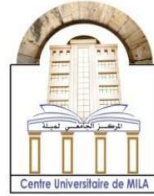


N° Ref : .....



## Université Abdelhafid BOUSSOUF-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de

### Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie végétale et amélioration des plants

### Thème :

Synthèse et évaluation de phyllosphère de plante de L'olivier  
(*Olea europaea* L.)

#### ❖ Présenté par :

➤ MEBERBECHE Samira

#### ❖ Devant le jury composé de :

- |                           |            |
|---------------------------|------------|
| - Mme. NOUICHI Siham      | Président  |
| - Mme. BOUCHEKRIT Mofida. | Examineurs |
| - Mme. BOUDRAA Wahiba     | Encadreur  |



## *Remerciements*



*Je remercie Dieu tout-puissant de m'avoir donné le courage et la patience d'achever cet humble travail.*

*La réalisation de cette thèse a été possible grâce à l'aide de nombreuses personnes à qui je voudrais exprimer ma gratitude.*

*Avec une profonde gratitude et une considération particulière, je remercie ma superviseuse **Dr. Mme Boudraa Wahiba** pour sa patience et surtout ses conseils avisés qui ont aidé à mener à bien ce travail.*

*Je tiens à remercier les membres du jury qui ont l'honneur de me juger pour cet humble travail.*

*Je tiens à remercier sincèrement tous les enseignants et responsables de laboratoire du Département de biologie de l'Université de Mila.*

*Merci à toutes les personnes qui, directement ou indirectement, de près ou de loin, m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.*

## *« Dédicace »*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes chers parents pour tous les sacrifices qu'ils ont  
faits pour moi,*

*A mon amie de cœur «Razika» ses encouragements*

*Et son soutien moral envers moi.*

*À ma famille, À mes amis.*

*Et à tous ceux qui comptent pour moi.*

## Résumé

La phyllosphère de l'olivier (*Olea europaea* L), est devenue l'objet de nombreuses études en tant qu'habitat colonisé par un groupe de microorganismes. Isoler ces organismes à la surface des feuilles des plantes est l'objectif de ce modeste travail, afin de mieux comprendre les interactions entre les plantes et leur environnement microbien. A cet effet, une série de tests morphologiques et microbiologiques sont appliqués sur les feuilles prélevées sur le site du sennaoua super de Mila, Algérie.

Les résultats montrent que la phyllosphère de l'olivier abrite une multitude d'espèces bactériennes et fongiques à la surface de ses feuilles. Où la présence de multiples diversités bactériennes telles que le *Staphylococcus* et *Entérobactérie*, et une autre variété fongique telle que *Aspergillus fumigatus*.

Ces travaux de recherche ont permis de mieux comprendre l'énorme diversité des communautés bactériennes et fongiques des feuilles d'olivier cultivées, et il peut être vérifié et complètes par des techniques de biologie moléculaire.

**Mots clés:** La phyllosphère, *Olea europaea* L, espèces bactériennes, morphologie, feuilles d'olivier.

## Abstract

The phyllosphere of the olive tree (*Olea europaea* L), has become the object of numerous studies as a habitat colonized by a group of microorganisms. Isolating these organisms on the surface of plant leaves is the objective of this modest work, in order to better understand the interactions between plants and their microbial environment. For this purpose, a series of morphological and microbiological tests are applied to the leaves taken from the sennaoua super site near Mila, Algeria.

The results show that the phyllosphere of the olive tree shelters a multitude of bacterial and fungal species on the surface of its leaves. Where the presence of multiple bacterial diversities such as *Staphylococcus* and *Enterobacterie*, and another fungal variety such as *Aspergillus fumigatus*.

This research work provided a general understanding of the enormous diversity of bacterial and fungal communities of cultivated olive tree leaves, verifiable and complete by molecular biology techniques.

**Keywords:** The phyllosphere, *Olea europaea* L, bacterial species, morphology, olive tree leaves.

## ملخص

أصبح الغلاف الجوي لشجرة الزيتون (*Olea europaea* L)، موضوعًا للعديد من الدراسات باعتباره موطن مستعمر من قبل مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة. إن عزل هذه الكائنات الحية عن سطح أوراق النبات هو الهدف من هذا العمل المتواضع ، من أجل فهم التفاعلات بين النباتات وبيئتها الميكروبية بشكل أفضل. ولهذا الغرض يتم تطبيق سلسلة من الإختبارات المورفولوجية والميكروبيولوجية للأوراق مأخوذة من موقع صناعية العليا ولاية ميلانة بالجزائر.

تظهر النتائج أن الغلاف الجوي لشجرة الزيتون يؤوي مجموعة من الأنواع البكتيرية والفطرية على سطح أوراقها. حيث تم التعرف على وجود تنوع بكتيري متعدد مثل *Staphylococcus* و *Enterobacterie*، و آخر فطري مثل *Aspergillus fumigatus*.

قدم هذا العمل البحثي فهما عاما للتنوع الهائل للمجتمعات البكتيرية والفطرية لأوراق شجرة الزيتون المزروعة ، ويمكن التحقق منه وإكماله بواسطة تقنيات البيولوجيا الجزيئية.

**الكلمات المفتاحية:** الغلاف الجوي، *Olea europaea* L، الأنواع البكتيرية، المورفولوجية، أوراق شجرة الزيتون.

# Table des matières

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Partie I : Synthèse bibliographique</b>	
I. Généralité sur l'olivier .....	3
I.1. Origine et historique de l'olivier .....	3
I.2. Classification botanique de l'olivier.....	5
I.2.1.Taxonomie .....	5
I.3.Description morphologique de l'olivier.....	6
I.3.1.Partie racinaire .....	6
I.3.2.Partie aérienne .....	7
I.3.2.1.Le tronc .....	7
I.3.2.2.les feuilles .....	8
I.3.2.3. Les fleurs .....	8
I.3.2.4. Les fruits .....	9
I.4.Répartition géographique de l'olivier.....	10
I.4.1.Dans bassin méditerranéenne .....	10
I.4.2.En Algérie .....	11
I.5.Ecologie de l'olivier.....	12
I.5.1.Température .....	12
I.5.2.Humidité .....	12
I.5.3.Pluviométrie .....	12
I.5.4. Vent.....	12
I.6. Les maladies de l'olivier.....	13
I.6.1.La gale du collet .....	13

I.6.2 .La cercosporiose de l'olivier .....	13
II. La phyllosphère et ses différents composants .....	14
II.1. Définition et composition de la phyllosphère .....	14
II.2. Rôle écologique des microorganismes de la phyllosphère .....	17
II.3. Origine des micro-organismes qui colonisent la phyllosphère.....	18
II.4. Facteurs affectant la croissance et les activités des MO dans la phyllosphère .....	20
II.4.1. Espèces végétales .....	20
II.4.2. Âge des plantes .....	20
II.4.3. Disponibilité des nutriments .....	20
II.4.4. Climat et conditions météorologique .....	20

## **Partie II : Partie expérimentale**

### **I : Matériel et méthodes**

I.1. Échantillonnage, prélèvement et stockage des feuilles de l'olivier .....	22
I.1.1. Présentation du site d'échantillonnage .....	22
I.1.2. Matériel et produits utilisés pour le prélèvement.....	23
I.1.3. Stratégie de prélèvement des feuilles de l'olivier .....	23
I.1.4. Conservation des feuilles .....	23
I.2. Préparation des milieux et des solutions pour l'isolement .....	24
I.2.1. Milieux de culture utilisés.....	24
I.2.2. Préparation du bouillon nutritif .....	25
I.2.3. Préparation de la solution mère contenant les feuilles .....	25
I.2.4. Préparation des dilutions.....	26
I.3. Isolement des bactéries à partir des feuilles.....	27
I.3.1. Ensemencement .....	28
I.3.2. Incubation .....	29
I.4. Caractérisation morphologique des isolats.....	29
I.4.2. Observation macroscopique des colonies bactériennes.....	29
I.4.2. Observation microscopique .....	30



## **II. Résultats et discussion**

II.1. Isolement des microorganismes des feuilles de l'olivier.....	33
II.1.1. Mise en évidence des microorganismes présents sur les feuilles de l'olivier .....	33
II.1.2. Analyse des microorganismes présents sur les feuilles de l'olivier.....	34
II.1.2.1. Analyse macroscopique après 24h d'incubation.....	34
II.1.2.2. Analyse des isolats après 4jours.....	35
II.1.3. Caractérisation morphologique des colonies obtenues.....	36
II.1.3.1. Caractères macroscopiques .....	36
II.1.3.2. Caractérisation microscopique .....	38
a- Observation après coloration par le bleu de méthylène.....	38
b- Observation après coloration de Gram.....	39
<b>Conclusion</b> .....	43
<b>Perspectives</b> .....	44
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexe</b>	
<b>Résumé</b>	

## Liste des abréviations

<b>Abréviations</b>	<b>Significations</b>
GN	Gélose nutritive ordinaire
Sab	gélose de Sabouraud
L	Linné
°C	Degré celsius
%	Pourcentage
ml	Millilitre
G	Gramme
Km <sup>2</sup>	Kilomètre Carré
J-C	Jésus-Christ
MO	Microorganisme
PH	Potentiel Hydrogène

## Liste des figures

<b>Figure n°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
01	Champ d'oliviers	04
02	Arbre d'olivier cultivé	06
03	Les principales parties d'un olivier	07
04	Feuilles de l'olivier cultivé	08
05	Fleurs d'olivier	09
06	Fruits d'olivier	09
07	Répartition des oliviers cultivés et sauvages dans la zone du bassin méditerranée	10
08	Carte de la répartition de l'oléiculture en Algérie	11
09	Feuilles d'olivier attaquées par cercosporiose	14
10	Schéma d'une coupe transversale d'une feuille	15
11	Schématisation de phyllosphère et de rhizosphère	16
12	Composition et rôles de la phyllosphère	17
13	Facteurs biotiques et abiotiques influençant la composition de la phyllosphère	19
14	Localisation géographique de site d'étude	22
15	Echantillons de feuilles d'olivier ( <i>Olea europaea</i> L).	23
16	L'agitation et la stérilisation du bouillon nutritif	25
17	Méthodes utilisées pour préparer la solution mère	26
18	Préparations des dilutions à partir de la solution mère (SM)	27
19	Étapes d'ensemencement à partir des dilutions (10-1 à 10-3).	28
20	Méthode d'ensemencement de 4 cadrans	29
21	Étapes de préparation des frottis bactérienne	31

22	Les étapes et résultats explicatifs de la coloration de Gram	32
23	Trouble montré par les dilutions décimales après 24h d'incubation.	33
24	L'observation sur les trois milieux (GN,Chapman et Sabouraud) après 24h d'incubation.	34
25	L'observation sur les trois milieux (GN,Chapman et Sabouraud) après 4jours d'incubation.	35
26	L'observation dans les trois milieux a la SM et la dilution (10 <sup>-1</sup> ) après 4 jours d'incubation.	36
27	Observation macroscopique sur chapman et sabouraud	37
28	La forme des champignons après observation microscopiques (×40).	38
29	La forme des champignons après coloration au bleu de méthylène (observée au microscope optique 40×).	38
30	Observation de quelques isolats (A et B) après coloration de Gram au microscope optique (×100).	40
31	Observation de isolat (C) après coloration de Gram au microscope optique×100.	41

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Croissance microbienne dans les dilutions décimales après 24h d'incubation.	33
<b>02</b>	Aspects macroscopiques des colonies isolées dans les feuilles	37
<b>03</b>	Aspects microscopiques des colonies isolées dans les feuilles	39



*Introduction*

## Introduction

La surface de la végétation est environ deux fois plus grande que la terre, et cet environnement fournit un habitat à de nombreux micro-organismes qui colonisent la surface des feuilles des plantes et les espaces qui s'y trouvent (**Vorholt JA, 2012**).

Cette plantes en interaction constante avec les micro-organismes (bactéries, champignons, virus, etc.) au niveau de leur phyllosphère. Il peut être considéré comme un habitat éphémère qui dure de quelques semaines à plusieurs années pour les espèces ligneuses vivaces. Cet habitat est très dynamique et est constamment exposé à des conditions environnementales changeantes. Les sociétés subissent de fréquents changements dus à des facteurs environnementaux, tels que la température, l'humidité relative, la vitesse du vent, le rayonnement uv et doivent également s'adapter aux conditions nutritionnelles changeantes, afin de survivre et de se reproduire à la surface de la phyllosphère (**Leveau et Lindow, 2001; Monier et Lindow, 2003**).

Certains de ces organismes peuvent causer de graves dommages aux cultures (pathogènes), tandis que d'autres sont bénéfiques pour le développement et la croissance des plantes et donc la résistance aux maladies. Par conséquent, une stratégie pour relever les défis de la production et de la sécurité alimentaires animales ou humaines consiste à comprendre comment les plantes interagissent, s'adaptent et peuvent tirer profit de la présence de micro-organismes dans leur environnement (**Lahouaria M, 2022**).

L'olivier (*Olea europaea* L) est l'une des espèces les plus anciennes du bassin méditerranéen algérien. Il une grande importance nutritionnelle et économique, il est cultivé pour obtenir ses fruits pour la production d'olives de table (**Gomes et al 2012**). C'est un arbre à feuilles persistantes qui nécessite un climat tempéré, se distingue par sa rusticité et sa longévité, son développement dépend des conditions climatiques et de la qualité du sol .Vous avez besoin d'un sol bien drainé avec un pH allant de 7 à 8, contenant des nutriments (phosphore, potassium, N, Ca, Mg, Zn ...) nécessaire à son développement. Les quantités requises de ces éléments sont différentes à chaque étape de leur développement (**Loussert et Brousse, 1978**).

L'olivier, comme tous les écosystèmes terrestres, abrite une grande diversité MO tels que bactéries, champignons, virus...etc, ce qui peut lui être utile ou nuisible. Ces microorganismes peuvent se déposer à la surface, dans les tissus végétaux et à proximité

immédiate du système racinaire dans la rhizosphère. La plante est toujours en interaction avec ces spores, mais la majorité des études menées dans ce domaine se sont concentrées sur les feuilles de la plante qui représente la structure aérienne la plus dominante sur terre. Sur les feuilles, les bactéries sont le groupe le plus étudié, puis viennent les champignons (Lu, 2020).

Cette étude vise à éclairer la description et isolement des microorganismes bactériens et champignons, et leur répartition à la surface des feuilles de l'olivier.

Quels sont les organismes vivants dans la surface des feuilles de l'olivier, ainsi que leur rôle écologique sur la plant ? est la question à laquelle on souhaite répondre dans ce modeste travail.

Notre première hypothèse est que la surface des feuilles de l'olivier peut contenir une variété de micro-organismes tels que des bactéries, des champignons et des virus. Ces microorganismes peuvent jouer un rôle important dans la promotion de la croissance et de la santé de l'olivier en fournissant des nutriments et en aidant à fixer l'azote.

Ce travail suit une articulation de plusieurs chapitres regroupés en deux principales parties :

- En premier lieu, la partie I représente une synthèse bibliographique concernant les généralités sur l'olivier cultivé et les concepts sur la phyllosphère et ses différentes composantes.
- La deuxième partie décrit une expérience menée sur des oliviers, d'abord cite le matériel, méthodes et le protocole expérimental utilisés. Le deuxième point traite des résultats enregistrés et de leur discussion. Enfin, la conclusion vient compiler ce travail de recherche, suivie par les perspectives.





*Partie 1 :*  
*Synthèse bibliographique*

## I. Généralité sur l'olivier

### I.1. Origine et historique de l'olivier

L'olivier est un arbre prophétique aux bienfaits innombrables. Symbole de paix, de richesse et de longévité, il est mentionné à plusieurs reprises dans le Saint Coran ainsi que dans d'autres livres comme la Bible. Cet arbre existe depuis la préhistoire, mais on ne sait pas quand il est apparu pour la première fois. Cependant, la théorie la plus largement acceptée désigne la Syrie et l'Iran comme les régions où les gens ont vécu pour la première fois grâce à des artefacts du milieu du troisième millénaire avant notre ère. Découvert dans la ville d'Alep au nord de la Syrie (Loussert et Brousse, 1978).

Le terme "Olivier" vient du grec, qu'ils ont eux-mêmes transféré dans une langue pré-indo-européenne. Les linguistes ont retracé son origine au terme "Elaiwon", qui devint plus tard "Elaia" chez les Grecs avant de devenir "Olea" chez les Romains, un mot signifiant "huile".

L'olivier est sans aucun doute l'un des arbres les plus anciens encore cultivés. Selon certains historiens, il a été domestiqué pour la première fois entre 2000 et 3000 ans avant J.-C. En Syrie et au Proche-Orient. Actuellement, des études en archéologie et en génétique indiquent que le bassin méditerranéen a été domestiqué à plusieurs endroits sur une très longue période. Plus récemment, on sait que les Phéniciens l'ont amené dans la péninsule ibérique. Puis les Romains développèrent leur culture car l'huile d'olive était très appréciée à Rome. La migration de nouveaux cultivars a renforcé et diversifié la culture sous l'occupation arabe, ce qui explique l'importance de l'huile d'olive dans le sud de l'Espagne (Gaussorgues, 2009).

