compléter cette étude par le séquençage des bactéries de la phyllosphère de nos deux espèces de pistachiers, en effet une étude metagénomique des bactéries nous permettra d'enrichir notre modélisation de l'habitat foliaire, le fait de mettre un nom sur ces espèces, nous renseignera davantage sur cette partie de la sphère.

On aspire également à tester la relation de la composition de la phyllosphère sur l'aspect médicinal des feuilles, on a remarqué que les microorganismes foliaires sont très sensibles aux variations climatiques, ça serait fort pertinent de faire la relation entre ces composants et les différents principes actifs extraits des feuilles pour des fins thérapeutiques. C'est à dire que les propriétés médicinales des plantes pourraient être optimisées selon les conditions environnementales.

Aussi, la pathogénicité de ces microorganismes est une partie à approfondir, pour deux raisons, la première est que le pistachier est une espèce protégée, donc, répertorier les espèces pathogènes nous permettra de lutter pour sa survie. Deuxièmement, on pourrait nous inspirer de cette manière qu'ont ces pathogènes à être contrôlés naturellement par des mécanismes symbiotiques, pour éviter les traitements chimiques et nous orienter plutôt vers des recherches sur la lutte biologique contre les maladies des feuilles causées par ces pathogènes.

Enfin, on a pour prochaine ambition de créer une plateforme gratuite qui regrouperait les séquences génomiques des espèces propres à la flore algérienne, il suffit d'un effort collectif pour faciliter les prochaines recherches en écologie évolutive et génétique microbienne dans ce domaine en plein essor.

## *Conclusion*

---

La composition de la phyllosphère en champignons et bactéries des deux espèces de pistachiers, le pistachier de l'Atlas et le pistachier lentisque, est fortement corrélée à l'espèce hôte et aux variations climatiques et stationnelles des sites d'échantillonnage. Cependant, la température reste le facteur le plus déterminant dans ces affinités, elle modulerait la richesse fongique de ces sphères. L'aridité du site serait, en grande partie, responsable de cette distribution.

L'élévation, la pollution atmosphérique et la distance géographique entre les stations restent des facteurs à étudier en perspectives. Concernant l'influence de l'espèce, la composition des feuilles pourrait créer des affinités avec les microorganismes, des groupes se formeraient ainsi, probablement. L'étude taxonomique fongique nous a permis de comprendre la manière dont ces microorganismes cohabitent au sein de leurs habitats (foliaires), des mécanismes d'adaptation jusqu'à la dégradation de la litière forestière; le rôle écologique de ces ensembles est non négligeable. En plus, de l'ensemble des endophytes et épiphytes fongiques étudiés, nous avons identifié plusieurs champignons pathogènes, ce qui va contribuer à l'identification des agents responsables des maladies des deux espèces de pistachiers, et permettre ainsi de préserver ces espèces forestières.

Qu'il s'agisse d'espèces hôtes ou de climat, la composition de la phyllosphère reste très variable. Une meilleure définition des espèces endophytes et leur physiologie est nécessaire afin de mettre en évidence les différentes corrélations entre l'espèce hôte, son environnement et les endophytes. Des études complémentaires de ces ensembles avec le séquençage d'ADN des bactéries phyllosphériques permettront de compléter le profil de la composition de la phyllosphère des espèces de pistachiers étudiées. Ces mystérieux assemblages de microorganismes ne cesseront de livrer leurs secrets, car leur capacité à se moduler en fonction des zones climatiques nous renseigne beaucoup sur leur rôle écologique.

## Références bibliographiques

---

- Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Larsson, K.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., ... & Kõljalg, U. (2010).** The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186 (2), 281-285.
- Abdel-Hafez, SII., Shoreit, AAM., & Abdel-Hafez, AII. (1986).** Mycoflore et champignons producteurs de mycotoxines des particules de poussières atmosphériques d'Egypte. *Mycopathologie*, 93 (1), 25-32.
- Abdelkrim, H. (1985).** Les dayates du Sud de l'Atlas Saharien (Algérie). Colloques phytosociologiques XIII, Végétation et géomorphologie. Bailleul, Pp 361-371.
- Abdelouahab, S. (2014).** Contribution à l'étude des caractères physico-chimiques des sols des pinèdes (*Pinus Halepensis*) de la wilaya de Saida. Mémoire de Master, Faculté des sciences de la nature et de la vie, département d'écologie et environnement. 83p.
- Al-Saghir, M.G., Porter, D.M. & Nilsen, E.T. (2006).** Leaf anatomy of *Pistacia* species (Anacardiaceae). *J Biol Sci.*, 6: 242-244.
- Al-Saghir, M.G. & Porter, D.M. (2012).** Taxonomic revision of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae). *American Journal of Plant Sciences*, 3: 12-32.
- Altschul, SF, Gish, W., Miller, W., Myers, EW & Lipman, DJ. (1990).** Outil de recherche d'alignement local de base. *Journal de biologie moléculaire*, 215 (3), 403-410.
- Aly, AH, Debbab, A., Kjer, J., & Proksch, P. (2010).** Endophytes fongiques des plantes supérieures : une source prolifique de composés phytochimiques et autres produits naturels bioactifs. *Diversité fongique*, 41 (1), 1-16.
- Arnold AE., Maynard Z., Gilbert GS., Coley PD. & Kursar TA. (2000).** Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* 3: 267-274.
- Arnold AE., Mejia LC., Kylo D., Rojas EI., Maynard Z., Robbins N. & Herre EA. (2003).** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100: 15649–15654.
- Arnold, AE. & Lewis LC. (2005).** Evolution des endophytes fongiques et leurs rôles contre les insectes. *Avancées écologiques et évolutives dans les associations insectes-champignons* (F. Vega et M. Blackwell, éd.). Oxford University Press, Oxford. pp. 74-96
- Arnold, AE. & Lutzoni, F. (2007).** Diversité et gamme d'hôtes des endophytes fongiques foliaires : les feuilles tropicales sont-elles des hotspots de biodiversité ? *Écologie*, 88 (3), 541-549.
- Arnot, DE., Roper, C., & Bayoumi, RA. (1993).** Les codes numériques provenant de séquences d'ADN répétées en tandem hypervariables dans le gène circumsporozoïte de *Plasmodium*

