

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun–Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

- TERBAH AHLEM
- SOUFI MALIKA
- TADJI ASMA

Thème

**Isolation, caractérisation et traitement de la bactérie
phytopathogène "Pseudomonas savastanoi pv savastanoi"
Agent causal de la tuberculose de l'olivier**

Soutenu publiquement le 25-06-2023

Jury:	Grade	Université
Président: Mme LAARADJ-ZAZOU. K.	MCB	Ibn Khaldoun-Tiaret
Encadrant: MmeGHARIBI . D.	MCA	Ibn Khaldoun-Tiaret
Co-encadrant: Mr.YEZLI .W.	MCA	Ibn Khaldoun-Tiaret
Examineur: Mlle BENMESSAOUD. A.	Doctorante	Mostafa Istanbul-Mascara

Année universitaire 2022-2023

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions, du plus profond de notre cœur, notre **Dieu** le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté pour mener à bien et achever ce travail.

Nous remercions, très chaleureusement Mme GHARABI Dhia notre encadreur, on tient vivement à lui exprimer notre profonde reconnaissance et notre gratitude pour sa disponibilité, sa patience et sa compréhension. Merci pour vos précieux conseils, pour votre soutien et les efforts fournis pour nous diriger vers la bonne voie et nous n'oublions jamais vos critiques bénéfiques pour nous diriger vers un esprit scientifique.

Nous remercions s'adressent également à Mr Wassim yezli notre Co encadrant pour son aide très importante et sa contribution au cours de la réalisation de ce travail.

Nous tenons à remercier vivement les membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail Mme Laaradj-Zazou Khalida pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de ce travail ainsi notre gratitude s'adresse aussi à Melle Benmessaoud Amel de nous avoir honoré en examinant notre travail.

Nous tenons à remercier également l'ingénieur de laboratoire de Microbiologie M^{me} Safa Z. M^{me} Smaïl et Mr Kadi, ainsi que les ingénieurs des laboratoires de biochimie Mr Benhalima avec son équipe et de physiologie M^{me} Chaïb S. et son équipe.

Nous remerciant les doctorantes Mesdemoiselles Benmessaoud A. et Boukhaloua A. Pour leur aide et conseils. Et à tous ceux qui ont participé, de près ou de loin à l'attribution de ce travail.

Nous sommes très reconnaissante à tous les enseignants qui ont veillé au bon déroulement de notre formation au long de notre cursus, qu'ils trouvent ici l'expression de nos sentiments les plus respectueux.

Nous voudrions aussi adresser un grand merci à tous nos collègues pour avoir partagé nos doutes et nos craintes.

Dédicace

En premier lieu, je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, le courage, la patience et la force pour aller toujours vers l'avant.

Je dédie ce modeste travail :

A ceux que j'aime du fond de mon cœur, à qui je dois la vie et qui n'ont cessé, à aucun moment, de me soutenir et de m'encourager par leur prières et leurs sacrifices : Mes chères parents

A mon père, en témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et les efforts qu'il m'a témoigné tout le long de mes études

A ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux, ma mère

A Ma chère sœur Kaltoum , mes frères Sohaib et Amjed pour leur amour et encouragement je leurs souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite.

A mes collègues Malika et Asmaa qui ont contribué à la réalisation de ce travail

A mes très chères amies Hasna, Samiha, Malika et Samah qui m'ont soutenu, encouragé et aidé dans les moments les plus difficiles

A mes grandes- mères, mes tantes et mes oncles, que dieu leur donne une langue et joyeuse vie.

A tous ceux qui m'ont aidé et soutenu durant cette période.

Sans oublier les professeurs que ce soit du primaire de secondaire ou de l'enseignement supérieur

TERBAH AHLEM

Dédicace

Avec l'aide de DIEU, j'ai pu réaliser ce modeste travail de fin d'étude à que je
dédie A:

A mes chères parents qui ont souffert sans me laisser souffrir qui n'ont épargné
aucun effort pour me rendre heureuse.

A mes frères Sahraoui, Amar et Boumediene

A mes sœurs Ikram, Ahlem et Ibtihel pour leur amour je leur souhaite une vie
pleine de bonheur et de réussite

A mes chers binôme: Ahlem et Asmaa qui ont contribué à la réalisation de ce
travail

A mes chers Amies : Mariem, Fatima, Ahlem, Samiha, Samah et Hasna.

A toute ma famille qui m'a soutenu, aidé et encouragé

Sans oublier mes professeurs que ce soit du primaire de secondaire ou de
l'enseignement supérieur

SOUFI MALIKA

Dédicace

Je dédie le fruit de ce modeste travail comme un geste de gratitude à :

Mes très chers parents qui m'ont soutenu, encouragé pour que je puisse mener à

Bien mes études, et qui ont attendu ce jour avec impatience.

Mes chers frères : Oussama et Mohamed.

Ma chère sœur : Chaima.

Mes Binômes : Malika et Ahlem.

A tous mes amis et mes collègues : Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité
et d'une amitié infinie.

A tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail

Tadji Asmaa

Table des matières

I.	Liste des figures	
II.	Liste des tableaux	
III.	Liste des abréviations	
	Introduction générale	1
	Partie I: Synthèse bibliographique	4
	Chapitre1: Étude de la tuberculose de l'olivier.	4
1.1	Définition de la maladie.....	4
1.2	Mode de propagation de la maladie.....	4
1.3	Répartition géographique de la tuberculose de l'olivier dans le monde.....	5
1.4	Symptômes.....	5
	Chapitre 2: étude de l'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier.....	6
1.5	Agent causal.....	6
1.6	Classification taxonomique.....	6
1.7	Pouvoir pathogène	7
1.8	Cycle de développement de la tuberculose l'olivier.....	8
	Partie II : Matériels et méthodes	9
1.9	L'échantillonnage	9
1.10	Isolement et identification	10
1.10.1	Prélèvement des échantillons.....	10
1.10.2	Ensemencement	11
1.10.2.1	Ensemencement direct	11
1.10.2.2	Ensemencement par dilution.....	11
1.10.3	La purification.....	12
1.11	Caractérisation macroscopique et microscopique	12
1.11.1	Observation macroscopique.....	12
1.11.2	Observation microscopique	12

1.12	Coloration de Gram.....	12
1.13	Tests biochimiques.....	13
1.13.1	Test de solubilité par KOH.....	14
1.13.2	Test catalase.....	14
1.13.3	Test oxydase.....	15
1.14	Fluorescence sur la gélose King B.....	16
1.15	Test de l'activité péctinolytique.....	16
1.16	Test de Mannitol mobilité.....	16
1.17	Activité Antibactérienne.....	17
1.17.1	Préparation du matériel végétal pour l'extraction des huiles.....	17
1.17.1.1	Séchage :.....	17
1.17.1.2	Broyage.....	18
1.18	Extraction des huiles essentielles.....	18
	Les huiles essentielles ont été extraites par hydro distillation, c'est à dire par entraînement à la vapeur selon le protocole de Baydar et <i>al.</i> (2004).....	18
1.19	Caractéristique des huiles essentielles (<i>Origanum vulgare</i> , <i>Schinus molle</i> et <i>l'eucalyptus radiata</i>),.....	19
1.19.1	Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles.....	19
1.19.2	. Détermination du rendement en huile essentielle.....	20
1.19.3	Analyse physico-chimiques des huiles.....	20
1.19.3.1	Densité.....	20
1.19.3.2	Détermination de l'indice de réfraction.....	21
1.19.4	Tests antimicrobiens.....	21
1.19.4.1	Standardisation.....	21
1.19.5	Aromatogramme.....	21
1.19.6	Antibiogramme.....	22
1.19.7	Le sulfate de cuivre.....	23
	Partie III : Résultats et discussion.....	24

2.....	Isolement de la bactérie	24
2.1	La purification de la bactérie :	24
2.2	Les tests biochimiques	28
2.2.1	Le test de KOH :(confirmation de la coloration de gram).....	28
2.2.2	Le test de catalase	29
2.2.3	Le test oxydase :.....	29
2.2.4	Le test de fluorescence sur King :.....	30
2.2.5	Le test de l'activité pectinolytique.....	30
2.2.6	Les test de mannitol mobilité.....	31
2.3	Caractérisation des trois huiles essentielles () :	31
2.3.1	Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles.....	32
2.3.2	Résultats du rendement des huiles essentielles.....	32
□	Les analyses physico-chimiques des huiles essentielles.....	34
2.3.3	Résultats et discussion de la densité des huiles testées :	34
2.4	L'évaluation de l'activité Antibactérienne des huiles essentielles	35
2.4.1	Résultats de l'aromatogramme	35
2.5	Résultats et discussion de l'évaluation de l'activité Antibactérienne des antibiotiques	38
2.5.1	Résultats de l'antibiogramme	38
2.6	L'évaluation de l'activité Antibactérienne des huiles essentielles, des antibiotiques et du sulfate de cuivre.....	40
	Conclusion.....	41
	Références bibliographiques:1	

