MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ……/UAMOB/FSNVST/2025

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER

Domaine : SNV. **Filière** : Sciences biologiques.

Spécialité : Microbiologie Appliquée.

Présenté par :

DJERALFIA Chaima & DOUMANE Leila

Thème

Etude de la flore microbiologique des graines du *cupressus sempervirens L.*

Soutenu le : 11/06/2025 **Devant le jury composé de :**

Nom et Prénom	*Grade*		
Mr. REMINI H	*MCA*	*Univ. De Bouira*	*Président*
Mr. KADRI N	*Professeur*	*Univ. De Bouira*	*Promoteur*
Mme. BACHIRI T	*MCA*	*Univ. De Bouira*	*Co-promotrice*
Mme. DJENADI K	*MCA*	*Univ. De Bouira*	*Examinatrice*

Année Universitaire : 2024/2025

Remerciement

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à mon promoteur **Kadri.N**, pour son encadrement scientifique et sa précieuse suivi tout au long de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Madame **Bachiri.T,** ma co-promotrice, pour son engagement exceptionnel, sa disponibilité constante et la richesse de ses remarques tout au long de cette recherche. Son soutien, tant scientifique que moral, a été d'une aide précieuse et je lui suis profondément reconnaissante pour son accompagnement attentionné et motivant.

Nous tenons à remercier également à exprimer notre gratitude à **Mr remini.H** pour avoir gracieusement accepte de présider ce jury, ainsi qu'à **Mme DJENADI.K** pour avoir accepté de faire partie du jury et d'évaluer notre travail

Enfin, je n'oublie pas toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire, et je leur adresse ici mes plus sincères remerciements.

Dédicace

À ceux qui ont affronté la vie pour moi,

À ceux qui ont semé le rêve dans mon cœur et l'ont arrosé de prières,

À ceux qui ont été la lumière de mon chemin et mon refuge lorsque les jours étaient lourds...

Vous êtes le sens et la beauté de la vie.

Aujourd'hui, je vous offre mon diplôme comme on couronne les rois,

Car vous êtes les souverains de mon cœur et la source de ma joie.

Cette remise de diplôme n'est pas la fin d'un parcours académique,

Mais l'aboutissement de votre amour, de votre patience et de votre soutien inépuisable.

Merci d'avoir été là,

Et vous resterez toujours mes plus grandes victoires

Mon père Lakhdar et Ma mère Hedjila

Et à ceux que Dieu m'a offerts comme une bénédiction

À la source de ma force, à ma terre ferme, au mur solide de mon cœur…

Mes frères et sœurs

Aymen, Achour, Selma, Selssabil

A celui qui, lorsque le monde m'étouffait, élargissait mon horizon par ses pas,

À celui qui, lorsque je chutais, était le premier à me relever par ses paroles,

À celui qui m'a accompagnée par le cœur avant de marcher à mes côtés,

Mon bien-aimé, mon fiancé

Alilou

Je dédie ce travail à tous ceux qui m'ont soutenu. Je vous aime profondément

Chaima

Dédicace

Je dédie ce travail, fruit de plusieurs années d'efforts, à ceux qui occupent une place toute particulière dans ma vie.

Ma très chère mère ***Baya*** *et mon chère père* ***Said****, pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices, leur patience et leurs prières. Vous êtes ma source d'inspiration et de* ***force . j'espère*** *que dieu vous protège et vous garde*

À mes chers frères ***Yacine et Youcef*** *pour leur présence, leur soutien et leurs encouragements constants tout au long de mon parcours.*

À mes chers amis ***Louiza, Hanane et Liza*** *qui ont su rendre cette aventure plus légère par leur présence, leur humour, leur écoute et leurs mots réconfortants.*

Et à toute ma famille, pour leur affection et leurs encouragements silencieux mais toujours sincères.

À vous tous, je dis merci du fond du cœur.

Leila

Sommaire

INTRODUCTION 1
REVUE DE LA LITTERATURE .....
I.1 Cupressus sempervirens 2
I.1.1 Taxonomie : 3
I.1.2 Nomenclature : 3
I.1.3 Description botanique de la plante : 3
I.1.4 Répartition biogéographique 5
I.1.5 Composition chimique : 7
I.1.6 L'exigence écologique : 7
I.1.7. Pharmacologie de Cupressus sempervirens 7
I.2. La flore microbienne des plantes 9
I.2.2 Transmission du microbiote à la graine 13
I.3. La flore microbienne de Cupressus sempervirens : 14
I.4 Les protéines 15
Matériels et méthodes……..
II.1 Échantillonnage 17
II.2 Isolement et purifications des souches 17
II.2.1 La recherche des bactéries a Gram positif et Gram négatif…….….18
II.3 Identification des souches 19
II.4 Extraction des protéines 19
II.4.1 Protéines extracellulaires 19
II.5.2 Protéines intracellulaires 19
II.6 Dosage des protéines 20
II.7 Mise en évidence de l'activité antibactérienne 20
Résultats…….
III.1 Souches bactériennes 22
III.1.1 Identification de bactéries Gram positifs 22
III.1.2 Identification des bactéries a Gram négatif 23
III.2 Extraction et dosage des protéines : 25
III.3 Résultats de l'activité antibactérienne : 26
Discussion…….....28
Conclusion……..…30
Références Bibliographiques……
Annexes……
Résumés…….

Liste des figures

Figure 1 : *cupressus sempervirens L*…… **4**

Figure 2 : fleurs mâles et femelles ……..... **5**

Figure 03 : fruits de *cupressus sempervirens L*……..…..**5**

Figure 04 : Aire de répartition du *cupressus sempervirens L*……..……..**6**

Figure 05 : carte géographique illustrant les différents lieux de récolte des cônes de *C. sempervirens L* au niveau de la wilaya de bouira…….……...**17**

Figure 06 : Résumé des phases d'isolement à partir des graines…….**18**

Figure 07 : Résultats de la coloration de Gram……..….**22**

Figure 08 : les colonies des souches au genre A : *Staphylococcus* et B : *Bacillus* sur milieu Chapman et genre C : *Lactobacillus sur milieu MRS* …….. …….....**23**

Figure 09 : Les colonies des souches au genre A : *Entérobacter* et B : *Klebseila* et C :*Pseudomonas* sur milieu Mac conckey …….……**24**

Figure 10 : Le pourcentage des souches isolées à partir des graines de *C. sempervirens L*…….**24**

Figure 11 : La teneur en protéines des extraits des souches à Gram négatif……...**25**

Figure 12 : La teneur en protéines des extraits des souches a Gram positif……..….**25**

Figure13 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits protéolytique contre *Staphylococcus aureus*……..….**26**

Liste des tableaux

Tableau I : Classification classique et phylogénétique de *C.sempervirens*……..……..…3

Tableau II : Constituants de l'huile essentielle de deux espèces de *C. sempervirens*……..5

Tableau III : Résultats des tests de différenciation pour l'identification des souches bactériennes
……13

Liste des abréviations

Gélose MRS : Gélose Man, Rogosa Et Sharpe

BN : Bouillon Nutritif

ED : Eau distillé

EP : Eau peptonée

CC : Cœur Cervelle

TSI : Le Triple Sugar Iron

LAC : Lactose

GLU : Glucose

PBS : Phosphate-Buffered Saline

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

FC : Fragment cristallisable

INTRODUCTION

Introduction

La majorité des êtres vivants pluricellulaires colonisés par une diversité de micro-organismes. Parmi cette diversité de micro-organismes environnant les plantes, certains peuvent interagir directement avec elles, et même les coloniser en surface ou à l'intérieur de leurs tissus, pour former ce qu'on appelle le microbiote des plantes (**Anne-Sophie et Marie Simonin., 2022**).

Le cyprès est un arbre très ancien, datant du Pliocène (Tertiaire) (-5,3 millions d'années - 1,8 millions d'années) ; nous trouvons quelques cyprès aujourd'hui. On estime que son histoire remonte à plus de 2 000 ans (**Malhebeau, 1994**). Cette espèce présente un intérêt particulier en raison de ses interactions étroites avec les micro-organismes du sol et de son microbiote, qui contribuent à son adaptation aux conditions environnementales spécifiques de la région méditerranéenne (**Battle *et al.,* 1997 ; Orhne *et al.,* 2015**). Ces interactions pourraient jouer un rôle important dans ses propriétés biologiques et physiologiques.

Sur le plan médicinal, *Cupressus sempervirens L* possède plusieurs activités biologiques démontrées. Des études ont mis en évidence ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antivirales, antiparasitaires, insecticides, anticoagulantes et œstrogéniques (**Bathia *et al.,* 2023).** Il est utilisé en médecine traditionnelle pour traiter diverses affections, notamment la toux, les troubles veineux, les hémorroïdes, les saignements utérins et les varices (**Fleurantin, 2008 ; Wahida *et al.,* 2023).**

En Algérie, plusieurs études ont confirmé l'activité antimicrobienne des extraits de *cupressus sempervirens L* contre des souches bactériennes pathogènes humaines et végétales, soutenant l'utilisation de ces extraits en phytothérapie locale comme alternative aux pesticides chimiques. (**Boudjemaa, 2017).** À l'échelle mondiale, les recherches sont plus élargies, les rechercheurs ont pû isoler des microorganismes associés à *cupressus sempervirens L* capables de produire des métabolites secondaires à activité antibactérienne et anticancéreuse (**Nicoletti *et al., 2014).***

Dans ce contexte, l'analyse du côté microbien de *Cupressus sempervirens L,* à travers l'isolement et la caractérisation des micro-organismes associés à ses graines, ainsi que l'extraction et l'étude des protéines produites par ces micro-organismes, constitue un axe de recherche innovant et prometteur. Ce travail vise ainsi à mettre en évidence la contribution microbiologique de cette espèce, tant dans son environnement naturel que dans le cadre

d’applications biotechnologiques potentielles, notamment dans les domaines pharmaceutiques, agricole et environnemental.

REVUE DE LA LITTERATURE

I.1 *Cupressus sempervirens*

I.1.1. Taxonomie

Selon **(Esmail, 2016).** La classification du cyprès est la suivante :

Tableau 01 : Classification classique et phylogénétique de *Cupressus sempervirens L*.

Règne	Plantae
Sous- Règne	**Viridiplantae**
Embranchement	**Tracheophyta**
Sous-embranchement	**Spermatophytina**
Classe	**Pinopsida**
Sous-classe	**Pinidae**
Ordre	**Pinales**
Famille	**Cupressaceae**
Genre	**Cupressus**
Espèce	***Cupressus sempervirens L***

I.1.2. Nomenclature

Dénomination scientifique : *Cupressus sempervirens* L

Le terme Cupressus trouve son origine dans le latin **(Chaudhary HJ, 2012)**. Où il fait référence au genre, et est dérivé du grec « Kuparissos », qui caractérise l'espèce. Certains spécialistes avancent que ce terme pourrait également être lié à Cyprus, faisant référence à son lieu d'origine. Chypriote, sempervirens est un terme signifiant toujours vert et persistant. Ce mot provient du latin « semper », qui signifie toujours, et « virens », qui veut dire vert **(Zineb, *R, 2020*)**.

I.1.3. Description botanique de la plante

a. l'arbre

Le *Cupressus sempervirens* L est un arbre de la famille des conifères qui peut atteindre 30 mètres de haut., doté d'une grande longévité, monoïque et thermophile, avec un tronc droit recouvert d'écorce fibreuse et striée de couleur gris brunâtre. Les branches écailleuses sont de

couleur brune. Le Port présente une silhouette élancée et conique, caractérisée par une colonne compacte et dense **(Nichane, 2015).**



Figure 1 ***:*** *cupressus sempervirens L* **(Hamouy, 2017)**.

b. Feuillage

Persistant, aromatique, de couleur vert sombre. Sur de courtes branches, des petites feuilles glanduleuses (glandes résinifères), squamiformes, disposées en couches sur au moins quatre niveaux à l'extrémité émoussée **(Nichane, 2015).**

c. Fleurs

Les chatons mâles, de couleur jaune à brun clair chargés de pollen et susceptibles de provoquer des allergies (en février-mars), se trouvent à l'extrémité des rameaux. Les fleurs femelles, globuleuses et vertes, se rassemblent en bouquet à l'extrémité des pousses récentes. **(Nichane, 2015)**



Figure 2: fleurs males fleurs femelles **(Nichane, 2015).**

d. Cônes

Strobiles, globulaires, d'une teinte verte (3 à 4 cm) et brillants, légèrement mucronés et dotés de 6 à 14 écailles ligneuses polygonales allant du brun clair au brun foncé une fois matures (tous les deux ans), et renfermant une multitude de graines ailées **(Nichane, 2015).**



Figure 3 : Fruits de *cupressus sempervirens* **(Marcello *et al,* 2004).**

I.1.4. Répartition biogéographique

1. Dans le monde

Des populations importantes de Cupressaceae, notamment *Cupressus sempervirens L*, se trouvent en Turquie (35-38 %), en Grèce (25 %), au Chili et en Argentine (20-30 %). En Espagne, la prévalence varie selon les régions, les chiffres allant de 3 % aux îles Canaries à 24 % à Tolède et 17 % aux îles Baléares.