falciparum peuvent génétiquement coder les isolats. *Parasitologie moléculaire et biochimique*, 61 (1), 15-24.

**Arora, D.K. (Ed.). (2003).** *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*. CRC Press.

**Arturo S-A., Yumi O., W Fernandes., Aaron Ball R & Gamon j.(2012).** Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. *Trees* (2012) 26:291-299 DOI 10.1007/s00468-011-0591-5

**Bagnouls, F. & Gaussen, H. (1953).** Saison sèche et indice xérothermique Bull., Hist., Nat., Toulouse, 88 : 143-239.

**Bailey, BA., Strem, MD. & Wood, D. (2009).** Les espèces de *Trichoderma* forment des associations endophytes au sein des trichomes de *Theobroma cacao*. *Recherches mycologiques*, 113 (12), 1365-1376.

**Bairoch, A., & Boeckmann, B. (1993).** The SWISS-PROT protein sequence data bank, recent developments. *Nucleic acids research*, 21(13), 3093.

**Bairoch, A., & Boeckmann, B. (1994).** The SWISS-PROT protein sequence data bank: current status. *Nucleic acids research*, 22(17), 3578.

**Barberán, A., Henley, J., Fierer, N., & Casamayor, E. O. (2014).** Structure, interannual recurrence, and global-scale connectivity of airborne microbial communities. *Science of The Total Environment*, 487, 187–195.

**Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., & Jacques, M.-A. (2015).** Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1257–1266.

**Beatty, PH et Jensen, SE. (2002).** *Paenibacillus polymyxa* produit des antibiotiques antifongiques de type fusaricine actifs contre *Leptosphaeria maculans*, l'agent causal de la maladie de la jambe noire du canola. *Revue canadienne de microbiologie*, 48 (2), 159-169.

**Beaugrand, G., Mackas, D., & Goberville, E. (2013).** Appliquer le concept de niche écologique et une approche macroécologique pour comprendre comment le climat influence le zooplancton : avantages, hypothèses, limites et exigences. *Progrès en océanographie*, 111, 75-90.

**Behrendt, U., Müller, T., & Seyfarth, W. (1997).** L'influence de l'extensification dans la gestion des prairies sur les populations de micro-organismes de la phyllosphère des graminées. *Recherche microbiologique*, 152 (1), 75-85.

**Belhadj S., (2002).** Geographical distribution of *Pistacia atlantica* Desf. in Algeria. Proc.3rd I.S. on Pistachios and Almonds. EDS, I. Battle, I. Hormaza and M.T. Espiau. Acta Hort. 591. I.S.H.S. Pp.499-503. Saragoza (Espagne).

**Belhadj S., (2007).** Etude Ecobotanique de *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae) en Algérie, préalable à sa conservation. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ. Tizi-Ouzou.

**Belhadj, S., Derridj, A., Auda, Y., Gers, C., & Gauquelin, T. (2008).** Analyse de la variété morphologique chez huit populations spontanées de *Pistacia atlantica* en Algérie. *Botanique* , 86 (5), 520-532.

**Belhadj, S., Derridj A., Moriana, A., Gijon, M.D.C., Mevy, J.P. and Gauquelin, T. (2011).** Comparative analysis of stomatal characters in eight population of Atlas pistachio (*Pistacia atlantica* Desf., Anacardiaceae). *International Research Journal of Plant Science*, 2 (3): 060-069.

**Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., & Courchamp, F. (2012).** Impacts du changement climatique sur l'avenir de la biodiversité. *Lettres d'écologie* , 15 (4), 365-377.

**Benabdallah, R.O., Kouamé, M., El Bentchikou, A. Zellagui et N., Gherraf .(2015).** Études ethnobotanique, phytochimique et valorisation de l'activité antimicrobienne des feuilles et de l'oléorésine du pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica* Desf.), *Phytothérapie* (2017) 15:222-229

**Benabderrahmane, M., Benali, M., Aouissat, H., & Bueso, M. J. J. (2009).** Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf. de l'Algérie. *Phytothérapie*, 7(6), 304-308.

**Benhassaini, Hachemi, Mehdadi, Zoheir, Hamel, Laid, Et Al. (2007).** Phytoécologie De *Pistacia atlantica* Desf. Subsp. *atlantica* Dans Le Nord-Ouest Algérien. *Science Et Changements Planétaires/Sécheresse*, Vol. 18, No 3, P. 199-205.

**Bernard, F. (2012).** *Le développement d'un champignon pathogène foliaire réagit bien à la température, mais à quelle température ?* (Thèse de doctorat, AgroParisTech).

**Bernard, A., & Mahillon, J. (2018).** *Étude de la diversité archéenne dans les salaisons, les fromages et les aliments à saumure* (Doctoral dissertation, Thesis, Université Catholique de Louvain).