Oliver a une histoire bien plus longue que celle de l'homme, puisque les premiers signes de son existence à l'état sauvage ont été découverts dans le bassin méditerranéen à l'époque tertiaire, il y a plus de 3 millions d'année. Les chercheurs et les oléiculteurs ont tous deux rejeté Olesters comme un cultivar sans importance. *Olea europaea subsp.europaea var. sylvestris* est la forme sauvage de l'espèce (*Olea europaea subsp.europaea var.sativa*) (Breton et Berville, 2012).

Les plus anciennes preuves connues de la culture de l'olivier se trouvent en Palestine et en Jordanie, datant de 3750 av .JC. Des olives ont également été trouvées dans des tombes et des pyramides égyptiennes antiques, y compris des outils pour presser les olives qui ont été trouvés dans la plus ancienne pyramide de Saqqarah (construite en 2500 avant JC), ainsi que des illustrations du processus de pressage des olives (Efe et al., 2012 ).

En Algérie, au sein du Tassili, les hommes du Néolithique ont enregistré l'histoire de l'olivier sous la forme de peintures rupestres datant de 5000 à 2500 avant JC, montrant des hommes tenant des branches d'olivier en guise de couronne.

Grâce aux Grecs et aux Romains tout au long de la période de colonisation, la culture de l'olivier s'est rapidement répandue dans tout le bassin méditerranéen. Depuis lors, les histoires d'Oliver et d'Alger se sont entrelacées. Les différentes invasions ont eu une certaine influence sur la répartition géographique des olives que nous avons héritée de l'indépendance du pays **(Bensouneh, 2014)**.



**Figure 1:** Champ d'oliviers **(Boulssen et Bouraoui, 2016)**.

## I.2. Classification botanique de l'olivier

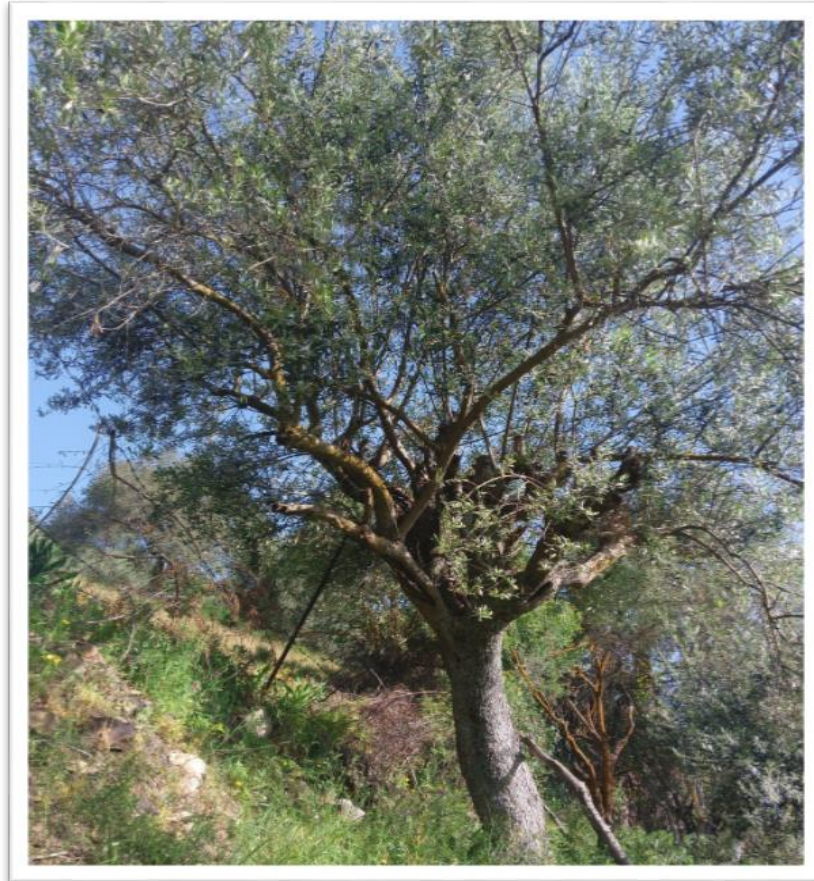
### I.2.1. Taxonomie

L'olivier (*Olea europaea*) fait partie de la famille des Oléacées et à l'ordre des Lamiales. Est classé dans la division des Magnoliophyta, qui regroupe les plantes à fleurs (phanérogames). La famille des Oleaceae comprend 25 genres, qui sont composés de 30 genres différents. Parmi eux se trouve *Olea europaea* L. avec deux sous-espèces :

- ❖ *Olea europaea Sylvestris* (oléastre): C'est un olivier sauvage, il a une forme touffue, avec de très petits fruits, et l'olive en arabe s'appelle « Zibog » (Ghezlaoui, 2011).
- ❖ *Olea europaea Sativa* (l'olivier cultivé): C'est l'olivier cultivé, il a une forme plus longue avec des fruits plus gros que ceux du précédents (Ghezlaoui, 2011).

La classification botanique (classiques) de l'olivier, selon (Maillard ,1975) est la suivante :

• <b>Régne</b>	:	Plantae
• <b>Embranchement.</b>	:	Phanérogames
• <b>Sous Embranchement</b>	:	Angiospermes
• <b>Classe</b>	:	Dicotylédones
• <b>Ordre</b>	:	Lamiales
• <b>Famille</b>	:	Oléacées
• <b>Genre</b>	:	<i>Olea</i>
• <b>Espèce</b>	:	<u><i>Olea europaea</i></u> L.1753



**Figure 2 :** Arbre d'olivier cultivé (Personnel, 2023).

### **I.3.Description morphologique de l'olivier**

L'olivier est un arbre à feuillage persistant, composé de deux parties principales, la partie aérienne et la partie racinaire.

#### **I.3.1.Partie racinaire**

L'olivier possède un système racinaire bien développé qui puise dans le sol des éléments nutritifs pour subvenir à ses besoins. Son développement est lié aux propriétés physiques et chimiques du sol ainsi qu'à sa texture et sa structure. Il a de 2 à 3 racines principales qui s'enfoncent à une profondeur de 20 à 40 cm, selon l'aération du sol.

Dans les sols argileux, la profondeur varie de 15 à 150 cm, et dans les sols sableux, les racines peuvent atteindre une profondeur de 6 mètres (Civantos, 1998).

### I.3.2. Partie aérienne

#### I.3.2.1. Le tronc :

Le tronc est la partie de l'arbre qui relie les racines aux branches principales. D'aspect et de couleur variables selon l'âge. Chez les jeunes arbres, il est dressé, de diamètre rond et lisse, de couleur gris verdâtre. Avec l'âge, il se fissure et s'élargit à la base, gris foncé et presque noir (Pagnol, 1975).

Selon la zone et le mode de culture en pratique, certains oliviers peuvent atteindre une hauteur de 18 à 10 mètres ou plus, tandis que d'autres ne dépassent pas 3 à 5 mètres.

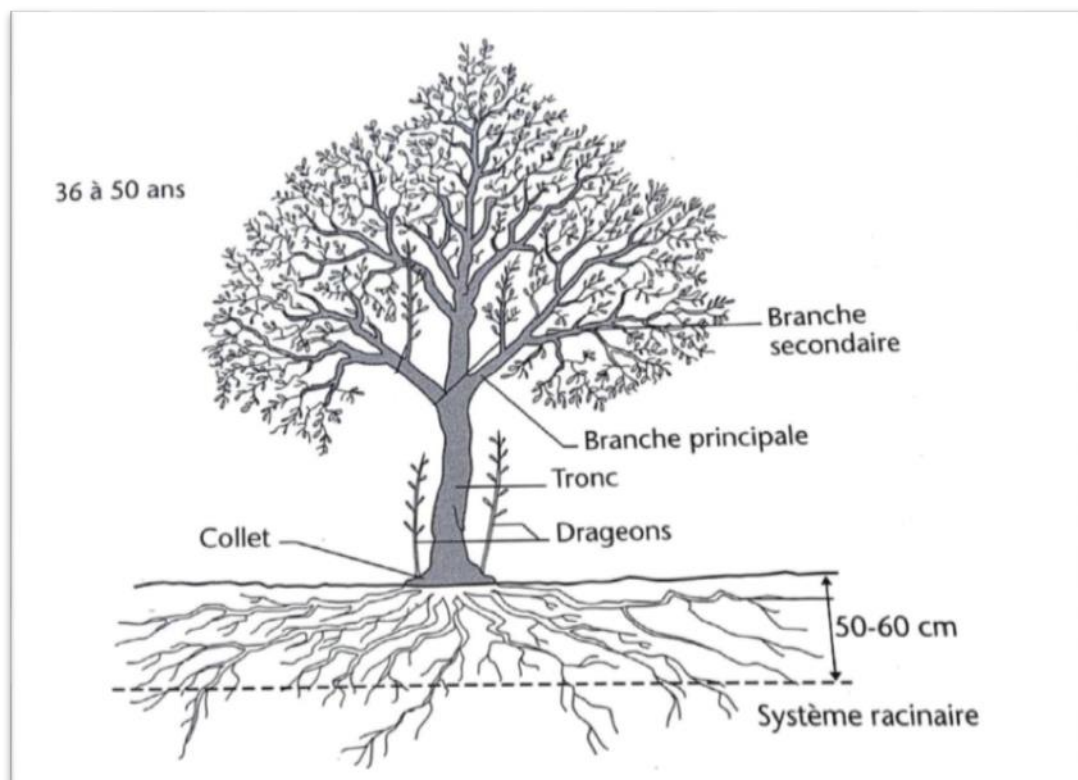


Figure 3 : Les principales parties d'un olivier (Argenson, 1999).

### I.3.2.2.les feuilles :

La forme, la taille et les caractéristiques des feuilles de l'olivier diffèrent selon les cultivars, tandis que les principales caractéristiques sont les plus diverses (**Villa, 2003**).

Les feuilles de l'olivier sont persistantes opposées et continues, foncées sur la face supérieure et gris en dessous (**Courolex, 2002**).Elles ont des formes et des tailles variables selon les cultivars. Elles peuvent être lancéolées ou oblongues-ovales, de 3 à 8 cm de long et 1 à 2,5 cm de large. L'âge des feuilles ne dépasse pas 3 ans, puis les vieilles feuilles tombent durant l'automne pour être remplacées par de nouvelles (**Loussert et Brousse, 1978**).



(a)



(b)

**Figure 4** : Feuilles de l'olivier cultivé (a et b) (**Personnel, 2023**).

### I.3.2.3. les fleurs :

L'olivier a des fleurs blanches constituées de quatre sépales, quatre pétales, 2 étamines et un pistil, (**Loussert et al Brousse, 1987**).

L'inflorescence se présente sous forme de grappes constituées d'un long groupe de 10 à 40 fleurs. Ce Le nombre est un petit personnage blanc panaché de jaune verdâtre, les fleurs sont régulières, et hermaphrodites, et autogames. La floraison de l'olivier en avril et début mai (**I.T.A.F, 2013**).



(a)

(b)

**Figure 5 : Fleurs d'olivier (a et b) (Personnel, 2023).**

#### I.3.2.4.les fruits :

Les fruits sont de forme ovale de 1,5 à 2 cm, verts au début mais changeant de couleur à mesure qu'ils mûrissent (pendant l'automne ou une partie de l'hiver). De forme et de couleur variables selon les variétés, à pulpe charnue et huileuse (**Roll et Jacmon, 1988**).

**Figure 6 : Fruits d'olivier (Breton et Berville, 2012).**

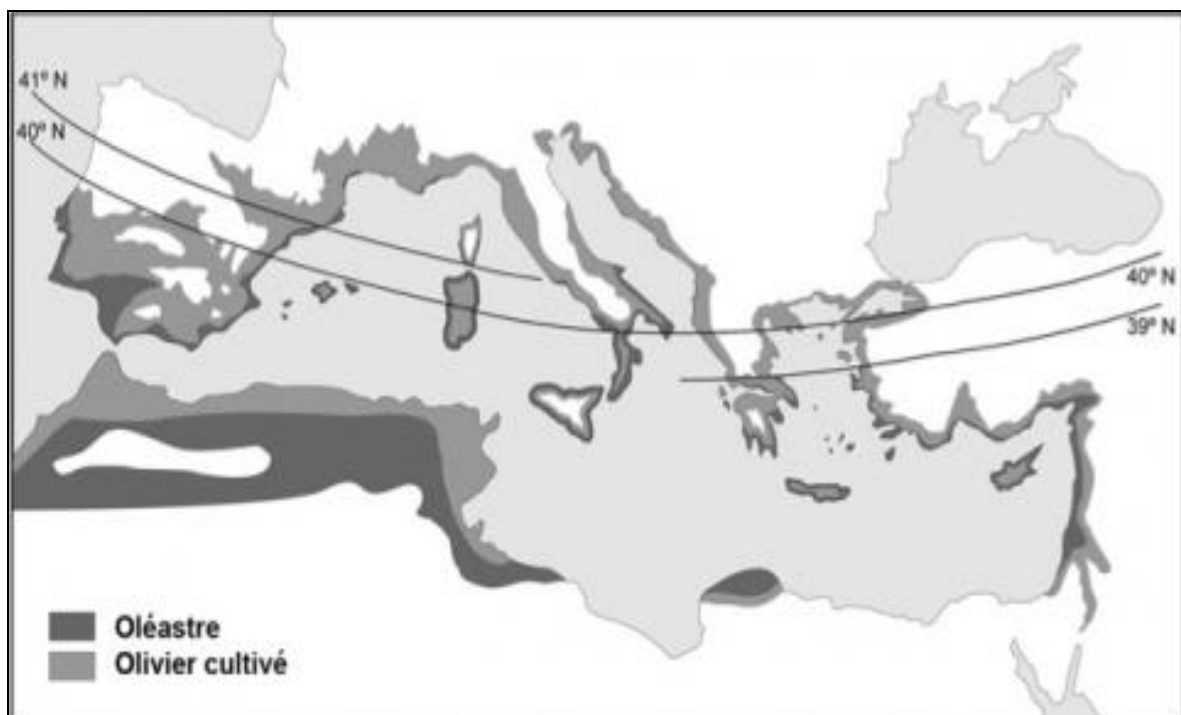


## I.4.Répartition géographique de l'olivier

### I.4.1.Dans bassin méditerranéenne

L'Oliver (*Olea europaea Sativa*) est l'une des plus anciennes cultures agricoles concentrées grâce à son climat favorable. La culture Oliver se situe entre 30 et 45 degrés de latitude nord (Baldy, 1990). D'une grande importance culturelle et économique. Plusieurs études se concentrent actuellement sur l'évaluation de la distribution et de la diversité entre les olives cultivées et sauvages (Lavee, 2013).

L'olivier (*Olea europaea* L.) a été largement cultivé dans toute la région méditerranéenne, en particulier en Espagne, Italie, Grèce, Turquie, France, Tunisie, Algérie et Croatie. Actuellement, des fermes se trouvent en Californie, en Australie et en Afrique du Sud. Cette répartition géographique est influencée par des facteurs climatiques et biologiques (Gaussorgues, 2009 ; Carrion, et al., 2010) et le pollen peut être dispersé par le vent et les oiseaux (Lumaret et al., 2004). (Figure 07)



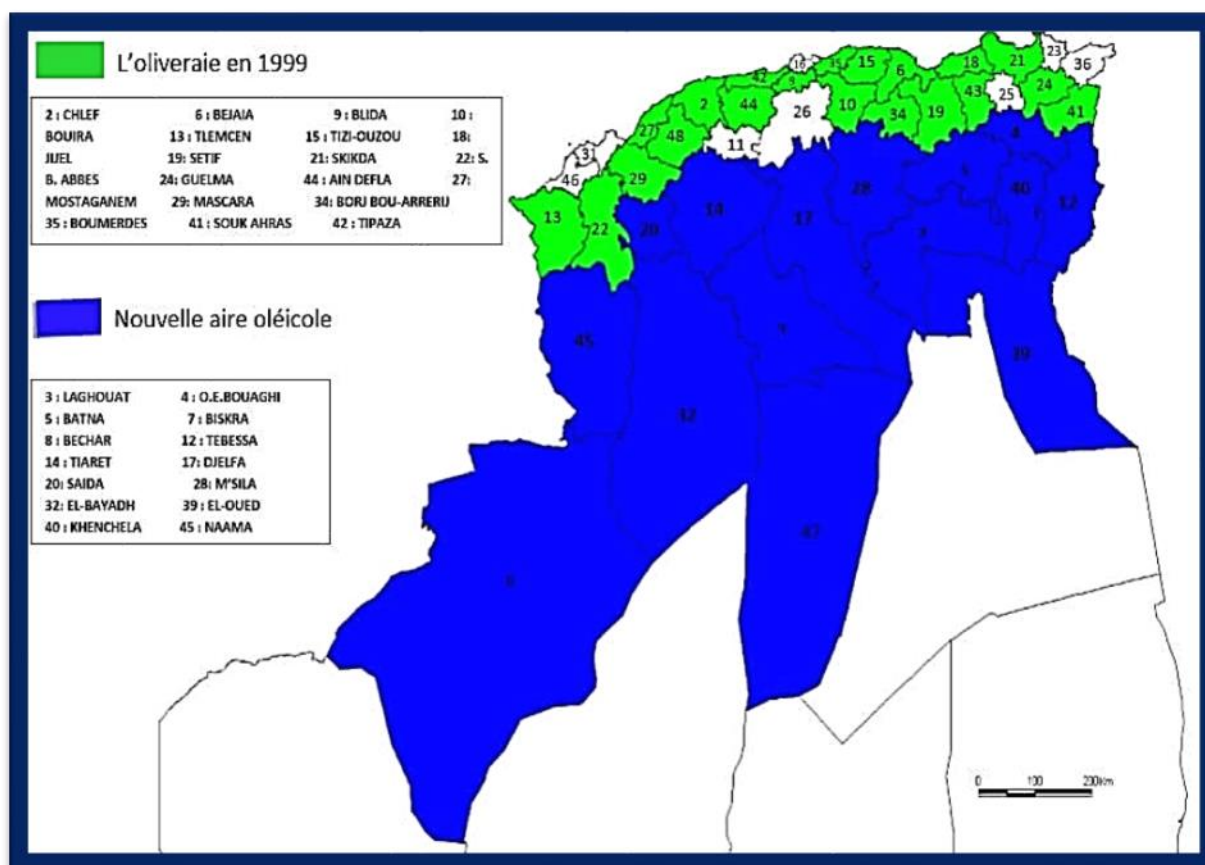
**Figure 7** : Répartition des oliviers cultivés et sauvages dans la zone du bassin méditerranée (Carrion, et al., 2010).