Des concentrations notables sont également présentes le long de la côte est des États-Unis (5-10 %), ainsi qu'à Chypre, au Mexique et dans la province chinoise du Yunnan, où l'on en trouve environ 20 %. En Océanie, *Cupressus sempervirens L* est cultivé en Australie et en Nouvelle-Zélande. En Afrique du Nord, on trouve la variété *Cupressus sempervirens L* var. numidica, tandis que la var.stricta se trouve en Afrique du Sud. Au cours des trente dernières années, diverses autres variétés ont été introduites en Afrique tropicale, notamment au Kenya, en Tanzanie et au Zimbabwe **(Poncet, 2021).**

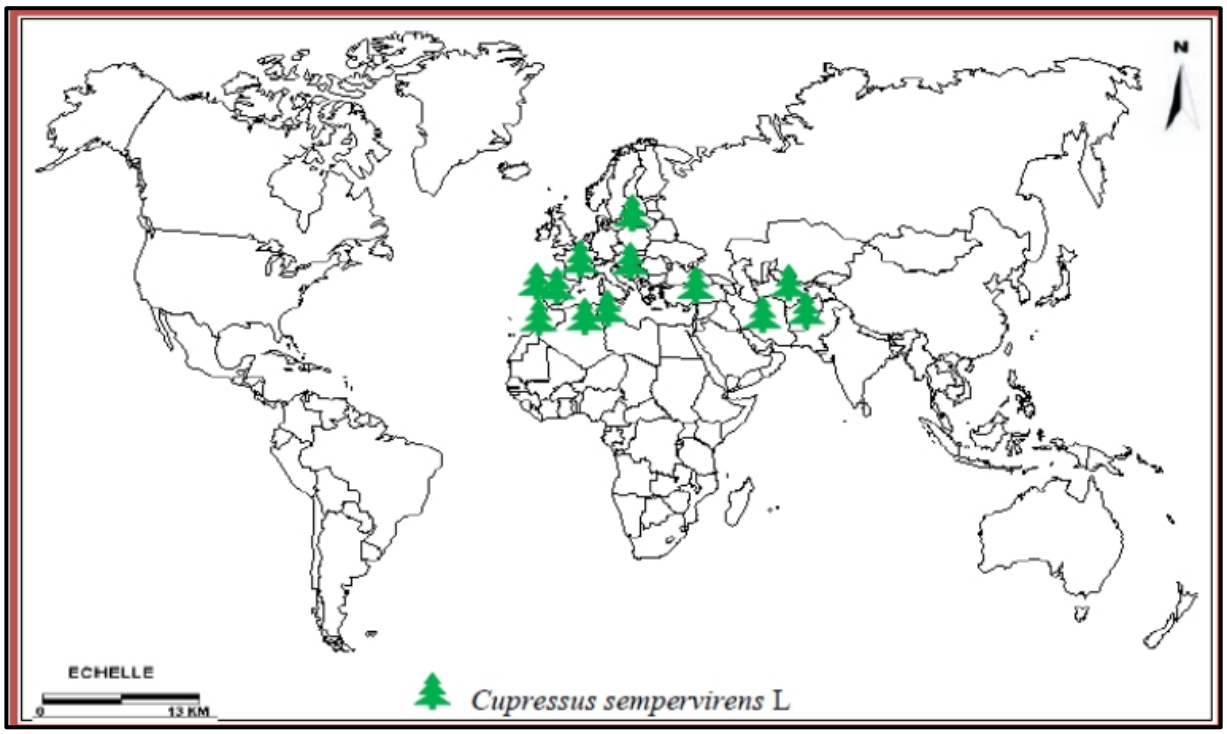


Figure 4 : Aire de répartition du *cupressus sempervirens L* **(Nichane, 2015).**

2. En Algérie

Le *cuprusss sempervirens L* est l'espèce la plus largement répandue parmi les variétés de cyprès trouvées en Algérie. Il prospère dans des conditions xérothermiques et est utilisé à des fins ornementales, servant de brise-vent ou fonctionnant comme arbre forestier.

La répartition spécifique de cette espèce en Algérie n'est pas aussi détaillée que celle d'autres espèces, même si elle est considérée comme largement distribuée. Il est présent dans diverses régions de l'Atlas algérien, soit aux côtés d'autres végétaux, soit en populations dispersées et solitaires **(Bouyahyaoui, 2017).**

I.1.5 Composition chimique

Phytochemicals	Leaves	Branches	Cones
1.9% saponins 0.7% alkaloids 0.31% tannins 0.22% flavonoids 0.067% phenols			
Sesquiterpenes	21.9%	14.9%	18.26%
Monoterpenes	42.7% and 43.21	60.4%	
Diterpenes			

Tableau 02 : Constituants de l'huile essentielle de deux espèces de *C. sempervirens L*(**Batiha *et al.*, 2023**) .

I.1.6 L'exigence écologique

C. sempervirens L présente une forte affinité avec le climat méditerranéen, comme en témoigne son extension à l'ensemble du bassin méditerranéen, ce qui confirme l'adéquation entre ses exigences climatiques et ce type de climat. Elle supporte bien la sécheresse et tolère une pluviosité importante, mais demeure sensible à l'excès d'humidité, qui peut favoriser l'apparition de maladies fongiques **(Afocel-Armef., 1985).** Sa croissance dépend fortement de la nature du sol, elle est accélérée dans les sols humides et profonds, mais est également capable de s'adapter à des sols calcaires pauvres, secs et même à des terrains arides et pierreux **(Nichane., 2015)**. Grâce à son système racinaire pivotant, elle résiste bien aux vents, en particulier pour les formes érigées, ce qui permet son utilisation comme haie brise-vent. Toutefois, elle craint les grands froids, surtout à un jeune âge, bien que des observations aient montré une certaine résistance à des températures allant jusqu'à -10 °C dans des stations semi-arides du Maroc **(Afocel-Armef., 1985).**

I.1.7. Pharmacologie de *Cupressus sempervirens*

- ✓ **Activité antivirale**

Des études in vitro ont révélé que les fractions riches en proanthocyanidines de C. sempervirens présentaient des propriétés antivirales contre le VIH et le virus lymphotrope humain (HTLV-III B). De plus, l'huile essentielle dérivée des fruits de *C. sempervirens L* subsp. pyramidalis a montré un léger effet antiviral contre le SRAS-CoV (7002,3 mg/mL). Notamment, l'huile essentielle de *C. sempervirens L* a montré une activité prononcée contre le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), obtenant un effet virucide significatif de 68 % à une dilution de 1:32 et de 53,2 % à une dilution de 1:64 **(Selim *et al., 2014*).**

- ✓ **Activité antibactérienne**

La croissance d'Helicobacter pylori, y compris des souches résistantes aux antibiotiques, a été entièrement inhibée par l'huile essentielle à une concentration de 0,1 % (v/v). De plus, l'extrait éthanolique de *C. sempervirens L* a créé une zone d'inhibition mesurant 1,1 cm contre H. pylori (**Rios et Recio.,** ***2005)***.Une activité antimicrobienne significative a été observée contre des agents pathogènes d'origine alimentaire, notamment *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* et *Listeria innocua*. Les extraits méthanoliques dérivés des feuilles et des fruits de diverses variétés de *C. sempervirens L* ont démontré des propriétés antimicrobiennes, en particulier une forte efficacité contre *S. aureus* (**Orhan *et al.*, 2015).**

- ✓ **Activité antifongique**

Les extraits de *cupressus sempervirens L* et l'huile essentielle présentent des niveaux variables d'activité antifongique selon les espèces testées. Elles inhibent efficacement les moisissures et certains champignons comme *Candida albicans, Aspergillus niger, A. flavus, A. fumigatus, Fusarium solani, F. oxysporum et Penicillium digitatum,* avec un impact modéré sur *Yarrowia lipolytica*. Cependant, aucune activité antifongique n'a été détectée contre *Aspergillus sp., Penicillium sp. , Fusarium sp. , Mucor sp.* Ou des agents pathogènes. **(*Orhan et al.*, 2015)**

- ✓ **Activité neurobiologique**

Les propriétés neuroprotectrices possibles du dichlorométhane, de l'acétone, de l'acétate d'éthyle et des extraits de méthanol obtenus des cônes et des feuilles de *C. sempervirens L* var. horizantalis et var. Les pyramidalis ont été évaluées par notre groupe à travers l'inhibition des

enzymes acétyl- (AChE) et butyrylcholinestérase (BCHE), qui sont liées à la maladie d'Alzheimer, comme En tant que tyrosinase, une enzyme associée à la maladie de Parkinson [43]. Les extraits ont exercé des niveaux légers à modérés de l'nhibition contre les cholinestérases et un faible niveau d'inhibition contre la tyrosinase à 200 mg / m. (**Orhan *et al.,* 2015).**

- ✓ **Activité antioxydant**

L'huile essentielle de *C. sempervirens L* a été évaluée dans trois essais antioxydants : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), essai de blanchiment au b-carotène et essai de luminol-photochimiluminescence (PCL). Il a montré une légère inhibition de DPPH et un effet inhibiteur significatif de la peroxydation lipidique dans le test de blanchiment b-carotène, mais inefficace dans le test PCL. Les propriétés antioxydantes des extraits de dichlorométhane, d'acétate, d'éthyle et de méthanol de *C. sempervirens L* var. horizantalis et var. pyramidalis ont été démontrés par l'activité de piégeage de DPPH et de N,N-diméthyl-p-phénylenediamine et la capacité de chélation du métal avec des tests réducteurs ferriques et phosphomolibdéniques. **(Orhan *et al.,* 2015)**

I.2. La flore microbienne des plantes

Le terme « microbiote végétal » désigne la diversité des micro-organismes, notamment les bactéries, les champignons, les virus et les archées, qui cohabitent avec les plantes. Cette flore microbienne est essentielle à la croissance, à la nutrition et à la défense des plantes contre les stress biotiques et abiotiques. **(Mahapatra *et al.*, 2020).**

I.2.1. Composants principaux du microbiote végétal

Une variété étendue de micro-organismes, comprenant des archées, bactéries, champignons, oomycètes, protistes et nématodes, est liée aux diverses parties de la plante.

La composition taxonomique du microbiote végétal a été principalement déterminée dans les fractions bactériennes et fongiques **(Trivedi *et al.,* 2020**). Cependant, l'intérêt pour les fractions virales **(Schoelz et Stewart., 2018**). Ou les protistes (**Xiong *et al.,* 2020**). ont connu une augmentation ces dernières années.

En tenant compte du niveau taxonomique supérieur, on distingue quatre phyla bactérien : les Actinobactéries, Bacteroidetes, Firmicutes et Protéobactéries. Qu'on retrouve principalement dans le microbiote des plantes (**Bulgarelli *et al.,* 2013 ; Bai *et al.,* 2015 ; Trivedi *et al.,* 2020)**.

Toutefois, il est ardu d'anticiper le rôle fonctionnel général de ces phyla compte tenu du grand nombre d'espèces bactériennes qui leur sont liées. En améliorant la résolution taxonomique, une cinquantaine de familles bactériennes sont souvent identifiées dans divers tissus végétaux ciblés **(Müller *et al.,* 2016**). Toutefois, la prévalence de ces familles peut varier considérablement.

A/ Changement Spatial

En termes d'échelle spatiale, deux niveaux de compartimentation des micro-organismes peuvent être observés chez l'hôte : soit (i) à l'intérieur des tissus végétaux, que ce soit en surface ou dans les tissus internes, ou bien (ii) entre les divers organes de la plante. L'hétérogénéité spatiale au sein des plantes est si significative qu'il est désormais admis que la composition du microbiote est davantage influencée par les caractéristiques phénotypiques de la plante que par ses caractéristiques génotypiques (**Hamonts *et al.,* 2018 ; Guo *et al.,* 2021 ; Wagner., 2021**). On qualifie les micro-organismes qui se trouvent à la surface des tissus végétaux d'épiphytes, tandis que ceux qui habitent à l'intérieur de ces tissus sont appelés endophytes (**Andrews et Harris., 2000 ; James et Poole., 2013**). On note un gradient de diversité bactérienne et fongique, avec une plus grande richesse spécifique pour les écosystèmes épiphytes par rapport aux écosystèmes endophytes, et ce, pour tous les habitats principaux de la plante tels que la rhizosphère (**Bulgarelli *et al.,* 2012 ; Lundberg *et al.,* 2012**). La phyllosphère (**Müller *et al.,* 2016**). ou encore la graine (**Eyre *et al.,* 2019**). La quantité de cellules est également plus élevée en surface des tissus. Pour ce qui est de l'habitat de la graine, on estime que les populations bactériennes épiphytes varient entre 10^4 et 10^8 UFC (Unité Formant Colonie) par gramme de graine (**Chimwamurombe *et al.,* 2016 ; Mano *et al.,* 2006).** Selon **(Compant *et al.,* 2011**) .et **(Truyens., 2016).** Il existe une variation des populations d'endophytes allant de 10 à 106 UFC par gramme de graine. Bien que tous les micro-organismes épiphytes ne soient pas forcément présents dans les tissus de la plante, on trouve pratiquement toujours des micro-organismes endophytes sur les organes de la plante ou à une certaine phase de leur cycle biologique.

Un cas bien illustré de transmission verticale chez les végétaux concerne les champignons du genre Epichloë qui infectent les Poaceae (**Leuchtmann et Spiering., 2004**). Ces champignons aident en particulier la plante à se défendre contre les herbivores, grâce à la production d'alcaloïdes. Un autre cas, au sein du domaine des eubactéries, est le symbiote Candidatus Burkholderia crenata, qui se transmet exclusivement de manière verticale chez les plantes appartenant à la famille des Rubiaceae **(Pinto-Carbó *et al.,* 2018**).

La deuxième échelle spatiale envisagée concerne les organes de la plante, avec une

première distinction entre les parties aériennes et souterraines. Il existe des divergences considérables en termes de structure taxonomique entre ces deux habitats, tant quant à la prépondérance relative des groupes taxonomiques que concernant l'identité des taxons présents (**Bai *et al.,* 2015 ; Trivedi *et al.,* 2020)**. Par exemple, le genre bactérien *Methylobacterium* se retrouve souvent à la surface des feuilles de diverses espèces végétales **(Vacher., 2016**). Surtout grâce à son aptitude à utiliser le méthanol comme source de carbone **(Delmotte *et al.,* 2009**).