**Berrichi Mohamed, Chikh Mohamed, Haddad Ahmed, Allam Fatfallah, Gueffar Mohamed Et Belkhodja Yacine. (2017).** Algerian Journal Of Arid Environment Quelques aspects histomorphologiques du pistachier de l'atlas dans le nord occidental de l'atlas tellien, Issn 2170-1318 Vol. 7, N°1, Juin 2017: 111-121

**Bhourri, W., Derbel, S., Skandrani, I., Boubaker, J., Bouhlel, I., Sghaier, MB, ... & Chekir-Ghedira, L. (2010).** Etude des activités génotoxiques, antigénotoxiques et antioxydantes de l'acide digallique isolé des fruits de *Pistacia lentiscus*. *Toxicologie in vitro* , 24 (2), 509-515.

**Bilofsky, H. S., Burks, C., Fickett, J. W., Goad, W. B., Lewitter, F. I., Rindone, W. P., ... & Tung, C. S. (1986).** The GenBank genetic sequence databank. *Nucleic acids research*, 14(1), 1-4.

**Blackwell M. (2011).** The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? *American Journal of Botany*, 98: 426-438.

**Bom, M., & Boland, GJ (2000).** Évaluation de dosages immunologiques à base d'anticorps polyclonaux pour la détection de *Sclerotinia sclerotiorum* sur les pétales de canola et prédiction de la pourriture de la tige. *Revue canadienne de microbiologie* , 46 (8), 723-729.

**Bouabdelli Z. , Belhadj S. et Smail-Sadoun .(2015).** Contribution à l'étude des champignons mycorrhiziens chez le pistachier de l'Atlas en milieu aride, Wilaya de Djelfa ElWahat pour les Recherches et les Etudes Vol.8 n°2 : 90 - 98

**Boudy, P. (1952).** Guide du forestier en Afrique du nord. La maison rustique. PARIS, Pp.195-196.

**Bradley DJ, Gilbert GS, Martiny JBH. (2008).** Pathogens promote plant diversity through a compensatory response. *Ecology Letters* 11: 461e469.

**Bricchet,M. (1931).** Compte rendu du livre des journées de l'arbre fruitier, Alger, 735p

**Bringel, F., & Couée, I. (2015).** Rôles pivots des microorganismes de la phyllosphère à l'interface entre le fonctionnement des plantes et la dynamique des gaz traces atmosphériques. *Frontières en microbiologie* , 6 , 486.

**Bucklin, A., Steinke, D., & Blanco-Bercial, L. (2011).** Code-barres ADN des métazoaires marins. *Revue annuelle des sciences marines* , 3 , 471-508.

**Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013).** Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. In S. S. Merchant (Ed.), *Annual Review of Plant Biology, Vol 64* (pp. 807–838). Palo Alto: Annual Reviews volume 64. WOS:000321699500032

**Castañeda, LE, Miura, T., Sánchez, R., & Barbosa, O. (2018).** Effets de la gestion agricole sur la diversité fongique de la phyllosphère dans les vignobles et l'association avec les forêts indigènes adjacentes. *PeerJ* , 6 , e5715.

**Cavender-Bares, J., Kozak, KH, Fine, PV, & Kembel, SW (2009).** La fusion de l'écologie des communautés et de la biologie phylogénétique. *Lettres d'écologie* , 12 (7), 693-715.

**Chebouti-Meziou, N., Merabet, A., Chebouti, Y., Bissaad, F. Z., Behidj-Benyounes, N., & Doumandji, S. (2014).** Effect of cold and scarification on seeds germination of *Pistacia atlantica* L. for rapid multiplication. *Pak. J. Bot.*, 46(2): 441-446

**Chehrit-Hacid, F. (2016).** *Etude de la variabilité biochimique, physiologique et évaluation des activités biologiques des polyphénols de deux espèces du genre Pistacia (P. lentiscus L. et P. atlantica Desf.)* ,Thèse de Doctorat. Université de Tizi-Ouzou

**Coince, A., Cael, O., Bach, C., Lengelle, J., Cruaud, C., Gavory, F., ... & Buee, M. (2013).** Distribution souterraine à échelle fine et détection sol versus racine fine des communautés fongiques et oomycètes du sol dans une hêtraie française. *écologie fongique* , 6 (3), 223-235.

**Compant, Marcel G.A. van der Heijden & Angela Sessitsch. (2010).** Climate change effects on beneficial plant microorganism interactions. *FEMS Microbiol Ecol* 73 (2010) 197–214.

**Cordier T. (2012).** Structure des assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers et effet potentiel du changement climatique. Thèse de Doctorat, *Université de Bordeaux I*, 103

**Crespo, G., Pérez-Victoria, I., Ortiz-López, F. J., González-Menéndez, V., de la Cruz, M., Cautain, B., ... & Reyes, F. (2020).** Structural Elucidation of Antibiotic TKR2999, an Antifungal Lipodepsipeptide Isolated from the Fungus *Foliophoma fallens*. *Antibiotics*, 9(6), 278.

**Crick, FH. (1958).** Sur la synthèse des protéines. Dans *Symp Soc Exp Biol* (Vol. 12, No. 138-63, p. 8).

**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*, Thèse de Doctorat. Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella.

**Darwin, C. (1964).** *Sur l'origine des espèces : Un fac-similé de la première édition* (Vol. 11). Presses de l'Université Harvard.

