

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique  
Centre Universitaire Belhadj Bouchaïb d'Aïn-Témouchent



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

## Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master  
biologie Option : Microbiologie appliquée

Présenté par :

M<sup>elle</sup>. Hanane HASSINOUI

et

M<sup>elle</sup>. Karima BELHORMA

---

## Contribution à l'étude de la tuberculose de l'olivier dans la région de l'Ouest Algérien

---

Encadrant :

Mme. Faiza ILIAS

Maitre de conférences "A" à C.U.B.B.A.T.

Soutenu le 23 Juin 2019

Devant le jury composé de :

---

Président : M <sup>me</sup> . Fatima MOGHTIT (M.C.B)	C.U.B.B.A.T.
Examinatrice : M <sup>me</sup> . Zineb DERRAG (M.C.B)	C.U.B.B.A.T.
Encadrant : M <sup>me</sup> . Faiza ILIAS (M.C.A)	C.U.B.B.A.T.

---



## **REMERCIEMENTS**

*Nous remercions tout d'abord notre grand seigneur ALLAH le tout puissant à la santé et la volonté qu'il nous a donné pour réaliser ce travail.*

*Nous aimerions, tout d'abord exprimer à Mme ILIAS Faiza nos profondes gratitude de nous avoir dirigé dans nos recherche, pour tout son support et les orientations durant toute la réalisation de ce mémoire par ses conseils qui nous ont appris la patience.*

*Nous adressons nos vifs remerciements à Mme MOGHTIT Fatima pour l'honneur qu'elle nous fait de présider notre jury de soutenance.*

*Nos remerciements vont également à Mme DERRAG Zineb pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ce modeste travail.*

*Nos remerciements les plus sincères aussi pour tous les enseignants de notre département pour leur patience et leurs efforts au cours de notre formation.*

*Nos remerciements à nos collègues SALEMKOUR Bochra, RAHAOUI Rania, ZEMMOUR Nadia et TALEB Zineb pour leur collaboration et leurs esprit d'équipe.*

*Nos remerciements à Mme ABDELLAOUI Hadjera ainsi que tout le personnel de la DSA d'Ain Temouchent et le personnel de laboratoire de bactériologie de L'INPV d'Oran.*

*Nos remerciements à toutes les personnes de près comme de loin qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.*

**Hanane et Karima**

## **DEDICACE**

*« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur; elles sont  
les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries »*

*Aux deux êtres les plus chers de ma vie, qui ont su m'apporter amour, tendresse  
et qui m'ont inculqué la droiture, la persévérance, le sérieux, l'honnêteté, à mon  
courageux **Père** et à ma tendre **Mère**.*

*À Mes frères et sœurs qui m'ont encouragé et soutenu tout au long de ce  
parcours.*

*A toute ma famille.*

*A mon binôme Karima et toute la famille BELHORMA.*

*A toutes mes amies.*

*A tous mes collègues de la promotion master 2 microbiologie appliquée  
(2018/2019).*

***Hanane***

## **DEDICACES**

*Je dédie ce modeste travail à la mémoire de ma grande mère qui aurait été fière de ma réussite.*

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*A mes frères MOUNIR, YOUNES et KAMAL et mes sœurs FATIMA et ASMAA Qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de courage et de générosité.*

*A toute ma famille (surtout à mes oncles BENAMAR et AHMAD) pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,*

*A mon binôme HANANE et toute la famille HASSINOUI.*

*A toutes mes amies*

*A tous mes collègues de la promotion master 2 microbiologie appliquée (2018/2019).*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.*

*Je vous dis merci.*

***Karima***

## Table des matières

Liste des abréviations

Table des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 1

### *Partie I : Synthèse bibliographique*

Présentation de la plante hôte: ..... 3

**1. Botanique : ..... 3**

1.1. Classification : ..... 3

**2. L'oléiculture en Algérie : ..... 4**

**3. L'importance de l'olivier : ..... 4**

**4. La Tuberculose de l'olivier : ..... 5**

4.1. Définition : ..... 5

4.2. Les symptômes de la maladie et description des galles : ..... 6

4.3. Origine de la maladie : ..... 8

4.4. Principaux caractères bactériologiques : ..... 8

4.5. Classification de *Pseudomonas savastanoi* : ..... 8

4.6. cycle de la maladie : ..... 8

4.6.1. Phase épiphyte : ..... 8

4.6.2. Phase endophyte : ..... 9

**5. Méthodes de lutte : ..... 9**

**6. La cartographie du taux d'infestation dans les wilayas d'Ain Témouchent et d'Oran : ..... 9**

### *Partie II : Matériels et méthodes*

**1. Matériel végétal ..... 13**

**2. Echantillonnage ..... 13**

**3. Macération ..... 15**

**4. Ensemencement ..... 15**

<b>5. Purification .....</b>	<b>15</b>
<b>6. Etude microscopique.....</b>	<b>15</b>
6.1. Etude à l'état frais.....	16
6.2. Coloration de Gram .....	16
<b>7. Tests biochimiques .....</b>	<b>16</b>
7. 1. Catalase.....	16
7. 2. Pectinase .....	17
7. 3. Test de fluorescence .....	17
7. 4. L'hypersensibilité sur les feuilles de tabac.....	17
7. 5. La galerie api 20E.....	17
<b>8. Activité antibactérienne .....</b>	<b>18</b>
8.1. Test de diffusion sur gélose .....	18
 <b>Partie III : Résultats et discussion</b>	
<b>1. Identification des souches bactériennes : .....</b>	<b>20</b>
<b>2. Isolement et caractérisation de l'isolat bactérien :.....</b>	<b>20</b>
2.1. Etude des caractères macroscopiques .....	21
2.1.1. Sur GN .....	21
2.1.2. Sur King B .....	22
2.2. Etude des caractères microscopique .....	23
2.2.1. l'état frais .....	23
2.2.2. Coloration de Gram .....	24
2.3. Etude des caractères biochimiques .....	24
2.3.1. Catalase .....	24
2.3.2. Pectinase .....	25
2.3.3. Etude de l'hypersensibilité .....	26
2.3.4. Identification préliminaire .....	27
<b>3. Activité antibactérienne, diffusion sur gélose .....</b>	<b>28</b>
3.1. Activité antibactérienne de l'HE de l' <i>Origanum vulgare</i> .....	28
3.2. Activité antibactérienne des extraits d' <i>eucalyptus globulus</i> .....	30
<b>Conclusion.....</b>	<b>33</b>
<b>Références bibliographie.....</b>	<b>34</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>38</b>

## Liste des abréviations

°C : Degrés Celsius  
AAF : Aéro-Anaérobi Facultatif  
ADH : Arginine Dihydrolase  
AS : Aerobie Stricte  
cm : Centimètre  
DMSO : Diméthyle Sulfoxyde  
DSA : Direction Des Services Agricoles  
G : Grossissement  
GEL : Gelatine  
GN: Gélose Nutritive  
h : Heure  
H<sub>2</sub>O : Hydroxyde D'hydrogène  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde D'hydrogène  
H<sub>2</sub>S: Sulfate d'Hydrogène  
has : Hectares  
HE : Huile Essentielle  
IND: Indole  
INPV : Institut Nationale De Protection Des Végétaux  
LCD : Lysine Décarboxylase  
ml : Millilitre  
mm : Millimètre  
Nbre : Nombre  
nm : Nanomètre  
O<sub>2</sub>: Oxygène  
ODC : Ornithine Décarboxylase  
ONPG: Ortho-Nitrophényl-B-Galactoside  
TDA: Tryptophane Désaminase  
UFC : Unité Formant Colonies  
Ul : Microlitre  
UV : Ultras Violet  
V/V : Volume A Volume  
VP: Voges-Proskauer



## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Arbre d'olivier de vergé d'AZZROU (Ain Temouchent).....	3
<b>Figure 02</b> : Vergé d'oléiculture Hassi El Ghella (Ain Temouchent) .....	4
<b>Figure 03</b> : arbres infectés par la Tuberculose de l'olivier (Ain Temouchent et Oran).....	6
<b>Figure 04</b> : Tumeurs dues au <i>Pseudomonas savastanoi</i> sur les branches et les rameaux (A) et le tronc (B), d'un arbre d'olivier. ....	7
<b>Figure 05</b> : Résultat de l'enquête durant les campagnes 2009-2017 (INPV, 2017).....	10
<b>Figure 06</b> : Pourcentage des vergers positives / les verges prospectés (INPV, 2017) .....	10
<b>Figure 07</b> : Cartographie des communes visitées d'Ain Temouchent (INPV, 2017). ....	11
<b>Figure 08</b> : Cartographie des communes visitées d'Oran (INPV, 2017).....	12
<b>Figure 09</b> : Site 01 et 02 d'Ain Temouchent.....	14
<b>Figure 10</b> : Site 03 et 04 d'Oran.....	14
<b>Figure 11</b> : Les étapes de macération. ....	15
<b>Figure 12</b> : souches pures sur milieu gélose nutritif. ....	22
<b>Figure 13</b> : souches pures sur milieu King B. ....	22
<b>Figure 14</b> : souches pures sous la lampe UV. ....	23
<b>Figure 15</b> : Aspect microscopique des souches isolées à l'état frais observer au microscope optique X100. ....	24
<b>Figure 16</b> : Aspect microscopique des souches isolées après coloration du Gram observer sous microscope optique X100. ....	24
<b>Figure 17</b> : Résultat de teste catalase. ....	25

<b>Figure 18:</b> Résultat de teste pectinase. ....	26
<b>Figure 19:</b> Résultat de teste de l'hypersensibilité sur les feuilles de tabac .....	27
<b>Figure 20:</b> Résultat de la galerie AP20E. ....	27
<b>Figure 21 :</b> Zones d'inhibition obtenues par l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis des souches bactériennes testées. ....	29
<b>Figure 22 :</b> Zones d'inhibition obtenues par les extraits d' <i>Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis des souches bactériennes testées.....	31

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01 :</b> Dépistage de la tuberculose au niveau des vergers oléicoles des régions d'Ain Temouchent et Oran (INPV, 2017).....	10
<b>Tableau 02:</b> Caractéristiques des sites de prélèvement.....	14
<b>Tableau 03 :</b> Isolement et caractérisation de l'isolat bactérien.....	21
<b>Tableau 04 :</b> Activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> exprimée selon la zone d'inhibition (mm) .....	29
<b>Tableau 05 :</b> Activité antibactérienne des extraits d' <i>Eucalyptus Globulus</i> exprimée selon la zone d'inhibition (mm).....	30

# *Introduction*

## **Introduction**

L'olivier est l'arbre méditerranéen par excellence, s'il y a bien un arbre qui symbolise le bassin méditerranéen c'est bien lui.

L'olivier et l'huile d'olive sont cités dans le saint Coran et Hadith comme étant un arbre béni ; un arbre de multiples donations et bienfaits ( **Boulssen et Bouraoui, 2016**).

L'Algérie (via le ministère de l'agriculture) a lancé un vaste programme (2009-2014) de plantation d'environ un million 1 000 000 d'hectares à travers une quinzaine de wilayas. Il s'agit, en fait, d'un programme très ambitieux dont l'objectif principal est de hisser la filière oléicole algérienne au rang des pays producteurs d'olives. (**Serdoun Bekri, 2013**).