Liste des figures

FIGURE 1: REPARTITION DE LA TUBERCULOSE DE L'OLIVIER DANS LE MONDE (SOURCE FAO)	5
FIGURE 2: DIFFERENCE ENTRE JEUNES ET VIELLES TUMEURS (SOURCE INRA).....	6
FIGURE 3: PHOTOS DE PLANTS TOUCHES PAR LA TUBERCULOSE DE L'OLIVIER; A:PLANTS; B: RAMEAUX (PHOTOS PRISES PAR GHARABI D.)	10
FIGURE 4: PHOTOS DES TROIS ECHANTILLONS DE LA TUBERCULOSE DE L'OLIVIER....	11
FIGURE 5: COLORATION DE GRAM.....	13
FIGURE 6: TEST DE LA SOLUBILITE PAR LE KOH.....	14
FIGURE 7: TEST DE CATALASE.....	15
FIGURE 8: TEST D'OXYDASE	15
FIGURE 9: TEST DE L'ACTIVITE PECTINOLYTIQUE	16
FIGURE 10: TEST DE MANNITOL MOBILITE.....	17
FIGURE 11: EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES.....	19
FIGURE 12: RESULTAT MACROSCOPIQUE D'UN ISOLAT PUR	25
FIGURE 13: OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES BACILLES A GRAM NEGATIF	26
FIGURE 14: OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES COQUES A GRAM POSITIF (B) ET DES BACILLES A GRAM POSITIF (C)	26
FIGURE 15: RESULTAT DU TEST KOH	28
FIGURE 16: RESULTAT DU TEST CATALASE (+).....	29
FIGURE 17: RESULTAT DU TEST OXYDASE	29
FIGURE 18: RESULTAT DU TEST FLUORESCENCE SUR KING B	30
FIGURE 19: RESULTAT DU TEST DE L'ACTIVITE PECTINOLYTIQUE	30
FIGURE 20: RESULTAT DU TEST MANNITOL-MOBILITE.....	31
FIGURE 21: PHOTO DES HUILES ESSENTIELLES EXTRAITES	32
FIGURE 22: REPRESENTATION GRAPHIQUE DES RENDEMENTS DES HUILES TESTEES ..	33
FIGURE 23: REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA DENSITE DES HUILES TESTEES	34
FIGURE 24: REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L'INDICE DE REFRACTION DES HUILES TESTEES.....	35
FIGURE 25: REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L'AROMATOGRAMME	36
FIGURE 26: PHOTO DES RESULTAT DE L'AROMATOGRAMME	37
FIGURE 27: REPRESENTATION GRAPHIQUE DES RESULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME..	38
FIGURE 28: PHOTO DES RESULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME	39

FIGURE 29: REPRESENTATION GRAPHIQUE GLOBALE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	41
--	-----------

Liste des tableaux

TABLE 1: RESULTAT MACROSCOPIQUE DES SIX ISOLATS.....	25
TABLE 2: RESULTAT MICROSCOPIQUE DES SIX ISOLATS.....	26
TABLE 3: CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DES HUILES TESTEES	32
TABLE 5: RESULTAT DU PROFIL DE RESISTANCE DE LA BACTERIE AUX ANTIBIOTIQUES TESTES.....	39

• *Liste des abréviations*

R:	Rendement
UV:	Ultraviolet
%:	pourcentage
Mm:	Millimètre
µl :	Microlitre
INPV :	Institut National de la Protection des Végétaux
HE :	Huile essentiel
ATB :	Antibiotique
AMC30 :	Amoxicilline
FOX30 :	Cefoxitin
CRO30 :	Ceftriaxon
B10 ::	Amphotéricine
CZ30	Cefazolin
MTS :	Metronid
CuSO4 :	Sulfate de cuivre
EDS :	Eau distillée stérile
MH :	Muller Hinton

Résumé

La tuberculose de l'olivier est une maladie causée « *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* » induisant la formation de nœuds (galles) sur le tronc et les rameaux. Elle fait des ravages sur la culture de l'olivier.

L'objectif de notre étude est d'isoler, identifier cette bactérie et tester son pouvoir de résistance et sa sensibilité à trois huiles essentielles (*Origanum vulgare*, *Schinus molle* et *Eucalyptus radiata*), aux antibiotiques et sulfate de cuivre.

L'isolement et l'identification de *Pseudomonas savastanoi* ont été réalisés à partir de rameaux de plant d'olivier infectés par la tuberculose. Qui ont montré que c'est une bactérie de type bacille, Gram négatif, catalase positif, oxydase négatif, mobile, elle n'a pas la capacité de fermenter le sucre mannitol.

L'activité antibactérienne a révélé que la souche *Pseudomonas savastanoi* est hautement sensible à l'huile essentielle de l'origan et à certains antibiotiques utilisés, (*Amoxicilline*, *Cefoxitin*, *Ceftriaxon* et *Cefazolin*).

Mots clés : La tuberculose d'Olivier, *pseudomonas savastanoi PV savastanoi*, l'activité antibactérienne, huile essentielle.

Abstract

Tuberculosis of the olive tree is a disease caused by the bacterium "*Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*" inducing the formation of knots (galls) on the trunk and branches. It wreaks havoc on the culture of the olive tree.

The objective of our study is to isolate, identify this bacterium and test its power of resistance and its sensitivity to three essential oils (*Origanum vulgare*, *Schinus molle* et *l'eucalyptus radiata*), antibiotics and copper sulphate. Isolation and identification of *Pseudomonas savastanoi* was carried out and ensured by microscopic and biochemical studies.

The isolation and identification of *Pseudomonas savastanoi* was carried out from olive plant branches infected with tuberculosis. Which have shown that it is a bacillus type bacterium, Gram negative, catalase positive, oxidase negative, mobile, it does not have the capacity to ferment the sugar mannitol.

The antibacterial activity revealed that the *Pseudomonas savastanoi* strain is highly sensitive to the essential oil of oregano and to certain antibiotics used (*Amoxicillin*, *Cefoxitin*, *Ceftriaxon* and *Cefazolin*).

Keywords: Olivier's tuberculosis, *pseudomonas savastanoi* PV *savastanoi*, antibacterial activity, essential oil.

ملخص

مرض السل الذي يصيب شجرة الزيتون هو مرض تسببه بكتيريا تسمى " *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* " التي تؤدي إلى تكوين عقدة (كرات) على الجذع والأغصان. التي تؤدي إلى تدهور زراعة الزيتون.

الهدف من دراستنا هو عزل هذه البكتيريا والتعرف عليها واختبار قدرتها على المقاومة وحساسيتها لثلاثة زيوت أساسية (*Origanum vulgare* , *Schinus molle* et *l'eucalyptus radiata*) والمضادات الحيوية وكبريتات النحاس.

تم عزل والتعرف على "*Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*" باستخدام أغصان الزيتون المصابة بالسل.. التي أظهرت أنها بكتيريا من نوع العصيات ، سالبة الجرام ، موجبة الكاتالز ، أوكسيديز سالب ، متحركة ، لا تملك القدرة على تخمير مانيتول السكر.

أظهر النشاط المضاد للبكتيريا أن هذه السلالة البكتيرية شديدة الحساسية للزيت العطري (*Origanum vulgare*) ولمضادات حيوية معينة مستخدمة (*Amoxicilline, Cefoxitin, Ceftriaxon et Cefazolin*).

الكلمات المفتاحية سل الزيتون ، *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* ، نشاط مضاد للجراثيم ، زيت عطري.

INTRODUCTION

Introduction générale

En Algérie, comme dans de nombreuses régions agricoles des pays méditerranéens, la culture de l'olivier (*Olea europaea* L.) tient une place très importante dans le développement durable, l'économie, et la lutte contre la désertification. le gouvernement algérien a mis en place un programme de plantation d'oliviers d'une superficie de 900 000 ha d'ici 2024.33% de la production arboricole en algérie est représenté par olivier. Les traditions oléicoles ancestrales et le climat favorable constituent des avantages compétitifs pour développer la filière oléicole et pour contribuer à l'autosuffisance en huiles végétales (**Hadj Sadok et al., 2018**). Il est à préciser aussi que même pendant la période coloniale l'oléiculture était une filière totalement algérienne (**Zoubir, 2017**).