### I.4.2. Répartition géographique de l'olivier en Algérie

Les olives sont principalement cultivées dans les régions côtières du pays, entre 8 et 100 kilomètres de la mer, où elles peuvent prospérer dans de bonnes conditions. Elle s'étendait sur une superficie de 310 000 hectares en 2009 dans toute la région (Figure08).

Les oliveraies les plus importantes et les plus anciennes sont situées dans les zones montagneuses et les zones effondrées couvrant 195 000 hectares, ainsi que dans les plaines occidentales du pays (Maskar, Sij, Relizane..) et les vallées (Summam). Cette superficie s'est considérablement accrue suite à la mise en œuvre d'un programme national de développement de l'oléiculture intensive dans les zones steppiques et désertiques (Msila, Biskra, Ghardaïa).

La carte ci-dessous montre la répartition de la nouvelle culture de l'olivier en Algérie; C'est une expansion nette dans les régions steppiques, présahariennes et même sahariennes.



**Figure 8** : Carte de la répartition de l'oléiculture en Algérie (I.T.A.F, 2008).

## I.5. Ecologie de l'olivier

L'olivier a les qualités indiscutables de résister à de mauvaises conditions de croissance, mais lorsque ces besoins sont satisfaits, il devient l'une des espèces les plus productives.

Un certain nombre de décisions et d'actions proactives sont nécessaires pour la cultiver.

### I.5.1. Température

L'olivier a besoin d'un climat tempéré avec des températures moyennes annuelles comprises entre 16° et 22°C. Il aime la lumière et donne de meilleurs résultats lorsqu'il est exposé au soleil (**Loussert et Brousse, 1978**), grâce à son racine profond, qui peut supporter des températures élevées (+40°) et de longues périodes de sécheresse, bien que les sécheresses estivales entravent le développement des fruits. Elle s'inquiète aussi du froid intense (-12°) qui l'affecte négativement, surtout s'il survient au moment de la floraison (**Hannachi et al., 2007**).

### I.5.2. Pluviométrie

Les précipitations hivernales permettent au sol de stocker des réserves d'eau qui sont transférées à l'arbre en fonction de ses besoins (**Laummanie, 1960**).

Les pluies automnales de septembre à octobre favorisent la croissance et la maturation des fruits. Les précipitations doivent être supérieures à 400 mm et bien réparties car il y a pas de périodes sèches de plus de 15 et 30 jours, ni d'inondations prolongées pour éviter les arrosages excessifs (**kattar et al., 2001**). La grêle est aussi nocive que la neige car elle fait tomber les fleurs et les branches (**C.O.I, 2007**).

### I.5.3. Humidité atmosphérique

L'olivier craint une forte humidité de l'air, ce qui empêche sa culture à des températures élevées (**Loussert et Brousse, 1978**). L'humidité peut être bénéfique tant qu'elle n'est ni excessive (+60%) ni constante car elle provoque le développement de certaines maladies et parasites.

### I.5.4. Le vent

Le vent joue un rôle majeur dans la production car il pollinise les l'olivier.

Malgré son importance, l'olivier craint les vents chauds qui peuvent provoquer des brûlures sur les arbres et le dessèchement des stigmates au moment de la floraison, qui peuvent endommager la récolte (**Lousert et Brousse, 1978**).

## **I.6. Les maladies de l'olivier**

La plupart des maladies de l'olivier sont causées par des bactéries, des virus et des champignons, par exemple.

### **I.6.1. La gale du collet**

La bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, qui cause le coup de vent du collet, affecte généralement les jeunes arbres.

Le symptôme le plus courant se manifeste par des tumeurs au niveau de la racine, juste au-dessus ou au-dessous du sol.

De multiples infections tumorales empêchent les arbres de transférer les nutriments et l'eau vers leurs parties supérieures. En conséquence, ils deviennent progressivement inaptes avant de décéder. Les bactéries peuvent persister pendant de nombreuses années sous terre.

### **I.6.2. La cercosporiose de l'olivier**

Les oligospores causées par l'agent pathogène *Cercospora cladosporioides* entraînent souvent une chute importante des feuilles, un retard du développement des fruits et une diminution de la production d'huile.

La gravité de l'attaque est favorisée par une humidité élevée et des températures modérées (**Trapero et Blanco, 2004**).

Les symptômes sur la surface supérieure du plumage se manifestent d'abord par des épines irrégulières jaunâtres, puis s'assombrissent et se nécrosent (figure 9).

Il y a quelques zones irrégulières et grises au bas du visage. Cependant, ces symptômes sont souvent confondus avec d'autres agents pathogènes (**Trapero et Blanco, 2004**).



**Figure 9 :** Feuilles d'olivier attaquées par cercosporiose (Avila et Trapero, 2010).

## II. La phyllosphère et ses différents composants

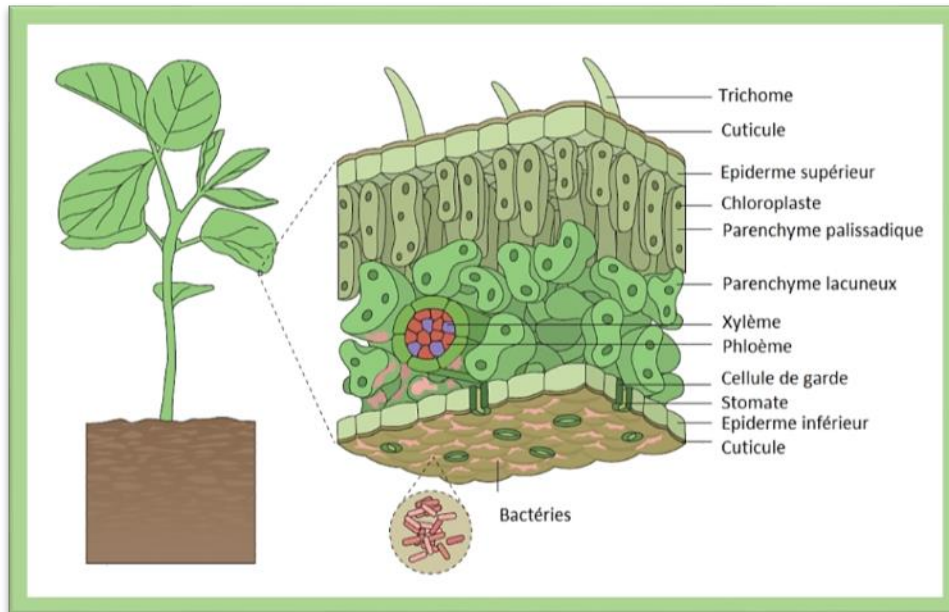
### II.1. Définition et composition de la phyllosphère

Des communautés complexes de micro-organismes vivent dans la phyllosphère, qui fait partie de la flore aéroportée. Contrairement aux champignons et aux archées, les bactéries y prédominent numériquement (Vorholt, 2012).

Il existe deux définitions de la « **phyllosphère** » dans la littérature : l'une se réfère à l'habitat fourni par toutes les parties aériennes de la plante (Lindow et Brandl, 2003), et l'autre se réfère uniquement à la partie feuillue de la plante (Jumpponen et Jones, 2009). De nombreuses espèces bactériennes et fongiques peuvent être trouvées sur ces feuilles et autres parties aériennes sous forme de leviers, de champignons filamenteux ou encore de spores dormantes (Lindow et Brandl, 2003).

Les microorganismes phyllosphériques sont appelés épiphytes ou endophytes selon où ils sont localisés sur la feuille. Par exemple, les épiphytes se trouvent à la surface de la feuille, tandis que les endophytes vivent à l'intérieur des tissus dans les espaces intercellulaires des feuilles. (Arnold et al, 2000; Rodriguez et al, 2009).

Cette condition peut changer puisque certaines cellules apicales ont la capacité de pénétrer la paroi et de se transformer en endophytes (Viret et al., 1994 ; Wilson et al., 1999) (Figure 10)



**Figure10** : Schéma d'une coupe transversale d'une feuille (Vorholt, 2012).

En termes de quantité et de diversité, les bactéries sont les principaux groupes qui colonisent la surface des feuilles ; généralement, la majorité des bactéries se répartissent sur la face inférieure des feuilles, en raison de la présence d'un plus grand nombre de stomates ou parce que la peau est plus fine (Beattie et al., 2002; Belhadj et al., 2008).

Par exemple, ont estimé que la diversité des bactéries dans une phyllosphère de 20 000 plantes vasculaires varient de 2 à 13 millions d'espèces (Whipps et al, 2008).

Les champignons également détectés dans la phyllosphère semblent être très divers.

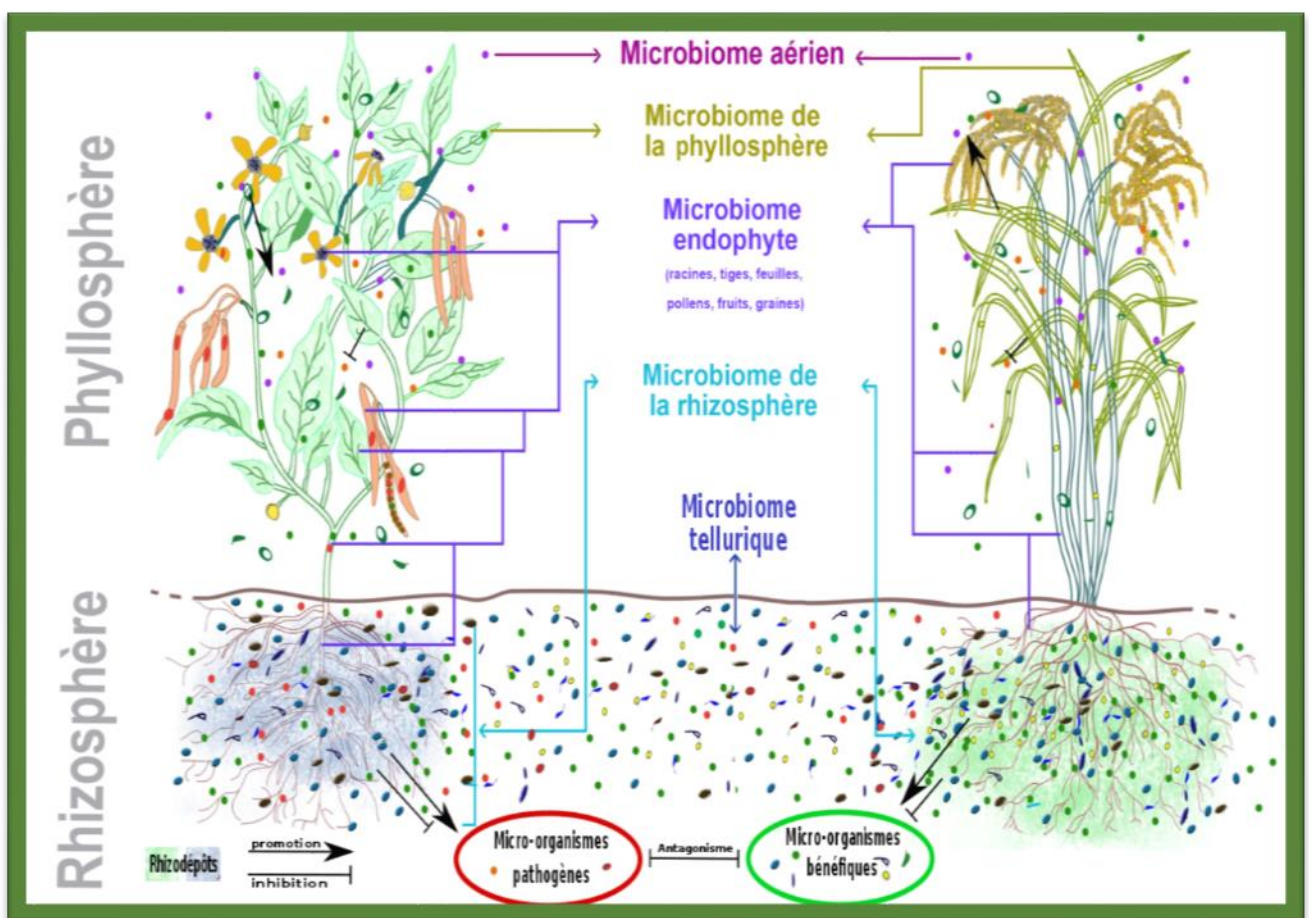
La surface foliaire couvre un pourcentage significative de la surface terrestre, estimée par  $6,4 \times 10^8$  km<sup>2</sup>, fournissant ainsi un habitat d'une large diversité de microorganismes ce qui apporte une contribution importante à la diversité microbienne.

Étant donné que le nombre de cellules bactériennes à la surface des feuilles peut atteindre  $10^6$  à  $10^8$  cellules par centimètre carré, le nombre total de bactéries peut dépasser  $10^{26}$  cellules, même sans tenir compte des autres groupes taxonomiques qui partagent le même habitat (Lindow et Brandl, 2003).

Des études métagénomiques récentes ont montré que la majorité des groupes bactériens sont soit mal compris, soit constitués d'espèces sans nom (Lambais, 2006). Malgré le fait que les

surfaces aérobies sont souvent un environnement hostile pour les micro-organismes en raison de leur système ouvert et de leurs forts effets abiotiques, les espèces microbiennes ont réussi à coloniser cet environnement malgré des conditions différentes et une faible disponibilité des nutriments (Lu,2020).

Les deux organisations (végétale et microbiologique) coexistent dans le même environnement (Figure 11), et en cause de leurs interactions, qui ont d'importantes implications agricoles et environnementales, leurs voies évolutives sont entrelacées (Whipps *et al.*, 2008).



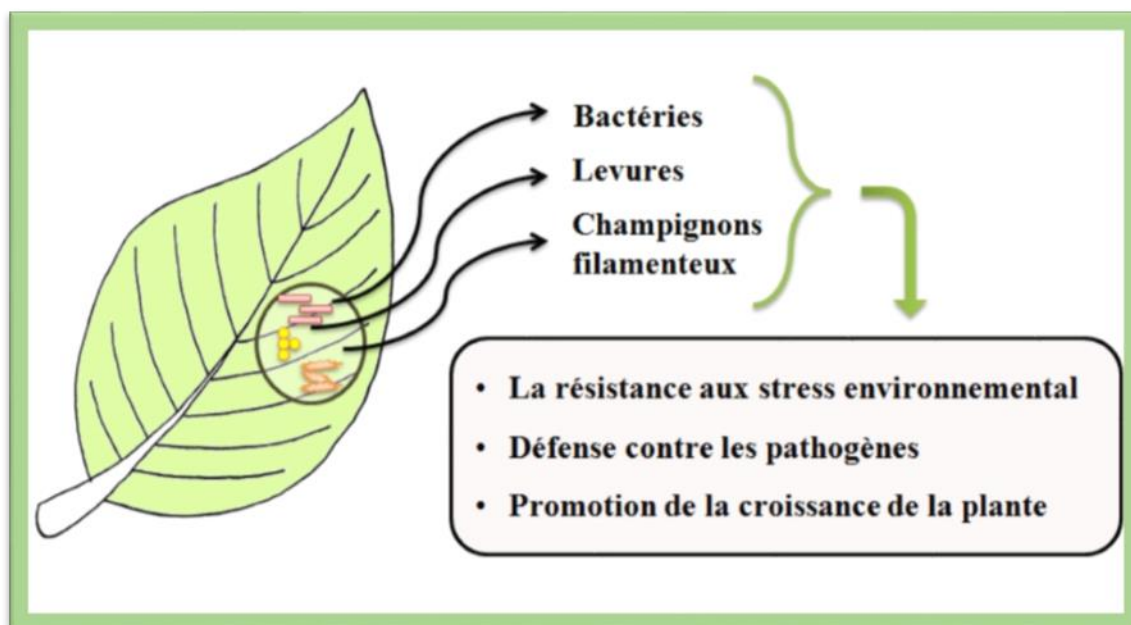
**Figure 11** : Schématisation de phyllosphère et de rhizosphère (Lu, 2020).