Comme tous autres champs, le champ d'olivier peut être attaqué par divers bioagresseurs qui sont nocifs pour cette culture en influençant sur la productivité en qualité et en quantité et ainsi que le développement de l'arbre. Ces bioagresseurs peuvent être de diverses origines, ils peuvent être des arthropodes, des champignons, des bactéries...etc. (**Latef, 2018**).

La tuberculose de l'olivier est la principale maladie bactérienne de l'olivier. Elle est causée par *Pseudomonas savastanoi* (**Benjama, 1988**). La bactérie s'installe sur les blessures et provoque des tumeurs aériennes sur différentes parties du végétal.

Vu cette importance la lutte contre cette dernière devient une priorité. Nous avons considéré qu'il était indispensable de s'intéresser aux problèmes qui peuvent nuire au développement de l'olivier et à sa production. Suite à cela nos objectifs étaient de fournir des connaissances sur la tuberculose de l'olivier au niveau de la région ouest de l'Algérie, l'observation et l'analyse des symptômes de cette maladie sur le terrain en effectuant des sorties en collaboration avec DSA d'Ain Temouchent et INPV d'Oran. L'échantillonnage à partir des oliviers infectés et l'identification présomptive de l'agent pathogène à l'intérieur des tumeurs en s'appuyant sur des tests phénotypiques ; coloration de Gram, morphologie et tests biochimiques.

Ainsi la notion de bio et de naturalité ont orienté les recherches vers une lutte alternative par l'utilisation de molécules naturelles extraites de plantes qui révèlent une grande efficacité contre certains microorganismes phytopathogènes.

On vise à étudier l'efficacité des extraits de plantes notamment l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et les extraits d'*Eucalyptus globulus* de ces deux plantes alimentaires et médicinales sur la croissance des bactéries phytopathogènes responsables de la tuberculose de l'olivier.

# *Synthèse bibliographique*

## Présentation de la plante hôte

L'olivier fut l'un des premiers arbres cultivés avec le figuier et le dattier (Belaj, 2010). Son origine remonte à 50. 000-60. 000 ans (Velitzelos *et al.*, 2005). L'olivier a été étendu vers l'Occident par les deux bords de la Méditerranée au gré des principales civilisations telles que les Phéniciens, les Grecs puis les Carthaginois, les Romains et les Arabes (Civantos, 2008 ; Carriòn *et al.*, 2010).



**Figure 01** : Arbre d'olivier de vergé d'AZZROU (Ain Temouchent).

## 1. Botanique

### 1.1. Classification

L'olivier est appelé *Olea europaea* L. (Linné, 1764).

L'olivier appartient: (Lazzeri, 2009)

- Règne : *Plantae*
- Sous-règne: *Tracheobionta*
- Division: *Magnoliophyta*
- Classe : *Magnoliopsida*
- Sous-classe : *Asteridae*
- Ordre : *Scrophulariales*



- Famille : *Oleacees*
- Genre : *Olea*
- Espèce : *europaea*

L'espèce *Olea europaea* a longtemps été subdivisée en deux sous-espèces, *Ola europaea* var. *Europaea* pour l'olivier domestique, et *Olea europaea* var *sylvestris* pour l'oléastre, ou olivier sauvage.



**Figure 02 :** Vergé d'oléiculture Hassi El Ghella (Ain Temouchent).

## **2. L'oléiculture en Algérie**

En 2010, la culture de l'olivier en Algérie occupait une superficie de 309500 hectares. L'oléiculture est présente sur l'ensemble du territoire d'Est, Ouest et du Nord au Sud (jusqu'à Tamanrasset).

## **3. L'importance de l'olivier**

L'intérêt de l'olivier ne se limite pas seulement à la production de l'huile et l'olive de table (**Hadjou et al., 2013**). Toutes les études démontrent que les régimes alimentaires à base d'huile d'olive sont bénéfiques pour la santé humaine en diminuant le risque de plusieurs maladies. La consommation régulière de cette huile est associée à une incidence limitée des

maladies cardiovasculaires, des désordres neurologiques, cancers du sein et du colon, ainsi qu'aux propriétés antioxydantes (**Ghedira, 2008**).

Les feuilles de l'olivier sont utilisées pour lutter contre les infections virales, bactériennes ou fongiques.

Au point de vue écologique et social, l'oléiculture permet de lutter contre l'érosion, la désertification, restaurer des terres agricoles.

#### **4. La Tuberculose de l'olivier**

##### **4.1. Définition**

La Tuberculose de l'olivier est une bactériose due au *Pseudomonas savastanoi*, qui infecte le système de circulation de la sève à l'occasion d'une plaie de l'écorce de bois causée par la grêle, le vent, la chute des feuilles, la taille, le greffage (**Boutkhil,2017**).Des excroissances de bois ressemblant à des verruesou des tumeurs parenchymateuses sur le bois sont des caractéristiques de la maladie. (**Figure 03**).

En cas de forte attaque, les rameaux perdent leur feuillage et se dessèchent, affectant ainsi le rendement et la qualité de l'huile d'olive (**Benyoub, 2010**). La Tuberculose est aussi appelée Chancre bactérien. La maladie peut tuer les arbres si les infections se produisent sur la ceinture et les troncs de jeunes arbres pour cause de blessure de taille.

Cette maladie très contagieuse sur certaines variétés, peut être également transmise par les techniques de multiplications (greffage et bouturage) à partir de rameaux provenant d'arbres contaminés. Cette maladie est parmi celles qui produisent le plus de dommages sur la culture de l'olivier, affectant même la qualité des fruits et donnant naissance à des odeurs indésirables. (**Hall et al, 2004 et Quesada et al, 2008**). Suivant le décret exécutif : **93-286 23/11/1993** *Pseudomonas savastanoi* est considéré comme un parasite de quarantaine (**Serdoun Bekri, 2013**).



A : Ain Temouchent.

B : Oran.

**Figure 03** : arbres infectés par la Tuberculose de l'olivier (Ain Temouchent et Oran).

#### 4.2. Les symptômes de la maladie et description des galles

Le symptôme caractéristique de l'infection est le développement des tumeurs, ou "galles" dans les sites d'infection. Les galles sont le plus souvent formées au niveau des sites de développement des bourgeons; cependant, elles peuvent également être formés à d'autres points d'entrée des agents pathogènes, telles que les plaies de taille ou de blessures causés par le gel ou la grêle (**Boulsse et Bourraoui, 2016**). La maladie agit sur la croissance des repousses et elle affecte les organes reproducteurs. L'intensité des dégâts provoqués est fortement liée au nombre de tumeurs par arbre (**Benjama, 2003**). Elle se manifeste par des tumeurs parenchymateuses à forme irrégulière de couleur vertes au début et à surface lisses. Le nœud d'olive apparaît comme galle bruts ou gonflement d'environ 0,5 à 2 cm de diamètre sur les rameaux, branches, troncs principaux et racines. Après quelques mois les galles acquièrent un aspect spongieux et irrégulier, devenant dures et brunes. Ces galles apparaissent isolément ou rapprochées sur toute la partie de la plante. Les galles peuvent endommager la structure de la tige et déformer l'échafaud de l'arbre si l'infection est sévère durant les premiers stades du développement des arbres (**Lacobelli, 2001 et Philippe, 2007**). (**Figure 04**).





**A** : Dégâts sur rameaux.



**B** : Dégâts sur tronc.

**Figure 04** : Tumeurs dues au *Pseudomonas savastanoi* sur les branches et les rameaux (**A**) et le tronc (**B**), d'un arbre d'olivier.

Selon **Nielsen (1990)**, l'impact de la maladie se traduit sous divers aspects :

- Perte de feuilles;
- Dessèchement du bois;
- Réduction de la production;

- Réduction même de la taille des arbres.

#### **4.3. Origine de la maladie**

*Pseudomonas savastanoi* est l'agent causal de la tuberculose de l'olivier, observé pour la première fois par Savastanoi en 1870 puis au début du vingtième siècle par Smith et Rorer 1904 (**Guido, 2005**).

#### **4.4. Principaux caractères bactériologiques**

Ce sont des bactéries bâtonnets, Gram négatives, catalase positives mobiles avec 1 ou plusieurs flagelles polaires, une croissance plutôt lente, les colonies sont blanches grises ou crèmes, lisses plates, scintillantes, produisant une réaction d'hypersensibilité sur tabac, métabolisme respiratoire, n'hydrolyse pas la gélatine et l'amidon, assimile plusieurs sucre : sucrose, L-arabinose, gluconate, caprylate (**Bergey, 2003**).

#### **4.5. Classification de *Pseudomonas savastanoi***

Le genre *Pseudomonas* est classé dans la famille des *pseudomonadaceae* (**Young, 1996**)

Règne : *Bacteria*

Division : *Proteobacteria*

Classe : *Gammaproteobacteria*

Ordre : *Pseudomonadales*

Genre : *Pseudomonas*

Espèce : *Pseudomonas savastanoi*

#### **4.6. Cycle de la maladie**

Le cycle de vie de *Pseudomonas savastanoi* passe par deux phases :

##### **4.6.1. Phase épiphyte**

*Pseudomonas savastanoi* survit à la fois dans les tissus des tumeurs et comme un épiphyte sur les rameaux, les feuilles et les fruits. Le terme "épiphyte" est dérivé du -épi grec (sur) et phyte (plante), ce qui signifie "sur la plante." Parce que l'agent pathogène survit mieux sur des surfaces d'écorce rugueuse que sur les feuilles, les populations de pathogènes sont plus

élevées sur les rameaux que sur les feuilles (**Ercolani, 1993**). La source potentielle de l'infection des plantes saines sont les bactéries épiphytiques (**Quesada et al., 2010**).

La plage de température dans laquelle *Pseudomonas savastanoi* peut déclencher l'infection se situe entre 5° et 37 ° C et cet intervalle permettrait aux bactéries de causer des infections tout au long de l'année. Cependant, les conditions optimales pour le développement de la maladie sont d'environ 22°- 26 °C.

#### **4.6.2. Phase endophyte**

Les bactéries endophytes sont définies comme des bactéries vivant dans les tissus végétaux sans faire un préjudice matériel (**Kado, 1992**). *Pseudomonas savastanoi* pourrait également présenter une phase endophytes, se déplaçant à travers les espaces intercellulaires et même dans les vaisseaux du bois et des zones infectant à proximité de la première zone infectée (**Wilson et al, 1979**). Les plaies de taille peuvent rester sensibles à l'infection pendant au moins 14 jours. Les cicatrices foliaires, cependant, sont les points les plus communs d'entrée des agents pathogènes et peuvent rester sensibles à l'infection jusqu'à 7 jours après la chute des feuilles (abscission).

### **5. Méthodes de lutte**

Il n'y a malheureusement, à ce jour, aucun remède connu et efficace contre ce fléau. Il faut cependant prendre quelques précautions afin de limiter la propagation de cette bactérie aux autres arbres (**anonyme, 2001**) :

- Désinfecter soigneusement tous les outils de taille.
- Toutes les parties atteintes seront, si possible, sectionner et détruites par le feu.
- Eviter les excès d'irrigation de l'arbre.
- Eviter de blesser l'arbre.
- Appliquer des produits cupriques afin de désinfecter et cicatriser les plaies de taille.