Malheureusement, l'olivier est soumis à des attaques d'origine fongique et bactérienne. Parmi les principaux ravageurs d'olivier les plus nuisibles sont la teigne de l'olivier (*Prays oleae*) ; la mouche de l'olivier (*Bactrocera olea*); le psylle de l'olivier (*Euphyllura olivina*) et la cochenille noire (*Saissetia oleae*); (**COI, 2007**; **Chliyeh et al., 2014**).en plus des ravageurs qui engendrent la réduction de la production et par conséquent, cause de lourdes pertes économique. Parmi ces attaques, la bactérie, *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* qui a été identifiée comme responsable de la tuberculose de l'olivier caractérisée par la présence des tubercules sur les branches et les tiges (**Chliyeh et al., 2014**).

La tuberculose de l'olivier a été décrite pour la première fois au IV siècle avant J.C par le philosophe grec Theophrastus. **En 1885 G. Arcangeli** a soupçonné une cause bactérienne à cette maladie. Une année plus tard, Savastano a réussi pour la première fois à isoler cette bactérie, d'où le nom *Pseudomonas savastanoi*.

Elle a également été étudiée par E. F Smith en 1904 aux États-Unis ainsi que par L. Petri en 1970 en Italie. Ces deux chercheurs ont confirmé les travaux de Savastano. Les trois chercheurs Petri, Savastano et Pelgion ont reproduit la maladie, respectivement sur l'olivier et Laurier-rose, en utilisant des cultures de *Pontoaea agglomerans* et de *Pseudomonas savastanoi* et ont déduit par la suite que ces deux dernières étaient toutes les deux derrière la formation de nœuds (**Surico et Marchi, 2003**).

La tuberculose de l'olivier, connue sous le nom de chancre d'olivier, est considérée comme la principale et l'une des plus graves maladies bactériennes affectant l'olivier (*Olea europea*). Cette maladie est omniprésente dans tout le bassin méditerranéen ainsi qu'en Californie.

Plusieurs facteurs interviennent dans le déclenchement du processus infectieux tels que les blessures qui peuvent être naturelles comme celles causées par la chute des feuilles ou mécanique dues à la taille. L'effet des insectes est non négligeable aussi, il a été démontré qu'un homoptère (*Ceresa* sp. Famille des membracidae) qui en déposant ses œufs provoque des plaies constituant un site d'infection par la bactérie (**Jardak et al, 2004**).

En Algérie, la maladie a été détectée depuis la période coloniale. En effet, chaque année des foyers de tuberculose sont signalés dans des exploitations agricoles implantées dans plusieurs wilayas. Le ministère de l'agriculture, et du développement de la Pêche par le biais de l'INPV, en collaboration avec les directions des services agricoles (DSA) et les Chambres de l'agriculture a déployé d'importants efforts pour dépister et lutter contre cette maladie.

Dans ce contexte s'inscrit notre travail dont l'objectif essentiel est d'isoler et caractériser l'agent causal de la tuberculose de l'olivier et d'évaluer, l'activité

antibactérienne de trois huiles essentielles (*Origanum vulgare*, *Schinus molle* et *Eucalyptus radiata*, du sulfate de cuivre et des antibiotiques)

Le présent travail est organisé en deux grandes parties essentielles :

- Une première partie bibliographique consacrée à l'étude de deux chapitres :
 1. La tuberculose de l'olivier
 2. L'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier.
- Une seconde partie expérimentale composée de deux chapitres :
 1. Matériel et méthodes de travail.
 2. Résultats obtenus et discussion.
- Et en fin une conclusion générale.

Synthèse
Bibliographique

Partie I: Synthèse bibliographique

Chapitre1: Étude de la tuberculose de l'olivier.

1.1 Définition de la maladie

La tuberculose de l'olivier, connue aussi sous le nom de chancre d'olivier, est considérée comme l'une des plus graves maladies bactériennes affectant l'olivier (*Olea europea*), celle-ci est probablement la première maladie clairement décrite dans l'antiquité par **Théophrastus (Iacobellis, 2001)**, observée pour la première fois par Savastanoi en 1870 puis au début du 20^{ème} siècle par Smith et Rorer 1904 (**Guido, 2005**) c'est une phytopathologie causée par la bactérie « *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* (**Zohary D, 1973**). Il est considéré comme le seul pathogène responsable de la formation des nœuds (tumeurs) bactériennes des oliviers (*Olea europa* L) (**Young et al, 1996 ; Janse, 1982 ;**). Le nom actuel est *Pseudomonas syringae* PV. *Savastanoi* (**Gardan et al. 1992**).

1.2 Mode de propagation de la maladie

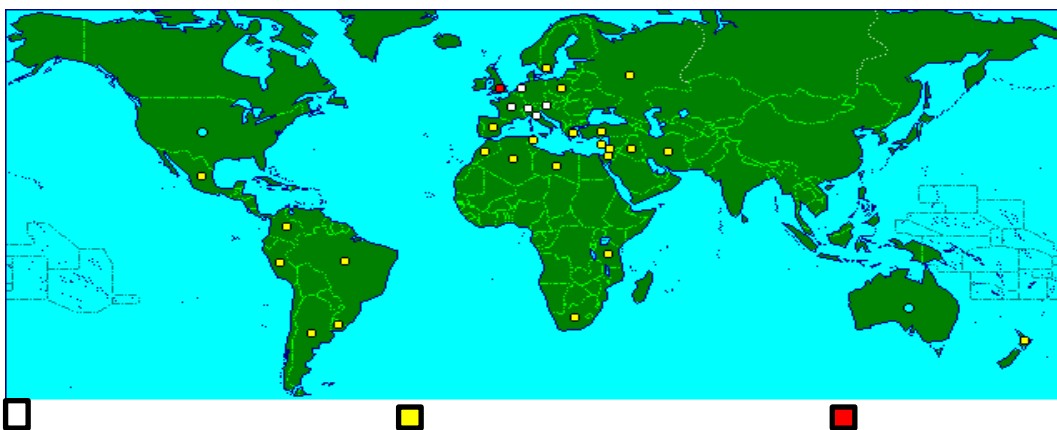
Elle commence sur les rameaux et se propage aux charpentes et tronc, sur des blessures provoquées sur le végétal par le grêle, le gel et des plaies banales de la taille. Elle se manifeste par des tumeurs parenchymateuses à forme irrégulière, de couleur verte au début et à surface lisse. Le diamètre de ces tumeurs augmente au fur et à mesure de l'évolution de l'attaque et les fissures deviennent irrégulières. Ensuite, on assiste au brunissement de la surface de ces tumeurs.

Le transport de la bactérie se fait par l'homme, la pluie et le vent. Sa gravité provient du fait qu'elle peut être également transmise par les techniques de multiplication en pépinière à partir d'organes provenant d'arbres contaminés apparemment indemnes (greffons-boutures). La sensibilité des oliviers est selon

les variétés : Elle peut causer pertes de production très importants dans les vergers oléicoles en affectant la taille, la qualité des fruits induisant des odeurs indésirable, (Quesada *et al.*, 2008).

1.3 Réparation géographique de la tuberculose de l'olivier dans le monde

La tuberculose de l'olivier est réponde dans tous les pays où il y a la culture de l'olivier (**Fig.01**) à différent degré : France ; Germanie, Grèce, Italie, Portugal, Spain, Norwid, Suède, Yougoslavie. Iran, Iraq, Palestine, Lebanon, Turquie, Algérie, Libye, Maroc, sud d'Afrique, Tanzanie, Tunisie, Mexique, USA (Arizona, Californie, Texas, Arkansas), Argentine, Brésil, Colombie, Pérou, Uruguay, Australie, New Zélande (**Bradbury, 1986**).



Zones légèrement touchées Zones modérément touchées Zones très touchées

Figure 1: Répartition de la tuberculose de l'olivier dans le monde (Source FAO)

1.4 Symptômes

Les symptômes s'observent principalement sur rameaux, brindilles mais également sur charpentes. Sur les parties infectées, on note la présence de petites tumeurs

parchymateuses avec un aspect spongieux et de forme irrégulière. Au début de leur apparition, elles sont molles, de couleur verte et à surface lisse.