## II.2. Rôle écologique des microorganismes de la phyllosphère

Les microbiomes de nombreux hôtes sont vitaux, tout comme la flore tubulaire le système digestif chez l'homme (Schreiner *et al.*, 2015).

De même, chez les plantes, ces micro-organismes contribuent à de nombreuses fonctions vitales, et leur absence serait particulièrement notable dans la vie sur Terre (Gilbert et Neufeld, 2014).

Ces êtres microscopiques jouent plusieurs rôles (Figure 12) et agissent comme des moteurs de la biodiversité, qui ont un impact significatif sur la vie végétale (Bradley *et al.*, 2008). Certaines espèces mutualistes augmentent la valeur adaptative de leur hôte en limitant les attaques d'insectes herbivores impliquant la formation d'alcaloïdes toxiques (Wilkinson *et al.*, 2000).



**Figure 12:** Composition et rôles de la phyllosphère (Ait ouamer, 2022).

Plusieurs études ont démontré l'effet des champignons de la phyllosphère sur l'aptitude des plantes hôtes. Par exemple, les agents pathogènes réduisent la valeur adaptative de leur hôte et limitent la propagation de la maladie à d'autres organismes (Gilbert, 2002 ; Newton *et al.*, 2010), par des champignons pathogènes (Arnold *et al.*, 2003), ou en améliorant la résistance aux stress environnementaux (Rodriguez et Redman, 2007).



Cette flore douce joue un rôle important dans la promotion de la croissance de la plante hôte ; En effet, le microbiome végétal est le déterminant de la gestion de la croissance et de la santé des plantes en modulant les processus physiologiques dans diverses situations environnementales (**Parasuraman et al., 2019**).

On pense que les composants de la phyllosphère sont des dégradateurs précoces (décomposeurs) de la litière forestière, continuant à jouer un rôle même après la chute des feuilles et contribuant au recyclage du matériel organique (**Osono, 2006**).

Ces micro-organismes jouent un rôle dans la capacité de la plante à résister aux différents stress environnementaux. Selon Rodriguez et, ils peuvent altérer la tolérance climatique physiologique d'une plante, affectant sa capacité à coloniser de nouveaux environnements ou pour s'adapter à de nouvelles situations environnementales. Lorsqu'un virus infecte un champignon végétal mutualiste, par exemple, cette plante peut être capable de supporter des températures extrêmement élevées (65°C) pendant plusieurs jours, alors que ni le champignon ni la plante ne peuvent le faire par eux-mêmes (**Redman et al., 2002 ; Marquez et al., 2007**).

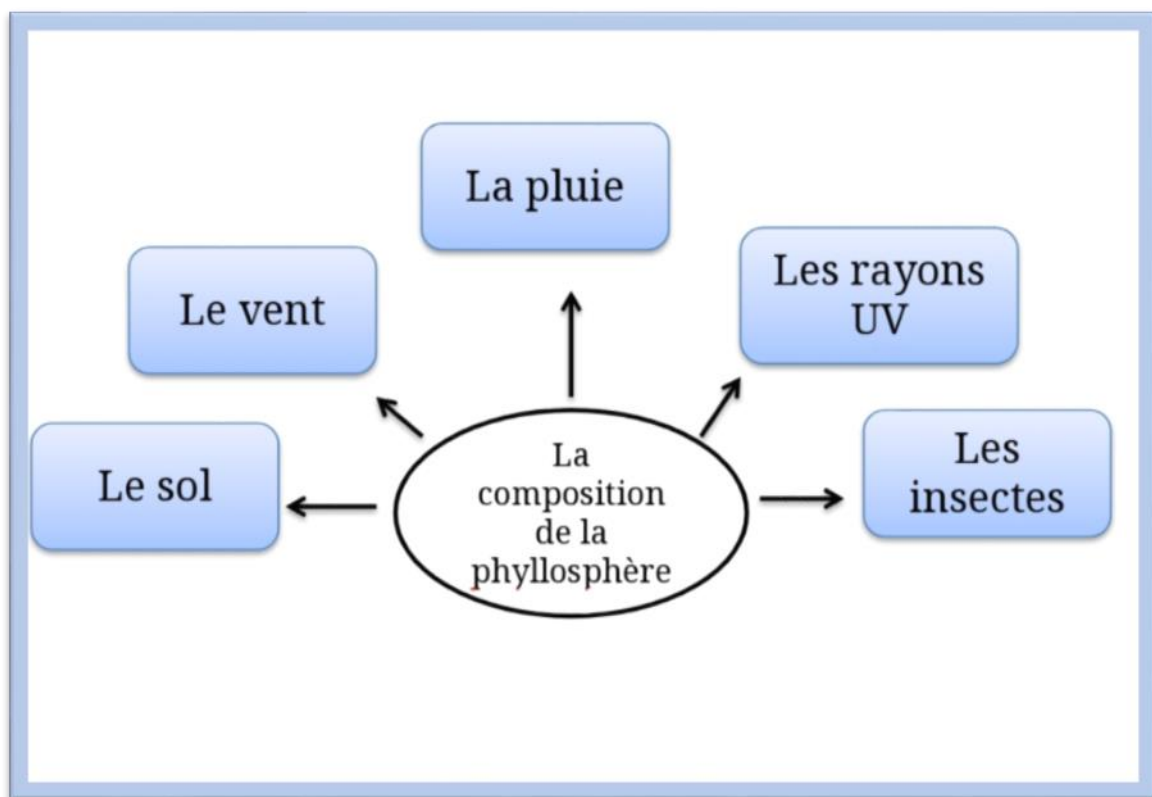
### **II.3. Origine des micro-organismes qui colonisent l'atmosphère**

Il y a plusieurs siècles, l'idée a émergé que l'air et les surfaces contiennent des organismes vivants existants. En 1891, Aristote, malgré sa croyance en la théorie de la génération spontanée, a suggéré que certaines maladies se propagent par quelque chose dans l'environnement, « parce qu'il y a dans cet air quelque chose de morbide ». Ainsi, l'air est chargé de micro-organismes, qui sont naturellement la première source de micro-organismes dans la couche de la phyllosphère, faisant de l'atmosphère le premier pourvoyeur. Plus tard, avec l'observation microscopique, cette théorie a été confirmée (**Bulgarelli et al., 2013**).

Lorsqu'ils atteindront la surface, ils s'occuperont d'abord des micro-organismes présents, avant de passer à ceux qui finiront par surgir (**Lindow et Brandl, 2003**).

La possibilité de transport vertical; Les espèces microbiologiques peuvent provenir de la graine ou du milieu de germination (**Barret et al., 2015**). S'applique à un certain nombre de champignons endophytes (**Rodriguez et al., 2009; Hodgson et al., 2014**). Des micro-organismes peuvent être déposés sur les feuilles par des facteurs environnementaux tels que la pluie et le vent (**Morris et al., 2008**).

La diversité atmosphérique est affectée par les animaux et les insectes car ils permettent le transfert d'innombrables types de micro-organismes d'une plante à l'autre (Osono, 2014). Grâce au système vasculaire de la plante, les bactéries du sol peuvent également coloniser les racines et se transformer en endophytes dans les feuilles (Lamb et al., 1996). Il est donc probable que la formation de la phyllosphère soit en fait le résultat de l'influence simultanée de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques (Figure13).



**Figure 13** : Facteurs biotiques et abiotiques influençant la composition de  
La phyllosphère (Personnel, 2023).

## **II.4. Facteurs affectant la croissance et les activités des microorganismes dans la phyllosphère**

Les microorganismes présents dans la phyllosphère sont influencés par de nombreux facteurs qui affectent leur croissance et leurs activités. Certains des principaux facteurs comprennent:

### **II.4.1. Espèces végétales :**

Différentes espèces végétales soutiennent des communautés de différents micro-organismes dans toute la phyllosphère. Ceci est en partie dû aux différentes compositions chimiques des surfaces végétales, qui peuvent affecter la survie et la croissance des microorganismes.

### **II.4.2. Âge des plantes :**

L'âge d'un organe végétal peut également affecter la composition et l'abondance des micro-organismes dans la phyllosphère. Les plantes plus jeunes ont tendance à contenir moins de micro-organismes que les plantes plus âgées, et qui ont eu plus de temps pour accumuler des communautés microbiennes. Ceci est déterminé par son état structurel (**Hallman et al, 1997**).

### **II.4.3. Disponibilité des nutriments :**

La croissance et les activités des microorganismes dans l'environnement de la phyllosphère peuvent être influencées par la disponibilité de nutriments tels que le phosphore et l'azote. Les plantes libèrent des nutriments à leur surface, ce qui favorise le développement de communautés microbiennes.

### **II.4.4. Climat et conditions météorologiques :**

Les facteurs environnementaux et les changements climatiques, tels que la température, les précipitations et l'humidité, peuvent affecter de manière significative la croissance et l'activité des microorganismes au niveau de la phyllosphère. Par exemple, une humidité élevée peut favoriser la croissance de champignons, tandis que des conditions sèches peuvent inhiber l'activité microbienne.

Différentes saisons affectent également la formation des organismes vivants, puisque ces derniers peuvent en trouver certains à un moment donné en hiver, et ne pas les retrouver à un autre moment (**Barberan, 2014**).

De nombreux facteurs liés à l'heure de la journée ou de l'année affectent l'activité et la composition de la communauté phyllosphère. Où les feuilles peuvent être exposées à une température élevée au soleil en tombant la nuit (**Thompson et al, 1993**).

Ainsi, les propriétés des nutriments sécrétés par la plante, sources de microorganismes, varient également entre le jour et la nuit et sont influencées par les stress biotiques et abiotiques auxquels elles sont exposées (**Trouvel et al., 2014**).



*Partie 2 :*  
*Partie expérimentale*



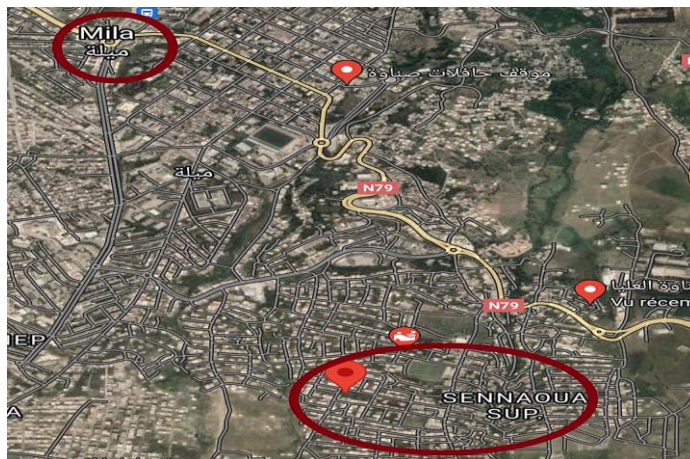
*Matériel & méthodes*

## I.1. Echantillonnage, prélèvement et stockage des feuilles de l'olivier

### I.1.1.Présentation du site d'échantillonnage

Ces travaux ont été réalisés dans l'État de Mila exactement dans la ville de Mila, qui prend le nom de l'État, qui occupe une superficie estimée à 340 700 K<sup>2</sup>. Caractérisé par son climat chaud en été et ses hivers froids et humides, où l'on estime que 600 mm de précipitations tombent chaque année. La ville dépend principalement de l'activité agricole, parmi lesquelles la culture de l'olivier a dépassé 12 mille hectares de la superficie totale de l'État, grâce à son climat et à la quantité de précipitations.

Le site d'échantillonnage est un champ situé dans Sennaoua Super, au sud de la ville de Mila, à 2 km du centre-ville, exactement dans le quartier de Bouàdem.



(a)



(b)

**Figure14** : Localisation géographique de site d'étude (a et b)

### **I.1.2.Matériel et produits utilisés pour le prélèvement**

Afin de réaliser un bon prélèvement stérile des feuilles de l'olivier, nous avons pris avec nous un ensemble d'outils sur le site d'échantillonnage : Alcool, un ciseau, sacs de plastique stérile, marqueur indélébile permanent, ruban adhésif et glacière propre.

### **I.1.3. Stratégie d'échantillonnage des feuilles d'olivier**

Dans cette étude, des feuilles d'olivier ont été prélevées dans 8 mai 2023, au niveau de sennaoua super des points de prélèvement sont sélectionnés au hasard du terrain. Les échantillons sont prélevés sans toucher la feuille de l'olivier, afin d'éviter la contamination, est obtenue en coupant le pétiole des feuilles avec un ciseau préalablement stérilisé par immersion dans de l'éthanol et flambage avec la flamme du briquet.

Le processus est répété sur toutes les feuilles, après quoi ils sont conservés dans sac en plastique stérile (Figure15).



**Figure15** : Echantillons de feuilles d'olivier (Personnel, 2023).

### **I.1.4.Conservation des feuilles**

Dans le sac dans lequel les feuilles ont été recueillis, la date, le lieu et l'emplacement exact seront inscrits. Pour éviter toute entrée d'air ou toute contamination externe, le sac en plastique est scellé hermétiquement avec du ruban adhésif, puis stocké dans une glacière à une température de (-20°C) pour être transporté au laboratoire.



## I.2. Préparation des milieux et des solutions pour l'isolement

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

### I.2.1. Milieux de culture utilisés

Trois milieux de culture ont été utilisés dans la partie expérimentale. Ces milieux contiennent les besoins nutritionnels (sources d'énergie, carbone, azote...) et physiques (pH, température, eau...) nécessaires à la croissance des bactéries et autres micro-organismes :

#### ❖ La gélose nutritive (GN) :

Appelée encore gélose nutritive ordinaire. Il s'agit d'un milieu non-sélectif solide, à usage général, il ne permet pas de sélectionner une souche bactérienne précise. qui favorise la croissance d'un large éventail d'organismes non filamenteux. La GN est populaire parce qu'elle permet la croissance de divers types de bactéries et de champignons.

#### ❖ Le bouillon nutritif (BN) :

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

#### ❖ Le milieu de Chapman :

C'est un milieu sélectif qui sélectionne les microorganismes halophiles, parmi lesquels les *micrococcus*, les *enterococcus* et les *staphylococcus* pathogènes, ces derniers donnant des colonies jaunes par fermentation du mannitol et se décolorant en rouge phénol. Sa teneur élevée en chlorure de sodium empêche la croissance de la plupart des autres espèces indésirables.

#### ❖ Le milieu gélosé de Sabouraud :

C'est un milieu de culture sélectif pour la culture fongique et est principalement utilisé pour isoler les levures et divers champignons pathogènes et non pathogènes.

L'ajout de chloramphénicol inhibe la croissance bactéries Gram positives et Gram négatives.

### **I.2.2. Préparation du bouillon nutritif (BN)**

13 g de poudre de bouillon nutritive sont pesés, d'autre part une petite quantité d'eau distillée est ajoutée dans un flacon erlenmeyer d'une contenance de 1000 ml. Il est mélangé avec le bn préalablement pesé, puis mélangé pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à dissolution. Après cela, le mélange est additionné d'eau distillée jusqu'à ce qu'il atteigne 1 litre et mélangé pendant une heure supplémentaire. De plus, nous avons prélevé 150 ml de la quantité totale et l'avons mis dans un flacon de 250 ml, puis stérilisé dans un autoclave pendant 20 minutes à 120 °C.



**Figure16** : L'agitation et la stérilisation du bouillon nutritif

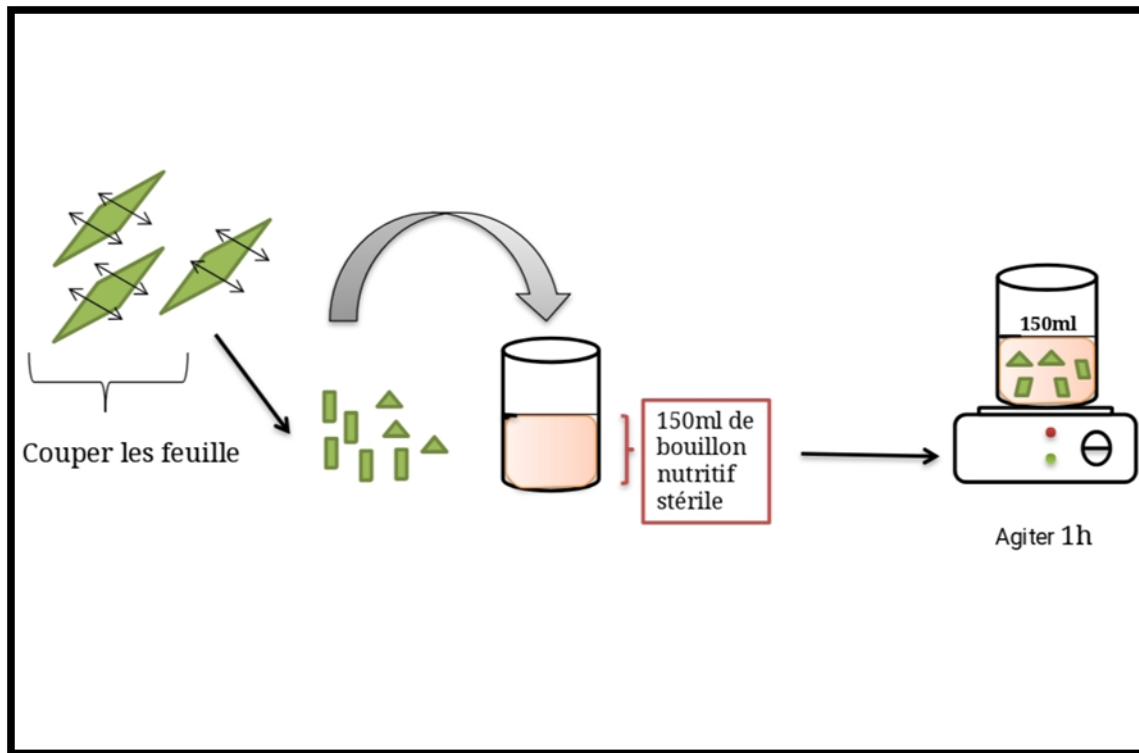
(Image prise par MEBERBECH Samira, Laboratoire de Biologie, Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF-Mila ; 2023).