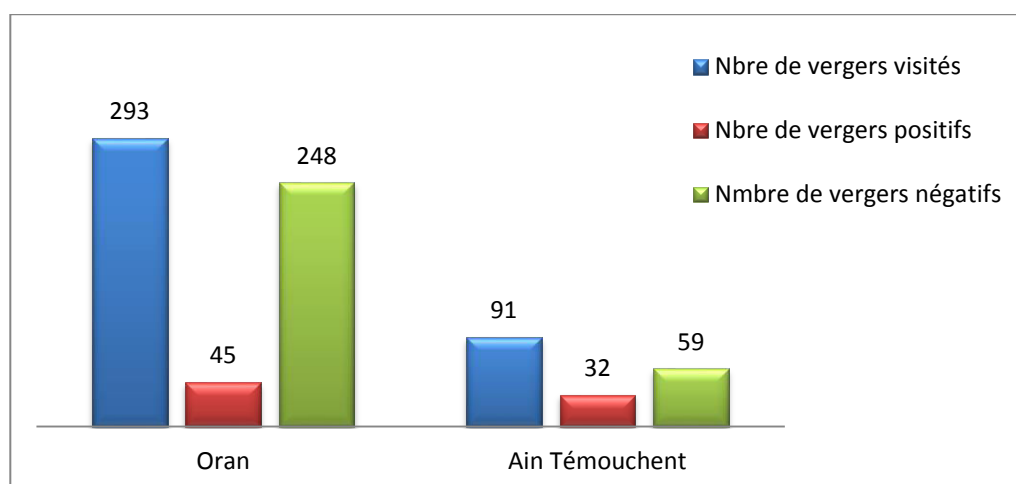
### **6. La cartographie du taux d'infestation dans les wilayas d'Ain Témouchent et d'Oran**

Durant la période 2009-2017, des prospections ont été réalisées pour cartographier les zones touchées et évaluer le taux d'infestation (**INPV, 2017**).

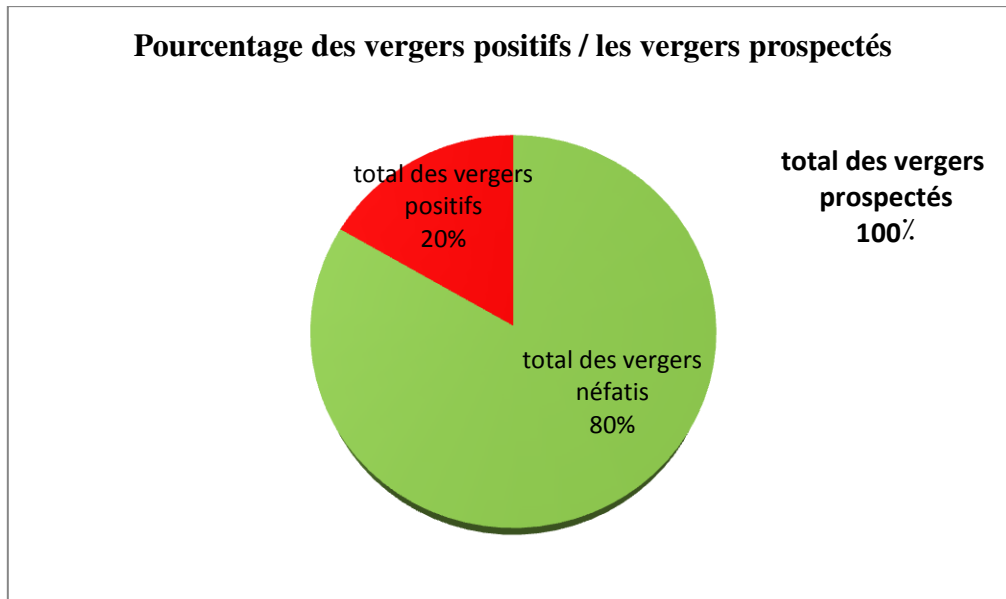
Les résultats concernant Ain Temouchent et Oran sont développés comme suit (**Tableau 01**) :

**Tableau 01** : dépistage de la tuberculose au niveau des vergers oléicoles des régions d'Ain Temouchent et Oran (INPV, 2017).

Wilayat	Nombre de vergers visités	Nombre de vergers touchés	Superficie prospectées (has)	Superficie positif (has)
Ain Temouchent	91	32	333,7	112,7
Oran	293	45	1339,4	262,75
Totale	384	77	1673,1	375,45



**Figure 05** : Résultat de l'enquête durant les campagnes 2009-2017 (INPV, 2017).

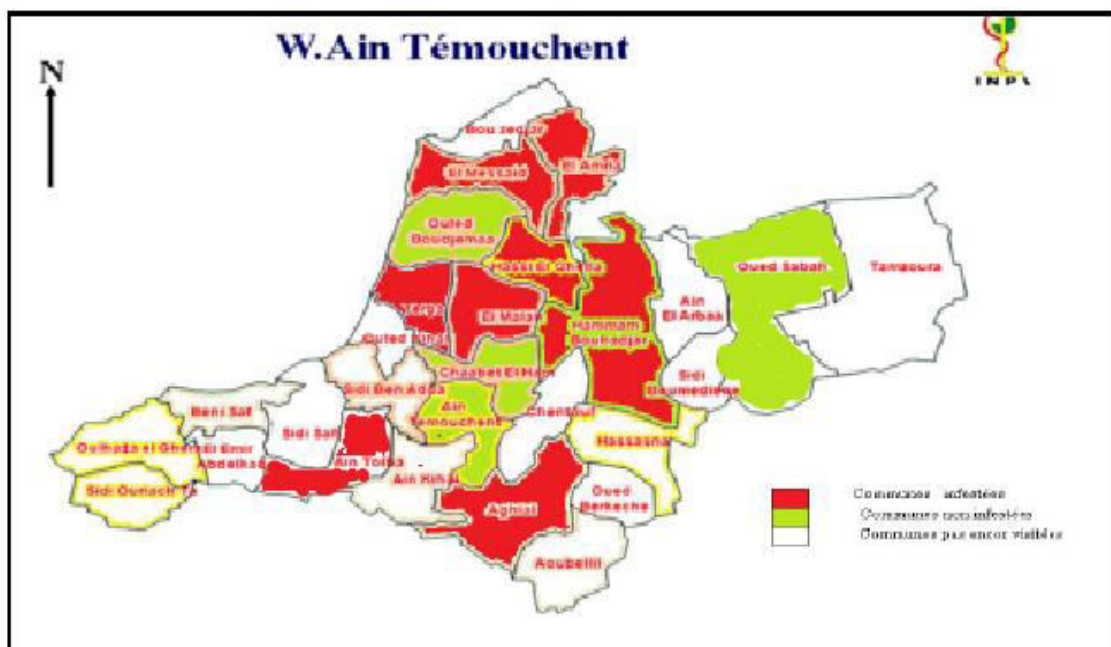


**Figure 06 :** Pourcentage des vergers positives / les verges prospectés (INPV, 2017).

Les prospections ont touché les communes des deux Wilayas d'un nombre totale de :

-23 au niveau de la wilaya d'Oran dont 11 communes infestées.

-16 au niveau de la wilaya d'Ain Témouchent dont 11 communes infestées.



**Figure 07 :** Cartographie des communes visitées d'Ain Temouchent (INPV, 2017).



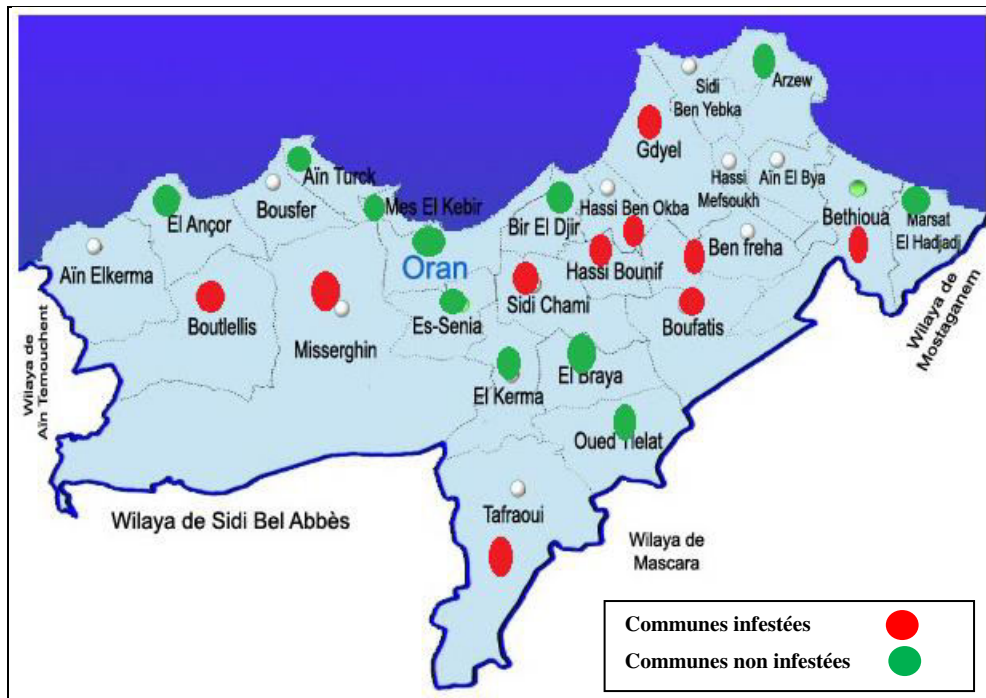


Figure 08 : Cartographie des communes visitées d'Oran (INPV, 2017).

# *Matériels et méthodes*

Ce travail a pour but principal, l'isolement des souches de *Pseudomonas savastanoi* à partir des tumeurs d'oliviers cultivés. Les isolats ont été caractérisés et identifiés en se basant sur des caractères phénotypiques. L'action antagoniste de certain l'huile essentielle et des extraits des plantes contre les souches isolées a été évaluée. Ce travail réalisé au laboratoire a été précédé par une prospection de la maladie sur terrain. En effet, des tumeurs semblables à celles induites par la tuberculose d'olivier ont été observées sur des rameaux d'olivier dans des oliveraies de différentes régions de la wilaya d'Ain Temouchent et d'Oran.

### **1. Matériel végétal**

Le matériel végétal est représenté par des galles coupées de différentes variétés d'arbres d'olivier cultivés « *Olea europea* » et des extraits naturels de plantes utilisés pour l'étude de l'activité antagoniste vis-à-vis des souches isolées. Il s'agit de l'huile essentielle de l'Origan vulgaire « *Origanum vulgare* » et l'extrait aqueux, l'extrait de l'huile totale, l'extrait dichloromethane d'Eucalyptus « *Eucalyptus globulus* ».

### **2. Echantillonnage**

Sous l'autorité de l'inspection phytosanitaire des deux wilayas, les visites de prospections ont eu lieu en présence d'un délégué de la subdivision agricole, durant la période du mois Mars - Avril. Les prospections ont concernés quatre sites différents au niveau de deux wilayas de l'Ouest. Il s'agit d'Ain Temouchent et d'Oran, chacune avec 02 stations.

A l'aide d'un sécateur désinfecté on a coupé des rameaux de 20 cm de long ayant des symptômes caractéristiques de la tuberculose de l'olivier (contenant des galles). Entre chaque prélèvement le sécateur est désinfecté. Nous avons détecté 08 arbres qui portent des galles sur toutes les parties de la plante. Au total, 20 galles ont été prélevées. Chaque galle est conservée dans un sachet en plastique et transporté immédiatement au laboratoire de l'université et conservée à 4°C.