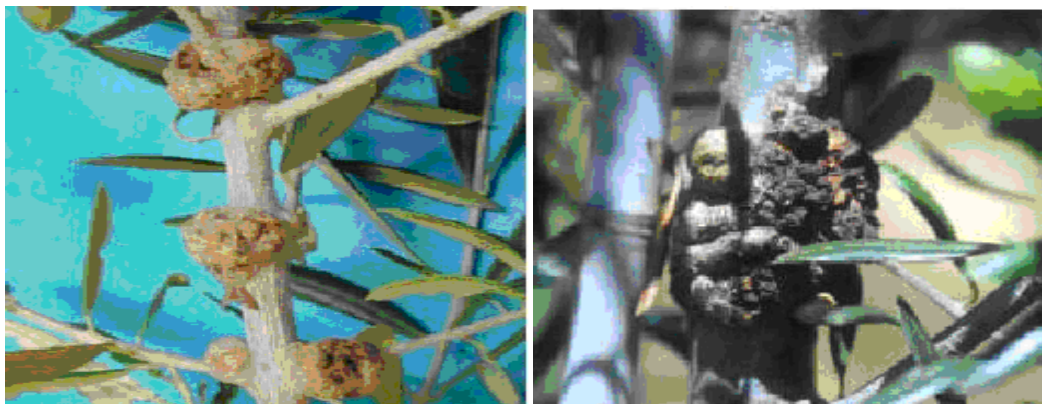


Figure 2: Différence entre jeunes et vieilles tumeurs (Source INRA)

Chapitre 2: étude de l'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier

1.5 Agent causal

L'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier est le *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Zohary et al., 1975), qui est une phytopathogène à Gram Le transport de la bactérie se fait par l'homme, la pluie et le vent. Sa gravité provient du fait qu'elle peut être également transmise par les techniques de multiplication en pépinière à partir d'organes provenant d'arbres contaminés apparemment indemnes.

1.6 Classification taxonomique

Pseudomonas savastanoi est une bactérie phytopathogène de la famille des *Pseudomonaceae*. Il fut longtemps considéré comme un pathovar de *Pseudomonas syringae*, mais suivant la classification phylogénique il a été élevé au rang de nouvelle espèce.

Règne : Bacteria

Division : Proteobacteria

Classe : GammaProteobacteria

Ordre :Pseudomonadales

Famille :Pseudomonadaceae

Genre: *Pseudomonas*

Espèce : *P. savastanoi* - Nom binominale : *Pseudomonas savastanoi*

Cette espèce a été divisée en 5 pathovars :

- *P. s. pv. fraxini*
- *P. s. pv. nerii*
- *P. s. pv. glucinea*
- *P. s. pv. phaseolicola*
- *P. s. pv. Savastanoi*

1.7 Pouvoir pathogène

L'agent pathogène colonise les tissus autour des plaies infectées et fraîches de l'arbre, à travers des enzymes pectolytiques et hémicellulolytiques, la bactérie produit des cavités dans les cellules hôtes où l'agent va se regrouper et envahit directement les vaisseaux du xylème (**Maldonado-González et al., 2013**). Après l'acide indole-3-acétique (AIA), les cytokinines qui sont codés par le plasmide pIAA1 de la bactérie et les gènes hrp de Psv avec autres bactéries coexistant au niveau des nœuds, provoquent une augmentation de la taille de la cellule végétale (hypertrophie) et une division cellulaire anormale (hyperplasie); (**Quesada et al., 2010 ; Buonauro et al., 2015**).

1.8 Cycle de développement de la tuberculose l'olivier

Le cycle de vie de la bactérie *Pseudomonas savastanoi* est composé de deux phases (**Bertolini, 2003**)

La première phase épiphyte

"Épiphyte" provient du grec épi = sur et phyte = plante, ce qui signifie "sur la plante." La bactérie *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* survit dans les tissus des tumeurs et sur les rameaux, les feuilles et les fruits. Mais elle survit mieux sur des surfaces d'écorce que sur les feuilles, (**Ercolani, 1993**).

Selon **Quesada et al., 2010** les bactéries épiphyte sont principale source de l'infection des plantes saines. Une température 22°-25 ° C est très favorable pour le développement de la maladie suivie par une forte probabilité d'infection *savastanoi* pv. *Savastanoi* et le déclenchement des tumeurs.,

La seconde phase endophyte

Selon **Kado, 1992**, cette phase elle est caractérisée par une vie de la bactérie endophyte, dans les tissus végétaux sans provoquer de dégâts ou retirer des avantages (**Kado, 1992**).

Selon d'autres auteurs (**Penyalver 2006 ; Schiff Giorgini, 1906 ; Wilson et al., 1964 ; Wilson et al., 1979**), qui ont mentionné que *pseudomonas savastanoi* dans les plantes d'oliviers, se déplace à travers les vaisseaux du xylème et les espaces intercellulaires qui constituent la première zone infectée.

Selon le C.O.I. ; 2006 ; il n'existe que de traitement préventif pas de moyens de lutte curatifs pour faire disparaître ou atténuer les effets de la maladie et limiter la propagation de cette bactérie dans le verger oléicoles.

*MATERIEL ET
METHODES*

Partie II : Matériels et méthodes

1.9 L'échantillonnage

Etant donné que le Verger oléicole de la ferme Pilote été arraché par les services de l'IPV ; à cause de son envahissement par la tuberculose de l'olivier, on était obligé à faire une enquête auprès des services concernés pour avoir une idée sur la plantation de l'olivier au niveau de la wilaya de Tiaret. Plusieurs sorties ont été organisées dans les vergers oléicoles de la wilaya de Tiaret dans le but de diagnostiquer les arbres de l'olivier touchés par la tuberculose et réaliser des prélèvements de rameaux infestés.

Trois sorties ont été réalisées durant la période automnale au niveau d'une exploitation arboricole avec 130ha olivier multi variétales sise à la commune de Rechaiga, Daïra de Hamadia, bien entretenue ne présentant aucune infestation par la tuberculose.

Deux autres sorties effectuées aux alentours de la commune de Nadhora Daïra, de Mahdia, une première sortie durant la dernière quinzaine du mois de janvier et une seconde pendant la première quinzaine du mois de février dans les vergers de la zone d'étude où on a localisé des plants plantés en isolés touchés par la maladie. Les plants touchés par la tuberculose sont plantés en brise vent sur une parcelle de production de pomme de terre en irrigué d'environ 3ha dans une exploitation privée (**Fig.03**).

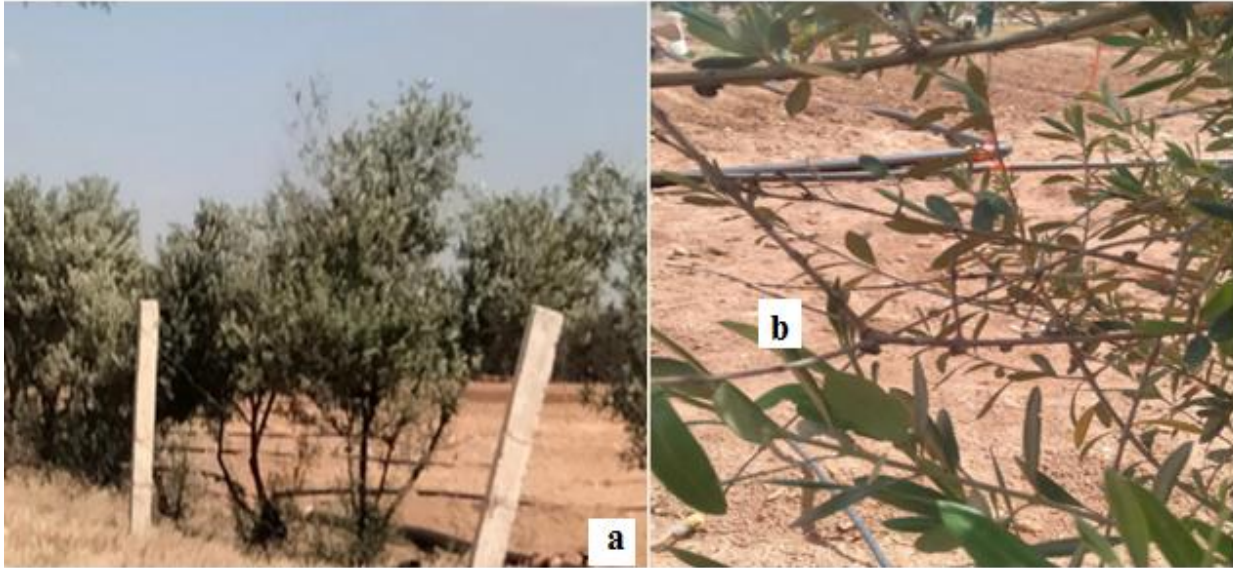


Figure 3: Photos de plants touchés par la tuberculose de l'olivier; a: plants; b: rameaux (photos prises par GHARABI D.)