**De Martonne E. (1926).** une nouvelle fonction climatologie : l'indice d'aridité. *La météo*, Pp : 449-459.

**Deacon, J. (2005).** Fungi as plant pathogens. *Fungal Biology*, 279-308.

**Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012).** The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.

**Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012).** The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.

**Devictor, V., & Jiguet, F. (2007).** Community richness and stability in agricultural landscapes: The importance of surrounding habitats. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 120, 179–184.

**DGF, (2015).** Direction générale des forêts (W. Médéa).

**Dobignard, A. et Chatelain, C. (2013).** Éditions des conservatoire et jardin botaniques, Genève, Index synonymique de la flore d'Afrique du nord, 451p.

**Dogan, Y, Baslar, S, Ayden, H et Mert, HH. (2003).** Une étude des interactions sol-plante de *Pistacia lentiscus* L. distribué dans la partie occidentale de l'Anatolie en Turquie. *Acta Botanica Croatica*, 62 (2), 73-88.



**Doghbage, A. (2011).** Contribution à l'étude de la variabilité des caractères foliaires et stomatiques de quatre espèces du genre *Pistacia* en Algérie. Mémoire de Magister. Département des Sciences Agronomiques. Université de Djelfa, 153p.

**Doghbage, A, Belhadj, S , & Derridj, A. (2016).** Effet du sexe sur la diversité morphologique des feuilles chez *Pistacia lentiscus*. *Options Méditerranéennes. Série A, Séminaires Méditerranéens* , (119), 193-196.

**Doghbage abdelghafour, Belhadj safia , Derridj arrezki , Mevy jean philippe , Gauquelin thierry, Merdas saifi, Tonetto alain and Foulla hassan ferial. (2020).** Comparative eco-botanical analysis of *Pistacia lentiscus* l. In algeria through morphological and ultra-structural markers related to leaves and stomata. *Revue Agrobiologia* 10(1): 1826-36

**Edgar, RC. (2013).** UPARSE: séquences OTU très précises à partir de lectures d'amplicon microbien, *Nature Methods* ,Pubmed: 23955772.

**El Zerey-Belaskri, Asma, Ribeiro, Teresa, Alcaraz, M. Librada, Et Al. (2018).** Molecular Characterization Of *Pistacia Atlantica* Desf. Subsp. *Atlantica* (Anacardiaceae) In Algeria: Genome Size Determination, Chromosome Count And Genetic Diversity Analysis Using SSR Markers. *Scientia Horticulturae*, Vol. 227, P. 278-287.

**El Zerey-Belaskri, A., & Benhassaini, H. (2016).** Morphological leaf variability in natural populations of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* along climatic gradient: new features to update *Pistacia atlantica* subsp. *atlantica* key. *International journal of Biometeorology*, 60 (4), 577-589.

**Emberger, L. (1952).** Sur le quotient pluviothermique .C.R.Sci. N° 234. Paris, Pp : 2508-2511.

**Fernandez-Acero, F. J., Carbú, M., Garrido, C., Vallejo, I., & Cantoral, J. M. (2007).** Proteomic advances in phytopathogenic fungi. *Current Proteomics*, 4(2), 79-88.

**Flexas, J., Gulías, J., Jonasson, S., Medrano, H. et Mus, M. (2001).** Modèles saisonniers et contrôle des échanges gazeux dans les populations locales de l'arbuste méditerranéen à feuilles persistantes *Pistacia lentiscus* L. *Acta Oecologica* , 22 (1), 33-43.

**Frank AC, Guzmán JPS and Shay JE .(2017).** Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms* 5: 70

**Frédérique Dardel et Francois Kepes. (2002).** *Bioinformatique. Génomique et post-génomique*, Palaiseau, Éditions de l'École Polytechnique, 246 p. (ISBN 2-7302-0927-1) .

**Fries, E. M., & Sieurin, J. M. (1836).** Synopsis generis *lentinorum*.

**G. Coude-Gaussen, C. Mosser, P. Rognon, J. Tourenq. (1982).** Une accumulation de loess du Pléistocène supérieur dans le Sud-Tunisien; la coupe de Techine. *Bulletin de la Société Géologique de France* 1982; S7-XXIV(2):283-92.

**G. Dubois, Wanda Smoragiewicz, R. Charbonneau, M. Gagnon.(1982).** Inhibition de quelques bactéries pathogènes et potentiellement pathogènes par streptococcus lactis, streptococcus thermophilus, lactobacillus acidophilus et lactobacillus helveticus. *Le Lait*, INRA Editions, 62 (621\_622), pp.681- 687. fihal-00928958f

**Galan, M., Razzauti, M., Bard, E., Bernard, M., Brouat, C., Charbonnel, N., Dehne-Garcia, A., Loiseau, A., Tatard, C., Tamisier, L., Vayssier-Taussat, M., Vignes, H., & Cosson, J. F. (2016).** 16s rRNA amplicon sequencing for epidemiological surveys of bacteria in wildlife: the importance of cleaning post-sequencing data before estimating positivity, prevalence and co-infection. *bioRxiv*, (p. 039826).

**Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993).** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2 , 113–118.

**George, DG, Hunt, LT et Barker, WC. (1988).** Macromolecular Sequencing and Synthesis (DH Schlesinger, Ed), Alan R. Liss, New York, pp. 127-149.

**Gilbert GS. (2002).** Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 40: 13e43.

**Gilbert, J. A., & Neufeld, J. D. (2014).** Life in a world without microbes. *PLoS biology*, 12(12), e1002020.

**Golubev WI, Sampaio JP, Golubeva EW. (2006).** Cryptococcus stepposus, a new filobasidiaceous yeast species found in the Prioksko-terrasny biosphere reserve in Russia. *Mycol Res.*110(Pt 8):957-61. doi: 10.1016/j.mycres.2006.04.006. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16904882.

**Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016).** Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17 , 333–351.

**Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Jacobzone, M., & Mercier, R. (1981).** L'utilisation du catalogue de codons est une stratégie du génome modulée pour l'expressivité des gènes. *Recherche sur les acides nucléiques* , 9 (1), 213-213.

**Hamad, I., Abdelgawad, H., Al Jaouni, S., Zinta, G., Asard, H., Hassan, S., et al. (2015).** Analyse métabolique de divers cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) d'Arabie Saoudite pour évaluer leur qualité nutritionnelle. *Molécules* 20, 13620-13641. doi : 10.3390/molécules200813620

**Hausdorf, B. (2011).** Progress toward a general species concept. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 65(4), 923-931.

**Heather, J. M., & Chain, B. (2016).** The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107 , 1–8.

**Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003).** Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl\_1), S96-S99.

**Heitman, J., Howlett, B. J., Crous, P. W., Stukenbrock, E. H., James, T. Y., & Gow, N. A. (2020).** *The fungal kingdom*. John Wiley & Sons.

**Helander, ML, Sieber, TN, Petrini, O., & Neuvonen, S. (1994).** Champignons endophytes dans les aiguilles de pin sylvestre : variation spatiale et conséquences des pluies acides simulées. *Revue canadienne de botanique* , 72 (8), 1108-1113.

**Hemma, R., Belhadj, S., Ouahchia, C., & Saidi, F. (2018).** antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* methanolic extracts. *Revue agrobiologia*, 8(1), 845-852.

**Hendrix, FF et Campbell, WA (1973).** Les pythiums en tant que phytopathogènes. *Revue annuelle de phytopathologie* , 11 (1), 77-98.

**Henikoff JG, Greene EA, Pietrokovski S. et Henikoff S. (2000).** Couverture accrue des familles de protéines avec les serveurs de base de données Blocks. *Nucleic Acids Res.* , 28 , 228-230.

**Hijmans, RJ, Cameron, SE, Parra, JL, Jones, PG et Jarvis, A. (2005).** Surfaces climatiques interpolées à très haute résolution pour les zones terrestres mondiales. *Journal international de climatologie : un journal de la Royal Meteorological Society* , 25 (15), 1965-1978.

**Hodgson, S., de Cates, C., Hodgson, J., Morley, N. J., Sutton, B. C., & Gange, A. C.(2014).** Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and Evolution*, 4 , 1199–1208.

**Inácio J, Pereira P, Carvalho M, Fonseca Á, Amaral-Collaco MT, Spencer-Martins I. (2002).** Estimation and Diversity of Phylloplane Mycobiota on Selected Plants in a Mediterranean-Type Ecosystem in Portugal. *Microbial Ecology* 44: 344-353.

**Inácio, J., Pereira, P., Carvalho, M. et al.(2002).** Estimation et diversité des mycobiotés phylloplanes sur des plantes sélectionnées dans un écosystème de type méditerranéen au Portugal . *Microb Ecol* 44, 344-353 (2002). <https://doi.org/10.1007/s00248-002-2022-z>

**Jia, T., Wang, R., Fan, X. et Chai, B. (2018).** Une étude comparative de la structure, de la diversité et de la richesse des communautés fongiques entre le sol et la phyllosphère d'espèces de graminées indigènes dans un barrage de résidus de cuivre dans la province du Shanxi, en Chine. *Sciences appliquées* , 8 (8), 1297.

**Jørgensen, Hans J Lyngs; Collinge, David B; Rojas, Edward C; Latz, Meike A C; Manzotti, Andrea; Ntana, Fani; and Jensen, Birgit .(2020).** Plant Endophytes. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0028893

**Judd, W. S., Campbel, C. S., Kellogge, A. et Stevens, P. (2002).** Botanique systématique. Edit. De Boeck, 467 p.

**Jumpponen A., Jones KL. (2009).** Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus* macrocarpaphyllosphere. *New Phytologist* 184: 438–448.

**Jumpponen A, Jones KL. (2010).** Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *NewPhytologist* 186: 496-513.

**Jumpponen, A., Herrera, J., Porrás-Alfaro, A., & Rudgers, J. (2017).** Biogéographie des endophytes fongiques associés aux racines. Dans *Biogéographie de la symbiose mycorhizienne* (pp. 195-222). Springer, Cham.

**Katsiotis, A., Hagedimitriou, M., Drossou, A., Pontikis, C., & Loukas, M. (2003).** Relations génétiques entre les espèces et les cultivars de *Pistacia* en utilisant les RAPD et les AFLP. *Euphytica* , 132 (3), 279-286.

**Kembel, SW, & Mueller, RC (2014).** Les caractéristiques des plantes et la taxonomie déterminent les associations d'hôtes dans les communautés fongiques de la phyllosphère tropicale. *Botanique* , 92 (4), 303-311.

**Khaldi, A. and Khoudja, M.K. (1996).** Atlas pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) in North Africa: taxonomy, geographical distribution, utilization and conservation. In: Taxonomy, distribution, conservation and uses of *Pistacia* genetic resources. Proceedings of the IPGRI Workshop 29-30 June 1995. Edited by S. Padulosi, T. Caruso and E. Barone. Palermo, Italy, Pp : 57-62.

**Kharwar, RN, Verma, SK, Mishra, A., Gond, SK, Sharma, VK, Afreen, T., & Kumar, A. (2011).** Evaluation de la diversité, de la distribution et de l'activité antibactérienne de champignons endophytes isolés à partir d'une plante médicinale *Adenocalymma alliaceum* Miers. *Symbiose* , 55 (1), 39-46.