A : Site 01 de Hassi El Ghella.

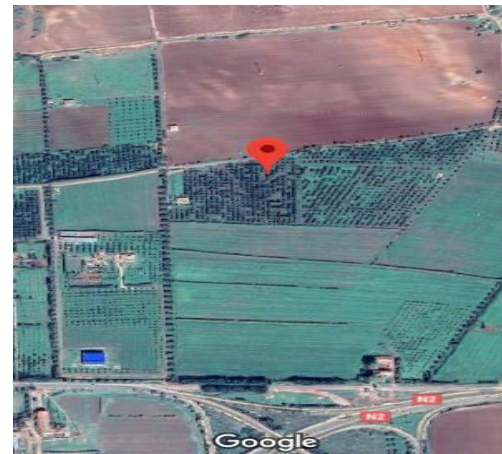


B : Site 02 d'El Amria.

Figure 09 : Site 01 et 02 d'Ain Temouchent.



A : Site 03 Hai Rabah



B : Site 04 Boulélis

Figure 10 : Site 03 et 04 d'Oran.

Tableau 02: Caractéristiques des sites de prélèvement.

Site	Laltitude	Longitude	Date de prélèvement
Hassi Elghella (Ain Temouchent)	35.454567,	-1.032612	02/04/2019
El Amria (Ain Temouchent)	35.521088,	-1.010993	02/04/2019
Hai Rabah (périphérie de Messerghine, Oran)	35.609836,	-0.747874	28/03/2019
Boulélis (Oran)	35.577064,	-0.881469	31/03/2019

### 3. Macération

Découpage des rameaux symptomatiques en petites tranches et on dépose les petits morceaux dans une boîte de pétri contenant une quantité d'eau distillée adéquate pendant 30 min. La macération a été faite en suivant les étapes présentées dans la figure ci dessous:



A : échantillon.

B : découpage des échantillons en petits morceaux.

**Figure 11** : Les étapes de macération.

### 4. Ensemencement

Après 30 minutes nous avons pris une goutte à l'aide d'une pipette pasteur qui sera ensemencée sur le milieu gélosé (gélose nutritif) puis incubée à une température de 26°C pendant 24 à 48h.

### 5. Purification

Après incubation du milieu, on prélève une colonie typique qui possède les caractéristiques phénotypiques de *Pseudomonas savastanoi* (colonie blanche à jaune pale, circulaire, ....), les colonies ainsi individualisées, sont repiquées sectoriellement sur King B.

### 6. Etude microscopique

L'étude des caractères micro-morphologiques permet d'avoir un certain nombre d'information pour l'élaboration d'une identification préliminaire. Pour cela, plusieurs tests ont été réalisés :

### **6.1. Etude à l'état frais**

L'analyse à l'état frais permet d'observer les bactéries à l'état vivant et d'étudier leur forme, leur mode de regroupement et enfin leur mobilité (**Faucher, 1990**). Afin de réaliser cette étude, on a déposé une petite goutte d'eau stérile sur la lame, puis on a prélevé une fraction de colonies sur gélose. Ensuite on a fait une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum et en remuant très délicatement. On a recouvert la lame par une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air. Et enfin, on a observé rapidement sous microscope optique à l'objectif X 40.

Des bactéries sont considérées comme mobiles lorsque des trajets très différents sont observés (déplacement dans toutes les directions). Une bactérie immobile est animée de mouvements d'agitation normaux, qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité. De plus, lors de dépôt de la lamelle, des flux liquidiens entraînent toutes les bactéries dans le même sens et à la même vitesse.

### **6.2. Coloration de Gram**

Des étalements minces et homogènes de chaque isolat bactérien purs, ont été fixés sur une lame. La lame est colorée au violet de gentiane pendant 1min puis rincée abondamment à l'eau distillée. On fait agir le Lugol pendant 20 secondes en vue de consolider la fixation du premier colorant sur la paroi. Après rinçage à l'eau distillée, le violet de gentiane est éliminé par lavage à l'éthanol jusqu'à décoloration totale. Une seconde coloration à la fuchsine est réalisée pendant 1min. on lave doucement à l'eau distillée. Après séchage au bec bunsen, la lame est observée au microscope.

L'observation microscopique se fait à l'émersion (Gx100). Les bactéries ayant gardées la coloration violette sont dites Gram positif, celles colorées en rose sont dites Gram négatif.

## **7. Tests biochimiques**

### **7. 1. Catalase**

Sur une lame propre une goutte ( $H_2O_2$ ) a été déposée, à l'aide d'une pipette Pasteur la colonie bactérienne a été ajoutée, l'apparition des bulles (dégagement gazeux de dioxygène) signifie que la bactérie produit l'enzyme de catalase (**Serdoun bekri, 2013**).

## **7. 2. Pectinase**

Le test Pectinase permet d'identifier l'activité pectinolytique d'une bactérie c'est-à-dire sa capacité à dégrader la pectine présente dans un milieu de culture spécifique ou des tranches de pomme terre. Les tranches de pomme de terre sont stérilisées à l'éthanol 70% puis lavées à l'eau distillée stérile et séchées. Les tranches ont été déposées dans une boîte de pétri contenant du papier filtre mouillé, des colonies bactériennes fraîchement prélevées ont été inoculées au centre des rondelles et incubé à 27° C pendant sept à quatorze jours, l'odeur indésirable et l'apparition de nécrose signifie la présence de l'enzyme pectinase (**Serdoun bekri, 2013**).

## **7. 3. Test de fluorescence**

Les cultures bactériennes en boîte de Pétri du milieu King B (**Annexe**) ont été observées sous une lumière ultraviolette ayant une longueur d'onde de 360 nm afin de noter la présence ou l'absence de fluorescence.

## **7. 4. L'hypersensibilité sur les feuilles de tabac**

1 ml de la suspension bactérienne a été injecté à l'aide d'une seringue dans la nervure principale sur la surface inférieure de la feuille de tabac. Après 3 à 5 jours à température ambiante on fait la lecture. Le dessèchement des zones foliaires inoculées signifie que la bactérie est phytopathogène.

L'eau distillée stérile a été utilisée comme un témoin négatif.

## **7. 5. La galerie api 20 E**

Le système API Biomerieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisées des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des Bacilles à Gram négatif dont les *Entérobactéries*. L'isolat bactérien est identifié par la galerie api 20E, cette dernière comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratés, Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période de 18 à 24h d'incubation à 27°C se traduisent par des virages colorés spontanées ou révélés par l'addition de réactifs. Faire une suspension bactérienne faible d'opacité 0,5 sur l'échelle Macfarlane, dans un tube contenant 5ml d'eau distillée stérile, ajouter quelque colonie bien isolée prélevée sur un



milieu gélosé. La suspension bactérienne préparée a été introduite dans chaque microtube à l'aide d'une micropipette où la pointe de l'embout est appuyée sur le côté intérieur pour éviter la formation de bulles. Les microtubes des tests CIT, VP et GEL ont été remplis par l'inoculum jusqu'à la cupule alors que les microtubes correspondant aux tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S et UREE ont été remplis par la suspension bactérienne et recouverts par une couche d'huile de paraffine pour assurer la condition d'anaérobiose. La lecture de ces réactions se fait après incubation à 27°C pendant 24 h, à l'aide du tableau de lecture, les résultats des réactions obtenues sont notés sur une fiche de résultats standards (Denis, 2007).

## **8. Activité antibactérienne**

- L'extraction de l'HE de *Origanum Vulgaris* est faite par les étudiantes de biochimie M 2 :

*ZEMMOUR Nadia et TALEB Zineb.*

- L'extraction des extraits d'*Eucalyptus globulus* (l'extrait dichloromethane, l'extrait de l'huile totale et l'extrait aqueux) est faite par les étudiantes de microbiologie appliquée M 2 :

*SALEMKOUR Bochra et RAHAOUI Rania.*

### **8.1. Test de diffusion sur gélose**

Pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits, nous avons adopté une seule méthode, celle de la diffusion sur gélose décrite par **Djenane et al (2011)**.

Des boîtes de Pétri contenant 15 ml du milieu gélosé (GN) (**Annexe**) ensemencées avec 01 ml de chaque suspension bactérienne standardisée à 10<sup>6</sup> UFC/ml (unité formant colonie/ml).

Les boîtes de Pétri sont ensuite laissées séchées pendant cinq minutes. Des disques en papiers Wattman stériles de 6 mm de diamètre imprégnés de 10 µl d'HE ou les extraits des plantes à tester ont été déposés au centre de chaque boîte. Pour avoir une meilleure diffusion de l'huile et les extraits dans le milieu, un émulsifiant diméthyle sulfoxyde (DMSO) est additionné dans ces derniers (v/v). Les boîtes de Pétri sont maintenues pendant 15 minutes à la température ambiante et sont incubées à 26 °C pendant 24 heures.

L'activité antibactérienne est évaluée par la mesure des diamètres des zones claires (mm) qui se forment autour des disques (Ø du disque est inclus, 6 mm). La sensibilité des bactéries



testées envers l'HE et les extraits est classée selon les diamètres des halos d'inhibition (**Ponce et al., 2003**) :  $\emptyset < 8$  mm : non sensible ;  $9 < \emptyset < 14$  mm : sensible ;  $15 < \emptyset < 19$  mm : très sensible et  $\emptyset > 20$  mm : extrêmement sensible. Un témoin négatif a été utilisé en utilisant le DMSO (**Ponce et al., 2003 ; Moreira et al., 2005**).

## *Résultats et discussion*

## **1. Identification des souches bactériennes**

Le but de notre travail est l'identification des souches bactériennes de *P. savastanoi* isolées à partir d'une macération des petits morceaux symptomatiques de plante de l'olivier et l'étude de leurs pouvoir de résistance et sensibilité aux extraits des plantes notamment l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et les extraits d'*Eucalyptus globulus*.

Après plusieurs étapes de purification sur milieu GN, on a pu isoler quatorze souches typiques de *P. savastanoi* :

1A<sub>1</sub>, 1A<sub>2</sub>, 2A, 3A, 4A<sub>1</sub>, 4A<sub>2</sub>, 5N, 6N, 7N, 8N, 9N, 10N, 11N<sub>1</sub>, 11N<sub>2</sub> à partir des échantillons testés.

### **I.2. Isolement et caractérisation de l'isolat bactérien**

Après isolement et afin de procéder à la caractérisation phénotypique de la souche isolée à partir de milieu GN, le passage par les caractères macroscopiques a été indispensable.

Après 24h d'incubation sur milieu King B à 26°C, six bactéries ont poussé :

1A<sub>1</sub>, 3A, 4A<sub>1</sub>, 5N, 11N<sub>1</sub>, 11N<sub>2</sub>.

Seulement trois souches bactériennes ensemencées sur milieu King B donnent un aspect fluorescent et prennent une couleur vert-jaune fluorescente sous les rayons UV :

5N, 11N<sub>1</sub>, 11N<sub>2</sub>.

Cela est dû à la présence de pigment fluorescéine (**Balstra et al., 2009**).