Le prélèvement a été réalisé à partir des plants infectés sur trois petits rameaux contenant des tumeurs par la coupe de ces derniers à l'aide d'un sécateur désinfecté à l'alcool 90% après chaque usage. Les échantillons prélevés ont été placés dans du papier et transportés directement au laboratoire.

1.10 Isolement et identification

1.10.1 Prélèvement des échantillons

Trois rameaux (A, B, C) de plante possédant des tumeurs ont été choisis pour l'isolement des bactéries présentes dans les tumeurs (**Fig. 04**).

Les trois tumeurs ont été désinfectées à l'aide d'une compresse stérile imbibée à l'éthanol 96°.



Figure 4: photos des trois échantillons de la tuberculose de l'olivier

1.10.2 Ensemencement

L'isolement des germes à partir des galles d'olivier a été effectué selon deux techniques d'ensemencements :

1.10.2.1 Ensemencement direct

Les tumeurs sont découpées à l'aide d'une lame stérile en petits fragments. En utilisant une pince stérile, les fragments ont été étalés sur les milieux King A et King B coulés dans des boîtes de Pétri, de sorte que l'intérieur de la tumeur soit en contact avec le milieu. Les boîtes ont été ensuite étuvées à 28°C pendant 24 à 48 heures.

1.10.2.2 Ensemencement par dilution

Toujours avec une lame stérile, le tissu interne des galles a été découpé en petits fragments sur une boîte de Pétri vide puis écrasé par la suite dans des tubes eppendorfs stériles contenant 1 ml d'eau distillée stérile (EDS) afin d'obtenir un macérât.

Après écrasement et obtention d'un broyat (agitation pendant 20mn) et à l'aide d'une anse de platine flambée au bec bunsen, une goutte de la suspension a été étalée selon la technique des trois cadrans avec flambage de l'anse après chaque

cadran sur les milieux semi sélectif king A et King B, puis incubées à 28 °C pendant 2 à 3 jours.

1.10.3 La purification

Les colonies bactériennes obtenues ont été purifiées par repiquages successifs sur le milieu sélectif King B. Le contrôle de la pureté des souches a été effectuée morphologiquement selon l'homogénéité, l'aspect, la couleur.

Le but de cette technique de purification est d'obtenir des isolats purs dans le but de faire une série de tests biochimiques.

1.11 Caractérisation macroscopique et microscopique

1.11.1 Observation macroscopique

C'est le premier examen effectué après l'isolement. C'est l'étude de l'aspect des colonies qui nécessite l'observation à l'œil nu. Il y a plusieurs critères de classification : forme, taille, couleur de colonies, etc.

1.11.2 Observation microscopique

L'étude des caractères microscopique permet d'avoir un certain nombre d'informations pour l'élaboration d'une identification préliminaire.

1.12 Coloration de Gram

La coloration de Gram est utilisée pour différencier les bactéries Gram positif des bactéries Gram négatif. Cette coloration différentielle repose sur l'aptitude ou non de la paroi bactérienne à s'opposer à la coloration par éthanol. Les bactéries dites Gram positif possèdent une paroi épaisse, composée de peptidoglycane en leur donnant une imperméabilité à l'éthanol, tandis que les bactéries Gram négatif ne contiennent qu'une fine couche de peptidoglycane et surtout de lipide en quantité importante et c'est ce qui va rendre la décoloration effective.

A l'aide d'une anse à ensemencement on prélève une colonie qu'on dépose sur une lame. Une goutte d'eau distillée est déposée sur le frottis qui sera séché à côté du bec. La lame est colorée au violet de gentiane pendant 1min puis rincée abondamment à l'eau distillée.

On fait agir le Lugol pendant 1min en vue de consolider la fixation du premier colorant sur la paroi, puis rincée à l'eau distillée, le violet de gentiane est éliminé par lavage à l'éthanol jusqu'à décoloration totale, après coloration à la fuchsine est réalisée pendant 1min.

On lave doucement à l'eau distillée. Après séchage par papier absorbant, la lame est observée au microscope en ajoutant une goutte de l'huile d'immersion. (Serdoun, 2013) (Fig. 05).



Figure 5: Coloration de Gram

1.13 Tests biochimiques

- ◆ Les tests biochimiques constituent en approche classique pour l'identification de l'espèce bactérienne.
- ◆ Tous les tests biochimiques sont effectués sur des souches âgées de 24h, en effet les colonies isolées sont repiquées sur gélose king B et incubées pendant 24 h à 28°C

1.13.1 Test de solubilité par KOH

Dans le but de vérifier la coloration de Gram, une colonie isolée a été mélangée à une goutte d'une solution de KOH (Hydroxyde de potassium) à 3% (**Fig .6**) à l'aide d'une anse flambée au bec Bunsen. Après quelques secondes, le mélange est tiré vers le haut; s'il y aura une formation d'un filament entre la boucle de l'anse et la lame, cela veut dire que la bactérie est à Gram négatif, si rien n'est entraîné par l'anse, veut dire que la bactérie est à Gram positif (**Ryu, 1938**).



Figure 6: Test de la solubilité par le KOH

1.13.2 Test catalase

Sur une lame stérile on dépose une goutte de la solution de peroxyde l'hydrogène (H_2O_2) sur laquelle on met une colonie (**Fig.7**). L'observation est faite immédiatement. Le dégagement gazeux d'oxygène (apparition de bulles d'air) est une réaction positive. (**Benyoub, 2011**)



Figure 7: Test de catalase

1.13.3 Test oxydase

Le test a été réalisé en utilisant des disques d'oxydase. Un de ces disques a été placé sur une lame, sur celui-ci une colonie bactérienne a été déposée en utilisant une pipette Pasteur stérilisée (**Fig.8**). S'il y a apparition d'une tache violette au bout de trente secondes, la bactérie est oxydase positive et elle possède la cytochrome oxydase. L'absence de la coloration violette est due à l'absence de l'enzyme recherchée, cela indique que la bactérie est dépourvue de cette enzyme respiratoire. (**Klement et al, 1990**).

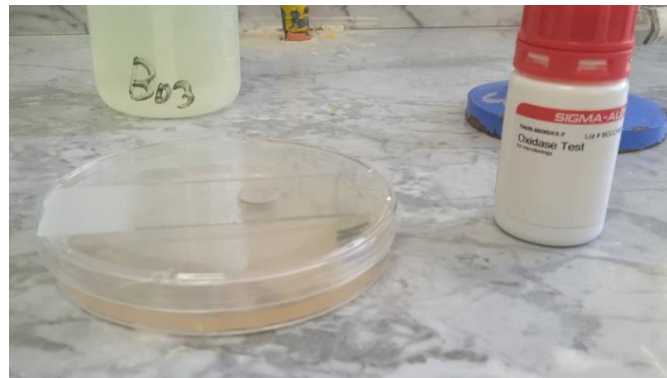


Figure 8: Test d'oxydase

1.14 Fluorescence sur la gélose King B

Le King B permet la mise en évidence de la pyoverdine (pigment diffusible de couleur jaune-vert fluorescent, sous la lumière UV, par certains *Pseudomonas* (Schaad et al, 2001).

1.15 Test de l'activité pectinolytique

Ce test permet d'identifier la possibilité d'une bactérie à dégrader la pectine, présente dans un milieu de culture spécifique ou sur une tranche de pomme de terre qui se trouve riche en pectine (Rathore et al., 2000).

Les tranches de pomme de terre ont été désinfecté avec de l'éthanol à 70%, lavées à l'eau distillée stérile puis déposées dans une boîte de Pétri contenant du papier filtre mouillé au préalable (Fig.9). Des colonies bactériennes âgées de 18 h ont été inoculées au centre des rondelles puis incubées à 26 °C pendant trois à cinq jours. Un test positif (dégradation de la pectine) s'est traduit par une présence d'une nécrose le tour de l'inoculation ainsi qu'une odeur indésirable s'est échappée de la boîte.