En revanche, on associe principalement les bactéries des genres Rhizobium et Agrobacterium aux racines (**Coleman-Derr *et al.,* 2016 ; Ramachandran *et Terpolilli.*, 2018 ; Amend *et al.,* 2019**). On peut affiner cette distinction entre organes aériens et racinaires en tenant compte des particularités de chaque organe végétal. Il est possible de distinguer des microbiotes propres à chaque partie de la plante, tels que la caulosphère (tige), la phyllosphère (feuille), la rhizosphère (zone du sol affectée par les racines), le rhizoplan (surface des racines), l'anthosphère (fleur), la carposphère (fruit), la spermosphère (zone influencée par la graine) et même la graine elle-même (**Amend *et al,* 2019 ; Singer *et al.,* 2019 ; Gao *et al.,* 2021**). Il est assez ardu de compiler une liste complète des taxons liés à chaque type d'habitat. Toutefois, en ce qui concerne l'habitat graine, on observe que l'espèce bactérienne *Pantoea agglomerans* et le genre de champignon *Cladosporium* sont régulièrement et largement liés aux graines d'une grande variété d'espèces végétales (**Simonin *et al,* 2021).**

B/ Changement dans le temps

Les fluctuations temporelles de la composition du microbiote dans des environnements temporaires tels que l'anthosphère ou la carposphère semblent assez évidentes **(Shade, McManus et Handelsman 2013)**. Cependant, cette dynamique temporelle est également présente dans des compartiments plus « durables ». Par exemple, la composition des communautés de microbes dans la rhizosphère varie pendant le cycle de développement de la plante (**Chaparro, Badri et Vivanco 2014 ; Shi *et al.,* 2015)**. Ces fluctuations temporelles dans la composition des communautés microbiennes sont même perceptibles sur de très courtes échelles temporelles, comme lors du cycle circadien de la plante (**Hubbard *et al.,* 2018**). La rhizosphère n'est pas l'unique environnement où l'on observe des variations de structure dans le temps. Effectivement, on observe aussi des variations de l'abondance relative de certains taxons bactériens à la surface des feuilles d'Arabidopsis thaliana **(Maignien *et al.*, 2014).**

Si les substrats carbonés disponibles durant la croissance de la plante constituent un élément crucial influençant la variation de la composition des communautés microbiennes qui lui sont liées (**DeAngelis *et al.,* 2009**). D'autres paramètres peuvent aussi jouer un rôle dans

cette dynamique au fil du temps. Par exemple, plusieurs plantes telles que le soja, le niébé, le chou, le coton ou l'arabette montrent une résistance de plus en plus grande aux pathogènes au fur et à mesure de leur croissance **(Develey-Rivière et Galiana., 2007**). L'explication de l'expression différentielle des défenses végétales et des modifications de la composition des communautés entre ces deux étapes de croissance pourrait être liée au rôle joué par les hormones végétales. En fait, en plus de leur participation à la défense **(Pieterse *et al.,* 2012**), les hormones végétales jouent également un rôle dans le développement de la plante **(Raskin., 1992; Vanstraelen et Benková.,2012).**

Hormis ces exemples concernant les parties végétatives, très peu de recherches, jusqu'à présent, se sont penchées sur la dynamique d'assemblage des communautés dans les habitats reproducteurs de la plante. Deux études notables ont effectué une surveillance dynamique du microbiote de l'anthosphère du pommier (**Shade, McManus et Handelsman., 2013 ; Cui *et al.,* 2021**), alors que pour ce qui est des graines, la composante endophyte des graines de maïs a été décrite durant les étapes de développement embryonnaire, de remplissage et de dessiccation (**Liu *et al.,* 2013**).

Les chercheurs de cette étude ont démontré une diversité supérieure de bactéries endophytes durant les premières phases de développement de la graine comparativement aux phases plus avancées. Ils ont aussi mentionné une présence plus marquée de certains genres taxonomiques particuliers en fonction du stade de développement de la graine. En résumé, l'étape de développement représente un facteur crucial à considérer pour l'intégration pérenne d'un inoculum microbien dans la plante, compte tenu des variations significatives qu'elle entraîne à l'échelle du microbiote. Outre les facteurs spatio-temporels, le type ou la famille de plante examinée peut aussi influencer la composition des communautés microbiennes qui lui sont associées.

C/ Variation au sein de l'espèce végétale

Des changements dans la composition des communautés microbiennes ont été observés en fonction de la famille, de l'espèce ou même de la variété végétale examinée. Par exemple, des disparités significatives de la composition microbienne des graines ont été démontrées chez différentes familles de plantes comme les Amaranthaceae (**Lopez-Velasco *et al.,* 2011**), les Asteraceae **(Leff *et al,* 2017**), les Cucurbitaceae **(Adam *et al, 2018***), les Brassicaceae **(Links et *al.,* 2014 ; Rezki *et al,* 2016 ; Rybakova *et al.,* 2017 ; Rochefort *et al.,* 2019)**, ainsi que les Fabaceae (**Klaedtke *et al,* 2016 ; Escobar Rodriguez *et al,* 2019**), les Poaceae (**Links *et al.,* 2014 ; Yang *et al.,* 2017 ; Escobar Rodriguez *et al,* 2019 ; Eyre *et al,* 2019)** ou encore les Solanaceae (**Bergna *et al.,* 2018 ; Chen *et al.,* 2020**). Ces variations de composition du

microbiote remarquées entre les familles botaniques sont partiellement attribuées à leurs traits morphologiques liés à leur génotype. Par exemple, concernant les graines, des traits tels que la dimension ou l'anatomie peuvent influencer la composition des communautés **(Barret *et al.*, 2015**). Ces fluctuations peuvent aussi être attribuées à la coévolution entre les plantes et leur assortiment de micro-organismes (**Delaux et Schornack 2021**).

Des recherches récentes ont démontré que la composition du microbiote de la rhizosphère des variétés modernes diffère de manière significative de celle des variétés anciennes, que ce soit chez la betterave **(Zachow *et al.*, 2014**), l'orge (**Bulgarelli *et al.*, 2015**). Ou le haricot (**Pérez-Jaramillo *et al.*, 2017**). Par conséquent, les caractéristiques choisies pour ces variétés modernes ont conduit à la sélection de certains taxons microbiens spécifiques qui ont, à leur tour, favorisé l'adaptation des plantes à divers défis biotiques et abiotiques **(McLaren et Callahan., 2020**). Étant donné les fluctuations de la composition du microbiote selon l'espèce végétale, il apparaît essentiel d'examiner le microbiote des plantes pour chaque espèce spécifique.

La graine

Il est crucial de faire une différence claire entre « graine » et « semence ». La graine, issue de la reproduction sexuée de la plante, favorise le mélange génétique de l'espèce. Elle jouera un rôle dans la propagation de l'espèce en formant une nouvelle plante. En revanche, une semence fait référence à un mécanisme de propagation de l'espèce, sans pour autant être issu de la reproduction sexuée, contrairement aux graines. Donc, une semence peut résulter de la reproduction sexuée, comme un grain de blé, ou de la reproduction asexuée, comme un tubercule de pomme de terre. (**Chesneau *et al.*, 2021).**

I.2.2 Transmission du microbiote à la graine

La transmission du microbiote chez les plantes peut être horizontale (par l'environnement) ou verticale (de la plante mère à sa descendance). Si la voie horizontale est majoritaire dans l'acquisition des micro-organismes, la transmission verticale joue un rôle important en agronomie en permettant une héritabilité du microbiote, influençable d'une génération à l'autre. (**Chesneau *et al.*, 2021).**

A/ de la plante mère à la graine

La transmission des micro-organismes de la plante-mère à la graine peut se faire selon trois voies principales :

Interne : par les tissus vasculaires ou non vasculaires (via le xylème).

Florale : par les organes floraux comme le pistil et le micropyle.

Externe : par contact avec des micro-organismes présents sur les fruits, les résidus végétaux ou l'environnement. **(Simonin *et al.*, 2021).**

B/ De la graine à la plantule

Lors de la germination, les graines subissent des modifications abiotiques qui favorisent l'activation de communautés microbiennes. L'environnement de la graine (spermosphère) entre en interaction avec le sol, favorisant une coalescence asymétrique des communautés microbiennes, où celles du sol dominent. Seulement une petite fraction des micro-organismes de la graine est transmise à la plantule, principalement des taxons rares ou dormants. La sélection des micro-organismes copiotrophes se produit au niveau de la rhizosphère, sans induire de réponses immunitaires précoces. Cette transmission est influencée par des facteurs génétiques spécifiques, bien que les mécanismes précis restent mal compris. (**Chesneau *et al.*, 2021).**

I.3. La flore microbienne de *Cupressus sempervirens L*

La recherche de **(Soltani *et al.*, 2016).** A examiné la diversité et l'activité biologique des bactéries endophytes liées aux Cupressacées, y compris *Cupressus arizonica*, *Cupressus sempervirens L*, *Juniperus comunis* et *Thuja orientalis*. Plus de 69 souches bactériennes endophytes ont été isolées par les chercheurs, appartenant majoritairement aux groupes suivants :

- **Protéobactéries**
  a) *Brevundimonas diminuta* (Alphaprotéobactérie, appartenant à la famille des Caulobacteraceae)
  b) *Stenotrophomonas maltophilia* (une Gammaprotéobactérie appartenant à la famille des Xanthomonadaceae)
- **Bacilles (Gram positif)**
  a) *Bacillus pumilus*
  b) *Bacillus subtilis*
- **Actinobacteria**
  a) Microbacterium resistens

Endophyte strain	Identity	Gram reaction	Aerobic/ Anaerobic	Spore formation	Oxidase test	Catalase test	Fluorescent pigment
CSE66	Bacilluspumilus	+	+/+	+	+	+	-
POE26	Bacillussubtilis	+	+/+	+	V	+	-
CSE19	Microbacterium resistens	+	+-	-	-	+	-
CAE24	Brevundimonas diminuta	-	+-	-	+	+	-
CSE4,CSE12, CSE42, CSE49, CSE62, CAE23, POE55	Stenotrophomonas maltophilia	-	+-	-	-	+	-

(+), positive reaction/result ; (-),negative reaction/result ;(V),variable result

Table 03 : Résultats des tests de différenciation pour l'identification des souches bactériennes **(Soltani et al., 2016).**

I.4 Les protéines

Les protéines bactériennes sont des macromolécules produites par les bactéries, sont vitales pour leur survie et leur fonctionnement, car elles accomplissent une multitude de rôles cruciaux. À l'instar de tous les organismes vivants, ces protéines se composent de chaînes d'acides aminés codées par l'ADN bactérien (**Madigan., 2018).**

Il existe divers types de protéines bactériennes en fonction de leur rôle :

- **Protéines structurales** : Ces protéines constituent les structures de la bactérie, telles que la membrane cellulaire, le flagelle (qui permet le mouvement) et les pili (qui assurent l'adhérence) **(Davidson., 2022).**
- **Protéines de transport** : Elles facilitent le transfert de substances à travers la membrane des bactéries (comme les ions, les sucres, etc.).
- **Protéines de régulation** : Elles contrôlent l'expression génétique, déclenchant ou bloquant certaines activités en fonction des nécessités de la bactérie**. (Popoff., 2011).**
- **Protéines de défense ou de virulence** : Certaines bactéries sécrètent des toxines ou autres protéines leur donnant la Capacité d'échapper aux défenses immunitaires ou d'infecter un hôte.

MATÈRIELS ET MÈTHODES

II.1 Échantillonnage

Quatre échantillons de cônes de *Cupressus sempervirens L* ont été récoltés dans les forêts de la wilaya de Bouira, notamment « Ain bessam », « Ait l'aâziz », « Bechloul », « Sour El Ghouzlen», comme illustré dans la carte géographique ci-dessous (**Figure 06**).

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté SNV ST de l'université de Bouira, de mars à Mai 2025



Figure 5 : carte géographique illustrant les différents lieux de récolte des cones de *C. sempervirens L* au niveau de la wilaya de bouira

Les cônes de *C.sempervirens L* ont été collecté sur des arbres mûrs sélectionnés de manière aléatoire. Puis placées dans de l'eau chaude pendant une minute pour faciliter le processus d'ouverture mécanique des cônes.

Avant d'entreprendre l'isolement des souches, une procédure de désinfection de surface a été appliquée à tous les graines dans le but de supprimer la flore externe. Les graines ont été immergé dans une solution d'eau de Javel à une concentration de 10% pendant deux minutes. Suivie, deux lavages successifs avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer tout trace de l'eau de javel. En fin, les graines ont été séchés à par de papier Whatman stérile.