Le **Tableau 03** montre les souches typiques de *P. savastanoi* et les premières étapes d'identifications :

**Tableau 03 :** Isolement et caractérisation de l'isolat bactérien.

N°	Source	Code	Gélose Nutritif	King B	Fluorescence
<b>01</b>	Oran	1A <sub>1</sub>	+	+	-
		1A <sub>2</sub>	+	-	/
<b>02</b>	Oran	2A	+	-	/
<b>03</b>	Oran	3A	+	+	-
<b>04</b>	Oran	4A <sub>1</sub>	+	+	-
		4A <sub>2</sub>	+	-	/
<b>05</b>	Ain Temouchent	5N	+	+	+
<b>06</b>	Ain Temouchent	6N	+	-	/
<b>07</b>	Ain Temouchent	7N	+	-	/
<b>08</b>	Ain Temouchent	8N	+	-	/
<b>09</b>	Ain Temouchent	9N	+	-	/
<b>10</b>	Ain Temouchent	10N	+	-	/
<b>11</b>	Ain Temouchent	11N <sub>1</sub>	+	+	+
		11N <sub>2</sub>	+	+	+

+ : Test positif

- : Test négatif

/ : Non fait.

## 2.1. Etude des caractères macroscopiques

### 2.1.1. Sur le milieu GN

Les colonies des souches apparaissent sur le milieu GN de couleur blanche, brillante à bords légèrement bombés ou plats. En effet cet aspect macroscopique caractérise des colonies de *P.savastanoi*, ces dernières ont été décrites par **Hamid et al (2017)**. (Figure 12).

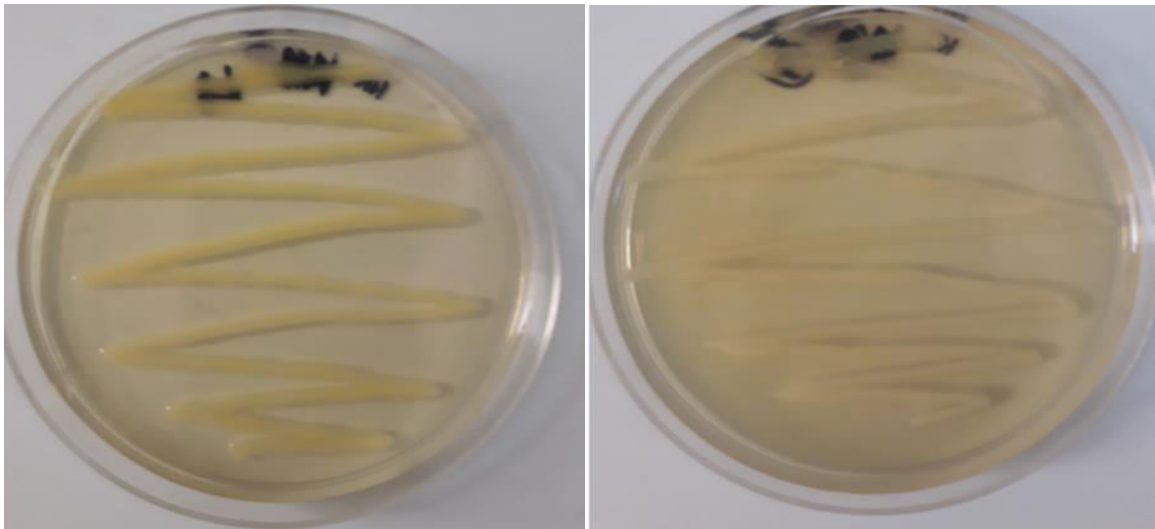
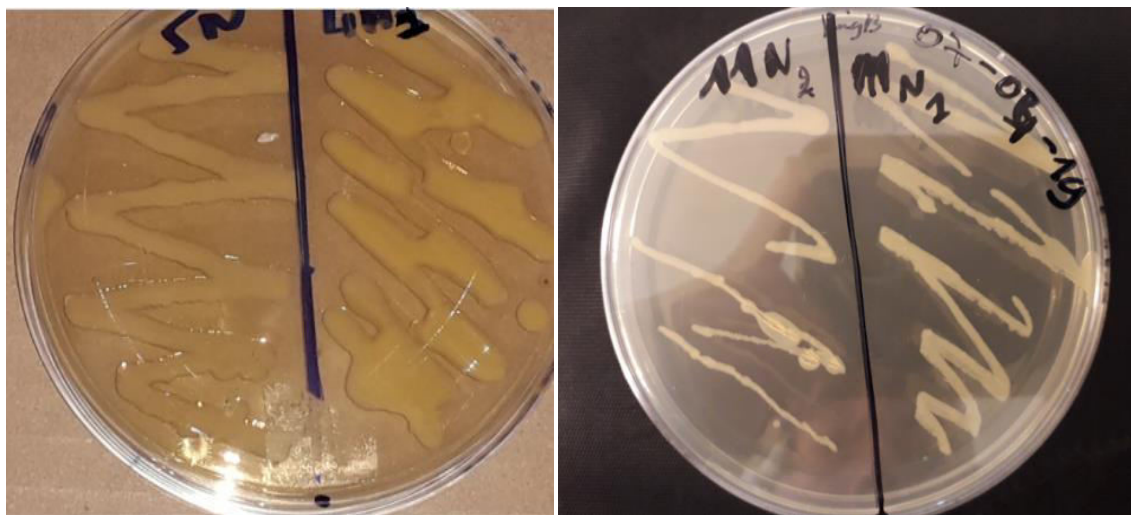


Figure 12 : souches pures sur milieu gélose nutritif.

### 2.1.2. Sur le milieu King B

Les colonies de couleur crème, de forme circulaire, convexe, translucide, lisse, brillante identique à celle décrite par (Bergey, 2003) ainsi que celle trouvé par Hamid *et al* (2017). Serdoune Bekri en 2013. (Figure 13)



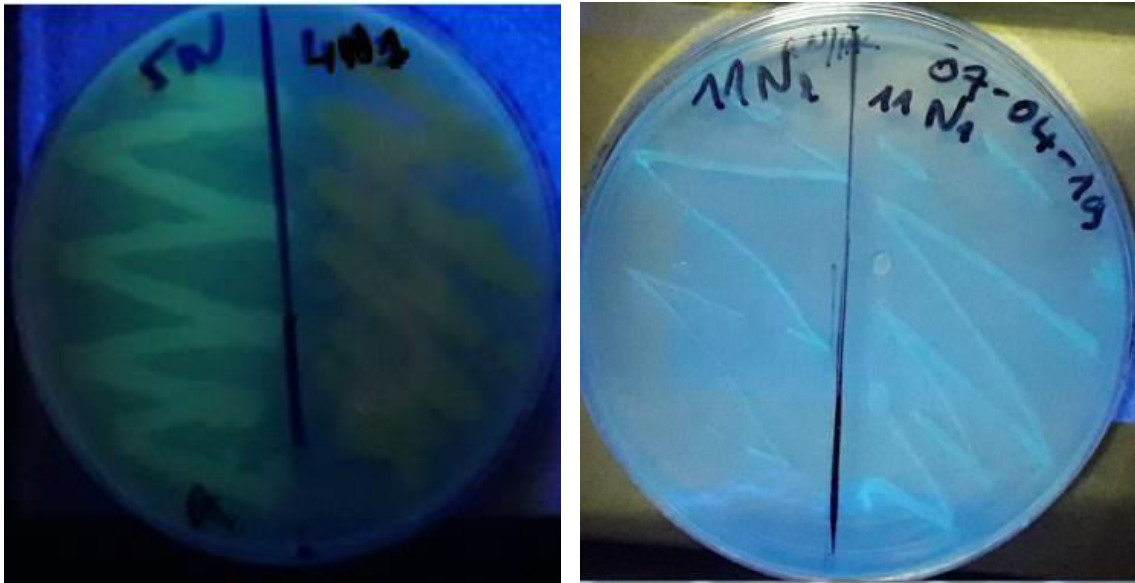
A : la souche 5N et la souche 4N<sub>1</sub>.

B : souche 11N<sub>1</sub> et la souche 11N<sub>2</sub>.

Figure 13 : souches pures sur milieu King B.

### 2.1.3. Sous la lampe UV

La gélose King B favorise la production de pyoverdine et inhibe par ailleurs la production de pyocyanine. La fluorescéine produite par les *Pseudomonas* est un pigment jaune vert fluorescent détectable sous lumière ultra- violette à 360 nm (Balestra *et al.*, 2009). (Figure 14)



**A** : la souche 5N fluorescente, la souche 4N<sub>1</sub> non fluorescente.

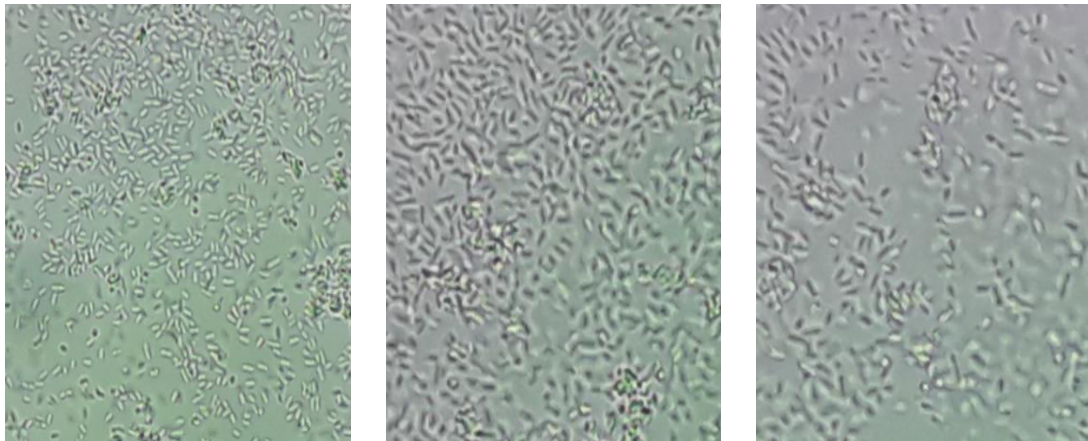
**B** : les deux souches 11N<sub>1</sub> et 11N<sub>2</sub> sont fluorescentes.

**Figure 14** : souches pures sous la lampe UV.

## 2.2. Etude des caractères microscopique

### 2.2.1. L'état frais

Des observations microscopiques à l'état frais effectuées à partir des cultures sur milieu solide des isolats purifiés ont montré que les souches sont en forme de bâtonnet mobile dans toutes les directions. Notre résultat est en accord avec ceux trouvés antérieurement sur les espèces de *P.savastanoi pv. savastanoi* par Ramos *et al* (2012) et Hamid *et al* (2017). (Figure 15).