**Khoury E, Fayad A, Sarkis DK, Awad MK, et al. (2020)** Isolation of potential new biocontrol strains from the blossom of *Malus trilobata* against the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Eur Exp Biol* Vol.10 No. 6:117

**Kirschner, R. (2018).** Champignons sur la feuille - une contribution à une revue de la microbiologie de la phyllosphère du point de vue mycologique. *Biosyst. Écol. Ser* , 34 , 433-448.

**Labdelli A., De La Herrán R., Arafeh R., Resentini F., Trainotti L., Halis Y., Adda A. and Merah O. (2020).** Genetic Variation in damaged Populations of *Pistacia atlantica* Desf. *Plants* (Basel). 9(11): 1541. Published online 2020 Nov 11. doi: 10.3390/plants9111541

**Lamb, TG, Tonkyn, DW et Kluepfel, DA. (1996).** Déplacement de *Pseudomonas aureofaciens* de la rhizosphère vers les tissus végétaux aériens. *Revue canadienne de microbiologie* , 42 (11), 1112-1120.

**Lambais, M. R., Crowley, D. E., Cury, J. C., Büll, R. C., & Rodrigues, R. R. (2006).** Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. *Science*, 312 , 1917–1917.

**Le Houérou H N. (1989).** Classification écoclimatique des zones arides de l'Afrique du Nord. *Ecolo Medit*, XV (3-4): 95-144

**Lenoir, J., & Gégout, J. C. (2010).** La remontée de la distribution altitudinale des espèces végétales forestières tempérées en lien avec le réchauffement climatique récent. *Revue forestière française*. Vol. 62, N° 3-4, p. 465-476

**Letreuch-Belarouci, N. (1981).** Les reboisements en Algérie et leurs perspectives d'avenir. *Tome I et II*, 31-35.

**Lieutaghi, P. (2004).** Le livre des arbres, arbustes et arbrisseaux. Edit. Actes Sud, 1305 p

**Limane, A. (2009).** Architecture racinaire du pistachier de l'Atlas en relation avec les propriétés physico-chimiques du sol sous jacent: cas de la population de la réserve nationale d'El-Mergueb (wilaya de M'sila), Algérie. Mémoire de Magister, Département des Sciences Agronomiques, Faculté des Sciences biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Pp.78-127.

**Lindow SE, Brandl MT. (2003).** Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1875-1883.

**Llorens, L., Peñuelas, J., & Filella, I. (2003).** Variations diurnes et saisonnières des performances photosynthétiques et des relations hydriques de deux arbustes méditerranéens coexistants, *Erica multiflora* et *Globularia alypum*. *Physiologia Plantarum* , 118 (1), 84-95.

**Madden, T. (2013).** The BLAST sequence analysis tool. In *The NCBI Handbook*. National Center for Biotechnology Information (US). (2nd ed.).

**Mansvelt EL, Hattingh MJ. (1987).** Microscopie électronique à balayage de la colonisation des feuilles de poirier par *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Can J Bot* 65:2517-2522

**Margulis, L. (1991).** Symbiogenesis and Symbiogenesis. In *Symbiosis as a source of evolutionary innovation* (pp. 1–14). Boston: Massachusetts Institute of Technology:

**Márquez, L.M., Redman, R.S., Rodriguez, R.J. & Roossinck, M.J. (2007).** A Virus In A Fungus In A Plant\_Science 315: 513–515.

**Martiny, J., Bohannan, B., Brown, J. et al. (2006).** Biogéographie microbienne: mettre les micro-organismes sur la carte. *Nat Rev Microbiol* 4, 102–112 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1341>.

**Mayr, E. (1947).** *Systematics and the Origin of Species* (No. 591.38 M3).

**Médail, F., & Quézel, P. (2003).** Que faut-il entendre par" forêts méditerranéennes. *Forêt méditerranéenne*, 24(1), 11-31.

**Meng, X., Mao, Z., Lou, J., Xu, L., Zhong, L., Peng, Y., ... & Wang, M. (2012).** Benzopyranones from the endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12 and their bioactivities. *Molecules*, 17(10), 11303-11314.