II.2 Isolement et purifications des souches

Après la désinfection des graines, 1g de chaque échantillon a été mis dans 9 ml de l'eau peptonée tamponnée stérile et dans 9 ml dans le bouillon nutritif stérile, 2g de chaque Échantillon ont été mis dans 5 ml d'eau physiologique stérile et 5 ml d'eau distillée stérile. Chaque tube a subi une agitation de cinq minutes par un vortex pour garantir une répartition uniforme des graines. Les tubes qui renferment le bouillon nutritif et l'eau peptonée tamponnée

ont été incuber à une température de 37°C pendant une durée de 24 heures. Tandis que les tubes renfermant de l'eau distillée et de l'eau physiologique ont été mis au frais dans un réfrigérateur à 5°C pendant une durée de 24 heures. Après l'incubation l'isolement des micro-organismes a été réaliser en encemençant 200 µL de chaque tube dans des boîtes renfermant divers milieux de culture sélectifs à savoir : gélose MRS, gélose MacConkey et gélose Chapman (**Annexe 01**). Puis incubé à 37°C pendant 24h. Toutes les colonies présentant des différences morphologiques ont été repiquées sur des géloses sélectives**.**

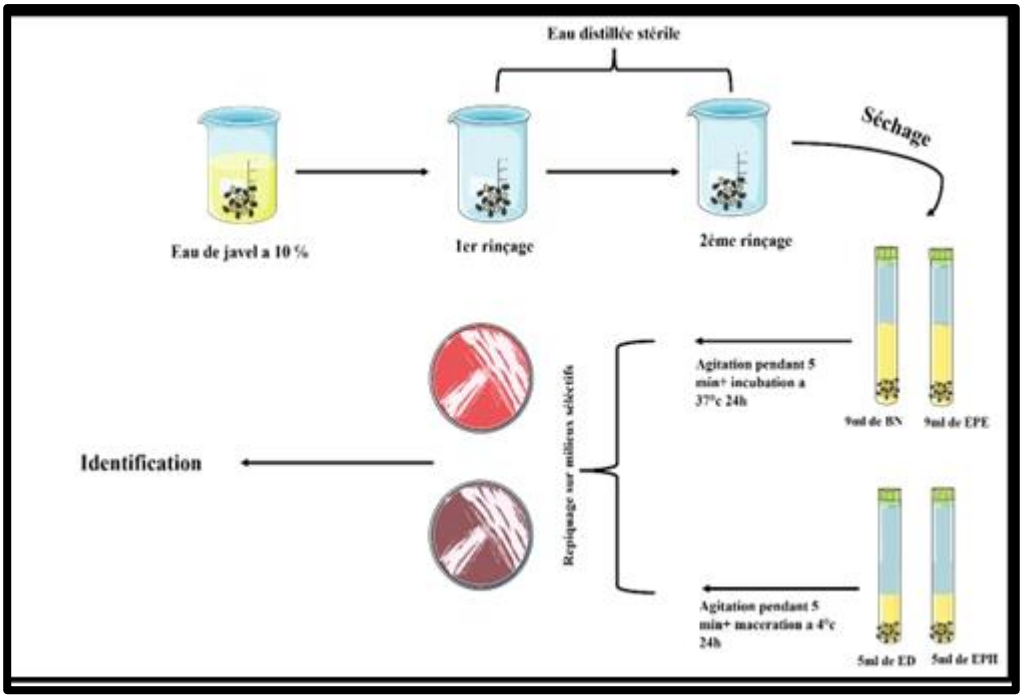


Figure 6 : Résumé des phases d'isolement à partir des graines **(Bourahla *et SAIDI., 2024*).**

II.2.1 La recherche des bactéries a Gram positif et Gram négatif

L'isolement est réalisé en ensemencent approximativement 200µL de chaque échantillon sur la surface des géloses MRS et Chapman. L'incubation se déroule à une température de 37°C pendant une durée de 24 heures. Pour les bactéries à Gram négatif

L'isolement se réalise en ensemencent approximativement 200µL de chaque échantillon sur la surface de la gélose Mac Cockney.

Afin d'obtenir des colonies bactériennes pures, les souches ont été purifiées par une série de repiquage successif sur des milieux sélectifs.

II.3 Identification des souches

L'ensemble des souches pures ont été identifiées à l'aide d'une coloration de gram (coloration de Gram (**Beveridge, *T.J,2001***). Une observation à l'état frais (**Tortora, G. J ,2016**). Suivi d'une mini galerie biochimique standard comprenant les milieux Citrate de Simmons, TSI, test catalase et milieu Mannitol-mobilité (**Kersters, *K.,et al, 2006***). et une orientation avec le milieu CHROM-AGAR.

II.4 Extraction des protéines

II.4.1 Protéines extracellulaires

Des colonies issues de diverses espèces bactériennes ont été disposées dans 20 ml de bouillon nutritif, puis incubées à une température de 37°C durant une période de 24 heures. Ensuite, chaque suspension a été mise dans des tubes coniques stérilisés et centrifugée à 7000 tours/minute à 4 °C pendant 20 minutes.

Suite à la centrifugation, le surnageant a été collecté dans des tubes Eppendorf stériles. (**S. Bhaduri *et al.,1983* ; Ravindra *et al., 2011)***

II.5.2. Protéines intracellulaires

Après l'incubation des colonies bactériennes dans 20 ml du bouillon cœur de cervelle enrichi avec de 'arginine à 37°C pendant une durée de 24 heures, chaque suspension a été transférée dans des tubes coniques stériles puis centrifugée à 7000 tours/minute à 4°C pendant 20 minutes. Ensuite le surnageant a été éliminé deux lavages successifs avec 1 ml de tampon phosphate salin (PBS) ont été effectués sur le culot. Après chaque lavage une centrifugation a été effectuée (à 7000 tours, 4°C, pendant 20 minutes) et le surnageant a été éliminé à chaque fois. (**S. Bhaduri *et al.,1983*** ; **Tariq *et al., 2010)***

Pour les souches Gram négatif, 1 ml de SDS a été rajouter directement dans les tubes après centrifugation, puis incubé à 37°C pendant 2 minutes afin de garantir la lyse des cellules et la libération des protéines intracellulaires. Après cette incubation, les tubes ont été soumis à une centrifugation à 4°C pendant vingt minutes, afin de récupérer le supernatant protéique a été recueilli dans des tubes Eppendorf stérilisés.

En ce qui concerne les Gram (+), nous avons d'abord ajouté 1 ml de lysozyme pour chaque tube, puis incubé à 37°C pendant une heure Après incubation, nous avons ajouté 1ml de SDS pour les tubes puis une centrifugation a été effectuée. Les protéique ont été récupéré dans des tubes Eppendorf stériles. (**S. Bhaduri *et al., 1983*** ; **Mohammed, 2017)**

II.6 Dosage des protéines

La méthode de Bradford **(M. M. Bradford)** a été utilisée pour le dosage des protéines. Cette méthode de dosage des protéines s'appuie sur la variation de couleur du bleu de Coomassie, qui se traduit par une variation d'absorbance lors de sa complexation avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) ainsi que les acides aminés hydrophobes présents dans les protéines. **(Kruger, 2009).**

II.6.1 Procédure de fonctionnement

Le réactif de Bradford a été élaboré en diluant 100 mg de bleu de Coomassie G-250 dans 50 ml d'éthanol pur et 100 ml d'acide phosphorique. Le volume final a été ajusté à 1 L en utilisant de l'eau distillée.

On a ajouté 1000 µl du réactif de Bradford à 20 µl de chaque extrait protéique préparé avec des dilutions appropriées. Après 5 minutes d'incubation, le mélange a été vortexé et l'absorbance a été mesurée à 595 nm **(Kruge, 2009)**. Pour quantifier les protéines, une courbe d'étalonnage fournie par la BSA **(annexe 03)** a été employée **(Kruger, 2009).**

II.7. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Une analyse de l'activité antibactérienne des extraits protéique a été réaliser à l'aide de la méthode des puits. **(Shunying *et al., 2009*)** Des puits de 6 mm de diamètre ont été réalisés directement sur la gélose Mueller-Hinton à l'aide de pipettes Pasteur stériles. Ensuite, les extraits protéiques ont été soigneusement versés à l'intérieur de ces puits. Les milieux ont été ensemencés avec trois souches de références à savoir : *Salmonella enterica serovar typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Escherichia coli* ATCC 25922. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures (**C.Bekhechi *et al., 2008***), l'apparition d'une zone d'inhibition supérieur à 6 mm autour des puits indique une activité antibactérienne de nos extraits.

RÈSULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Souches bactériennes

Un total de 4 échantillons de cônes de *Cupressus sempervirens L* ont été récoltés dans différentes régions de la wilaya de Bouira. 40 souches bactériennes ont été isoler à partir des échantillons préparés à base (Eau peptonée, eau distillée stérile, le bouillon nutritif et de l'eau physiologie) **(Annexe 01),** dont 70% sont des bactéries Gram-positives et 30% sont des bactéries Gram-négatives.

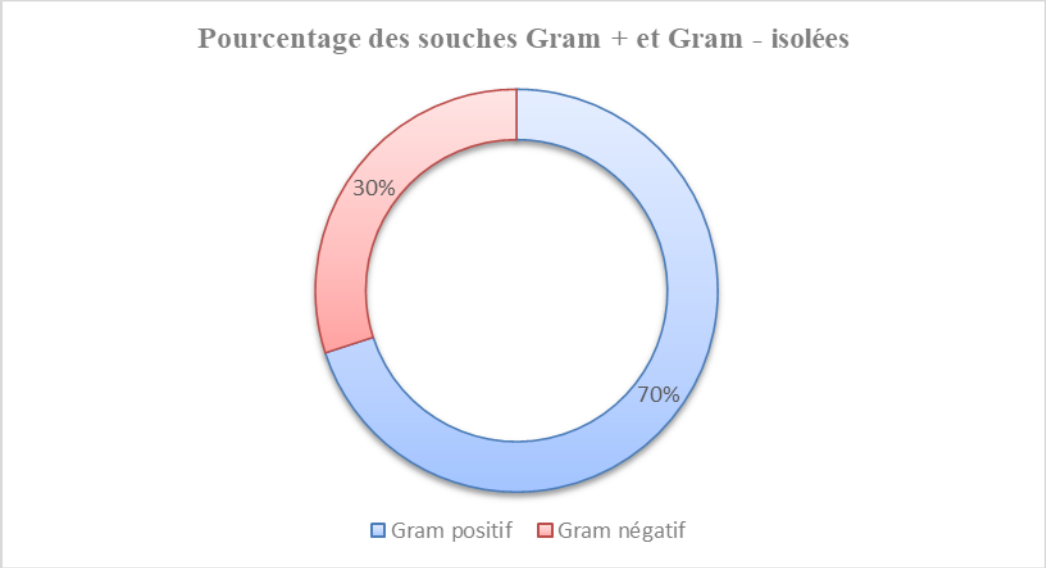


Figure 7 : Résultats de la coloration de Gram

III.1.1 Identification de bactéries Gram positifs

Après ensemencement et incubation pendant 24 h à 37 °C sur les milieux Chapman et MRS, plusieurs types de colonies ont été observés. Sur le milieu Chapman, des colonies rondes, régulières, bombées, lisses, de taille moyenne et de couleur jaune sont apparues. La coloration de Gram a révélé qu'il s'agissait de coques Gram positif en amas, ce qui, en se basant sur les tests biochimiques et l'orientation sur le milieu CHROMAGAR (**Annexe 02**), a permis de suspecter des souches appartenant au genre *Staphylococcus* (**Figure 09**). D'autres colonies, plus grandes, rugueuses, irrégulières, sèches et de couleur blanchâtre, ont également été observées sur le même milieu. La coloration de Gram a montré qu'il s'agissait de bacilles à Gram positif, suggérant, selon les tests biochimiques et l'orientation sur CHROMAGAR, des souches du genre *Bacillus.* **(Figure 09)**

Par ailleurs, sur le milieu MRS, des colonies rondes, lisses, de petite taille et de couleur blanche, dégageant une odeur acidulée, ont été détectées. L'examen de Gram a révélé la présence de bacilles arrondis à Gram positif. En se fondant sur les tests biochimiques et l'orientation sur CHROMAGAR, ces souches ont été suspectées appartenir au genre *Lactobacillus*. (**Figure 09**)

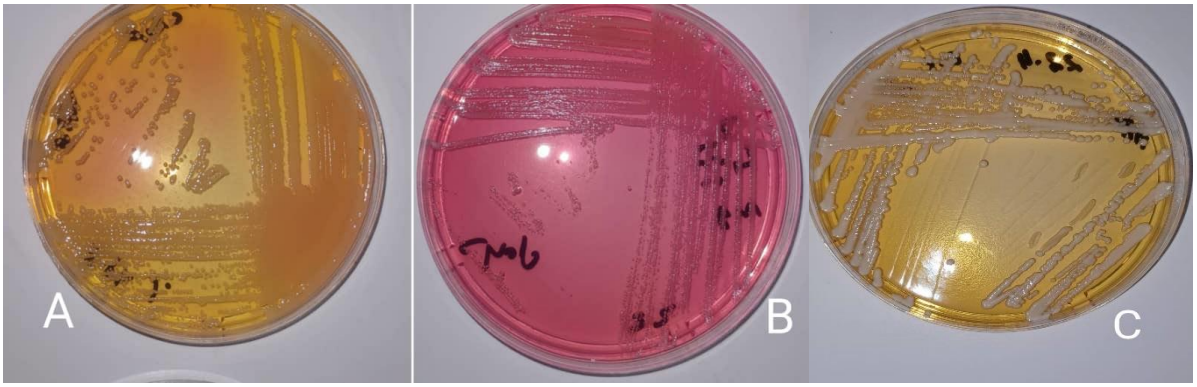


Figure 08 : les colonies des souches au genre A : *Staphylococcus* et B : *Bacillus* sur milieu Chapman et C : *Lactobacillus*

III.1.2 Identification des bactéries a Gram négatif

Après 24 h d'incubation à 37 °C sur le milieu MacConkey, différentes colonies caractéristiques de bactéries à Gram négatif ont été observées. Des colonies roses, rondes, lisses, brillantes avec un centre plus foncé correspondaient à de petits bacilles à Gram négatif. Les résultats des tests biochimiques et l'orientation sur CHROMAGAR ont permis de suspecter des souches appartenant au genre *Entérobacter*.

D'autres colonies, également roses, mais présentant une texture muqueuse, bombées et brillantes, ont révélé des bacilles à Gram négatif, orientant l'identification vers le genre *Klebsiella*.

Enfin, des colonies incolores, irrégulières et légèrement rugueuses ont été observées. La coloration de Gram a mis en évidence des bacilles à Gram négatif, et les analyses biochimiques ainsi que l'orientation sur CHROMAGAR ont permis de suspecter des souches du genre *Pseudomonas*.