**A** : la souche 5N.

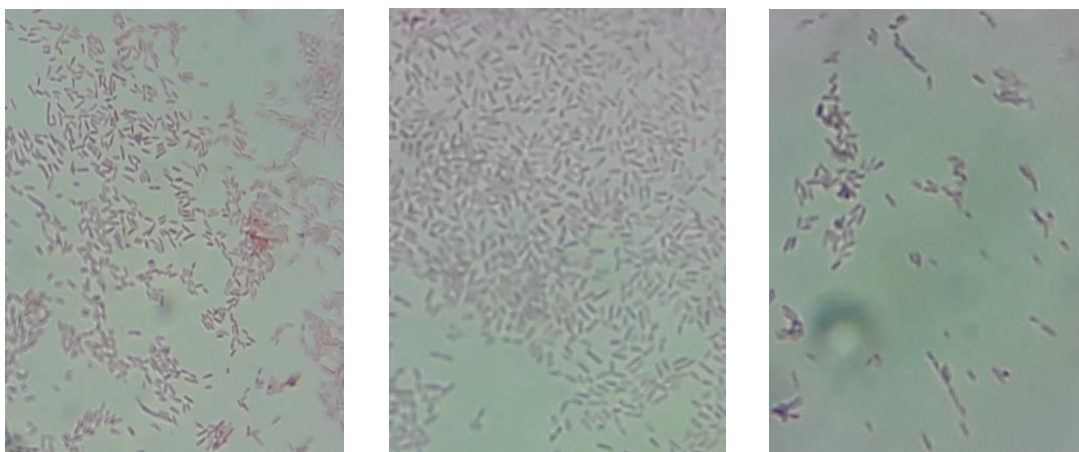
**B** : la souche 11N<sub>1</sub>.

**C** : la souche 11N<sub>2</sub>.

**Figure 15** : Aspect microscopique des souches isolées à l'état frais observer au microscope optique X100.

### 2.2.2. Coloration de Gram

Après la réalisation de la coloration de Gram, nous avons noté que la souche, est en forme de bacilles, présentant une coloration rose (**Figure 16**). Se sont des bâtonnets à Gram négatif. Ces résultats sont en accord avec les résultats de **Serdoun Bekri (2013)** et **Hamid *et al* (2017)**.



**A** : la souche 5N.

**B** : la souche 11N<sub>1</sub>.

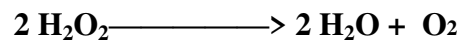
**C** : la souche 11N<sub>2</sub>.

**Figure 16** : Aspect microscopique des souches isolées après coloration du Gram observer sous microscope optique X100.

## 2.3. Etude des caractères biochimiques

### 2.3.1. Catalase

Apparition des bulles (dégagement gazeux de dioxygène) signifie que la bactérie produit l'enzyme de catalase, cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire (AS et AAF) qui peuvent détruire les peroxydes. La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en H<sub>2</sub>O et 1/2 O<sub>2</sub>, selon la réaction suivante :



Le teste est positif ce résultat est en accord avec les résultats de **Kird *et al* (2011)**, **Serdoun bekri (2013)** et **Hamid *et al* (2017)**. (**Figure 17**).



**Figure 17:** Résultat de teste catalase.

### 2.3.2. Pectinase

En ce qui concerne le test pectinase, nous avons remarqué l'absence de nécrose ainsi que de zone de lyse ce qui signifie que la bactérie isolée ne possède pas la capacité de dégrader la pectine dans les tranches de pomme de terre (**Figure 18**). Selon **Guido *et al* (2005)**, les *Pseudomonas savastanoi* ne dégradent pas la pectine, résultat signalé également par les travaux de **Serdoune bekri (2013)** et **Hamid *et al* (2017)**.





A : Les tranches des pommes de terre avant l'incubation.



B : Les tranches des pommes de terre après l'incubation.

Figure 18: Résultat de teste pectinase.

### 2.3.3. Etude de l'hypersensibilité

Après injection de l'inoculum dans la plante de tabac, des zones nécrotiques ont été observés autour du site d'infection, ce qui signifie que la plante du tabac a développé une réaction d'hypersensibilité (plante sensible) vis-à-vis des souches isolées (réactions positives). Sachant que l'eau distillée stérile a été utilisée comme un témoin négatif, le dessèchement des zones foliaires inoculées signifie que les bactéries sont phytopathogènes (Figure 19). Ces résultats sont en accord avec les résultats de Serdoun bekri (2013) et Oulebsir-Mohandkaci *et al* (2017).



Figure 19: Résultat de teste de l'hypersensibilité sur les feuilles de tabac.

### 2.3.4. Identification préliminaire

Selon les résultats de la caractérisation de nos souches, du catalogue d'identification des API 20 E, des tests biochimiques classiques, préalablement obtenus, l'identification préliminaire des souches isolées l'ont affilié probablement à l'espèce *Pseudomonas savastanoi* (Figure 20).

Ces résultats nous orientent vers l'espèce responsable de la maladie de tumeurs bactériennes de l'olivier qui est *Pseudomonas savastanoi*, il faut les confirmer par les analyses moléculaires.

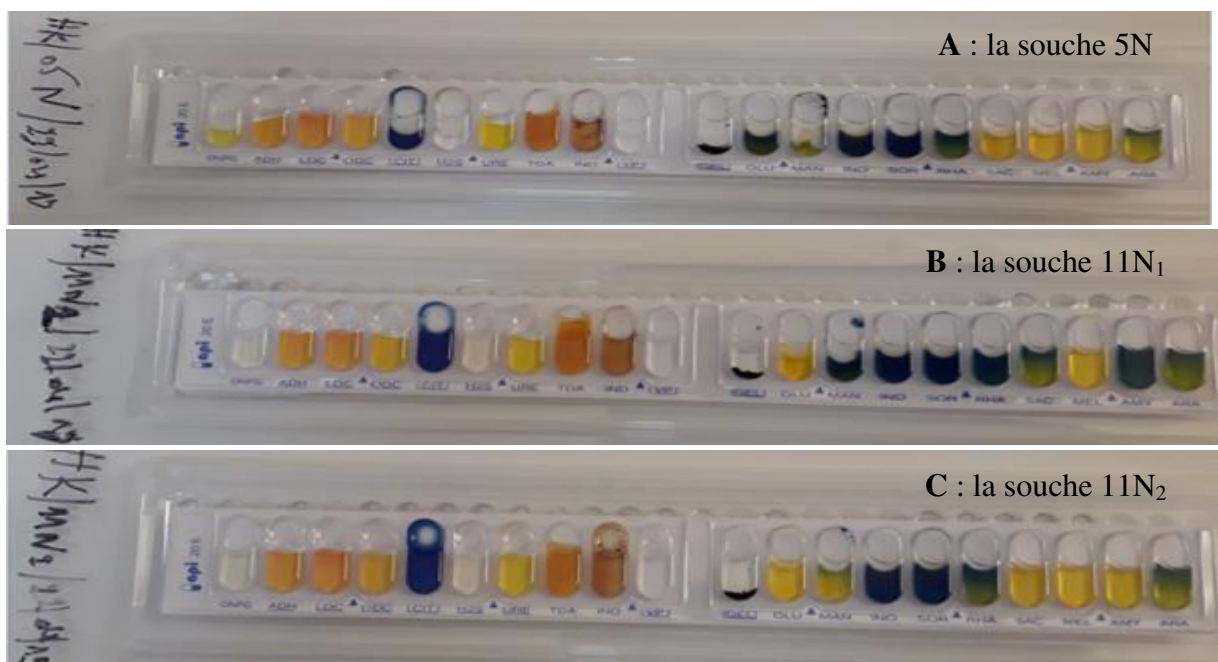


Figure 20: Résultat de la galerie api 20E.

La contamination des échantillons varie en fonction du site de collecte et de la zone agro-écologique (Adjou et Soumanou, 2013) :

Les bactéries détectées appartiennent à l'espèce de *Pseudomonas savastanoi* sont celles obtenues à partir des échantillons d'Ain Temouchent provenant des oliviers abandonnés, avec des oliviers âgés et qui ont été contaminés à un âge très jeune et caractérisés par la présence des tumeurs primaires, secondaires, tertiaires....., même le tronc contient beaucoup des nodules.

Par contre les échantillons d'Oran provenant des oliviers bien traités, des oliviers avec un degré d'attaque minime, montrent peu de tumeurs par arbre et seulement au niveau des rameaux. Ils sont caractérisés par l'absence de *Pseudomonas savastanoi* et la présence des autres espèces bactériennes, ces résultats sont en accord avec les résultats de **Boulsen et Bouraui (2016)** qui ont travaillé sur la tuberculose de l'olivier ; isolement et identification présumés de quelques isolats bactériens à partir des tumeurs, qui n'ont pas révélé la présence de *pseudomonas savastanoi* mais ils ont détecté des souches de *Enterobacter cloacae*, *Clostridium* et *Lactobacillus*.

### **3. Activité antibactérienne, diffusion sur gélose**

#### **3.1. Activité antibactérienne de l'HE de l'*Origanum vulgare***

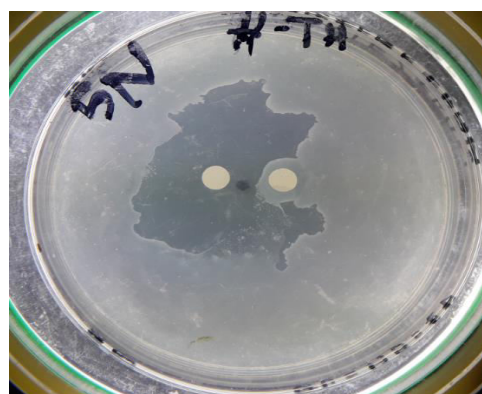
Les tests *in vitro* de l'activité antibactérienne de l'HE vis-à-vis des souches obtenues ont été évalués qualitativement par la présence ou l'absence de zone d'inhibition. Selon les résultats présentés dans le **Tableau 04**, l'HE de l'*Origanum Vulgare* présente une très forte activité antibactérienne vis-à-vis de la souche 5N et 11N<sub>2</sub> avec des diamètres d'inhibition de 45 mm et 35 mm, respectivement et une forte activité antibactérienne vis-à-vis de la souche 11N<sub>1</sub> avec un diamètre d'inhibition de 15 mm (**Figure 21**). On a trouvé que toutes les souches bactériennes testées sont sensibles vis-à-vis de l'HE d'*Origanum Vulgare*.

**Tableau 04 :** Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* exprimée selon la zone d'inhibition (mm).

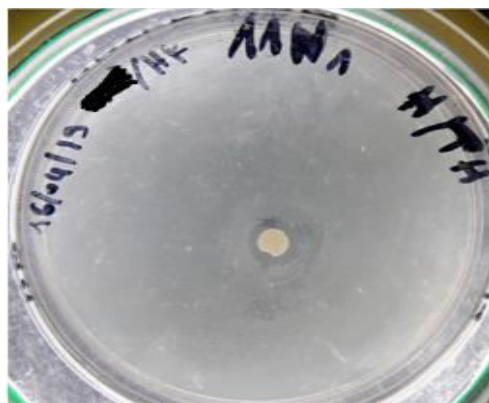
Souche	Dilution (HE/DMSO) ul	Volume sur le disque/ul	Zone d'inhibition (mm)	Résultat
Témoin	00/50	10	00	/
5N	50/50	10	45	Extrêmement Sensible
11N <sub>1</sub>	50/50	10	15	Très Sensible
11N <sub>2</sub>	50/50	10	35	Extrêmement Sensible



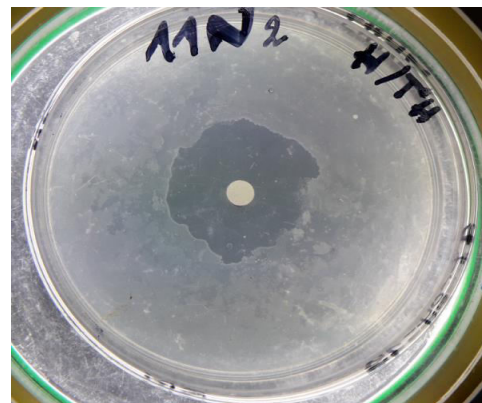
A : témoin.