- Mew, TW et Cruz, CMV. (1986).** Colonisation épiphyte des plantes hôtes et non hôtes par des bactéries phytopathogènes, pp. 269–282 dans Fokkema, NJ et Van den Heuvel, J. (éditeurs), *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni.
- Meyer, CP et Paulay, G. (2005).** Code-barres ADN : taux d'erreurs basés sur un échantillonnage complet. *PLoS Biol*, 3 (12), e422.
- Monjauze, A. (1965).** Répartition et écologie de *Pistacia atlantica* Desf., en Algérie. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord, Alger*, 56: 5-128.
- Monjauze, A. (1980).** Connaissance du « betoum » *Pistacia atlantica* Desf. *Biologie et forêt. Rev. For. Fran*, 4: 357-363.
- Morlon, H., Parsons, TL et Plotkin, JB. (2011).** Concilier les phylogénies moléculaires avec les archives fossiles. *Actes de l'Académie nationale des sciences*, 108 (39), 16327-16332.
- Morris, CE et Kinkel, LL. (2002).** Cinquante ans de microbiologie de la phyllosphère : contributions importantes à la recherche dans des domaines connexes. Dans *Phyllosphere Microbiology* ed. SE Lindow, EI Hecht-Poinar et VJ Elliott pp. 365 – 375 St Paul, États-Unis : APS Press.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H., & Thompson, B. M. (2008).** The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME Journal*, 2, 321–334.
- Mukhtar K, et al. (2010).** Étude comparative sur deux souches commerciales de *Saccharomyces cerevisiae* pour une production optimale d'éthanol à l'échelle industrielle. *J Biomed Biotechnol* 2010: 419586
- Müller, T., & Ruppel, S. (2014).** Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS Microbiology Ecology*, 87, 2–17
- Newton AC, Fitt BDL, Atkins SD, Walters DR, Daniell TJ. (2010).** Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe plant interactions. *Trends in Microbiology* 18: 365e373.
- Nguyen, HDT et Seifert, KA (2008).** Description et code-barres ADN de trois nouvelles espèces de *Leohumicola* d'Afrique du Sud et des États-Unis. *Persoonia : Phylogénie moléculaire et évolution des champignons*, 21, 57.
- Nguyen, N. H., Smith, D., Peay, K., & Kennedy, P. (2015).** Parsing ecological signal from noise in next generation amplicon sequencing. *New Phytologist*, 205, 1389–1393.
- Osono, T. (2002).** Champignons de la phyllosphère sur litière de feuilles de *Fagus crenata* : occurrence, colonisation et succession. *Revue canadienne de botanique*, 80 (5), 460-469.

**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: 701e716.

**Osono, T. (2014).** Diversity and Ecology of Endophytic and Epiphytic Fungi of Tree Leaves in Japan: A Review. In V. C. Verma, & A. C. Gange (Eds.), *Advances in Endophytic Research* (pp. 3–26). Springer India.

**Ouzid, Y., Smail-Saadoun, N., & Houali, K. (2018).** Etude comparative de l'activité antioxydante in vitro de champignons endophytes foliaires et d'extraits de feuilles de *Peganum harmala* de Dayate aiat (Laghouat, Algérie). *Journal des sciences fondamentales et appliquées* , 10 (1), 147-157.

**Ozenda, P. (1977).** Flore du Sahara, Paris, CNRS, 622p.

**Ozenda, P. (1983).** Flore du Sahara, Paris, CNRS, 159p.

**Parasuraman, P., Pattnaik, S. et Busi, S. (2019).** Microbiome de la phyllosphère : importance fonctionnelle dans l'agriculture durable. Dans *Développements nouveaux et futurs de la biotechnologie microbienne et de la bio-ingénierie* (pp. 135-148). Elsevier.

**Parfitt, DE, & Badenes, ML (1997).** Phylogénie du genre *Pistacia* telle que déterminée à partir de l'analyse du génome chloroplastique. *Actes de l'Académie nationale des sciences* , 94 (15), 7987-7992.

**Pearl-Treves, R. et Perl, A. (2002).** Stress oxydant : une introduction. Dans : *Stress Oxydatif chez les Plantes* . (Inze, D. et Van Montagu, M., Eds.). Taylor & Francis, Londres, Royaume-Uni. 1–33.

**Petit, S., & Lavigne, C. (2019).** *Paysage, biodiversité fonctionnelle et santé des plantes*. Editions Quae.

**Purvis, A., & Hector, A. (2000).** Getting the measure of biodiversity. *Nature*, 405(6783), 212-219.

**Quaedvlieg, W., Verkley, GJM, Shin, HD, Barreto, RW, Alfenas, AC, Swart, WJ, ... & Crous, PW. (2013).** Dimensionnement de la septoriose. *Études de mycologie* , 75 , 307-390.

**Quézel, P. et Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. C.N.R.S. Paris, 1087p.

**Rameau, J-c., Mansion, D., Dumé, G., Gauberville, C., Bardat, J., Bruno, E. et R.Keller. (2008).** Flore forestière française, Guide écologique illustré vol.3 région Méditerranéen.2426p.

**Redman, RS, Sheehan, KB, Stout, RG, Rodriguez, RJ et Henson, JM. (2002).** Thermotolérance générée par la symbiose plante/champignon. *Sciences* , 298 (5598), 1581-1581.

**Rezaeyan, S., Pourmajidian, M. R., Jalilv, H., & Parsakhoo, A. (2009).** Growth parameters of *Pistacia atlantica* Desf. under different soil conditions in Iran. *African Journal of Plant Science*, 3(9), 184-189.

**Rodriguez R, Redman R. (2007).** More than 400 million years of evolution and plants still can't make it on their own: plant stress tolerance and habitat expansion via fungal symbiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146: 20.

**Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. (2009).** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314-330.

**Román Ikonicoff. (2015).** « Origine des virusle nouveau scénario », *Sciences et vie*, N°1179, p.75-77.

**Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001).** Le concept d'espèce pour les procaryotes. *Revue de microbiologie FEMS*, 25 (1), 39-67.

**Rupert Anand Yumlembam., Suresh Govind Borkar.(2016).** épiphytes bactériens à densité de population et endophytes de différentes plantes médicinales dans le même environnement écologique *ejpmr*,3 (9), 342 - 346

**Samson, RA, Hoekstra, ES et Frisvad, JC. (2004).** *Introduction aux champignons d'origine alimentaire et aérienne* (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

**Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., & Crous, P. W. (2012).** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 6241–6246.

**Seltzer, P. (1946).** Le climat de l'Algérie. Inst. Météor. Et de Phys- du globe. Univ. Alger. 219 p.

**Shreiner, A. B., Kao, J. Y., & Young, V. B. (2015).** The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*, 31, 69–75.