### **I.2.3. Préparation de la solution mère contenant les feuilles**

La feuille est coupée en petits morceaux avec d'un scalpel ou de ciseau stérilisée au bec Bunsen. Ces derniers sont placés dans une fiole contenant 150 ml de bouillon nutritif stérile

(BN). Ensuite, la fiole est bien fermée avec un morceau de papier film et le tout est laissé sous agitation pendant une heure (1h) sur un agitateur magnétique (figure 17).

Cela permet de détecter et décrocher les bactéries et autres micro-organismes concentrés dans les tissus (épiphytes) et augmente le nombre de bactéries pouvant être cultivées. Ce mélange est ensuite filtré par du papier filtre stérile. Le résultat de ce processus est la solution finale, qui est la solution mère.



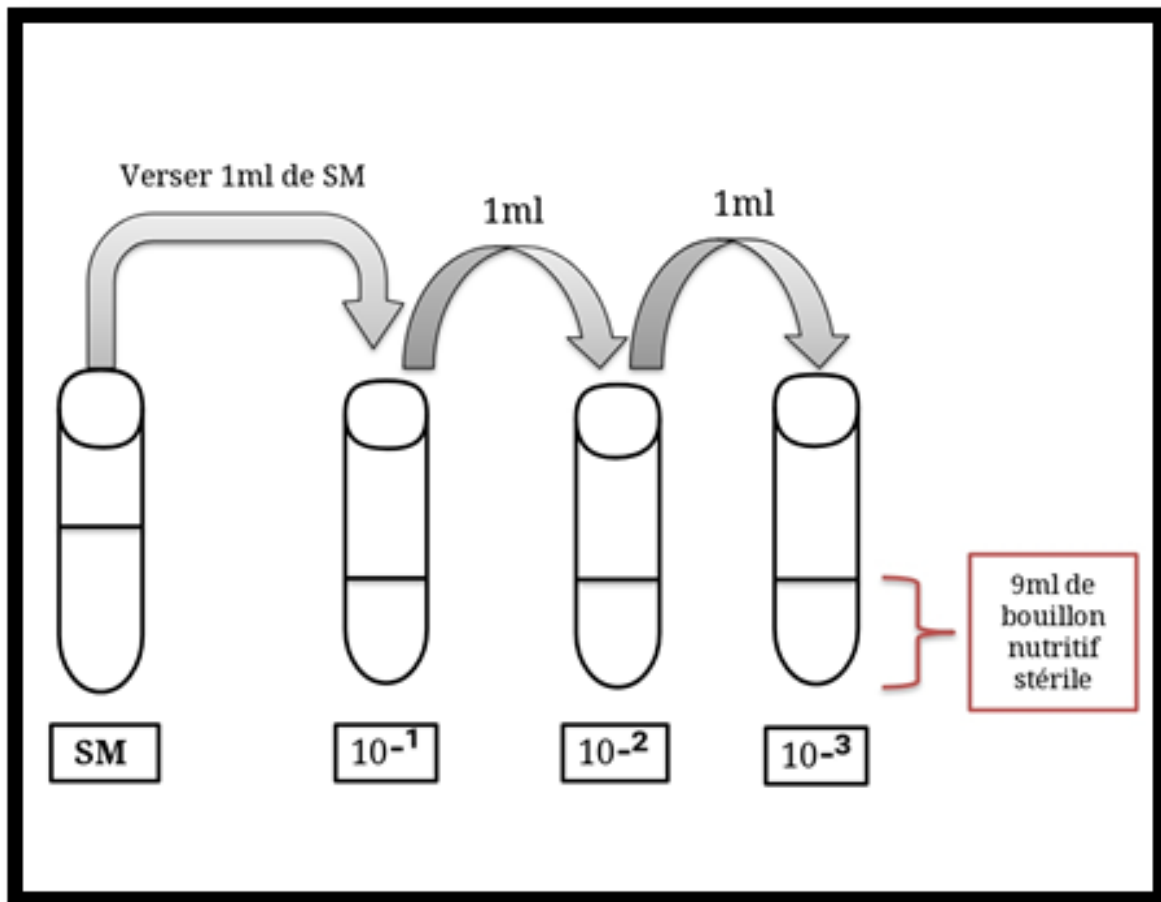
**Figure 17** : Méthodes utilisées pour préparer la solution mère (Personnel, 2023).

#### I.2.4.Préparation des dilutions

L'isolement des bactéries d'une culture sur gélose semble parfois difficile en raison de la charge microbienne élevée. Il en résulte une surface de boîte de Pétri recouverte de colonies s'agglomérant, rendant difficile la visualisation de colonies séparées, qui sont difficiles à réensemencées et étudiées, nécessitant une dilution du produit à analyser.

Un volume de 1 ml de la solution mère préparée précédemment est ajouté dans un tube à essai contenant 10 ml de bouillon nutritif stérile, représentant la première dilution ( $10^{-1}$ ). Pour une deuxième dilution ( $10^{-2}$ ), 10 ml de bouillon nutritionnel stérile sont préalablement mélangés à 1

ml d'une première dilution ( $10^{-1}$ ). La même procédure est utilisée pour obtenir la dilution finale ( $10^{-3}$ ).



**Figure 18 :** Préparations des dilutions à partir de la solution mère (SM).

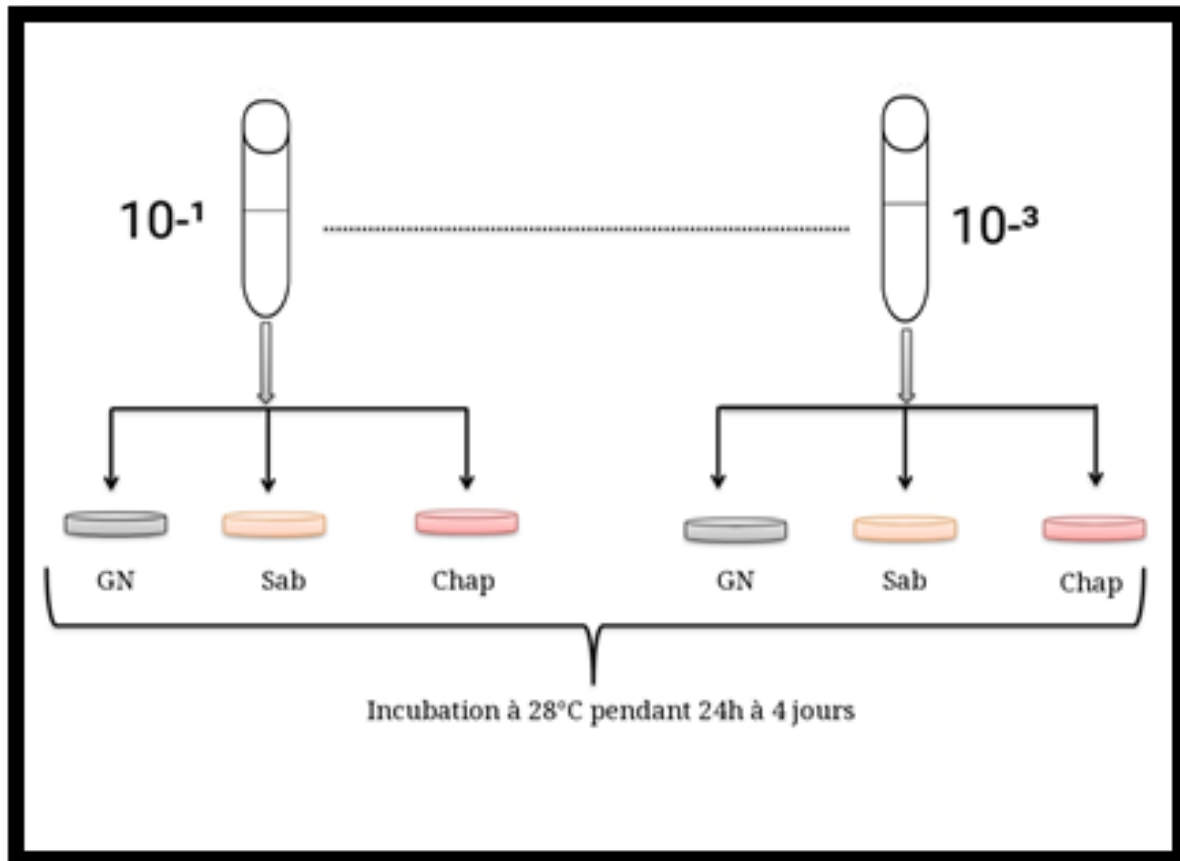
Les différents tubes contenant les différentes solutions préparées sont mis à incuber avec agitation, pendant 24h à 28 °C et sont ensuite contrôlés pour la croissance bactérienne après incubation par présence ou absence de trouble.

### I.3. Isolement des bactéries à partir des feuilles

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

### I.3.1.ensemencement

L'ensemencement est réalisé à partir de chacune des dilutions retenues ( $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ), ces dernières représentent l'inoculum (Figure 19).



**Figure 19** : Etapes d'ensemencement à partir des dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ).

A l'aide d'une anse de platine préalablement stérilisé dans un bec Bunsen, ensemenecer une quantité de l'inoculum, de manière à ce que l'ouverture des tubes de l'inoculum soit stérilisée à chaque utilisation.

L'inoculum est ensemenecé sur la surface et distribué après rotation des boîtes à chaque fois et par la méthode de quatre cadrans dans des boîtes de pétri contenant chacune du GN, Chap et du Sab coulé et pré-séché.

Le procédé est réalisé dans chaque milieu avec 3 répétitions pour chaque dilution (Figure 20).

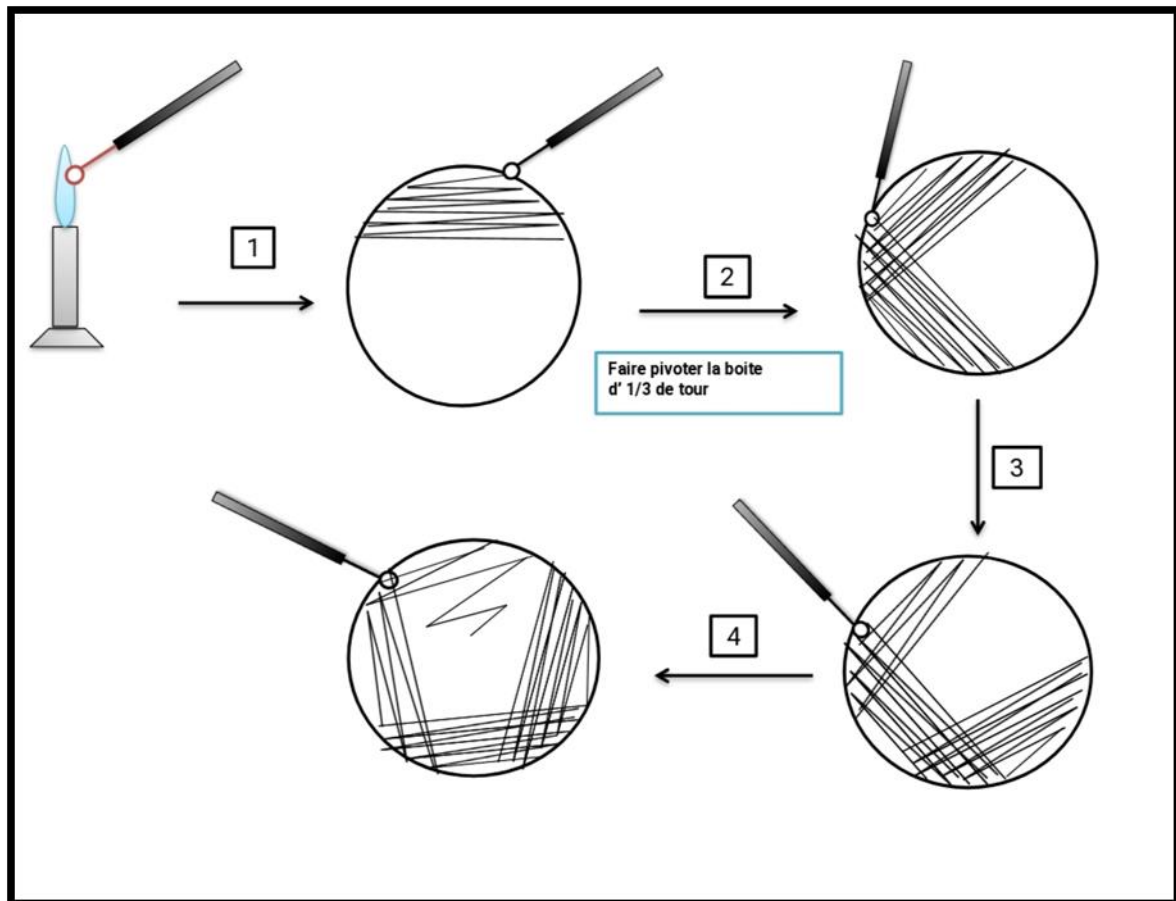


Figure 20: Méthode d'ensemencement de 4 cadrans (Personnel, 2023).

### I.3.2. Incubation

Après séchage, les boîtes ensemencées préalablement préparées sont ensuite incubées à 28°C pendant 24 heures à 4 jours dans une étuve. Après incubation, les boîtes sont utilisées pour suivre les colonies qui se sont développées sur les GN, chap et sab. Après un et quatre jours d'incubation, les boîtes sont prêtes à être examinées.

## I.4. Caractérisation morphologique des isolats

### I.4.1. Observation macroscopique des colonies bactériennes

Il s'agit d'une étude morphologique à l'œil nu permettant de distinguer les caractéristiques des colonies apparues sur tous les milieux de culture après incubation. Chaque type bactérien développe une grande colonie. L'apparition des colonies dépend du milieu, de la durée et de la

température de l'incubation. Différents caractères d'identification macroscopique sont examinés dans cette observation macroscopique tels que :

La forme (rond, entier, ondulé, zoné, filamenteux...), taille, hauteur (concave, convexe, plat), opacité (opaque, translucide, transparente), texture de surface (lisse, rugueux, sec), couleur, aspect (collant, filandreux...) et tranchant (régulier, lobé, ondulé...).

#### **I.4.2.Observation microscopique**

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

##### **a- La coloration au bleu de méthylène**

La coloration au bleu de méthylène est simple et rapide à réaliser, et permet l'observation de bactéries et de champignons, car elle respecte mieux la structure cellulaire que gram. L'utilisation de cette coloration permet de distinguer leurs formes, le regroupement et tailles et de bien voir les cellules présentes (Gill, 2015).

##### **Protocole de réalisation :**

Il existe deux méthodes d'observation microscopique des champignons : la plus simple consiste à utiliser un morceau de ruban adhésif transparent « scotch » en évitant de laisser les empreintes sur la face adhésive, utiliser une pince pour le manipuler, et appliquer la face adhésive sur la colonie de champignons, puis poser le morceau de ruban sur la lame (l'observation peut se faire à sec ou avec une goutte d'eau).A la fin observer la moisissure en faible luminosité à l'objectif x 40.

Dans la deuxième méthode, la coloration commence par la préparation des écouvillons et leur fixation, en passant du bleu de méthylène sur le frottis fixé et en attendant 1 minute ou plus, puis en rinçant la lame avec de l'eau distillée et en séchant doucement la lame avec du papier ou à l'air libre, et enfin en observant l'objectif x40.