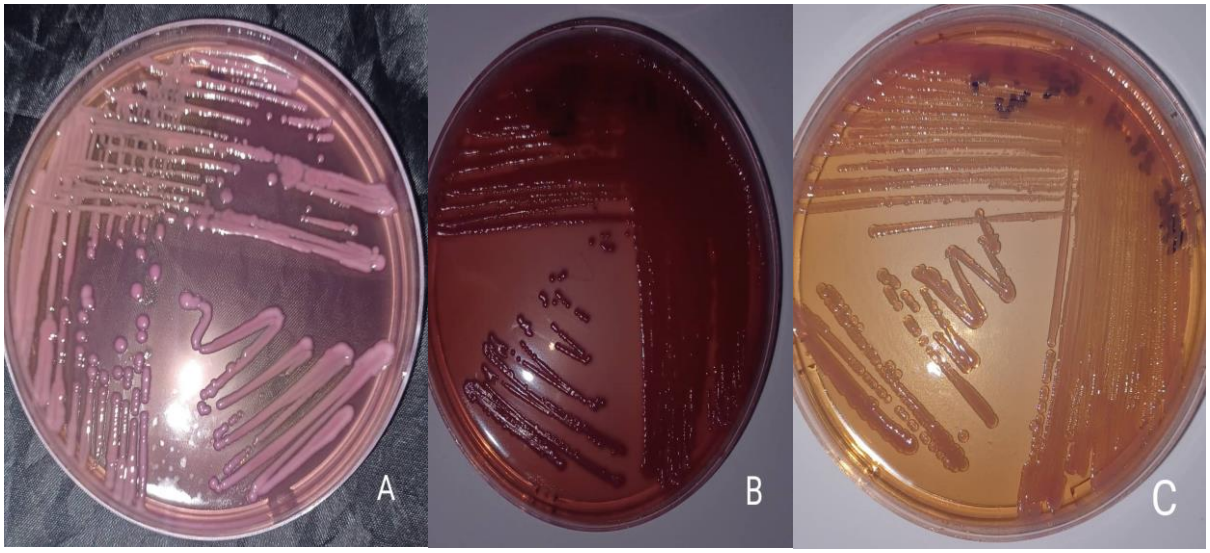


Figure 9 : Les colonies des souches au genre A : *Entérobacter* et B : *Klebseila* et C : *Pseudomonas* sur milieu Mac conckey

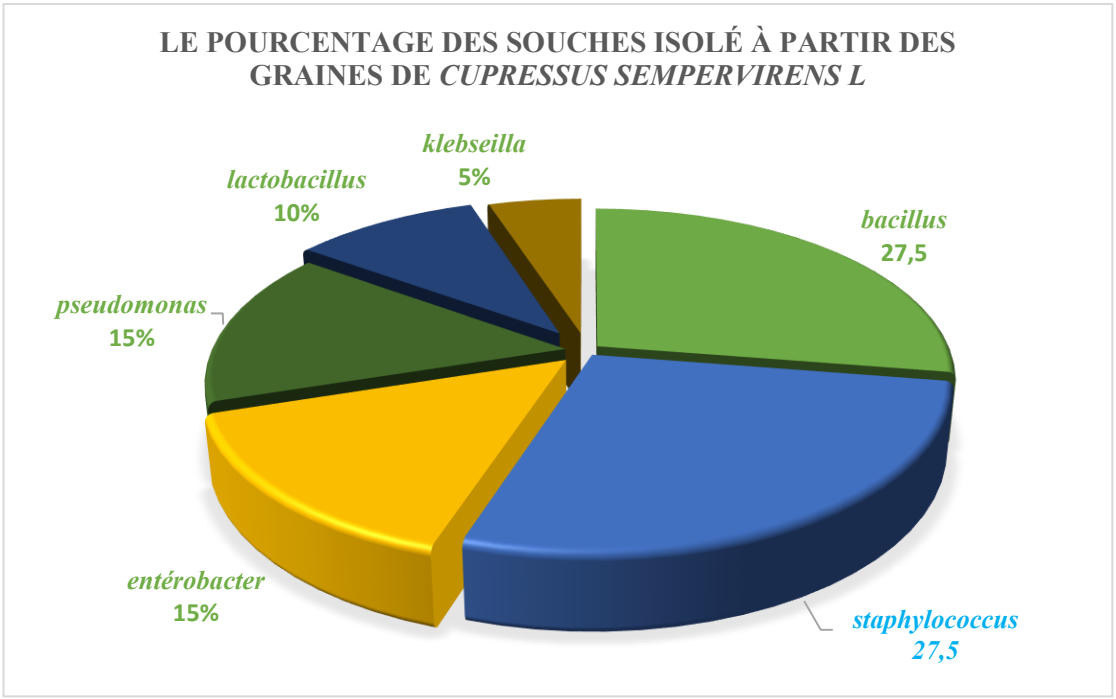


Figure 10 : Le pourcentage des souches isolées à partir des graines de *C. Sempervirens L*

III.2. Extraction et dosage des protéines

L'évaluation de la concentration en protéines extraites a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre.et les protéines intracellulaires présentent un pourcentage élevé de concentration qui varier entre 73% et 99%, Alors que les protéines extracellulaires montrent des pourcentages allant de 28% à 79%. **(Figure 12) (Figure 13)**

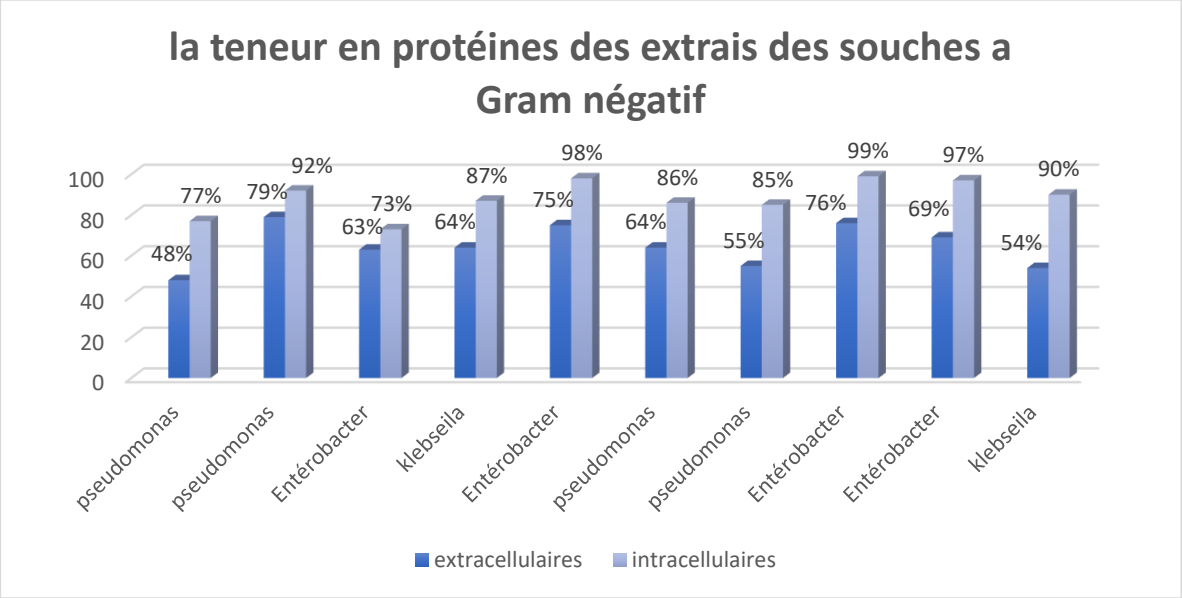


Figure 11 : La teneur en protéines des extraits des souches à Gram négatif

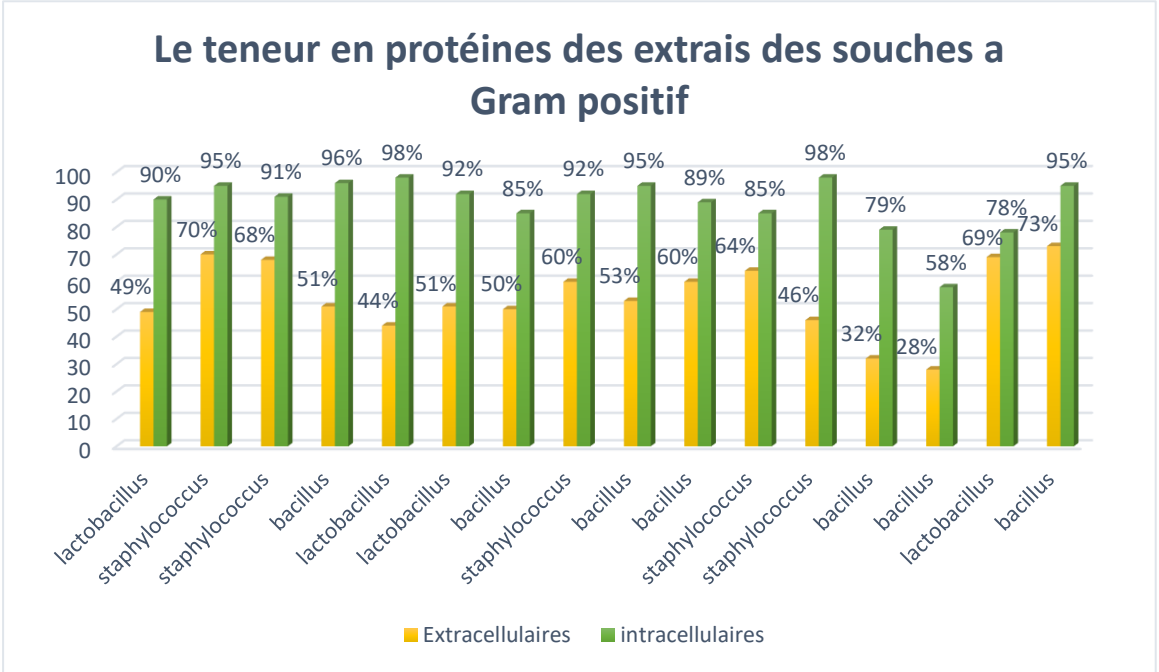


Figure 12 : La teneur en protéines des extraits des souches a Gram positif

III.3. Résultats de l'activité antibactérienne :

Les extraits extracellulaires ont montré une activité inhibitrice de 52 % contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) avec des zones d'inhibition de divers diamètres autour des puits (> 6 mm) (**Annexe 03**). En comparaison, les extraits intracellulaires ont présenté une activité légèrement inférieure, de 48 %, contre la même bactérie.

En revanche, concernant *Salmonella enterica* (ATCC 14028), Les extraits intracellulaires ont révélé une forte activité inhibitrice de 92 %, tandis que les extraits extracellulaires n'ont montré aucune activité (0 %) contre cette souche, et aucun des extraits n'a présenté d'activité contre la souche *Escherichia coli* (ATCC 25922)

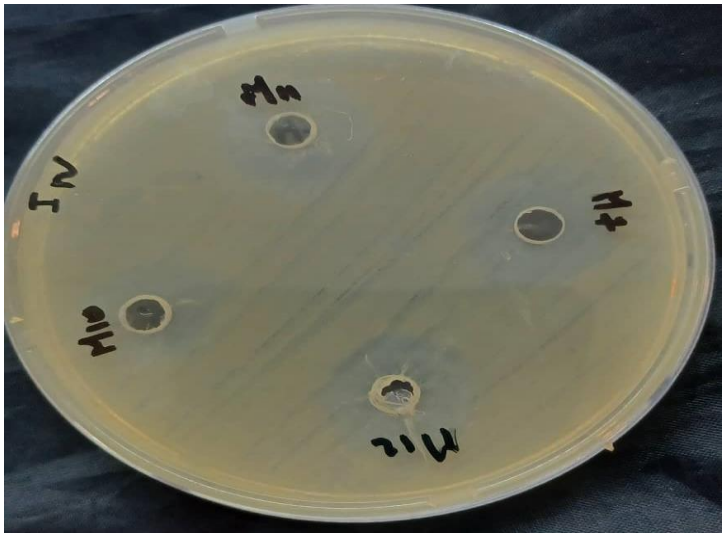


Figure 13 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits protéolytique contre *Staphylococcus aureus*

DUSCUSSION

À ce jour, malgré qu'il existe de nombreuses études sur *le Cupressus sempervirens L* aucune n'a encore été menée sur l'analyser de la microflore contenue dans ces graines. Ainsi, notre étude se distingue comme étant la première à rechercher et à analyser la composition microbiologique des graines de *Cupressus sempervirens L*, ouvrant par conséquent de nouvelles avenues dans ce champ d'étude.

Notre étude est importante car elle vise à combler le manque de données dans la caractérisation des communautés microbiennes associées aux graines de *Cupressus sempervirens L*. Et sur l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits de protéines intracellulaires et extracellulaires contre diverses souches bactériennes pathogènes. Les résultats attendus nous ont permis de mieux comprendre la composition et les propriétés du microbiote de cet espèce végétale, contribuant ainsi de manière significative à l'avancement des connaissances dans ce domaine de recherche.

Nos résultats ont mis en évidence une importante diversité microbienne dans chacun des échantillons analysés. Nous avons isoler des bactéries Gram-négatives fréquemment rencontrés dans différentes niches écologiques tels qu'*Enterobacter, Klebsiella et Pseudomonas*, ainsi que des bactéries Gram-positifs tels que *Staphylococcus* et *Bacillus* et *lactobacillus* Ces résultats, sont simulable à ceux rapporté par (**Soltani et ses collaborateurs en 2016**) à partir des graines de *Cupressus sempervirens L.*

L'analyse de la microflore endophyte présente dans les graines a permis d'identifier principalement les genres *Staphylococcus* et *Bacillus*, représentant ensemble 27,5 % des isolats obtenus dans les quatre zones d'échantillonnage. Les genres *Enterobacter* et Pseudomonas ont été détectés dans 15 % des cas, tandis que *Lactobacillus et Klebsiella* ont été observés avec une fréquence plus faible, respectivement 10 % et 5 %. Ces résultats confirment les données de travaux antérieurs ayant mis en évidence la présence du genre *Bacillus*. Notre étude est également en accord avec les conclusions de (**Selim et ses collaborateurs 2014).** Qui ont souligné la présence des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*.