**Smith, TF et Waterman, MS. (1981).** Identification de sous-séquences moléculaires communes. *Journal de biologie moléculaire*, 147 (1), 195-197.

**Spichiger, R.E., Savolainen, V.V. et Figeat, M. (2000).** Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Collection biologie. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. Lausanne, P 372.

**Stewart, P. (1968).** Quotient pluviothermique et dégradation biosphérique. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord*, 59: 23-36.



**Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012).** Environmental DNA. *Molecular Ecology*, *21*, 1789–1793.

**Tao Ding., Ulrich Melcher. (2016).** Influences of Plant Species, Season and Location on Leaf Endophytic Bacterial Communities of Non-Cultivated Plants PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0150895 March 14, 2016

**Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Põlme, S., Riit, T., Liiv, I., Kõljalg, U., Kisand, V., Nilsson, H., Hildebrand, F., Bork, P., & Abarenkov, K. (2015).** Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycoKeys*, *10*, 1–43.

**Thomas Fort.(2016).** Effet et du paysage sur la structure des communautés fongiques foliaires. Biodiversité et Ecologie. Université de Bordeaux, NNT : 2016BORD0266

**Unterseher, M., Jumpponen, A., Öpik, M., Tedersoo, L., Moora, M., Dormann, C. F., & Schnittler, M. (2011).** Species abundance distributions and richness estimations in fungal metagenomics – lessons learned from community ecology. *Molecular Ecology*, *20*, 275–285.

**Vacher, C., Hampe, A., Porté, A. J., Sauer, U., Compant, S., & Morris, C. E. (2016).** The Phyllosphere: Microbial Jungle at the Plant–Climate Interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *47*.

**Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009).** Code-barres ADN pour les écologistes. *Tendances de l'écologie et de l'évolution*, *24* (2), 110-117.

**Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009).** Code-barres ADN pour les écologistes. *Tendances de l'écologie et de l'évolution*, *24* (2), 110-117.

**Varanda, CM, Materatski, P., Landum, M., Campos, MD, & Félix, MDR. (2019).** Communautés fongiques associées aux taches de paon et de cercospora chez l'olivier. *Plantes*, *8* (6), 169.

**Viret O, Scheidegger C, Petrini O. 1994.** Infection of Beech Leaves (*Fagus-Sylvatica*) by the Endophyte *Discula-Umbrinella* (Teleomorph, *Apiognomonina-Errabunda*) - Low-Temperature Scanning Electron-Microscopy Studies. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* *71*: 1520-1527.

**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 Phyllosphere and its Relationship with Airborne Bacteria. *Microbial Ecology*, *64*, 714–724. doi:10.1007/s00248-012-0053-7.

**Vokou, D., Genitsaris, S., Karamanoli, K., Vareli, K., Zachari, M., Voggoli, D., ... & Sainis, I. (2019).** La caractérisation métagénomique révèle une saisonnalité prononcée dans la diversité et la structure de la communauté bactérienne de la phyllosphère dans un écosystème méditerranéen. *Micro-organismes*, *7* (11), 518.

- Vorholt JA. (2012).** Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology* 10(12):828–840 DOI 10.1038/nrmicro2910.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols* (pp. 315–322). Elsevier.
- Wilkinson HH, Siegel MR, Blankenship JD, Mallory AC, Bush LP, Schardl CL. (2000).** Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a rarseendophyte mutualism. *Molecular PlanteMicrobe Interactions* 13:1027e1033.
- Wilson M, Hirano SS, Lindow SE. (1999).** Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1435-1443.
- Woese, CR et Fox, GE (1977).** Structure phylogénétique du domaine procaryote : les règnes primaires. *Actes de l'Académie nationale des sciences* , 74 (11), 5088-5090.
- Womack, A. M., Bohannan, B. J. M., & Green, J. L. (2010).** Biodiversity and ogeography of the atmosphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365 , 3645–3653.
- Yaaqobi, A., El hafid, L. et Haloui, B. (2009).** Étude biologique de *Pistacia atlantica* Desf. de la région orientale du Maroc, Pp : 41-48.
- Yadav, R. K. P., Karamanoli, K., & Vokou, D. (2005).** Bacterial colonization of the phyllosphere of mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microbial Ecology*, 50, 185–196. doi:10.1007/s00248-004-0171-y
- Yadav, R. K. P., Papatheodorou, E. M., Karamanoli, K., Constantinidou, H. I. a, & Vokou, D. (2008).** Abundance and diversity of the phyllosphere bacterial communities of Mediterranean perennial plants that differ in leaf chemistry. *Chemoecology*, 18, 217–226. doi:10.1007/s00049-008-0408-1
- Yi T, Wen J, Golan-Goldhirsh A, Parfitt DE. (2008).** Phylogenetics and réticulated evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *Suis J Bot* 95:241-251
- Zhiquan Cai ., Xiaobo Wang ., Sreetama Bhadra ., Qi Gao.(2019).** Distinct factors drive the assembly of quinoa-associated microbiomes along elevation. *Plant* 104-019-04387-1
- Zohary D .(1996).** The genus *Pistacia* L. In: Padulosi S, Caruso T, Barone E (eds) *Taxonomy, distribution, conservation and uses of Pistacia genetic resources*. IPGRI, Palermo, pp 1–11
- Zohary, M. (1952).** A monographical study of the genus *Pistacia* Palestine Journ. Bot. J., 5 (4): 187-228.
- Zohary, M. (1987).** *Flora of Palaestina Platanaceae to Umbelliferae*. Second printing, 2: 296