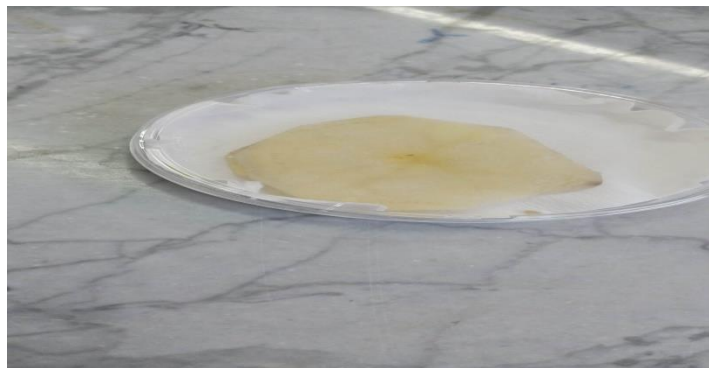


Figure 9: Test de l'activité pectinolytique

1.16 Test de Mannitol mobilité

Le but du test de Mannitol permet de mettre en évidence la mobilité de pseudo et la fermentation du mannitol.

Le test de mannitol et de la mobilité sont fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube de la souche à tester à l'aide d'une pipette pasteur (**Fig.10**). Puis incubé à 26 C° durant 3 à 5 jours. La fermentation du mannitol provoque un virage de la coloration du milieu vers le jaune. Les bactéries mobiles envahissent tout le milieu à partir de la piqûre centrale. (**Boulssen et al, 2016**)



Figure 10: Test de Mannitol mobilité

1.17 Activité Antibactérienne

1.17.1 Préparation du matériel végétal pour l'extraction des huiles

La collecte du matériel végétal a été réalisée de différentes zones et à différentes périodes.

En effet, les feuilles de l'origan sont récoltées au mois de juin 2022, d'El Bkhaich de Tissemsilt le faux poivrier a été récolté au mois de juin 2022, région de Tiaret et par l'eucalyptus le mois de novembre 2022 à Tiaret.

1.17.1.1 Séchage :

Les échantillons de feuilles des trois plantes, ont été étalés sur des feuilles en papier, à la température ambiante, dans une chambre aérée pendant 15 jours. Lorsque les feuilles sont complètement sèches quand elles sont friables entre les

doigts. Nous avons éliminé les feuilles qui portent des signes d'attaques par les ravageurs ou les microorganismes.

1.17.1.2 Broyage

Les feuilles sont initialement coupées en petits morceaux puis écrasées entre les mains. Et nous avons utilisé broyat des feuilles obtenu pour la préparation des huiles.

1.18 Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites par hydro distillation, c'est à dire par entrainement à la vapeur selon le protocole de Baydar *et al.* (2004) 50 g de matériel végétal séché est introduite dans un ballon contenant 500 ml d'eau distillée l'eau et le végétal sont chauffés dans le chauffe ballon, jusqu'à une température de 80°C, le chauffe ballon est réglé au minimum. Après 1 heure d'hydro distillation, un apport d'eau à travers le tube de dégagement latéral est effectué progressivement; le volume atteint à la fin de l'hydro distillation est de 500 ml pour 50 g de matière végétale (**Fig. 11**).

La vapeur chargée d'huile essentielle (distillat), en traversant le réfrigérant se condensent est récupéré dans le ballon de 500 ml mis dans un cristalliseur rempli de glaçons.

Le distillat récupéré est mis en décantation, dans le but est la séparation des deux phases aqueuse et huileuse qui sont intimement liées.

Etant donnée la quantité d'huile qui représente que quelques gouttelettes, et pour avoir une quantité d'huile essentielle suffisante pour la caractérisation et l'activité antibactérienne l'opération a été répétée plusieurs fois, tout on ayant le soin de

nettoyer le dispositif avec de l'éthanol absolu suivi d'un rinçage à l'eau distillée après chaque utilisation et cela afin d'éviter la contamination de l'huile essentielle.



Figure 11: Extraction des huiles essentielles

Une fois les huiles essentielles obtenues, elles sont conservées dans des flacons en verre enveloppés de papier d'aluminium à une température comprise entre 4 et 6°C pour éviter toute dégradation des huiles.

1.19 Caractéristique des huiles essentielles (*Origanum vulgare*, *Schinus molle* et *Eucalyptus radiata*),

1.19.1 Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles

L'analyse sensorielle est une source d'information essentielle qui, reflète les attentes et les tendances des consommateurs. L'analyse a été effectuée en observant et en inhalant directement l'huile essentielle. L'évaluation des propriétés organoleptiques constitue généralement une partie des études visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité de l'huile essentielle.

Concernant notre étude, trois critères sont considérés pour évaluer la qualité organoleptique : L'odeur, la couleur, l'aspect

1.19.2. Détermination du rendement en huile essentielle

Le rendement est défini comme étant le rapport de la masse d'huile essentielle sur la masse de matière végétale sèche :

$$R\% = \frac{m_{H.E}}{m_{M.V.S}}$$

m_{H.E} (g) : masse d'huile essentielle.

m_{M.V.S} (g) : masse de la matière végétale sèche.

R% : rendement en huile essentielle.

$$m_{HE} = FR - FV$$

1.19.3 Analyse physico-chimiques des huiles

1.19.3.1 Densité

La densité d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à la masse d'un égal volume d'eau distillée, (BOUKHATEM ., 2010 ; KHOLKHAL ., 2014 ; OUIS., 2015) la densité est donnée par la formule suivante :

$$D = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Où ;

*m*₀ : La masse de flacon vide.

*m*₁ : la masse de flacon remplie d'eau distillée.

*m*₂ : La masse de flacon remplie d'HE

1.19.3.2 Détermination de l'indice de réfraction

La mesure de l'indice de réfraction est faite par le biais d'un réfractomètre relié à un bain thermostaté à la température où l'huile est liquide. Le réfractomètre est préalablement étalonné avec de l'eau distillée. La méthode utilisée est celle décrite dans la norme ISO 6320 (1983). (**Kouidri Mohamed, 2008**).

1.19.4 Tests antimicrobiens

1.19.4.1 Standardisation

A partir d'une culture bactérienne pure et jeune (de 18h sur milieu King B), Réaliser une dilution de 1/100 dans 9 ml d'eau physiologique, puis Homogénéiser la suspension bactérienne au vortex ; sa densité optique doit être de 0,08 à 0,13 à une longueur d'onde de 625nm équivalente à 0,5 Mac Ferland (**Bendahou et al, 2007**).

1.19.5 Aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode permettant d'évaluer si une HE présente une activité antibactérienne, in vitro, vis-à-vis d'une bactérie. Le procédé par lequel ce test est réalisé est comparable à l'antibiogramme. Le principe repose sur l'ensemencement d'une suspension bactérienne sur une gélose.

Mode opératoire

- ◆ La gélose de MH stérile est coulé dans des boîtes de pétri.
- ◆ Un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne.
- ◆ L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélose MH, de haut en bas, en stries serrées selon la méthode quadrants.

- ◆ Préparation des trois répétitions de chaque huile essentielle (*Origanum vulgare*, *Schinus molle* et *l'eucalyptus radiata*)
- ◆ Des disques vierges sont placés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile.
- ◆ A l'aide d'une micropipette on ajoute 10µl des différents d'huiles essentielles, sur les disques.
- ◆ Les boîtes laissées 2 h à la température ambiante jusqu'à l'absorption de l'HE
- ◆ Incubation des boîtes à 27°C pendant 24 heures.
- ◆ Mesure des diamètres de zones d'inhibition
- ◆ Pour le témoin négatif; le disque est imbibés dans l'eau physiologique.

1.19.6 Antibiogramme

L'antibiogramme est un outil d'aide à la décision thérapeutique. C'est un test biologique in vitro qui permet de mesurer la résistance bactérienne au laboratoire. L'antibiogramme permet de catégoriser une souche bactérienne selon son degré de sensibilité (sensible S, intermédiaire I ou résistante R) et d'orienter l'antibiothérapie. Il est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique, obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé. (CA-SFM, 2010).

La sensibilité/résistance des bactéries est évaluée par la mesure du diamètre d'inhibition de croissance autour des pastilles.

Mode opératoire :

- ◆ Ensemencement de la dilution obtenue par standardisation par inondation sur les boîtes de pétri contenant 20 ml de gélose MH rejeter le surplus et laisser sécher les boîtes pendant 20 minutes à l'étuve à 26°C ;
- ◆ Appliquer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile

Laisser les boîtes 20 minutes à température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis les incuber pendant 18-24 heures à 26°C. Les diamètres de zones d'inhibition entourant le disque sont mesurés en millimètre.