En raison du nombre limité d'études consacré à ce sujet, notre recherche se distingue comme la première à explorer spécifiquement la flore des graines de *Cupressus sempervirens L.*

L'examen des souches bactériennes extraites de *Cupressus sempervirens L* met en lumière un potentiel passionnant concernant leurs protéines à l'intérieur et à l'extérieur des cellules.

Nous avons constaté que la proportion de protéines intracellulaires est plus élevée que celle des protéines extracellulaires. Cette différence s'explique par le fait que la synthèse et la

sécrétion des protéines extracellulaires nécessitent une dépense énergétique importante et sont généralement soumises à une régulation stricte, ne se produisant qu'en réponse à des stimuli spécifiques. Par conséquent, l'analyse des protéines intracellulaires offre une vision plus représentative des mécanismes métaboliques internes et du potentiel fonctionnel des souches bactériennes. Ces protéines constituent donc des cibles d'étude pertinentes pour approfondir la compréhension du fonctionnement bactérien, en cohérence avec les observations expérimentales **Trishin., 2004.**

La concentration et la variété des protéines à l'intérieur de la cellule dépassent de loin celles des protéines à l'extérieur. Les protéines extracellulaires, malgré leur rôle crucial dans la communication entre les cellules et l'interaction avec le milieu ambiant, ne constituent qu'une petite portion des protéomes bactériens **karpinski., 2013.**

Nos recherches récentes concernant l'efficacité antibactérienne des extraits protéiques intracellulaires et extracellulaires provenant de diverses souches bactériennes prélevées sur les graines de *Cupressus sempervirens L*, ont permis de mettre en évidence le potentiel de ces extraits en tant qu'agents antibactériens performants contre des souches pathogènes habituelles, comme *Staphylococcus aureus* et *salmonella enterica*. Tous les échantillons testés ont démontré une action antibactérienne favorable, attestant de l'existence de molécules antibactériennes bioactives abondantes et variées dans ces extraits. Ces données concordent aux ceux rapporté par **Abbassi *et al*., 2022** qui ont démontré que les extraits aqueux des feuilles de *C. sempervirens L* inhibent efficacement la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*, et l'étude de **Brahimi *et al*., 2023 ;Rios et Recio., 2005** sur le fait que l'huile essentielle de *C. sempervirens* a montré une forte activité antibactérienne contre des bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, Salmonella enterica Spp, les résultats de notre recherche confirment les informations trouvées dans les publications scientifiques, en particulier celles de **Hammoudi *et al.,* 2021** et **Sharifi-Rad *et al.,* 2013**, qui ont toutes deux signalé une activité antibactérienne quasi inexistante ou très faible du *Cupressus sempervirens L* contre *l'Escherichia colis*. En effet, la souche qui a été examinée dans notre étude a démontré une résistance, sans qu'aucune activité inhibitrice ne soit observée. Ces observations appuient l'hypothèse que les substances contenues dans cette espèce végétale ont une efficacité limitée contre certains bactéries Gram négatives, comme *E. coli.*

Les protéines bactériennes extraites de diverses souches présentent un potentiel industriel considérable. *Bacillus subtilis*, en particulier, est reconnu pour sa capacité à produire et à sécréter des enzymes industrielles telles que les amylases, protéases et cellulases, essentielles

dans les industries agroalimentaires et des détergents. Sa capacité à produire des antibiotiques, comme la bacitracine, en fait également un organisme d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique. (**Zhang, *D.,2020***) *Lactobacillus rhamnosus*, notamment la souche GG, est utilisée dans la fermentation alimentaire et produit des protéines bioactives ayant des effets bénéfiques sur la santé intestinale, notamment en prévenant les diarrhées associées aux antibiotiques. (**Contesini, *F. J, 2018***) *Pseudomonas aeruginosa* est connue pour produire des rhamnolipides, des biosurfactants utilisés dans la bioremédiation pour dégrader les hydrocarbures et autres polluants environnementaux. La protéine A produite par *Staphylococcus aureus* est utilisée en biotechnologie pour la purification des anticorps, grâce à sa capacité de liaison spécifique à la région Fc des immunoglobulines. *Enterobacter* et *Klebsiella* sont capables de former des biofilms, ce qui leur confère une résistance accrue aux conditions environnementales et aux agents antimicrobiens. Cette propriété est exploitée dans diverses applications industrielles, notamment dans la production de bioplastiques et la bioremédiation (**Ganguli, *K,2015)***.

Pour maximiser le potentiel de nos extraits protéiques, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour caractériser précisément les protéines présentes, évaluer leur activité biologique spécifique et optimiser les conditions de production. L'ingénierie génétique des souches bactériennes pourrait également être envisagée pour améliorer le rendement et la fonctionnalité des protéines produites (**Rao, *M. B,1998***).

CONCLUSION

Conclusion

Les plantes sont des réservoirs naturels de micro-organismes dotés d'un potentiel biologique et biotechnologique diversifié. Parmi ces micro-organismes, ceux présents dans les graines suscitent une attention croissante en raison de leur rôle écologique et de leur potentiel d'application. Dans cette étude, nous avons étudié le microbiote bactérien associé aux graines de *Cupressus sempervirens L*, une espèce d'arbre méditerranéenne connue pour ses propriétés médicinales.

L'analyse microbiologique des graines a permis d'isoler une large gamme de bactéries appartenant à la fois aux groupes Gram-positifs et Gram-négatifs, mettant en évidence la richesse du microbiote. Cette diversité suggère que ces micro-organismes présentent des adaptations particulières à l'environnement spécifique des graines et souligne leur intérêt comme source de biomolécules actives.

Les protéines extraites de ces souches bactériennes ont démontré une remarquable activité antibactérienne contre certaines espèces cibles, mettant en évidence la production de composés bioactifs possédant de propriétés antimicrobiennes. Ces résultats mettent en évidence l'engagement des micro-organismes liés aux graines de *Cupressus sempervirens L* dans l'exploration de nouvelles alternatives naturels aux antibiotiques traditionnels. L'étude de cette microflore présente des perspectives encourageantes aux niveaux fondamental et appliqué. Grâce à une meilleure identification des composés actifs et à l'élaboration de stratégies de valorisation, ces ressources naturelles pourraient être utilisées dans divers secteurs tels que la santé, l'agriculture ou la conservation alimentaire, contribuant ainsi à une bioéconomie durable et novatrice.

LES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUS

- Abbassi, F., et al. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cupressus sempervirens* essential oils against bacteria isolated from respiratory tract infections.Tropical Journal of Natural Product Research, 4(10), 868–873.

- Afocel-Armef. (1985). Les cyprès. Informations-Forêt, 174(44). Glass, Oxford

- Ait Chitt, A., Belmir, H., Lazrak, A., 2007. Production des plants sélectionnés et greffées du crépes. Transfert de technologie en Agriculture. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA MAPM/DERD 153, 1–4.

- Alain Roques Stephanos Mark b alas Géraldine Ro a ux Yong-zhi Pa an Jiang-hua Su an Jean-Paul Raimbault .1998. Impact of insects damaging seed cones of cypress, Cupressus sempervirens, in natural stands and plantations of southeastern Europe.

- Ali, M. M., et al. (2022). Phytochemical investigation and antimicrobial activity of Cupressus macrocarpa roots. Molecules, 27(2), 346.

- ALVAREZ E and McGee, “New Assays for Detection of Pseudomonas syringae pv . glycinea in Soybean Seed,” 1995.

- Amara, N., & Boughérara, Y. (2017). Activité antimicrobienne de l’huile essentielle du cyprès vert (Cupressus sempervirens L.). Algerian Journal of NaturalProducts,5(2),455–462.https://doi.org/10.5281/zenodo.883857Readkong

- .Amend, A. S., et al. (2019). Phytobiomes are compositionally nested from the ground up. FEMS Microbiology Ecology, 95(9), fiz111. https://doi.org/10.1093/femsec/fiz111

- Amvam Zollo, P. H., et al. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Cupressus lusitanica from Cameroon. BMC Complementary and Alternative Medicine, 13(1), 130.

- Andrews, J. H., & Harris, R. F. (2000). The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces.Annual Review of Phytopathology, 38, 145–180. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.145 .

- Anne-Sophie Masson and Marie Simonin, “Le microbiote des plantes, de son rôle dans la survie végétale à son ingénierie pour une agriculture durable,” https://planet vie.ens.fr/.

-B-

- B. Karimi et al., “Biogeography of soil bacteria and archaea across France,” 2018. [Online]. Available: http://advances.sciencemag.org/ .

- Bai Y, Müller DB, Srinivas G et al. Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota. Nature 2015;528:364–9 .

- Bakr, R. O., et al. (2021). Polyphenolic profile and antibacterial activity of Cupressus sempervirens bark extract. Antibiotics, 10(8), 890.

- 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(4), 1257–1266. (https://doi.org/10.1128/AEM.03722-14).

- Batiha, G. E. S., Teibo, J. O., Shaheen, H. M., Akinfe, O. A., Awad, A. A., Teibo, T. K. A., Alexiou, A., & Papadakis, M. (2023). Bioactive compounds, pharmacological actions and pharmacokinetics of Cupressus sempervirens. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 396(3), 389–403.

- Batlle, I., Tous, J., 1997. Carob tree Ceratonia siliqua L., Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17, Gatersleben: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Rome : International Plant Genetic Resources Institute. 92 pages.

- Bergna, A., Cernava, T., Riedel, T., Kollmann, A., Keiblinger, K. M., & Berg, G. (2018). Tomato seeds preferably transmit plant beneficial endophytes. Phytobiomes Journal, 2(4), 183–193. [https://doi.org/10.1094/PBIOMES-05-18-0029 .

- Boucif, O. E. W., Benhammou, B. N., Kanouni, M. R., & Rahab, R. (2023). Valorisation phytochimique de Cupressus sempervirens L. de la forêt de Terni (Monts de Tlemcen). Revue des BioRessources, 13(1).

- Boudjemaa, A. (2017). Activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites de *Cupressus sempervirens* récolté dans la région de Tizi-Ouzou. Mémoire de Master, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie.

- BOURAHLA Samah et SAIDI Dania, 2024, MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER ; Etude de la flore microbiologique des graines du *Pinus halepensis*.

- Bouyahyaoui A., 2017. Contribution à la valorisation des substances naturelles : Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région de l'Atlas algérien (Doctoral dissertation), P.80-99.

- Brahmi, F., et al. (2023) Antimicrobial Activity of Cupressus sempervirens Essential Oil: Biocidal Effect on Pathogenic Bacteria. Molecules, 28(21), 7402.

- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. Annual Review of Plant Biology 2013a;64:807–38.

-C-

- C. Bekhechi, F. Atik-Bekkara, and D. E. Abdelouahid, "Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'Origanum glandulosum d'Algérie," Phytothérapie, vol. 6, no. 3, pp. 153–159, Jun. 2008, doi: 10.1007/s10298-008-0310-6.

- Caudullo, G., Welk, E., and San-Miguel-Ayanz, J. Cupressus sempervirens chorology. 2019 [cited 2019 01/08/2019]; Available from: https://figshare.com/articles/Cupressus_sempervirens_chorology/5101132.

- Chaparro, J. M., Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. The ISME Journal, 8(4), 790–803. https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196.

- Chaudhary HJ, Shahid W, Bano A, Ullah F, Munis F, Fahad S and Ahmad I. In vitro analysis of Cupressus sempervirens L plant extracts antibaterial activity. Journal of Medicinal Plants Research 2012; 6(2): 273-276.

- Chen, T., Nomura, K., Wang, X., Sohrabi, R., Xu, J., Yao, L., ... & He, S. Y. (2020a). A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. Nature, 580(7805), 653–657. [https://doi.org/10.1038/s41586-020-2185 0].

- Chesneau, G., Laroche, B., Préveaux, A., Marais, C., Briand, M., Marolleau, B., Simonin, M., & Barret, M. (2022). Single seed microbiota: assembly and transmission from parent plant to seedling. mBio, 13(5), e01648-22. https://doi.org/10.1128/mbio.01648-22 .

- Chimwamurombe, P. M., et al. (2016). Diversity of endophytic bacteria in Sorghum bicolor seeds and their potential as plant growth promoters. African Journal of Biotechnology, 15(35), 1891–1899. https://doi.org/10.5897/AJB2016.15487 .

- Coleman-Derr, D., et al. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. New Phytologist, 209(2), 798–811. https://doi.org/10.1111/nph.13697 .

- Cronquist, A., 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, 248-250 .

- Cui, X., et al. (2023). Spatio-temporal dynamics of phytohormones in the tomato graft healing process. Plant Communications, 4(1), 100182. https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100182 .

-D-

- Davidson A (2022) therole of nuclear energy in the global energy transition. Oxford institute for Energy studies, oxford, Uk.

- DeAngelis, K. M., Brodie, E. L., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Lindow, S. E., & Firestone, M. K. (2009). Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. The ISME Journal, 3(2), 168–178. https://doi.org/10.1038/ismej.2008.103.

- Delaux, P.-M., & Schornack, S. (2021). Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. Science, 371(6531), eaba6605. [https://doi.org/10.1126/science.aba6605].

- Delmotte, N., et al. (2009). Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(38), 16428–16433. https://doi.org/10.1073/pnas.0905240106.

- DEPOERS P., LEDOUX F., MEURIN P., 2002 La phytothérapie entre science et tradition, Edition Amyris et Inspir, SPRL, p 98-9.

- Develey-Rivière, M.-P., & Galiana, E. (2007). Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. New Phytologist, 175(3), 405–416. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02130.x.

-E-

- Esmail, A. (2016). " Medical importance of Cupressus sempervirens". International Organization of Scientific Research Journal Of Pharmacy, Vol. 6. Pp. 66-76.

- Eyre, A. W., et al. (2019). Dynamic changes in the microbiome of rice during shoot and root growth derived from seed. Frontiers in Microbiology, 10, 889. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00889.