B : la souche 5N.



C: la souche 11N<sub>1</sub>.



D : la souche 11N<sub>2</sub>.

**Figure 21 :** Zones d'inhibition obtenues par l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Les HEs sont connues pour leur activité antibactérienne. Cette activité des huiles essentielles a été démontrée *in vitro* par de nombreuses études, principalement vis-à-vis des bactéries pathogènes (**Dorman et Deans, 2000**). Selon **Kaloustian et al (2008)** l'HE de l'*Origanum vulgare* présente la meilleure activité antibactérienne, ces résultats sont en accord avec les notre.

Le mode d'action antibactérienne des huiles essentielles repose sur la variabilité des quantités et des profils de leurs composants, il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne.

Le mode d'action des huiles essentielles dépend aussi du type de microorganismes (**El amri et al., 2014**).

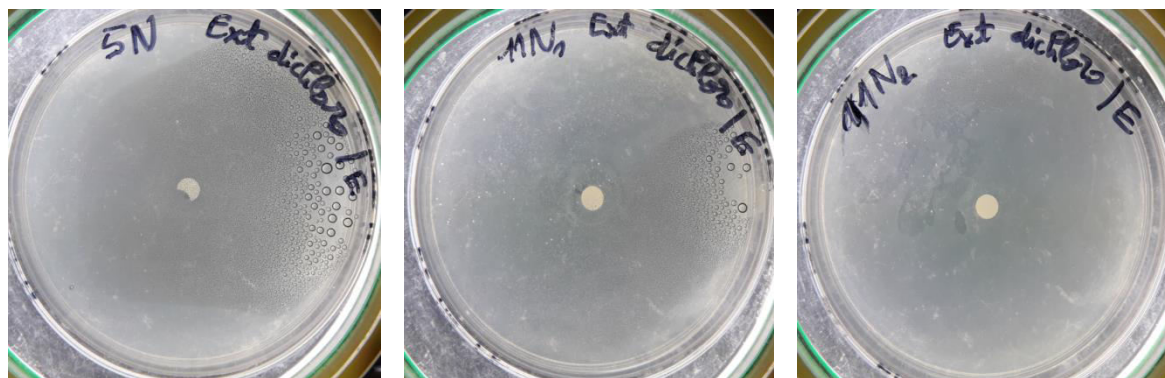
### 3.2. Activité antibactérienne des extraits d'*eucalyptus globulus*

Le **Tableau 05** montre les résultats de l'activité antibactérienne des extraits d'*Eucalyptus Globulus* vis-à-vis les souches obtenues. Les tests *in vitro* ont été évalués qualitativement par la présence ou l'absence de zone d'inhibition. D'après ces résultats, il ressort que toutes les bactéries sont résistantes vis-à-vis l'extrait de Dichloromethane et l'extrait de l'Huile totale, par contre elles sont sensibles vis-à-vis l'extrait aqueux. Les diamètres d'inhibition obtenus vis-à-vis l'extrait aqueux sont : 25 mm, 30 mm et 35 mm pour les bactéries 5N, 11N<sub>1</sub> et 11N<sub>2</sub>, respectivement. (**Figure 22**).

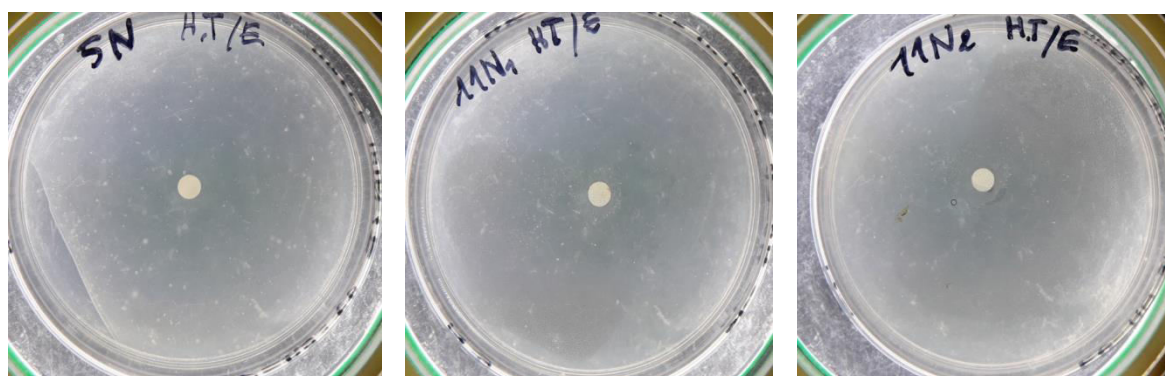
**Tableau 05** : Activité antibactérienne des extraits d'*Eucalyptus Globulus* exprimée selon la zone d'inhibition (mm).

Souche	Dilution (EXTRAIT/DMSO) ul	Volume sur le disque/ul	Zone D'inhibition (mm)		
			E.Dichloromet hane	E. huile totale	E. aqueux
5N	50/50	10	00	00	25
11N <sub>1</sub>	50/50	10	00	00	30
11N <sub>2</sub>	50/50	10	00	00	35

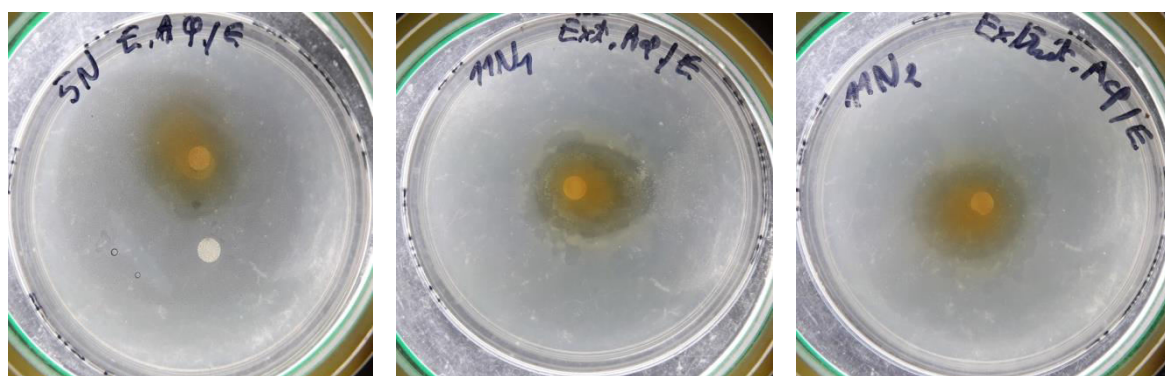




A : Zones d'inhibition obtenues par l'extrait de Dichloromethane.



B : Zones d'inhibition obtenues par l'extrait de l'Huile totale.



C : Zones d'inhibition obtenues par l'extrait aqueux.

**Figure 22:** Zones d'inhibition obtenues par les extraits d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis des souches bactériennes testées.

L'extrait aqueux, l'extrait de Dichloromethane et l'extrait de l'Huile totale d'*Eucalyptus globulus* ont fait l'objet d'un screening par la méthode de diffusion en milieu solide pour tester leur activité contre la croissance *in vitro* de trois souches de *Pseudomonas savastanoi*. Les résultats obtenus montrent que le pouvoir inhibiteur de cette plante diffère selon :

➤ La nature de la bactérie étudiée. En effet les souches pigmentées possèdent un potentiel de résistance très élevé (**Bouharb *et al.*, 2014**) contre l'action antibactérienne des différents extraits de plantes à l'exception de l'extrait aqueux d'Eucalyptus.

➤ La nature du solvant : C'est une évidence de dire que l'activité pharmacologique dépend de la nature du solvant d'extraction. Des différences pharmacologiques importantes apparaissent par une activité plus large de l'extrait aqueux par rapport à l'extrait Dichloromethane et l'extrait de l'Huile totale qui montraient une absence d'activité.

Ces résultats se concordent avec celui trouvé par **Bouharb *et al* (2014)**.

En effet, l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare* et les extraits aqueux d'*Eucalyptus globulus* ont exercé une activité antibactérienne prononcée sur les souches bactériennes testées qui sont due à la composition chimique.

# *Conclusion*



## **Conclusion**

L'olivier est parmi les plus anciens arbres fruitiers cultivés principalement dans les pays méditerranéens, cet arbre est bien connu pour son intérêt alimentaire et thérapeutique. Les maladies de l'olivier entraîne des chutes de rendement considérables et représente une menace permanente pour l'oléiculture algérienne. Les enquêtes sur le terrain et les analyses au laboratoire ont permis d'observer les maladies de l'olivier déjà connues dans le pays ,dans les olivaires et en pépinière. Il s'agit notamment de la tuberculose des oliviers. Notre étude a montré une propagation de la maladie de la tuberculose de l'olivier dans les wilayas d'Ain Temouchent et Oran. Nous considérons que les agriculteurs ne montrent pas un intérêt au suivi et au traitement de leurs champs. Des oliviers infectés situés dans les régions des deux wilayas et leur identification présomptive révèlent que les trois bactéries identifiées sont probablement *Pseudomonas savastanoi*.

Par ailleurs, les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et l'extrait aqueux d'*Eucalyptus globulus* ont une activité très fortement inhibitrice vis-à-vis de *P. savastanoi*.

Suite aux résultats intéressants que nous avons déduit de notre expérimentation, nous ont pousser à procéder à une étude biochimique plus complète d'*Eucalyptus globulus* et *Origanum vulgare* afin de purifier ces phytomolécules et les tester à nouveau sur les souches de *Pseudomonas savastanoi* pour une proposition d'une lutte biologique.

Perspective :

Continuer nos études, nous espérons approfondir nos connaissances.

Nous souhaitons développer les tests en s'appuyant sur des techniques récentes approfondies.

Et avec la collaboration de l'état accompagner les agriculteurs, et les sensibiliser à l'entretien de leurs champs.