1.19.7 Le sulfate de cuivre

Le sulfate de cuivre, appelée aussi bouillie bordelaise est à base de sulfate de cuivre (20%), il permet de maîtriser le développement de maladies fongiques et bactériennes agissant par contact, grâce aux propriétés fongiques et bactéricide du cuivre. C'est une poudre mouillable qui assure une longue durée de protection mais sa persistance d'action est limitée aux nouvelles contaminations.

Mode opératoire :

- ◆ Le sulfate de cuivre est d'abord dilué, à raison de 1,5g de CuSO₄ pour 125 ml d'EDS.
- ◆ La gélose de MH stérile est coulée dans des boîtes de pétri.
- ◆ Un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne.
- ◆ L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélose MH, de haut en bas, en stries serrées selon la méthode quadrants.
- ◆ Appliquer les disques vierges à l'aide d'une pince stérile.
- ◆ A l'aide d'une micropipette on ajoute 10µl de solution du CuSO₄
- ◆ Laisser les boîtes 20 minutes à température ambiante jusqu'à l'absorption de solution puis les incuber pendant 24 heures à 26°C.
- ◆ Les diamètres de zones d'inhibition entourant le disque sont mesurés.

Résultats et discussion

Partie III : Résultats et discussion

2 Isolement de la bactérie

Après l'incubation à 26°C pendant 3 à 5 jours de six souches obtenues par les deux techniques d'isolation (**A1 ; A2 ; B1 ; B2 ; C1 ; C2**), les bactéries ont été poussées sur le milieu sélectif King B.

Nos résultats ont confirmé que la bactérie phyto-pathogène de la tuberculose de l'olivier présente les caractéristiques morphologiques du genre *Pseudomonas* citées dans la littérature (**Botelho et Leda, 2006**). Ces colonies sont de couleur blanchâtre, crémeuse, brillante, transparente à bords légèrement bombé plate (tableau 01) :

2.1 La purification de la bactérie :

Après plusieurs étapes de purification sur milieu king B, on a pu obtenir une souche typique de *P. Savastanoi PV Savastanoi* à partir de l'échantillon A (**Fig. 12**)

Les résultats des six isolats bactériens (**A1 ; A2 ; B1 ; B2 ; C1 ; C2**) sont identifiés par les tests définissant les caractères morphologiques (**Tab. 02**).

L'examen microscopique des isolats (après coloration de Gram) a montré que les deux isolats (**A1 ; A2**) ; sont des bacilles à Gram négatif (**Fig. 13**)

Nous avons donc confirmé à partir de l'échantillon (A) qui possède un grand nombre de tumeurs jeunes et fraîches les caractéristiques morphologiques des *Pseudomonas* citées dans la littérature (**Philippe, 2007**).

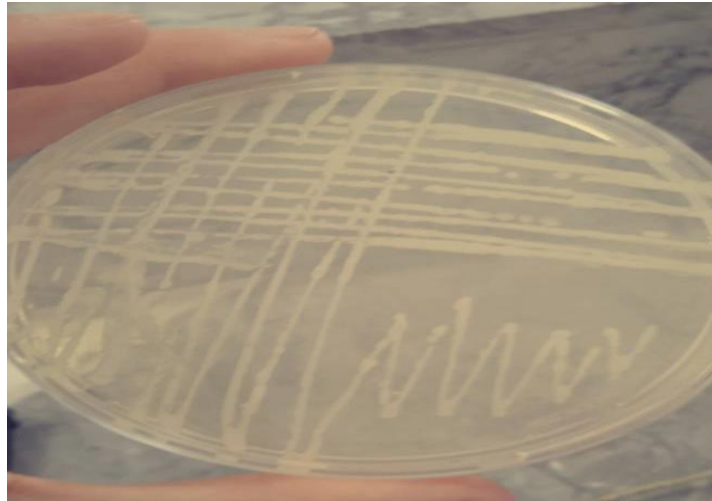


Figure 12: Résultat macroscopique d'un isolat pur

Table 1: Résultat macroscopique des six isolats

Souche	Technique d'isolation	Forme	Couleur	Aspect
A1	Direct	Grande et crémeuse	Blanchâtre	B.b
			Transparente	NB.p
A2	Dilution	Petite, circulaire et crémeuse	Blanchâtre	B.b
			Transparente	NB.p
B1	Direct	Grande et crémeuse	Blanchâtre	B.b
			Transparente	NB.p
B2	Dilution	Petite, circulaire et crémeuse	Blanchâtre	B.b
			Transparente	NB.p
C1	Direct	Grande et crémeuse	Blanchâtre	B.b
			Transparente	NB.p
C2	Dilution	Petite, circulaire et crémeuse	Blanchâtre	B.b
			Transparente	NB.p

(**B** : brillante ; **NB** : non brillante ; **b** : bombé ; **p** : plate)

Table 2: Résultat microscopique des six isolats

Souche	Aspect	Gram
A1	Bacilles	-
A2	Bacilles	-
B1	Coques	+
B2	Coques	+
C1²	Bacilles	+
C2	Bacilles	+

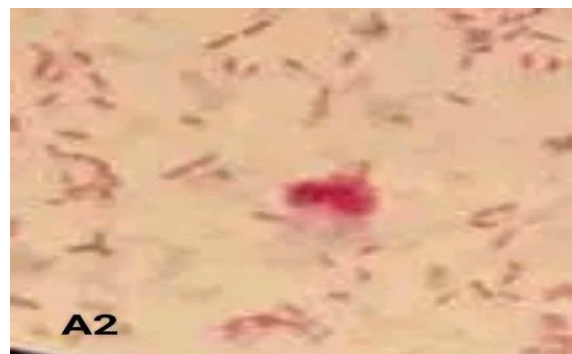


Figure 13: Observation microscopique des bacilles à gram négatif

Les quatre autres isolats (**B1 ; B2 ; C1 ; C2**) sont un mélange entre des coques à gram positif et des bacilles à gram positif donc ils ne sont des *Pseudomonas* (fig. 14) ;

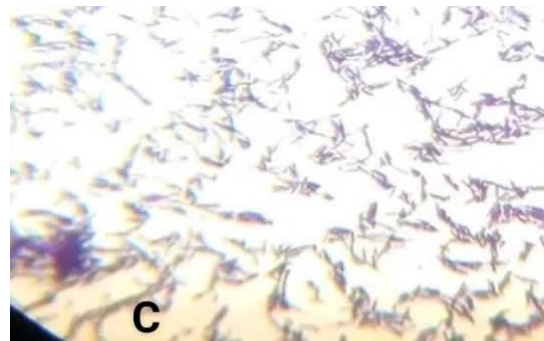
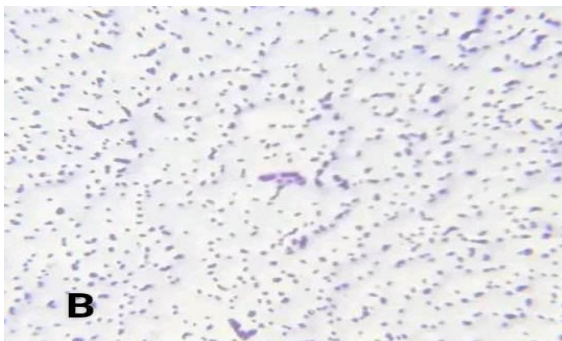


Figure 14: Observation microscopique des coques à gram positif (B) et des bacilles à gram Positif (C)

Durant la période de la recherche de la bactérie *P. savastanoi pv savastanoi* on a pu isoler deux souches de champignons à partir des échantillons **B** et **C**

Caractères macroscopique des deux souches fongiques

Nous avons observé des colonies vert foncé olivâtre et un aspect cotonneux avec une périphérie légèrement compacte et des bordures irréguliers, compactes de couleur claire. la surface des colonies est souvent hétérogène, présentant des zones blanches constituées exclusivement d'hyphes aériens et des zones sombres rasantes renfermant les spores asexuées mélanisées ce qui correspond à la souche *Alternaria sp* décrit par (**Fraser, 2002**).