-F-

- FLEURENTIN J, octobre 2008 Plantes médicinales, traditions et thérapeutiques, Edition Ouest-France, p 50-51

- Fuente, J., et al. (2011). Essential oils of Cupressus lusitanica from Costa Rica: Composition and antimicrobial activity. *Molecules*, 16(5), 3878–3889.

-G-

- Gaber El-Saber Batiha1 · John Oluwafemi Teibo2 · Hazem M. Shaheen1 · Opeyemi Abigail Akinfe3 · Aya Ahmed Awad1 · Titilade Kehinde Ayandeyi Teibo 4 · Athanasios Alexiou5,6 ·

Marios Papadakis7 (2023), Bioactive compounds, pharmacological actions and pharmacokinetics of Cupressus sempervirens.

- Granner D, Biochimie de HARPER., 3ème édition., vol. 47. Bruxelle, 2008.

- Guo, Z., et al. (2021). Deciphering the spatial distribution and function profiles of soil microbial communities. Science of the Total Environment, 757, 143825. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.14382.

-H-

- Hammoudi, R., et al. (2021). Antimicrobial Activity of Some Species from Pinaceae and Cupressaceae. (https://www.academia.edu/80742081/Antimicrobial_Activity_of_Some_Species_from_Pinaceae_and_Cupressaceae).

- Hamonts, K., Trivedi, P., Garg, A., Janitz, C., Grinyer, J., Holford, P., et al. (2018). Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. Frontiers in Microbiology, 9, 2868. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02868.

- Hamouy, l. Neggar,f , Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du Diplôme de Master (Isolement, purification et caractérisation partielle des lectines à partir des cônes fructifères du Cyprès méditerranéen (*Cupressus sempervirens*).

- Hillcoat, D., Lewis, G., & Verdcourt, B., 1980. A new species of Ceratonia.

- Hubbard, C. J., Brock, M. T., van Diepen, L. T. A., Maignien, L., Ewers, B. E., & Weinig, C. (2018). The plant circadian clock influences rhizosphere community structure and function. The ISME Journal, 12(2), 400–410. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.172.

-K-

- KARPINSKI, T. M., SZKARADKIEWICZ, A. K. (2013). Characteristic of bacteriocines and their application. Polish Journal of Microbiology 62(3), 223–235.

- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., ... & Vorholt, J. A. (2010). *Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice*. The ISME Journal, 6, 1378–1390.

-L-

- Links, M. G., Demeke, T., Gräfenhan, T., Hill, J. E., Hemmingsen, S. M., & Dumonceaux, T. J. (2014). *Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals antagonistic interactions between microorganisms within a shared epiphytic microbiome on Triticum and Brassica seeds*. New Phytologist, 202(2), 542–553. [https://doi.org/10.1111/nph.12693].

- Liu, X., et al. (2021). Zooming in on the temporal dimensions of plant–soil feedback: Plant sensitivity and microbial dynamics. Plant and Soil, 468, 1–14. https://doi.org/10.1007/s11104-021-05006-4.

- Lopez-Velasco, G., Carder, P. A., Welbaum, G. E., & Ponder, M. A. (2011). *Diversity of the spinach rhizosphere and phyllosphere bacterial communities*. FEMS Microbiology Letters, 322(1), 15–23. [https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02339.x] .

- Lundberg, D. S., et al. (2012). Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome. Nature, 488(7409), 86–90. https://doi.org/10.1038/nature11237.

-M-

- M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” Anal Biochem, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, May 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

- Madigan Michael T. ET.Al | Brock Biology of Microorganisms [Paperback] [Jan 01, 2018] Michael T. Madigan, Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley, W. Matthew Sattley, David A. Stahl.

- Mahapatra, S., Rayanoothala, P., Solanki, M. K., & Das, S. (2020). Wheat Microbiome : Present Status and Future Perspective. In Phytobiomes: Current Insights and Future Vistas (pp. 191–223). Springer.

- Maignien, L., DeForce, E. A., Chafee, M. E., Eren, A. M., & Simmons, S. L. (2014). Ecological succession and stochastic variation in the assembly of Arabidopsis thaliana phyllosphere communities. mBio, 5(1), e00682-13. https://doi.org/10.1128/mBio.00682-13.

- MALHEBIAU P., 1994 La nouvelle aromathérapie, caractérologie des essences et tempéraments humains, Edition Jakin, p 122-123 , p 125-126 , p 124, p 127, p 129, p 132-133-134, p 147-148, p 150-151,P 154.

- Mano, H., & Morisaki, H. (2006). Endophytic bacteria in rice seeds and their potential as plant growth promoters. Microbes and Environments, 21(1), 1–6. https://doi.org/10.1264/jsme2.21.1.

- MARCELLO I. – PAOLO R. et CLAUDINE A., 2004 – Les espèces de Cyprès. CYPMED. INTERREG III B. MEDOCC. Corte, 100 p.

- Mazari, K., Bendimerad, N., Bekhechi, C., & Fernandez, X. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian Juniperus phoenicea L. and Cupressus sempervirens L. Journal of Medicinal Plants Research, 4(10), 959–964.

- Meunier N, "Evaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales," Mémoire pour l'obtention du grade de Maitre ès Sciences, Université du Quebec., Canada , 1999.

- Mokhtar Youcef Benkada, "Etude de l'inoculum séminicole de Drechslera teres (Sacc.) Shoem. Et caractérisation de souches par l'utilisation de profils protéiques et isoenzymatiques," Toulouse, INPT, 1994.

- Mokhtari, S., et al. (2023). Polyphenol content and antimicrobial potential of Algerian Cupressus sempervirens extracts. Algerian Journal of Natural Products*, 11(1), 20–26.

- Müller DB, Vogel C, Bai Y et al. The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. Annual Review of Genetics 2016;50:211–34.

-N-

- N. J. Kruger, "The Bradford Method For Protein Quantitation," 2009, pp. 17–24. doi: 10.1007/978-1-59745-198-7_4.

- N. Patel, D. Rai, Shivam, S. Shahane, and U. Mishra, “Lipases: Sources, Production, Purification, and Applications,” Recent Pat Biotechnol, vol. 13, no. 1, pp. 45–56, Feb. 2019, doi: 10.2174/1872208312666181029093333.

- Nichane, N. (2015). Contribution à l’étude du dépérissement du Cyprès vert (Cupressus sempervirens L.) dans les monts des Traras Occidentaux (Wilaya de Tlemcen). Département d’Ecologie et Environnement. Université Tlemcan. Algerie.Pp :22-26.

- Nicoletti, R., Trincone, A., & Marziano, F. (2014). Endophytic fungi of *Cupressus sempervirens* L. and their bioactivity. Fungal Diversity, 66, 1–19.

-O-

- Orhan, I. E., et al. (2015). Potential of *Cupressus sempervirens* (Mediterranean cypress) in health. In Novel nutraceuticals and edible plants used in the Mediterranean region (Chap. 57). Elsevier.

-P-

- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 28, 489–521. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055.

- Pinto-Carbó, M., et al. (2018). Bacterial endophytes in Dioscorea spp.: diversity and potential functional roles. Frontiers in Microbiology, 9, 2541. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02541.

- Poncet, P., Charpin, D., & Sénéchal, H. (2021). Cupressaceae from five continents. Revue française d’allergologie, 61, 198–201.

- PONTOPIDDAN A., avril 2000 Le cyprès, Edition Actes Sud, p 13, p 15-16, p 17-18-19, p 58, p 61-62, p 64-65 ,p 66-67, p 72, p 74, p 76-77, p 79, p 81, p 86.

- Popoff, M.R. (2011) Epsilon Toxin : The Challenges of Diagnosis and Control of Enterotoxaemia Caused by Clostridium perfringens in Small Ruminants.

-R-

- Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43, 439–463. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.002255.

- Rezki, S., Campion, C., Simoneau, P., Jacques, M. A., Shade, A., & Barret, M. (2016). Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. Plant and Soil, 422(1-2), 67–79. [https://doi.org/10.1007/s11104-016-3175-y].

- Rochefort, A., Briand, M., Marais, C., Wagner, M. H., & Roussel, S. (2019). *Influence of grapevine genotype on microbial communities associated with the root system*.

- Roques, A., Markalas, S., Roux, G., Pan, Y., Sun, J., & Raimbault, J.P. (1999). Impact of insects damaging seed cones of cypress, *Cupressus sempervirens*, in natural stands and plantations of southeastern Europe. Annals of Forest Science, 56(2), 167–177.

- Rybakova, D., Mancinelli, R., Wikström, M., Birch-Jensen, A. S., Postma, J., Ehlers, R. U., & Berg, G. (2017). *The structure of the bacterial and fungal microbiome in the rhizosphere of the nematode trap-crop Tagetes patula varies with plant growth stage*. Scientific Reports, 7, 5136.](https://doi.org/10.1038/s41598-017-05045-6).

-*S*-

- S. Bhaduri and P. H. Demchick, “NOTES Simple and Rapid Method for Disruption of Bacteria for Protein Studies,” 1983.

- Schardl, C. L., Leuchtmann, A., & Spiering, M. J. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. Annual Review of Plant Biology, 55, 315–340. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141735.

- Schoelz JE, Stewart LR. The Role of Viruses in the Phytobiome. Annual Review of Virology 2018;5:93–111.

- Selim, S. A., Adam, M. E., Hassan, S. M., & Albalawi, A. R. (2014). Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, .

- Shade, A., McManus, P. S., & Handelsman, J. (2013). Unexpected diversity during community succession in the apple flower microbiome. mBio, 4(2), e00602-12. https://doi.org/10.1128/mBio.00602-12.

- Sharifi-Rad, M., et al. (2013). *Biological Activities of Essential Oils and Extracts from Iranian Conifers*. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(2), 106–114. Disponible sur [PubMed Central] (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813213/).

- Shi, S., Nuccio, E. E., Herman, D. J., Rijkers, R., Estera, K., Li, J., & Firestone, M. K. (2015). Successional trajectories of rhizosphere bacterial communities over consecutive seasons. mBio, 6(4), e00746-15. https://doi.org/10.1128/mBio.00746-15.

- Simonin, M., et al. (2021). Temporal and spatial interactions modulate the soybean microbiome. FEMS Microbiology Ecology, 97(1), fiaa206. https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa206.

- Singer, E., et al. (2019). High-resolution phylogenetic microbial community profiling. PNAS, 116(14), 6735–6740. https://doi.org/10.1073/pnas.1814648116.

- Soltani, J., Zaheri-Shoja, M., Hamzei, J., Hosseyni Moghaddam, M. S., & Pakvaz, S. (2016). Diversity and bioactivity of endophytic bacterial community of Cupressaceae. Forest Pathology, 46(6), 353–361. https://doi.org/10.1111/efp.12270.

-T-

- TRISHIN, A.V., ZHDANOVICH, M., SAVVATEEVA,L, TOPTYGIN, A.,DONENKO ,M.(2004). Protease activity of Klebsiella pneumoniae of different virulence ,Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., no 4, p. 7-11

- .

- Trivedi P, Leach JE, Tringe SG et al. Plant–microbiome interactions : from community assembly to plant health. Nature Reviews Microbiology 2020;18:607–21.

- Truyens, S., et al. (2016). Community structure and diversity of endophytic bacteria in seeds of three consecutive generations of Crotalaria pumila growing on metal mine residues. Microbial Ecology, 72(4), 835–847. https://doi.org/10.1007/s00248-016-0770-4.

- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2023). Insights into the seed microbiome and its ecological significance in plant adaptation. FEMS Microbiology Ecology, 99(2), fiad015. https://doi.org/10.1093/femsec/fiad015.

-U-

- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: http://www.arsgrin.gov.4/cgi-bin/npgs/html/taxon. pl?12665 (01 November 2015).

-V-

- Vacher, C., et al. (2016). The phyllosphere: microbial jungle at the plant–climate interface. New Phytologist, 211(3), 969–972. https://doi.org/10.1111/nph.13918.

- Vanstraelen, M., & Benková, E. (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 28, 463–487. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155741.

-W-

- Wagner, M. R. (2021). Prioritizing host phenotype to understand microbiome heritability in plants. New Phytologist, 232(2), 502–509. https://doi.org/10.1111/nph.17622.

-X-

- Xiong W, Song Y, Yang K et al. Rhizosphere protists are key determinants of plant health. Microbiome 2020;8:27.

-Z-

- Zhang, Y., Liang, H., Wang, H., et al. (2022). Integrative physiological, transcriptomic and proteomic analyses reveal mechanisms of drought tolerance in **Cupressus gigantea**. *Forests*, 13(3), 401.

- Zineb Rahmani1, Ali Douadi2, Zehour Rahmani ,2020 Laboratory of Valorisation et Promotion des Ressources Sahariennes (LVPRS), Univ Kasdi Merbah BP 511 Route Ghardaia, Ouargla, Algeria - 30000.

- Zrira, S., et al. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Cupressus atlantica Gaussen. Natural Product Communications, 6(1),

ANNEXES

Annexe 01

- **Préparation du milieu Mac Conkey, Chapeman, MRS, du bouillon nutritif et de l'eau peptonée tamponnée**

  - On mesure la poudre déshydratée de chaque milieu à l'aide d'une balance analytique.
  - La poudre est mise en suspension dans de l'eau distillée.
  - Le mélange accueille le dépôt du barreau magnétique.
  - On place le mélange sur une plaque chauffante avec agitateur et on le porte à ébullition jusqu'à ce que les ingrédients soient totalement dissous.
  - Le milieu est par la suite stérilisé à l'aide d'un autoclave.