##### **b- Coloration de Gram**

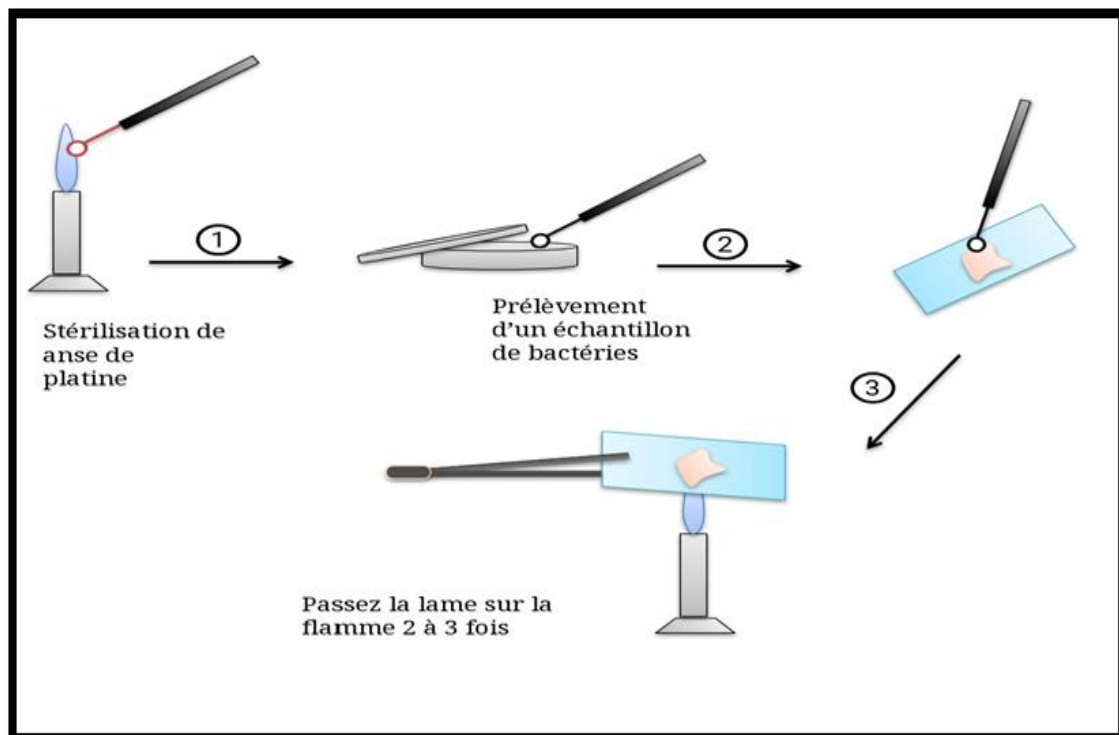
La coloration de Gram permet de mettre en évidence les caractéristiques de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de classer les bactéries en deux grands groupes dits bactéries Gram positives et bactéries Gram négatives.

Le principe de cette coloration est que la paroi des bactéries Gram négatives contient un fort pourcentage de lipides et une fine couche de peptidoglycane qui rend la paroi bactérienne plus poreuse et incapable de retenir la coloration, changeant ainsi la couleur des bactéries. L'inverse est observé pour la paroi des bactéries Gram positives.

### Protocole de réalisation:

#### ➤ La préparation des frottis bactérienne

Après avoir stérilisé l'anse de platine en le chauffant sur un bec Bunsen jusqu'à ce qu'il incandescence, une goutte d'eau est déposée sur une lame microscopique préalablement stérilisée à l'alcool, puis re-stériliser l'anse de platine et le laisser refroidir avant de l'utiliser nouveau pour transférer un petit échantillon de bactéries et le mélanger avec de l'eau dans un mouvement circulaire. Puis l'échantillon de bactérienne est chauffé en passant rapidement la lame deux fois ou trois fois sur la flamme d'un bec bunsen, ce chauffage agit pour stabiliser les bactéries sur la lame afin qu'elle ne glisse pas facilement lors de l'utilisation du colorant. Nous faisons la même chose sur le milieu du GN et le Chap (Figure 21).

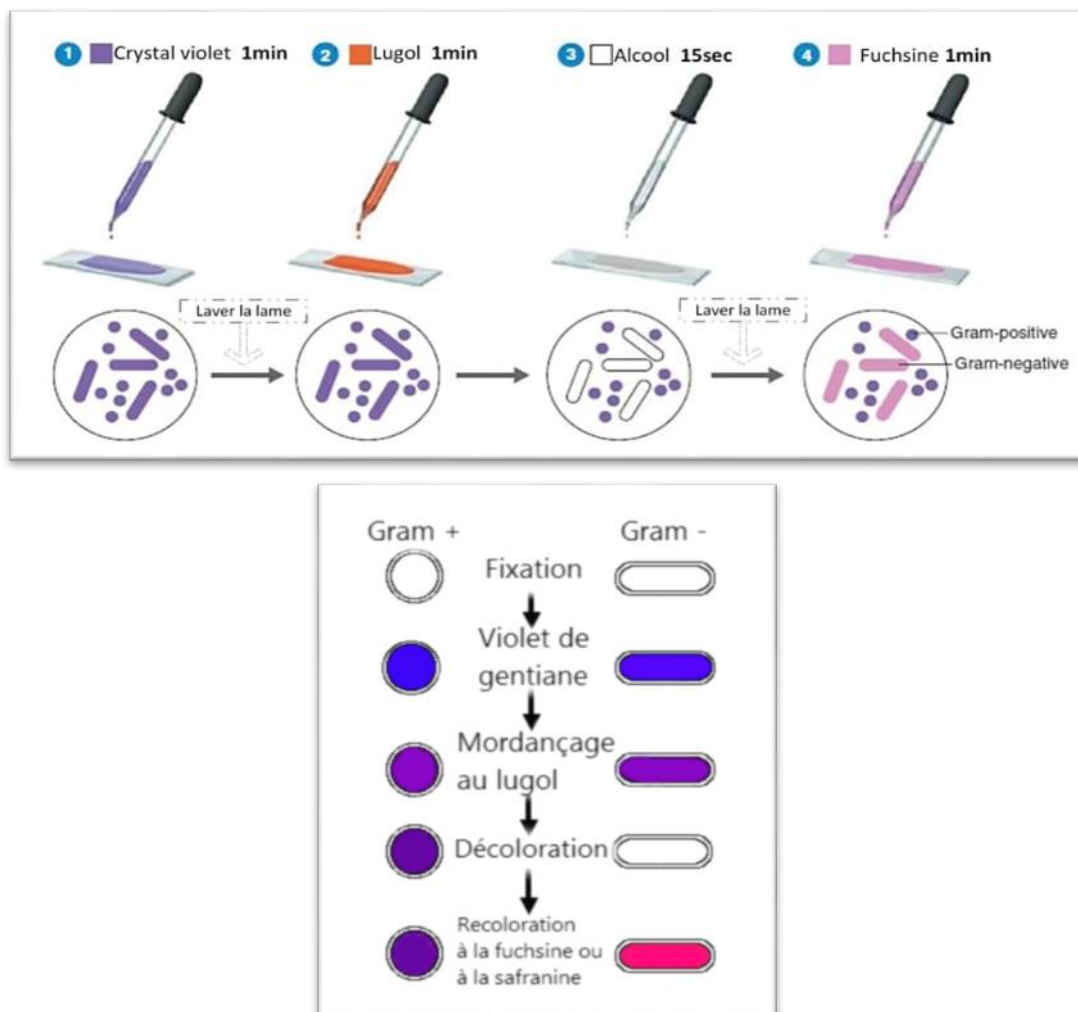


**Figure 21** : Étapes de préparation des frottis bactérienne (Personnel, 2023).



### ➤ L'Application de la coloration de Gram

Après préparation et fixation du frottis on dépose le violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis et le laisser agir pour 1min, on rince très brièvement en faisant couler l'eau distillée sur la lame, puis on dépose quelque goutte de lugol sur le frottis, on laisse agir encore 1min et on rince à l'eau distillée comme précédemment décrit, on fait couler l'alcool sur la lame pendant 5 à 15seconde. Enfin, on dépose la fuchsine, après 1min, on rince à l'eau distillée et on fait sécher par un papier ou on laisse sécher à l'air libre et observer à l'objectif x100 par immersion dans une huile (Figure 22).



**Figure 22:** Les étapes et résultats explicatifs de la coloration de Gram

(Microbiologie clinique, 2022).



## *Résultats & discussions*

## II.1. Isolement des microorganismes des feuilles de l'olivier

### II.1.1. Mise en évidence des microorganismes présents sur les feuilles de l'olivier

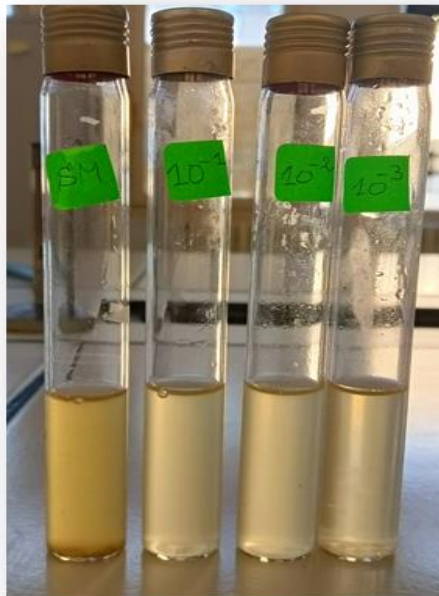
Pour examiner la présence des microorganismes présents sur les feuilles de l'olivier, nous nous sommes basés sur une observation des solutions préparées à partir de ces feuilles. L'observation à l'œil nu de chacune des dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ) incubées pendant 24h montre que tous les tubes donnent un résultat positif (Tableau 01) et (Figure 23).

**Tableau 01** : Croissance microbienne dans les dilutions décimales après 24h d'incubation.

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

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

Tous les tubes avec leurs différentes dilutions ont montré un certain trouble, indiquant la présence et la croissance de micro-organismes (Figure 23).



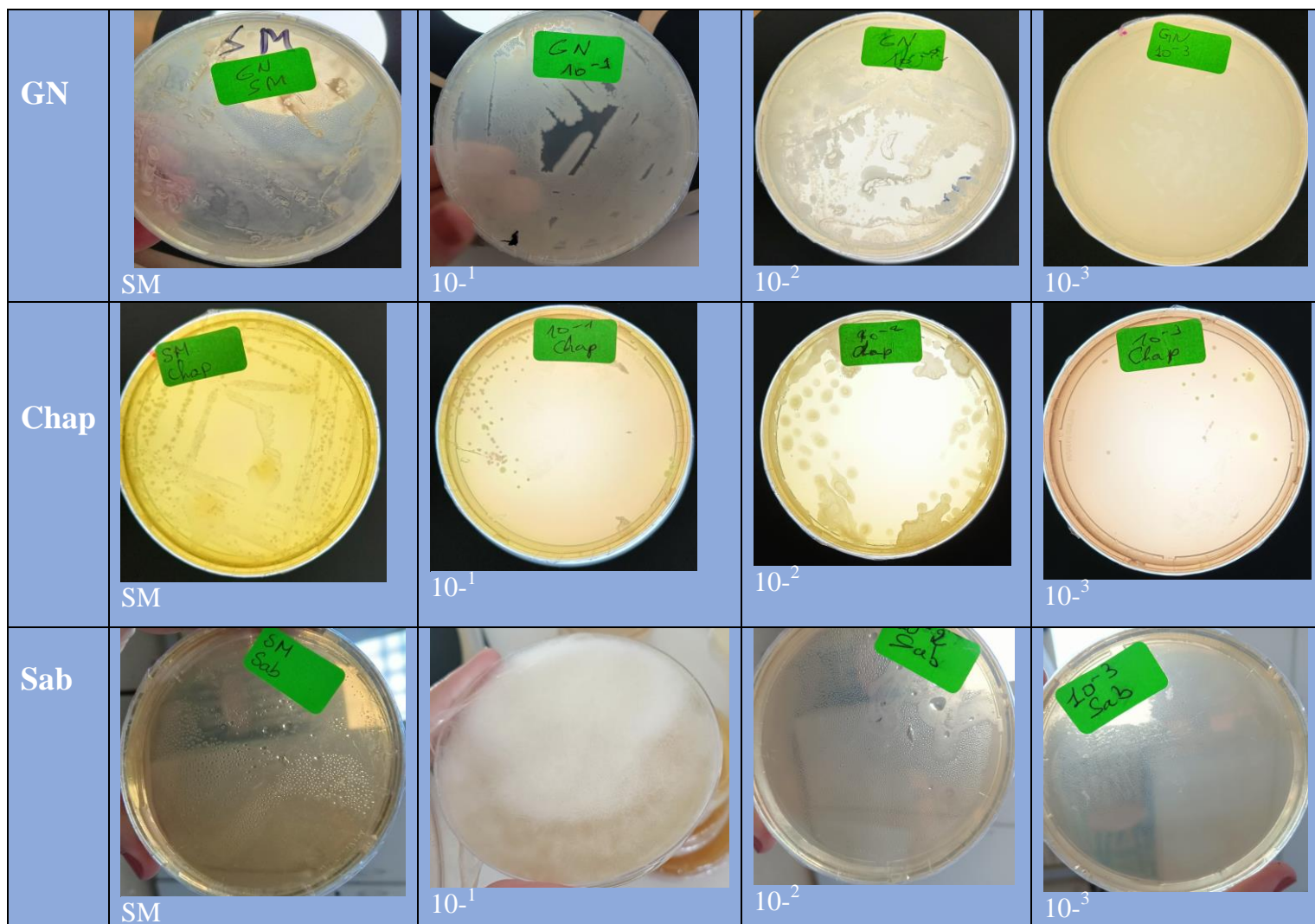
**Figure 23** : Trouble montré par les dilutions décimales après 24h d'incubation.

## II.1.2 Analyse des microorganismes présents sur les feuilles de l'olivier

### II.1.2.1 Analyse macroscopique après 24h d'incubation

#### a- Observation sur Gélose nritif, Chapman et Sabouraud

De nombreuses colonies microbiologiques différentes peuvent être observées à la surface des trois milieux de culture après incubation pendant 24 heures. Certaines colonies sont séparées, Alors que d'autres sont confuses et peu clairs (Figure24).