# *Références bibliographiques*

- **Adjou et Soumanou. J. Appl. Biosci (2013).** Efficacité des extraits de plantes contre les moisissures, toxigènes isolées de l'arachide, *Journal of Applied Biosciences* 70, 5555–5566.
- **Anonyme, 2001,** site : [www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-44593,2001](http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-44593,2001)
- **Anonyme, 2001.** *Pseudomonas syringae* sp. *savastanoi* pv. *oleae*. <http://www.inra.fr/internet/produits/HYP3/pathogen/6pssysa.htm>.
- **Balestra GM, Mazzaglia A, Quattrucci A, Renzi M, Rossetti A (2009)** Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australas Plant Dis Notes* 4, 34–36
- **Belaj A., Munoz-Diez C., Baldoni L., Satovic Z., Barranco D. (2010).** Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Sci. Hortic.*, 124, 323–330.
- **Benjama A (1988).** Parasitic olive diseases in Morocco, *Olivae* 20, 21–33
- **Benjama Abdelhadi (2003).** Méthode d'évaluation rapide du degré d'attaque de l'olivier par la tuberculose causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, en verger au Maroc *Fruits*, vol. 58, p. 213–219. DOI: 10.1051/fruits:2003009
- **Benyoub K. (2010).** Isolement de souches de *Pseudomonas* à partir des sols et des nécroses d'oliviers de l'Ouest Algérien : Identification et caractérisation biochimique, sérotypique et phytopathologique. Recherche de l'antibiorésistance, d'antagonisme (bactériocine) et d'ADN plasmidique. Mém. Magis. Univ. Oran (Algérie). 156p.
- **Bergy ,2003**
- **Bouharb Hayate, Khalid El Badaoui, Touriya Zair, Jalila El amri, Said Chakir, Tajelmolk Alaoui (2014)** Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences* 78, 6685 – 6693.
- **Boulsen Bouthaina Zahra et Bouroui Nour El Houda (2016)** Etude sur la tuberculose de l'olivier ; isolement et identification présumptifs de quelques isolats bactériens à partir des tumeurs (Mémoire de Master) Université des Frères Mentouri Constantine.
- **Boutkhil Samir (2017).** Isolement, identification et caractérisation physiologique et pathogénique de quelques pathogènes de l'olivier (*Olea europea* L.) (Thèse de Doctorat) Université Djillaliliabes De Sidi Bel Abbes

- **Carrión Y., Ntinou M., Badal E. (2010).** *Olea europaea* L. in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early–Middle Holocene. *Quaternary Science Reviews*, 29, 952–968.
- **Civantos L. (2008).** La olivicultura en el mundo y en España. In: Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L (eds) *El cultivo del olivo*, 6th edn. Junta de Andalucía and Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 17–35.
- **Denis F., 2007.** Bactériologies médicale technique usuelles. E Iservier Mosson (eds). France. 22-36p)
- **Djenane D, Yanguela J, Amrouche T, et al (2011)** Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* in minced, beef. *Food Sci Technol Int* 17, 505–15
- **Dorman HJD, Deans SG (2000)** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88, 308–16
- **El amri Jalila, Khalid Elbadaoui, Touria Zair, Hayate bouharb, Saïd chakir , Taj Imolk Alaouiet (2014).** Étude de l’activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l’extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées *Journal of Applied Biosciences* 82, 7481– 7492.
- **Ercolani, G.L. (1993).** Comparison of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* from olive leaves and knots. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 16, No. 4, (April 1993), pp. 199- 202.
- **Faucher J.L., 1990.** Bacterio-fische. Ed Markiting, Paris : 54p
- **Ghedira K., 2008.** L’olivier. *Phytothérapie*, volume 6. Pp : 83-89.
- **Guido Marchi, Carlo Viti, Luciana Giovannetti and Guisepe Surico, (2005).** Spread of levan positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy, *European Journal of Plant Pathology*. 112, 101-112.
- **Hadjou Lamara, Ouassila Lamani, Foued Cheriet (2013)** Labellisation des huiles d’olive algériennes: contraintes et opportunités du processus. *NEW MEDIT N.* 2/2013 ; Jel Classification: L66, O25, Q13
- **Hall, B. H., Cothe, E. J., Whattam, M., D., Noble, D., Luck, J. and Cartwright, D. (2004).** First report of olive Knot caused by *Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Savastanoi* on olives (*Olea europea*) in Australia. *Australasian. Plant. Pathology*. 33: 219-228p.

- **Hamid Sonia, Chergui Zahra, Ouchefoune Imane, Halouane Fatma (2017)** Diagnostique de la tuberculose de l'olivier dans la région centre. *Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologique (VALCORE), Université de Boumerdes.*
- **INPV. Institut Nationale Protection des Végétaux. (2017).** Rapport national sur l'état de la tuberculose de l'olivier en Algérie.
- **Kado, C.I. (1992).** Plant pathogenic bacteria, In: *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.H., Vol. I, pp. 659-674, Springer-Verlag, ISBN 0387972587, New York, USA.
- **Kaloustian. J, Chevalier. J, Mikail .C, Martino. M, Abou. L, Vergnes. M.-F (2008)** Etude de six huiles essentielles, composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie* 6, 160–164. DOI 10.1007/s10298-008-0307-1
- **Kirde S., Gharsallaoui M, Mohamed Ali Triki A.M., et Rhouma A. (2011)** Epidémiologie et étiologie de *Pseudomonas savastanoi pv.savastanoi* agent causal de la tuberculose de l'olivier en Tunisie. *Revue ezzaitouna*. 12(1) : 1-4.
- **Lacobellis, N., S. 2001.** Olive knot. In, « Encyclopaedia of Plant Pathologie ». **Vol.2.** (Eds Oc Malloy. ID Murroy). 713-715p. (John Wiley and Sons).
- **Latef Amina(2018).** Contribution à l'étude de deux maladies de l'olivier rencontrées dans la région de M'chaddellah-Bouira : cas de dépérissement et de la tuberculose de l'olivier (Mémoire de Master) Université Akli Mohand Oulhadj – Bouira
- **Lazzeri Y. 2009.** Les défis de la mondialisation pour l'oléiculture méditerranéenne,
- **Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE, Roura SI, 2005.** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT* 38, 565-570.
- **Linné Carl (1764).** *Species plantarum*: 2
- **Nilsen, J. W., Dickson, J. S. and Crousse, J. D. (1990).** Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *App. Environ. Microbiol.* 56, 2142-2145.
- **Oulebsir-Mohandkaci H, Selami S, Benzina F (2017)** Détection de *Pseudomonas savastanoi.pv* agent causal de la tuberculose de l'olivier. Evaluation du pouvoir antagoniste de quelques substances végétales bioactives. *Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologique (VALCORE), Faculté des sciences, Université de Boumerdes.*

- **Philippe, L. 2007.** Les procaryotes phytopathogènes. Chapitre 4 phytopathologies. Ed ; Feeman, New York. 432p.
- **Ponce AG, Fritz R, Del Valle C, et al (2003)** Antifungal activity of essential oils on the native microflora of organic swiss chard. *Leben-Wiss u Technol* 36, 679–84
- **Quesada, J.M., Perez-Martinez, I., Ramos, C., Lopez, M.M. & Penyalver, R., (2008).** IS53: an insertion element for molecular typing of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Research in Microbiology* 159, 207–15.
- **Quesada, J.M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C.I., Carbonell, E.A. & López, M.M. (2010a).** Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. *Plant Pathology*, Vol. 59, No. 2, (April 2010), pp. 262–269.
- **Ramos C., Isabel., Matas., Bardaji L., Isabel M ., Aragon M and Murillo J ( 2012).** *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*: some like it knot. *Molecular plant pathology*. 10, 1-3.
- **Serdoun Bekri (2013)** La détection de *pseudomonas savastanoi*, agent causal de la tuberculose de l'olivier évaluation et comparaison d'une technique d'isolement sur milieux de cultures et d'une technique sérologique (immunofluorescence) (Mémoire De Magister) Université d'Oran
- **Velitzelos E., Velitzelos D. (2005).** Geohistorical evidence on the evolution of plants in the Aegean Sea. In *Biodiversity and natural heritage in the Aegean*, Eds., Karamanos, A. J. and C.A. Thanos. The Agricultural University of Athens, 133-148.
- **Wilson, E.E. & Ogawa, J.M. (1979).** Fungal, bacterial, and certain nonparasitic diseases of fruit and nut crops in California, Division of Agricultural Sciences, University of California, ISBN 093187629X, Berkeley, USA.
- **Young, J.M., Saddler, G.S., Takikawa, Y., De Boer, S.H., Vaqueterin, L., Gardan, L., Gvozdyak, R.I. & Stead De .(1996).** Names of plant pathogenic bacteria. *Review of plant pathology*, 75, 721-763.

# *Annexe*

## Annexe

### Gélose nutritive

Extrait de viande.....	03g
Peptone.....	05g
Chlorure de sodium.....	05g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1L

pH = 7,2

### King B

Protéase peptone n°03.....	20g
Glycérol.....	10ml
Sulfate de magnésium.....	1,5g
Potassium phosphate dibasique.....	1,5g
Agar.....	15g
Eau distillée .....	1L

pH = 7,2

**\*Les milieux sont stérilisés à l'autoclave à 120° pendant 20mn.**



## Résumé

L'olivier est le bien connu pour son intérêt alimentaire et thérapeutique, est un arbre qui symbolise le bassin méditerranéen. Une majorité des agriculteurs ne savent pas que la chute de rendement en olive est due aux maladies des oliviers. Parmi ces maladies nous sommes intéressés à la tuberculose, très répandue dans toutes les surfaces de culture des oliviers. La tuberculose est la principale maladie bactérienne, elle est causée par *Pseudomonas savastanoi*. Notre étude vise à isoler des bactéries et identifier à partir des tumeurs trouvées sur la branche des arbres, et de tester leur pouvoir de résistance et sensibilité aux extraits des différentes plantes. Notre champ d'investigation s'est limité dans les régions de la wilaya d'Ain Témouchent et Oran,

Les tests réalisés ont révélé la présence de la bactérie recherchée *Pseudomonas savastanoi* la méthode de diffusion sur gélose présente une sensibilité aux certains extraits (L'extrait aqueux d'*Eucalyptus* et l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare*) par contre elle est résistante aux l'extrait de Dichlorométhane et l'extrait de l'huile totale d'*Eucalyptus*.

**Mots clés :** Olivier, tuberculose, *Pseudomonas savastanoi*, galles, test de diffusion sur gélose.

## ملخص

تعرف شجرة الزيتون بفوائدها الغذائية والعلاجية و بأنها رمز من رموز الحوض المتوسط . غالبية المزارعين يجهلون أن انخفاض مردود الزيتون يعود إلى الأمراض التي تصيب الأشجار من بينها مرض السل، الذي يشغل كل اهتماماتنا و الذي يشهد انتشارا واسعا في بساتين الزيتون ، انه من أهم الأمراض البكتيرية ، تسببه بكتيريا تسمى بسودومنا سفستانوي . تصبو دراستنا إلى تحديد البكتيريا بعد عزلها من الأورام الموجودة على أغصان أشجار بساتين الزيتون لولايتي عين تموشنت و وهران و اختبار قدرتها على مقاومة مستخلصات نباتات مختلفة. كشفت الاختبارات على وجود البكتيريا المطلوبة و طريقة الانتشار فوق الهلام تظهر حساسيتها تجاه بعض المستخلصات (مستخلص الماء لشجرة الكينا و الزيت الأساسي لنبته التوابل) في حين تظهر مقاومتها تجاه مستخلص ديكلوروميثان و مستخلص الزيت الكامل لشجرة الكينا.

**الكلمات المفتاحية** شجرة الزيتون، مرض السل، بكتيريا بسودومنا سفستانوي، الدمامل ، اختبار انتشار ألهلام.

## Abstract

The olive tree is known for its nutritional and therapeutic benefits, it symbolizes the Mediterranean basin. The majority of farmers do not know that the drop in olive yields is due to olive tree diseases. Among these diseases, we are interested in tuberculosis which is widespread in all areas of olive growing. Tuberculosis is one of the most important bacterial diseases, it is caused by *Pseudomonas savastanoi*. Our study aims to isolate the bacteria and identify it from tumors that found on the branch of trees, and test their resistance and sensitivity to extracts of different plants. This study has been conducted in the regions of Ain Témouchent and Oran. The tests carried out revealed the presence of the bacterium to search *Pseudomonas savastanoi*, the method of diffusion on agar shows sensitivity to some extract (the aqueous extract of *Eucalyptus* and the essential oil of *Origanum vulgare*), in contrast, it is resistant to the Dichloromethane extract and the extract of the total Eucalyptus oil.

**Key words:** The olive tree, tuberculosis, *Pseudomonas savastanoi*, galls, agar diffusion test.