Annexe 02

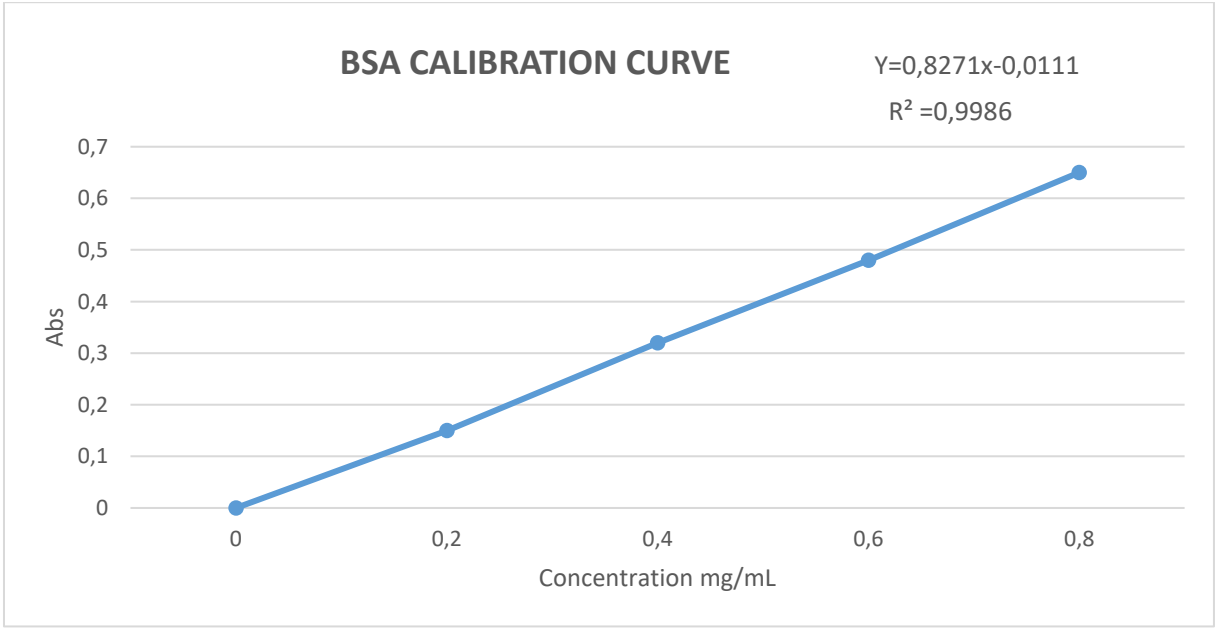
Tableau des résultats d'identification des souches

		TSI							
	MILIEU	**GAZ**	**LAC/GLU**	**manitol/mobilité**	**citrate**	**catalase**	**Colonie sur chromagar**	**FORME**	***Bactérie suspecte***
	CHAPMAN	-	+	+/-	-	+	/	**bacille**	***bacillus***
	CHAPMAN	-	+	+/-	-	+	Jaune	**cocci**	***staphylococcus***
ED1	CHAPMAN	-	+	+/-	+	+	/	**bacille**	***bacillus***
	CHAPMAN	-	+	+/+	-	+	Jaune	**cocci**	***staphylococcus***
	CHAPMAN	-	+	+/+	-	+	/	**bacille**	***bacillus***
	MAC	+	+	+/+	-	+	bleu	**bacille**	***enterobacter***
	MAC	-	+	+/+	-	+	vert	**bacille**	***pseudomonas***
EP1	MAC	+	+	+/+	+	+	bleu	**bacille**	***entérobacter***
	MAC	+	+	+/+	-	+	bleu	**bacille**	***enteérobacter***
BN1	CHAPMAN	-	+	+/+	-	+	/	**bacille**	***bacillus***
	MAC	-	+	+/-	-	+	vert	**bacille**	***pseudomonas***
	MAC	+	+	+/-	-	+	bleu violet	**bacille**	***klebsella***
	MAC	-	+	+/-	-	+	vert	**bacille**	***pseudomonas***
EPH1	MAC	+	+	+/+	-	+	bleu	**bacille**	***enterobacter***
	CHAPMAN	-	+	+/-	-	+	/	**bacille**	***bacillus***
	MAC	-	+	+/-	-	+	vert	**bacille**	***pseudomonas***
	CHAPMAN	-	+	+/-	-	+	jaune	**cocci**	***staphylococcus***
	CHAPMAN	-	+	-/-	-	+	Jaune	**cocci**	***staphylococcus***
EP2	MRS	-	+	-/-	-	+	/	**bacille**	***lactobacillus***
EPH2	CHAPMAN	-	-	+/-	-	+	/	**bacille**	***bacillus***

	CHAPMAN	-	+	+/+	-	+	jaune	**cocci**	***staphylococcus***
	MAC	-	+	+/-	-	+	vert	**bacille**	***pseudomonas***
	MRS	-	+	+/-	-	+	/	**bacille**	***lactobacillus***
BN2	MRS	-	+	+/-	-	+	/	**bacille**	***lactobacillus***
ED3	MRS	-	+	+/-	-	+	/	**bacille**	***lactobacillus***
	CHAPMAN	-	+	+/+	-	+	/	**bacille**	***bacillus***
	CHAPMAN	-	+	+/+	-	+	Jaune	**cocci**	***staphylococcus***
	MAC	+	-	+/-	-	+	bleu	**bacille**	***enterobacter***
BN3	MAC	+	-	+/+	-	+	bleu	**bacille**	***enterobacter***
EP3	MAC	-	+	+/+	-	+	vert	**bacille**	***pseudomonas***
EPH3	CHAPMAN	-	+	+/-	+	+	/	**bacille**	***bacillus***
	CHAPMAN	-	+	+/+	+	+	/	**bacille**	***bacillus***
	CHAPMAN	-	+	+/+	-	+	jaune	**cocci**	***staphylococcus***
BN4	MAC	+	-	+/-	-	+	Bleu violet	**cocci**	***klebsella***
	CHAPMAN	-	+	+/+	-	+	jaune	**cocci**	***staphylococcus***
EPH4	CHAPMAN	-	+	+/+	-	+	jaune	**cocci**	***staphylococcus***
	CHAPMAN	-	+	+/-	-	+	/	**bacille**	***bacillus***
ED4	CHAPMAN	-	+	+/+	-	+	/	**bacille**	***bacillus***
	CHAPMAN	-	+	+/-	-	+	jaune	**cocci**	***staphylococcus***
EP4	MAC			+/+	+	+	Jaune	**cocci**	***staphylococcus***

Annexe 03

Courbe d'étalon du dosage des protéines



Annexe 04

Tableau des résultats des extraits aux activités antibactérienne.

	Bactérie suspecte	***Staphylococcus aureus***
Extrait intracellulaire	*staphyloccocus*	-
	Bacillus	-
	Bacillus	7mm
	entérobacter	7mm
	staphylococcus	14mm
	lactobacillus	-
	lactobacillus	-
	entérobacter	9mm
	Bacillus	-
	staphylococcus	-
	staphylococcus	-
	Bacillus	11mm
	lactobacillus	-
	pseudomonas	-
	lactobacillus	-
	entérobacter	13mm
	Bacillus	-
	staphylococcus	7mm
	staphylococcus	11mm
	Bacillus	8mm
	pseudomonas	10mm
	pseudomonas	13mm
	klebseilla	-
	klebseilla	7mm

	Bactérie suspecte	***Staphylococcus aureus***
Extrait Extracellulaire	*staphylococcus*	6mm
	Bacillus	7mm
	Bacillus	9mm
	staphylococcus	-
	staphylococcus	-
	Bacillus	-
	staphylococcus	-
	enterobacter	10mm
	staphylococcus	8mm
	pseudomonas	-
	entérobacter	-
	entérobacter	11mm
	pseudomonas	8mm
	klebseilla	9mm
	pseudomonas	9mm
	Bacillus	-
	Bacillus	-
	staphylococcus	11mm
	klebseilla	6mm
	enterobacter	7mm
	lactobacillus	-
	lactobacillus	-
	lactobacillus	-
	lactobacillus	-

	Bactérie suspecte	salemonella
Extrait intracellulaire	staphyloccocus	9mm
	Bacillus	8mm
	Bacillus	9mm
	entérobacter	7mm
	staphylococcus	14mm
	lactobacillus	12mm
	lactobacillus	-
	entérobacter	13mm
	Bacillus	11mm
	staphylococcus	11mm
	staphylococcus	8mm
	Bacillus	8mm
	lactobacillus	9mm
	pseudomonas	14mm
	lactobacillus	8mm
	entérobacter	12mm
	Bacillus	6mm
	staphylococcus	6mm
	staphylococcus	7mm
	Bacillus	9mm
	pseudomonas	8mm
	pseudomonas	9mm
	klebseilla	13mm
	klebseilla	11mm

	Bactérie suspecte	salemonella
Extrait Extracellulaires	staphylococcus	-
	Bacillus	-
	Bacillus	-
	staphylococcus	-
	staphylococcus	-
	Bacillus	-
	staphylococcus	-
	enterobacter	-
	staphylococcus	-
	pseudomonas	-
	entérobacter	-
	entérobacter	-
	pseudomonas	-
	klebseilla	-
	pseudomonas	-
	Bacillus	-
	Bacillus	-
	staphylococcus	-
	klebseilla	-
	enterobacter	-
	lactobacillus	-
	lactobacillus	-
	lactobacillus	-
	lactobacillus	-

	Bactérie suspecte	E.coli
Extrait intracellulaire	staphyloccocus	-
	Bacillus	-
	Bacillus	-
	entérobacter	-
	staphylococcus	-
	lactobacillus	-
	lactobacillus	-
	entérobacter	-
	Bacillus	-
	staphylococcus	-
	staphylococcus	-
	Bacillus	-
	lactobacillus	-
	pseudomonas	-
	lactobacillus	-
	entérobacter	-
	Bacillus	-
	staphylococcus	-
	staphylococcus	-
	Bacillus	-
	pseudomonas	-
	pseudomonas	-
	klebseilla	-
	klebseilla	-

	Bactérie suspecte	E.coli
Extrait Extracellulaires	staphylococcus	-
	Bacillus	-
	Bacillus	-
	staphylococcus	-
	staphylococcus	-
	Bacillus	-
	staphylococcus	-
	enterobacter	-
	staphylococcus	-
	pseudomonas	-
	entérobacter	-
	entérobacter	-
	pseudomonas	-
	klebseilla	-
	pseudomonas	-
	Bacillus	-
	Bacillus	-
	staphylococcus	-
	klebseilla	-
	enterobacter	-
	lactobacillus	-
	lactobacillus	-
	lactobacillus	-
	lactobacillus	-

Résumé :

Diverses espèces endophytes, y compris des bactéries endophytes des graines, résident au sein des plantes. Bien que de nombreuses recherches aient été menées sur la caractérisation microbiologique des graines végétales, nous avons encore peu d'informations sur les endophytes microbiens contenus dans les graines du cupressus sempervirens. Cette recherche vise à décrire la microflore bactérienne des graines de cupressus sempervirens et à extraire les protéines fonctionnelles générées par cette flore microbienne. Nos analyses ont mis en évidence la présence de différentes souches bactériennes dans ces graines, comme Staphylococcus 27,5%, Bacillus 27,5%, Pseudomonas et Enterobacter 15% et Lactobacillus à 10%, sans oublier Klebsiella à 5%. L'examen de l'activité antibactérienne des extraits obtenus montre des disparités dans leur pouvoir contre les souches testées, indiquant une possibilité dans la création de nouvelles solutions antibactériennes. Cette recherche souligne l'importance des protéines dérivées de ces bactéries comme agents antibactériens potentiels, préparant le terrain pour des études ultérieures dans ce secteur.

Mots clés : Graines, Cupressus sempervirens activité antibactérienne, souches bactériennes.

Abstract

Various endophyte species, including seed endophyte bacteria, reside in plants. Although much research has been conducted on the microbiological characterization of plant seeds, we still have little information on microbial endophytes contained in the seeds of cupressus sempervirens. This research aims to describe the bacterial microflora of the seeds of cupressus sempervirens and to extract the functional proteins generated by this microbial flora. Our analyses revealed the presence of different bacterial strains in these seeds, such as Staphylococcus 27.5%, Bacillus 27.5%, Pseudomonas and Enterobacter 15% and Lactobacillus 10%, not to mention Klebsiella 5%. The examination of the antibacterial action of the extracts obtained shows disparities in their power against the strains tested, indicating a possibility in the creation of new antibacterial solutions. This research highlights the importance of proteins derived from these bacteria as potential antibacterial agents, paving the way for further studies in this area.

Keywords : Seeds, *cupressus sempervirens*, antibacterial activity, bacterial strains.

ملخص

تستضيف النباتات مجموعه متنوعة من الانواع المستوطنة بما في ذلك البكتيريا الداخليه للبذور على الرغم من اجراء الكثير من الابحاث حول التوظيف الميكروبيولوجي لبذور النباتات الى انه لا يزال لدينا القليل من المعلومات حول النباتات الداخليه الميكروبية الموجودة في بذور نبات، *cuprussus sempervirens* يهدف هذا البحث إلى وصف البكتيريا الدقيقة الموجودة في*بذور cupressus sempervirens*واستخراج البروتينات الوظيفية التي تنتجها هذه البكتيريا الدقيقة. وكشفت تحليلاتنا عن وجود سلالات بكتيريا مختلفة في هذه البذور، مثل*staphylococcus* 27.5% ، *bacillus* 27.5، *pseudomonas* 15%، *Entérobacter* 15%، lactobacillus 10%، بالإضافة إلى klebseilla 5% يظهر فحص التأثير المضاد للبكتيريا للمستخلصات التي تم الحصول عليها تباينات في قوتها ضد السلالات التي تم اختبارها، مما يشير إلى إمكانية إنشاء محاليل جديدة مضادة للبكتيريا. ويسلط هذا البحث الضوء على أهمية البروتينات المشتقة من هذه البكتيريا كعوامل مضادة للبكتيريا المحتملة، مما يمهد الطريق لمزيد من الدراسات في هذا المجال.

الكلمات المفتاحية: البذور، *cupressus sempervirens* النشاط المضاد للبكتيريا, السلالات البكتيريا