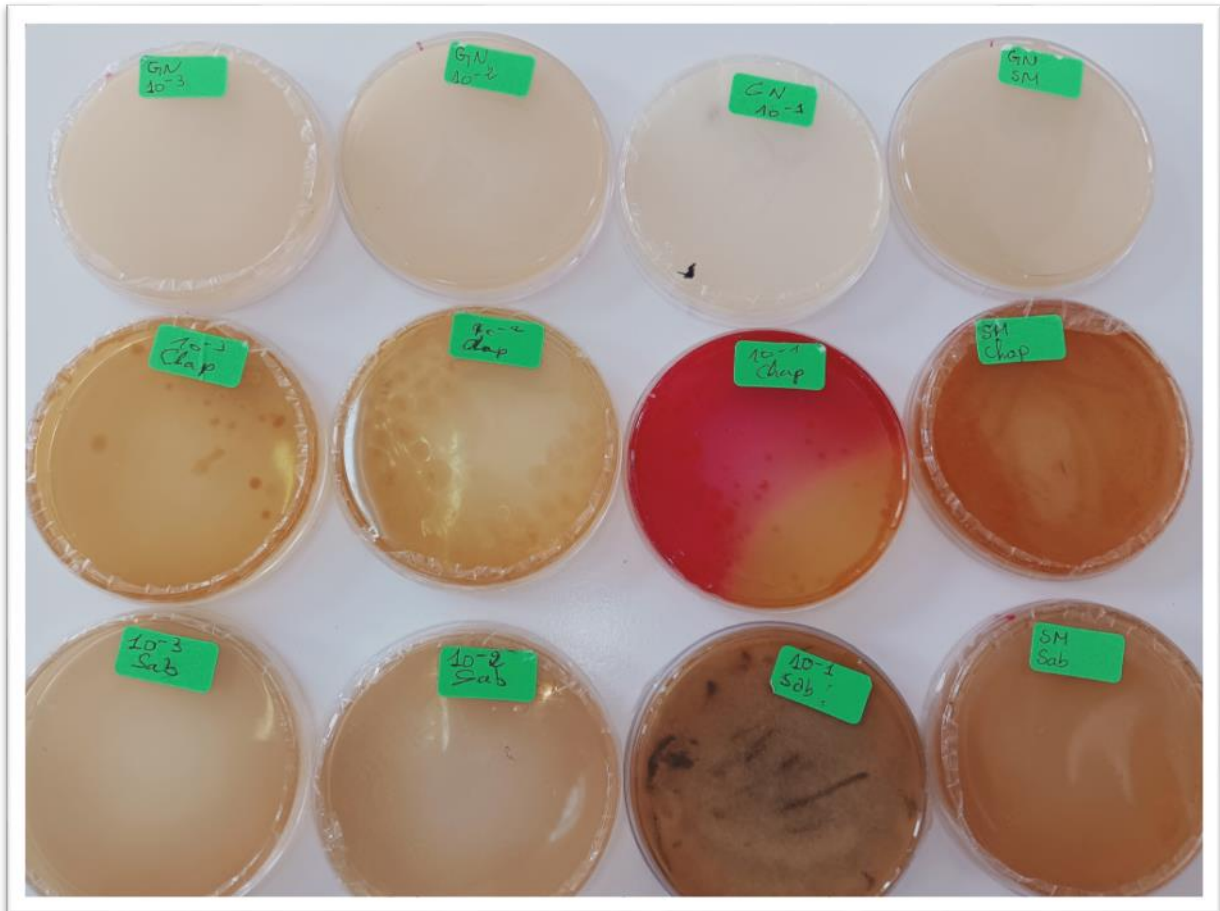


**Figure 24** : L'observation sur les trois milieux (GN,Chapman et Sabouraud) après 24h d'incubation.

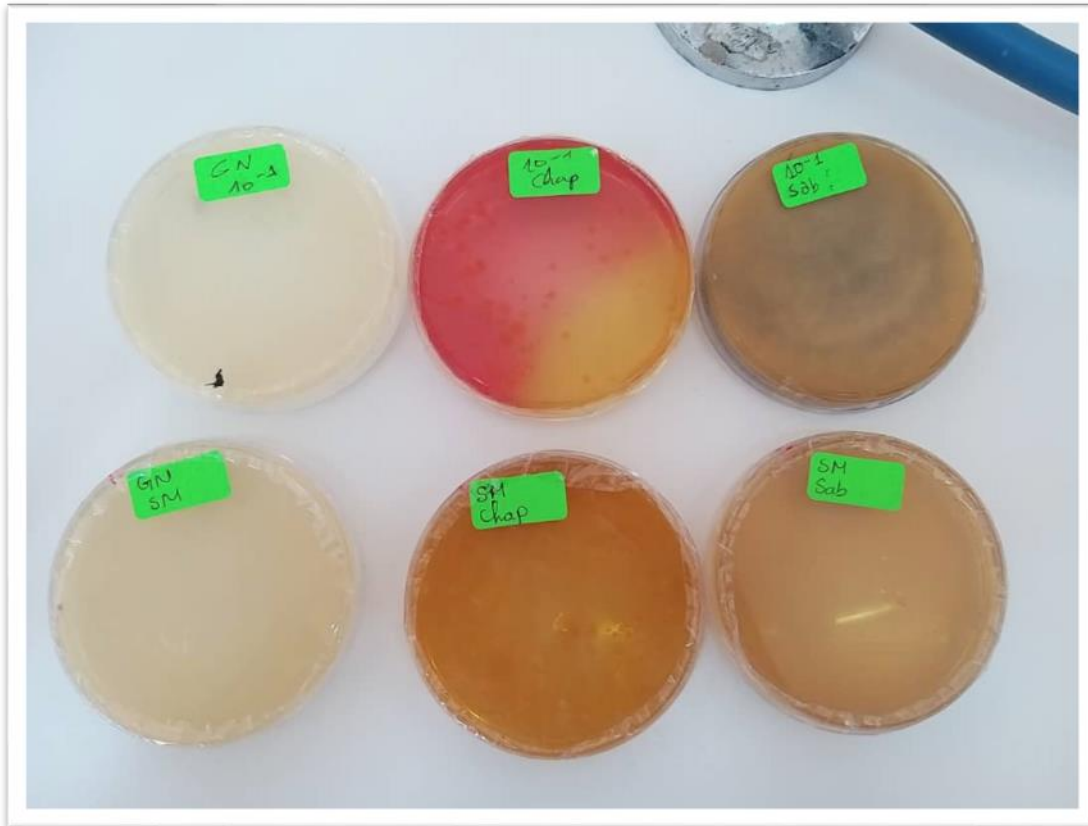
### II.1.2.2 Analyse des isolats après 4 jours

#### a- Observation sur gélose nutritif, Chapman et Sabouraud

Après une période d'incubation de quatre jours des mêmes boîtes pour chaque milieu, une augmentation du nombre de microbienne dans chaque boîte a été observée. Les colonies sont bien distinguées les unes des autres. Leur différence de morphologie est très prononcée surtout à la dilution  $10^{-1}$  et en solution mer (Figure 25).



**Figure 25** : L'observation sur les trois milieux (GN,Chapman et Sabouraud) après 4jours d'incubation.



**Figure 26:** L'observation dans les trois milieux a la SM et la dilution ( $10^{-1}$ ) après 4 jours d'incubation.

### II.1.3.Caractérisation morphologique des colonies obtenues

#### II.1.3.1.Caractères macroscopiques

L'observation macroscopique des boîtes de gélose incubées a permis de mettre en évidence la présence d'une nette diversité bactérienne en obtenant différentes colonies. De la période d'incubation de 24 heures à 4 jours, nous avons sélectionné les colonies les plus détachées et les plus visibles, afin de les examiner sous l'aspect macroscopique et microscopique. Ils sont illustrés dans (Figure27).



**Figure 27:** Observation macroscopique sur chapman et sabouraud

Les résultats des aspects macroscopiques des colonies isolées sont résumés dans le (Tableau02).

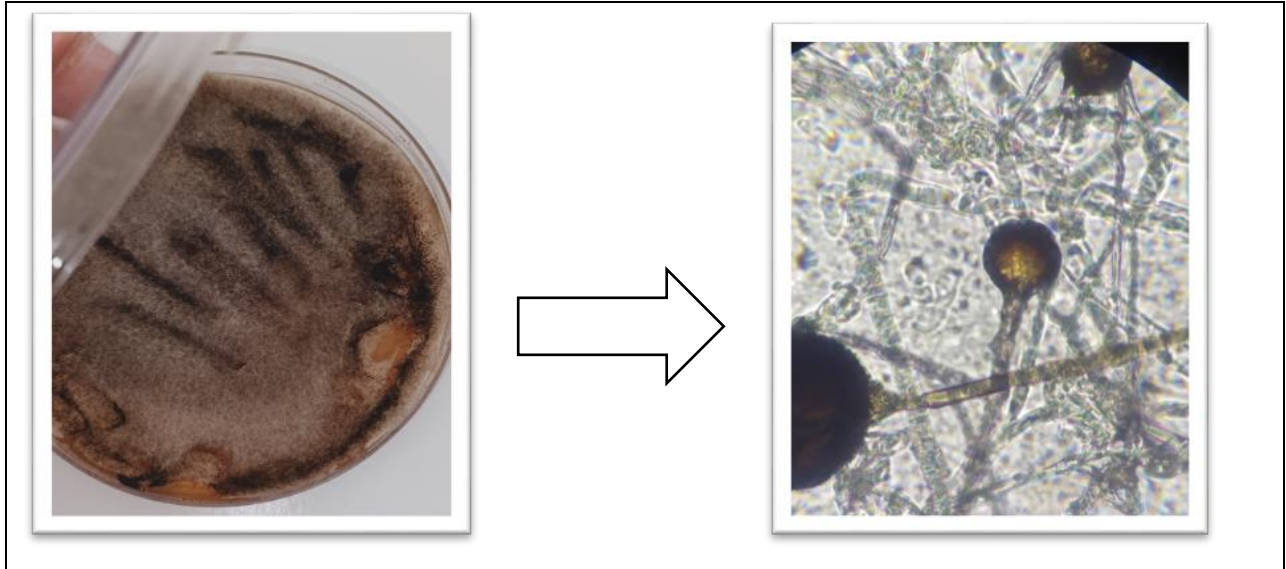
**Tableau 02 :** Aspects macroscopiques des colonies isolées dans les feuilles.

Milieux de culture	Observatoire macroscopique
<b>Chapman</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les colonies sont petites, orange, rondes opaques, lisses.</li> <li>- colonies moyennes d'un diamètre de 2 mm, blanches, irréguliers, translucides, lisses.</li> <li>- Colonies petites, blanches, ronde, régulier, opaques, lisses.</li> </ul>
<b>Sabouraud</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Filamenteux transparent.</li> <li>- Les sporophytes sont discrets ou simples.</li> </ul>
<b>GN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les colonies sont petites, brillantes et translucides</li> <li>Lisse, plate, à contours irrégulière.</li> </ul>

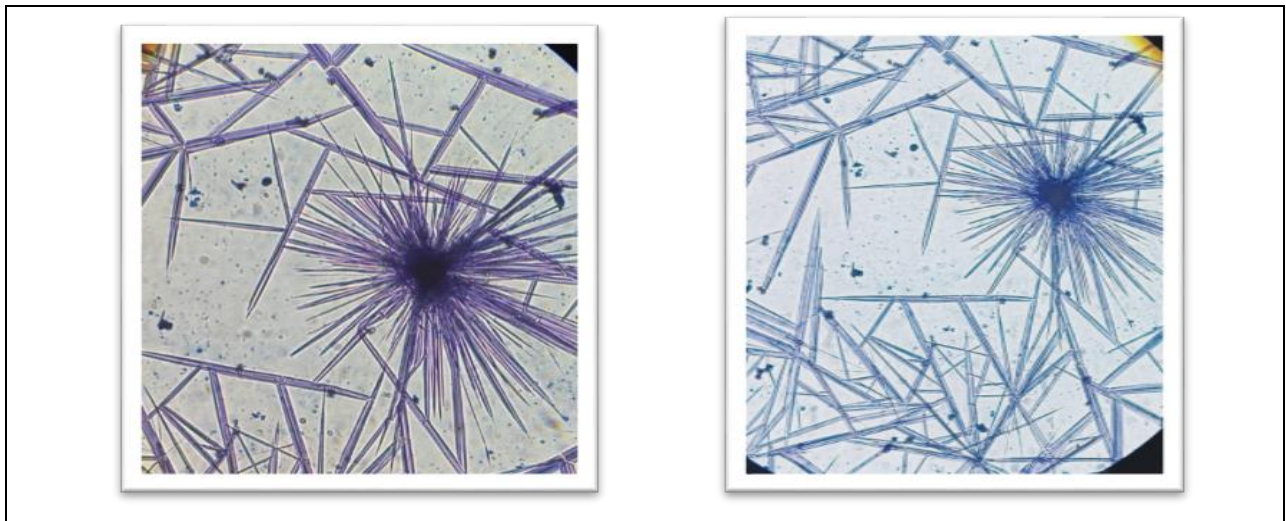
### II.1.3.2. Caractérisation microscopique

#### a- Observation après coloration par le bleu de méthylène

L'observation microscopique a montré que les champignons obtenus en milieu saporaud correspondant à la première dilution ( $10^{-1}$ ) sont de type *Aspergillus fumigatus* (Figure 28; 29).



**Figure 28** : La forme des champignons après observation microscopiques ( $\times 40$ ).



**Figure 29**: La forme des champignons après coloration au bleu de méthylène

(Observée au microscope optique  $40\times$ ).



### b-Observation après coloration de Gram

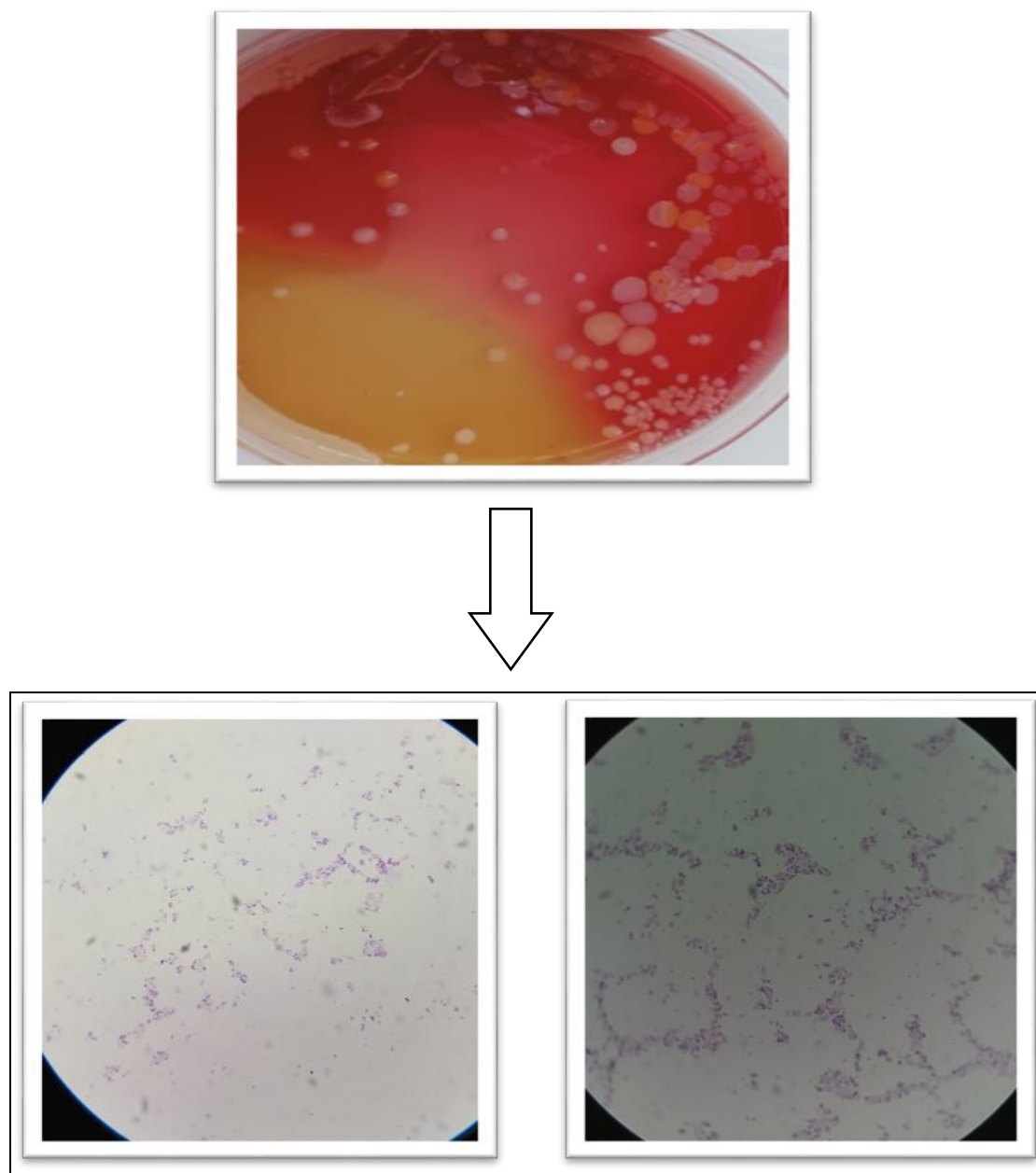
Les observations microscopiques dans ce cas concernaient trois isolats (A, B et C) prélevés consécutivement dans des colonies sélectionnées parmi les trois milieux de culture ayant subi une coloration de Gram. Lorsque deux isolats sont prélevés sur des colonies de milieu Chapman, l'isolat A provient d'une colonie blanche et un autre isolat B provient d'une colonie orange, et enfin l'isolat C provient d'une colonie blanche provenant du milieu GN.

Le résultat montre que les isolats A et B sont en forme de cocci et leur mode de regroupement correspond à un diplococci, et sont de couleur violet. Cette couleur permet de conclure que ces deux isolats ont une couche épaisse de peptidoglycane dans la composition de la paroi cellulaire, ce qui leur permet de conserver leur couleur, on peut donc dire que ces isolats sont à Gram positif (Figure30). Tandis que l'isolat C'est en forme de cocci et de couleur rose. L'apparition de cette couleur indique que cet isolat a une fine couche de peptidoglycane dans la composition de la paroi cellulaire, on peut donc dire qu'il est gram négatif. (Figure31).

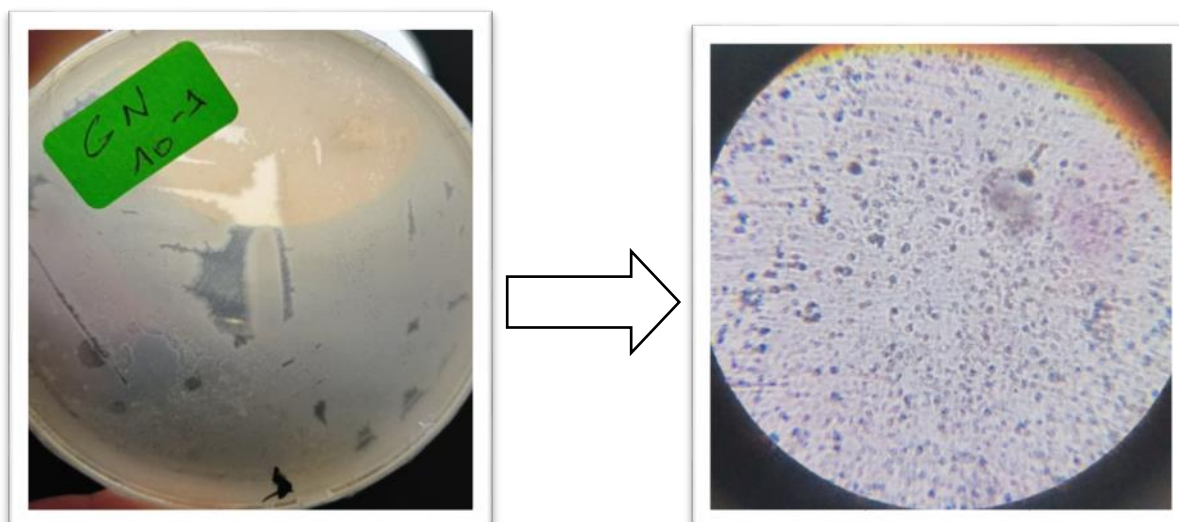
Les résultats des aspects microscopiques des colonies bactériennes et champignons isolées sont résumés dans le (Tableau03).

**Tableau 03:** Aspects microscopiques des colonies isolées dans les feuilles.

Milieux de culture	Observatoire microscopique
<b>Chapman</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cocci, Gram positif, isolés ou regroupés en diplocoques ou en tétrades (isolat A).</li> <li>- Cocci Gram positif groupés en amas sous forme de grappes de raisin, immobiles. (isolat B).</li> </ul>
<b>GN</b>	- Cocci Gram négatif isolés (isolat C)
<b>Sabouraud</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Filamenteux transparent.</li> <li>- Conidies à deux cellules.</li> </ul>



**Figure 30 :** Observation de quelques isolats (A et B) après la coloration de Gram au microscope optique ( $\times 100$ ).



**Figure 31** : Observation de l'isolat (C) après la coloration de Gram au microscope optique×100.

Les espèces obtenues (isolées) d'après la coloration a partir de la coloration de Gram sont :

- Staphylocoque comme *Staphylococcus auréus*.

-Entérobacteriaceae comme *Escherichia coli*

-Champignons comme *Aspergillus fumigatus*

Ces derniers sont isolés à partir de notre échantillon des feuilles de l'Olivier réalisées au Laboratoire de microbiologie de notre Centre Universitaire.

Dont ;

➤ *Staphylococcus auréus*

Le staphylocoque doré est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles. *S. aureus* se présente comme une coque en amas, Gram positif et catalase positif.

cette bactérie est présente dans le nez (d'ordinaire temporairement) d'environ 30 % des adultes sains et sur la peau d'environ 20 % d'entre eux.).

➤ *Escherichia coli* la plus grande famille de l'ordre auquel elle appartient.

« Entérobactéries » est un terme imprécis sur le plan taxonomique mais largement utilisé pour désigner des bactéries abondantes dans le tube digestif des Mammifères et dans l'environnement, dotées de certaines caractéristiques biologiques communes.

➤ *Aspergillus fumigatus* est un champignon du genre *Aspergillus*, responsable d'infections sévères chez les humains et chez les oiseaux.

Chez les humains, il est responsable de maladies comme l'aspergillose broncho-pulmonaire et l'aspergillome, chez les oiseaux il est responsable de l'aspergillose aviaire.



*Conclusion & perspectives*

## **Conclusion**

Bien que l'analyse de la diversité des bactéries associées à la surface des feuilles de l'olivier soient encore en cours .Il ressort clairement des travaux effectués jusqu'à présent que l'olivier abrite un écosystème microbien riche et complexe.

Le but de l'expérience était de mettre en évidence la description et iselement des microorganismes et de leur diversité sur la phyllosphère de l'olivier exactement à la surface de ses feuilles.

Après avoir effectué des prélèvements et une série de tests sur les feuilles de l'olivier selon des méthodes microbiologiques, les analyses ont montré une grande diversité de microorganismes à la surface des feuilles, et un certain nombre de bactéries et de champignons pouvant être pathogènes ont été identifiés.

Les résultats de l'utilisation de la coloration de Gram afin d'identifier les bactéries, de déterminer leur forme et leur division, ont montré la présence de diverses souches bactériennes sur les feuilles des deux types de gram (positives et négatives) telles que les staphylocoques et les entérobactéries. D'autre part, une espèce fongique a également été identifiée, le résultat de sa visualisation au microscope ( $\times 40$ ) et de sa coloration au bleu de méthylène a montré qu'elle est de type *Aspergillus fumigatus*.

Dans ce dernier, on constate que la surface des feuilles de l'olivier est colonisée par une grande variété de microorganismes, parmi lesquels les bactéries y sont majoritaires, ainsi que les champignons. Ces organismes jouent un rôle important dans la gestion de la phyllosphère, ils y interagissent de diverses manières qui peuvent avoir des effets négatifs ou positifs sur l'arbre. Les organismes bénéfiques contribuent au renforcement et à la résistance de l'olivier aux maladies et aux stress environnementaux, tandis que d'autres organismes ont des effets pathogènes et infectieux négatifs entraînant une perte de rendement et de qualité des fruits, l'apparition de symptômes tels que taches foliaires et jaunissement, pourriture et nécrose.

Les organismes présents dans la phyllosphère de la plante sont influencés en fonction de plusieurs facteurs tels que le type et l'âge de la plante, la situation géographique ainsi que les conditions climatiques changeantes. Ainsi, le maintien de l'équilibre microbien dans la phyllosphère de la plante l'affecte positivement.

## **Perspectives**

Il peut y avoir des études liées à la gaine de l'olivier et à ses effets sur la croissance et la santé de cet arbre, donc plus de recherches et de connaissances sont nécessaires. Bien qu'il soit correct de déterminer la composition de la phyllosphère chez certaines espèces végétales, leur origine et leur répartition sont encore mal comprises.

Les analyses appliquées dans ce modeste travail se sont concentrées uniquement sur l'étude des bactéries et des champignons, et les résultats obtenus ne concernaient que la partie feuillue de l'olivier. Par conséquent, la découverte microbienne d'autres parties de l'arbre sera intéressante pour la découverte de nouveaux organismes. La diversité microbienne mise en évidence dans cette étude ne concerne que les analyses phénotypiques, les techniques de biologie moléculaire sont donc le moyen le plus puissant de confirmer ces résultats.



*Références bibliographiques*



## Références Bibliographiques

- **Agroforestal de l'universiade de cordoba. Argenson C ; Régis S ; Jourdain J.M et vaysse p.**, 1999. L'olivier. Ed : centre technique interprofessionnel des fruits et légumes. 204p.
- **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.
- **Avila A. et Trapero A. 2010,** El Emplomado del olivo y del acebuche. Grupo de Patología .
- **Baldy C H. (1990).** Le climat de l'olivier (*Olea europea*) volume jubilaire du professeur P.QUAZEL. Ecole méditerranéenne XVI, 1990. 113-121 p.
- **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 fusaricidine actifs contre *Leptosphaeria maculans*, l'agent causal de la maladie de la jambe noire du canola. *Revue canadienne de microbiologie*, 48 (2), 159-169.
- **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.
- **Bensouna H. 2014:** Production des plantes d'olivier par bouturage et greffage. méditerranéennes, G.P. Maisonneuve et larose, Paris, 447p
- **Boulsse, B., Bouraoui, N. (2016).** Etude de la tuberculose de l'olivier, isolement et identification présomptifs et quelques isolats bactériens à partir des tumeurs. Mémoire de master en Sciences biologique, sous la direction de Dr. Karima Boubekri, Constantine, Université des Frères Mentouri Constantine 1, 79p.
- **Bradley DJ, Gilbert GS, Martiny JBH. (2008).** Pathogens promote plant diversity through a compensatory response. *Ecology Letters* 11: 461e469.
- **Breton C.et Berville A., 2012 :** Histoire de l'olivier : arbre des temps. Ed. Quae.RD 10:160p.

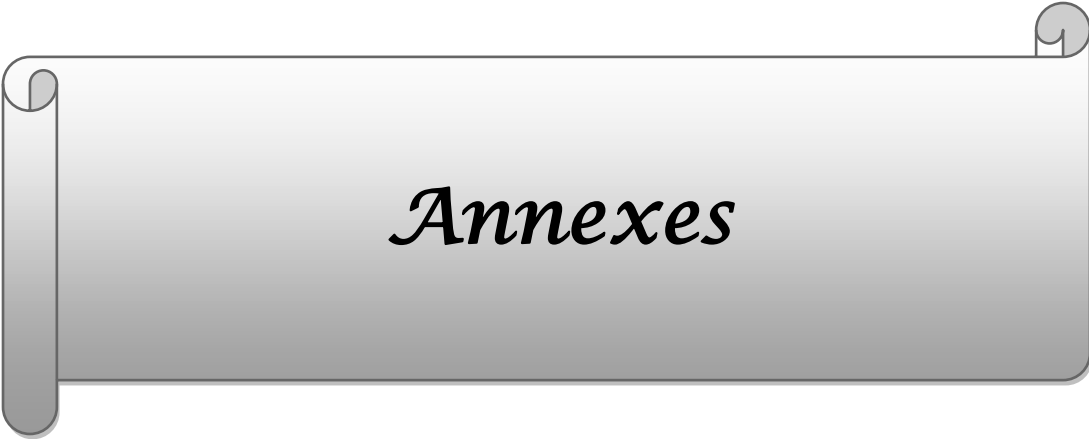
- **Breton, C., Medial, F., Pinatel, C., et Berville, A. (2006).** De l'olivier à L'oléastre : Origine et domestication de l'Olea europaea L dans le Bassin méditerranéen, Cahiers agricultures vol.15, n°4.
- **Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013).** 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.
- **Carrion, Y.,Ntinou, M.,Badal, E. 2010 .**Olea europaea L. in the NorthMediterranean Basin during the Pleniglacialand the Early–Middle Holocene. Quaternary Science Reviews 29,p 952–968.
- **Civantos L. 1998:** L'olivier, l'huile d'olive et l'olive, Ed, Conseil oléicole international, p130.
- **Conseil Oléicole International (COI. 2007).**
- **Courboulex M., 2002.**Les olives. Ed. Rustica.- paris, 119p.
- **Efe, R., Soykan, A., Curebal, I., et Sonmez, S. (2012).** Olive and Olive Culture in the Mediterranean Basin. In: Efe R, Ozturk S, Ghazanfar (Eds.) Environment and Ecology in the Mediterranean Region, 5: 54-64. Cambridge Scholars Publishing. Newcastle, UK.ISBN: 1-4438-3757-1, ISBN: 978-1-4438-3757-6.
- **Gaussourgues, R. (2009).** L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique. Revue française d'allergologie. (49), p : 52–56.
- **Ghezlaoui, M(2011).** Influence de la variété, Nature du sol et les conditions climatiques sur la qualité des huiles d'olives des variétés Chemlal, Sigoise et d'Oléastre dans la Wilaya de Tlemcen: Thèse de Magister en Agronomie: Amélioration de la production végétale et Biodiversité:Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen,
- **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.
- **Gille, Y.** Biologie tropicale. Coloration au bleu de méthylène [en ligne]. (Page consulté le 14-08-2015).
- **Gomes S; Martins-Lopes P et Guedes-Pinto H., ( 2012).** Olive Tree Genetic Resources Characterization through Molecular Markers, Genetic Diversity in Plants, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0185-7, InTech, Available from:

- « <https://www.intechopen.com/books/genetic-diversity-inplants/olivetree-genetic-resources-characterization-through-molecular-markers> »
- **Hallmann J, Mahaffee WF, Klopper JW. 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 914: 895–914.
  - **Hannachi H, M'sallem M, Benalhadj S, El-Gazzah M. 2007:** Influence du site géographique sur les potentialités agronomiques et technologiques de l'olivier (*Olea europaea*) en Tunisie. *C.R. Biologies* 330, p 135-142.
  - **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.  
« <http://www.bioltrop.fr/spip.php?article417> »
  - **I.T.A.F., 2013.** La culture de l'olivier. DFRV 2013. Tesla El Merdja. Birtouta. Alger.
  - **Jumpponen A., Jones KL. (2009).** Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist* 184: 438–448.
  - **Kattar S. Stéphan N et Youssef S. 2001:** La culture des oliviers. Institut libanais.
  - **Lahouaria M. (2022).** Relations plantes-Microorganisme: Grin Verlag. 61p.
  - **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.
  - **Laummonie, 1960:** Cultures fruitières méditerranéennes, Bailiere J.B et fils. (Edit). Paris.  
« <https://www.verdeterreprod.fr/la-phyllosphere-interractions-plantes-microorganismes-a-la-surface-des-feuilles/> »
  - **Lavee, S. 2013.** Evaluation of the need and present potential of olive breeding indicating the nature of the available genetic resources involved. *Scientia Horticulturae*, 161, 333-339.
  - **Leveau, J.H.; Lindow, S.E. (2001).** Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 98, p.3446-3453.
  - **Lindow SE, Brandl MT. (2003).** Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1875-1883.
  - **Loussert, R., Brousse, G., (1978).** L'olivier, coll. Des Techniques agricoles et Productions

- **Lu, H. (2020).** La phyllosphère (interactions plantes-microorganismes à la surface des feuilles) [en ligne]. (Page consulté le 03-02-2020).
- **Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M. F., & Di Giusto, F. 2004.** Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree)(*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. *Heredity*, 92(4), 343.
- **Maillard, (1975).** L'olivier, Ed comité technique de l'olivier, Paris, 75p.
- **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.
- **Microbiologie clinique (2021),** coloration de gram [en ligne].(page consulté en 2021).  
« <https://microbiologie-clinique.com/coloration-Gram.html> ».
- méditerranéennes, G.P. Maisonneuve et Larose, Paris, 447p.
- **Monier, J.M.; Lindow, S.E. (2003).** Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 100, n. 26, p.15977–15982.
- **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.
- **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.
- **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.
- **Pagnol J. 1975:** L'olivier. Ed. Librairie Lavoisier, France. 3<sup>ème</sup> édition. Pp17-150. Paris, France. 285p.
- **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).
- **Perret, R. (1935),** *Annales de géographie*, Ed. Separatruck, 409p.

- **Redman, RS, Sheehan, KB, Stout, RG, Rodriguez, RJ et Henson, JM. (2002).** Thermotolérance générée par la symbiose plante/champignon. *Sciences*, 298 (5598), 1581-1581.
- **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.
- **Rol R. et Jacamon M., 1988** - Flore des arbres, arbustes et arbrisseaux. Ed. La Maison rustique, Paris, p51
- **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.
- **Thompson IP, Bailey MJ, Fenlon JS, Fermor TR, Lilley AK, Lynch JM, McCormack PJ, McQuilken MP, Purdy KJ, Rainey PB, et al. 1993.** Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant and Soil* 150: 177–191.
- **Trapero, A., Blanco, M. A. 2004,** Enfermedades. In : EI cultivo del olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. eds. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa. Madrid. Pp. 557-595-614-656.
- **Trouvelot S, HÃ©loir M-C, Poinssot B, Gauthier A, Paris F, Guillier C, Combiér M, TrdÃ; L, Daire X, Adrian M. 2014.** Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in Plant Science*.
- **Villa P., 2003.** La culture de l'olivier. DE.vitthi.95p.
- **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.
- **Vorholt JA. (2012).** Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology* 10(12):828–840 DOI 10.1038/nrmicro2910.
- **Whipps, J. M. Hand, P. Pink, D. Bending, G.D. (2008).** Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology* [en ligne]. 105(6), P1744–1755.

- **Wilkinson H, 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.



*Annexes*

## Annexes

### Milieux utilisés

#### [M1]- Gélose nutritives (GN) : pH = 7.6 à 7.8

Eau distillée + extrait de viande .....	1000 ml
Peptone trypsine .....	15 g/l
NaCl ou KCl .....	5 g/l
Agar .....	15 à 20 g/l

#### [M2]-Bouillon nutritive : ph =6.8

Peptones .....	10 g
Extrait de boeuf .....	1 g
Extrait de levure .....	2g
Chlorure de sodium .....	5g

#### [M3]- Chapman: pH = 7. 5

Peptone bactériologique .....	10 g/l
Extrait de viande de bœuf .....	1 g/l
Chlorure de sodium .....	75 g/l
Mannitol .....	10 g/l
Rouge de phénol .....	0.025 g/l
Agar .....	15 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

#### [M]- Gélose Sabouraud : pH = 6

Peptone.....	10 g/l
Glucose massé .....	20 g/l
Agar.....	15 g/l
Eau distillée .....	1000 ml



## Les colorants utilisés

### [C1]- Violet de gentiane

Violet de gentiane .....	1 g/l
Ethanol à 90% .....	10 ml/l
Phénol .....	2 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

### [C2]- Lugol

Iode .....	1 g/l
Iodure de potassium .....	2 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

### [C3]- Fushine

Fushine basique .....	1 g/l
Alcool éthylique .....	100 ml/l
Phénol .....	5 g/l
Eau distillée .....	1000 m

<b>Mémoire présenté par :</b> ➤ MEBERBECHE Samira	<b>Année Universitaire : 2022-2023</b>
<b>Thème : Synthèse et évaluation de phyllosphère de plant de L'olivier (<u>Olea europaea</u> L.)</b>	
<b>Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie</b>	
<p>La phyllosphère de l'olivier (<u>Olea europaea</u> L), est devenue l'objet de nombreuses études en tant qu'habitat colonisé par un groupe de microorganismes. Isoler et identifier ces organismes à la surface des feuilles des plantes est l'objectif de ce modeste travail, afin de mieux comprendre les interactions entre les plantes et leur environnement microbien. A cet effet, une série de tests morphologiques et microbiologiques sont appliqués sur les feuilles prélevées sur le site du sennaoua super de Mila, Algérie.</p> <p>Les résultats montrent que la phyllosphère de l'olivier abrite une multitude d'espèces bactériennes et fongiques à la surface de ses feuilles. Où la présence de multiples diversités bactériennes telles que le <i>Staphylococcus</i> et <i>Enterobacterie</i> et une autre variété fongique telle que <i>Aspergillus fumigatus</i> a été identifiée.</p> <p>Ces travaux de recherche ont permis de mieux comprendre l'énorme diversité des communautés bactériennes et fongiques des feuilles d'olivier cultivées, et il peut être vérifié et complètes par des techniques de biologie moléculaire.</p>	
<b>Mots clés:</b> La phyllosphère, <u>Olea europaea</u> L, espèces bactériennes, morphologie, feuilles d'olivier.	
<b>Laboratoire de recherche :</b> Biologie moléculaire et cellulaire	
<b>Jury d'évaluation :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Président du jury :</b> Mme. NOUICHI Siham</li> <li>• <b>Examinatrice :</b> Mme. BOUCHEKRIT Mofida.</li> <li>• <b>Encadreur :</b> Mme. BOUDRAA Wahiba.</li> </ul>	
<b>Date de soutenance :</b> 26/06/2023	