Figure 15: Observation macroscopique des souches fongiques

Caractères microscopique des deux souches fongiques

Les hyphes, septes, sont ramifiés et tardivement certains filaments sont pigmentés en brun. Les conidiospores sont cloisonnés, bruns, simples ou ramifiés, plus ou moins droits ou flexueux (géniculés). Les conidies ou porospores sont brunes, pluricellulaires, d'aspect piriforme ou ovoïde, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important. Ce sont des dictyospores. A maturité, elles présentent à la fois des cloisons transversales, obliques ou longitudinales. Ces spores à paroi lisse ou verruqueuse et de taille importante, sont souvent disposées en chaînes. Ces caractères microscopiques de la souche fongique *Alternaria sp* correspondent à ceux décrit par **Simmons, 2000**.



Figure 16: Observation microscopique de l'*Alternaria* sp

Les colonies obtenues à partir des deux souches de *Pseudomonas* (A1 ; A2) sont utilisées pour réaliser une série de tests biochimiques pour les identifier.

2.2 Les tests biochimiques

2.2.1 Le test de KOH : (confirmation de la coloration de gram)

Les résultats obtenus dans ce test montrent que les deux colonies isolées appartiennent au Gram -, sur la lame on a observé une solution très visqueuse qui prend une forme de filament mucoïde (**Fig. 15**).

Selon (**Crégersen, 1978**) : Seules les bactéries de type gram négatives sont lysées lorsque les cellules sont mélangées avec une solution de KOH à 3% (P/V).

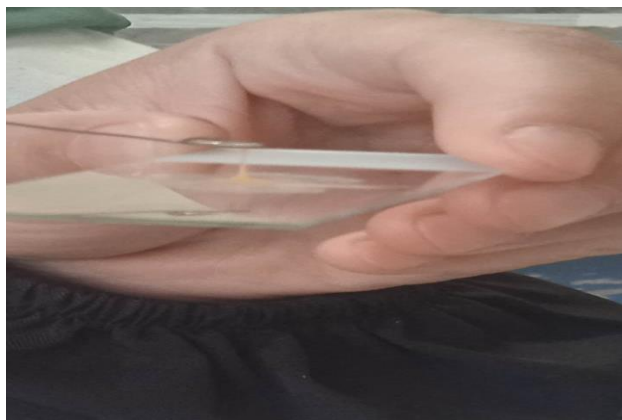


Figure 15: Résultat du test KOH

2.2.2 Le test de catalase

La bactérie qui contiennent l'enzyme de catalase dite bactérie à catalase +, peuvent décomposer le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau : $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Cette décomposition forme des bulles grâce à cette l'enzyme (Kird et al, 2009). Le test est positif pour les deux isolats (Fig. 16).



Figure 17 Résultat du test catalase (+)

2.2.3 Le test oxydase :

Les résultats de ce test montrent que les deux isolats (A1 ; A2) présentes une réaction négative (absence de coloration violette), (Fig.17) ; ça veut dire absence de l'enzyme oxydase, qui est l'enzyme responsable d'une réaction oxydoréduction, en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons. (Meziani, 2012).



Figure 16: Résultat du test Oxydase

2.2.4 Le test de fluorescence sur King :

Parmi les caractères essentiels des *P. Savastanoi PV Savastanoi* la fluorescence sous la lumière U-V. Les colonies cultivée sur le milieu king –B produisant une pigmentation jaune-verdâtre qui fluorescents (pyoverdine),

Dans ce test on a observé la fluorescence dans les deux isolats (**Fig. 18**).



Figure 17: Résultat du test fluorescence sur King B

2.2.5 Le test de l'activité pectinolytique

Nos résultats concernant le test pectinase sur pomme de terre ont montré que les deux souches (**A1 ; A2**) ont dégradé la pectine et ont formé une nécrose donc sont de pectinase positive (**Fig.19**).



Figure 18: Résultat du test de l'activité pectinolytique

2.2.6 Les test de mannitol mobilité

Les résultats obtenus sur milieu mannitol-mobilité ont montré que les deux souches **A1** et **A2** sont mobiles et se diffusent dans la gélose molle, sans acidification du milieu révélée ;ce qui prouve qu'elles n'ont pas la capacité de fermenter le sucre mannitol, résultat obtenu est négatif (**Fig. 20**).



Figure 19: Résultat du test mannitol-mobilité

Nos résultats confirment ceux des travaux menés par (**Benyoub, 2020 ; Malki et Guellab, 2020 ; Boulssen et Bouraoui, 2016 ; Fatmi et Sammar, 2019**) et montrent que *Pseudomonas. Savastanoi PV Savastanoi* est une bactérie de type bacille, Gram négatif, catalase positif, oxydase négatif, mobile, elle n'a pas la capacité de fermenter le sucre mannitol.

2.3 Caractérisation des trois huiles essentielles () :

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation des plantes sèches. La formation de la 1ère goutte d'huile essentielle est observée après 20 minutes de chauffage. Une fois la température stabilisée à 100 °C et au bout de 3 heures d'hydrodistillation, nous avons récupéré environ 350 ml de distillat.

Ainsi les huiles essentielles obtenues sont séparée de l'hydrolat par la décantation (Fig. 21)



Figure 20: photo des huiles essentielles extraites

2.3.1 Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles

Le résultat de la caractérisation des huiles essentielles des trois plantes (l'aspect, la couleur et l'odeur), sont représentés dans le tableau n° 3

Table 3: Caractéristiques organoleptiques des huiles testées

Caractéristiques organoleptiques	L'origan	Le faux poivrier	L'eucalyptus
Aspect	Visqueux	Visqueux	Liquide
Couleur	Jaunâtre	Transparente	Jaune pale
Odeur	Fort	Fort	Fort

2.3.2 Résultats du rendement des huiles essentielles

Les résultats obtenus montrent le rendement le plus élevé est enregistré par l'origan de la région de Tissemsilt avec 1,68%, ce rendement est élevé par rapport à celui de **Mahfouf, 2018** avec l'origan de région de Guelma avec 1,15%, celui

de **Derwich et al. (2010)** avec l'origan du Maroc avec 1,15 et celui de **Mechergui et al. (2010)** avec l'origan de Tunisie avec un rendement de 0,1-0,7%.

Le faux poivrier étudié dans ce travail possède un rendement relativement égal au rendement d'origan (1,66%). Cependant, aucun travail antérieur n'a mentionné la valeur de rendement du faux poivrier.

Le rendement de l'huile essentielle d'eucalyptus est le plus faible dans notre étude (0,45%), il est presque égal à celui trouvé par **Karmiche et Chaougui, 2013** qui marqué la valeur (0,48%) (**Fig. 22**)

La différence enregistrée entre les rendements de l'huile essentielle des trois plantes étudiées est probablement liée aux facteurs suivants :

- ◆ Période de récolte
- ◆ La zone géographique de collecte.
- ◆ Le climat
- ◆ la méthode d'extraction (**besombes, 2018**).

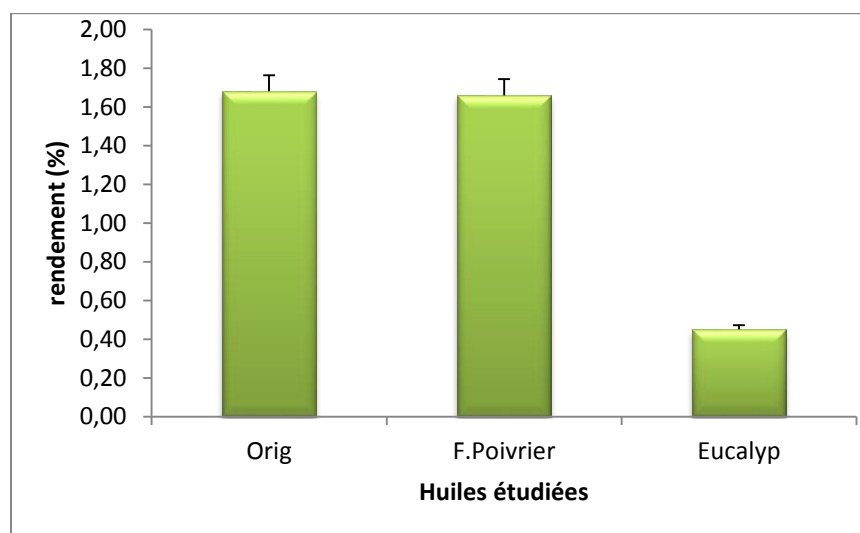


Figure 21: Représentation graphique des rendements des huiles testées

➤ **Les analyses physico-chimiques des huiles essentielles**

Les analyses physico-chimiques des huiles essentielles ont concerné la densité des huiles extraites, l'indice de réfraction, dont les résultats sont représentés en histogrammes comme suit :

2.3.3 Résultats et discussion de la densité des huiles testées :

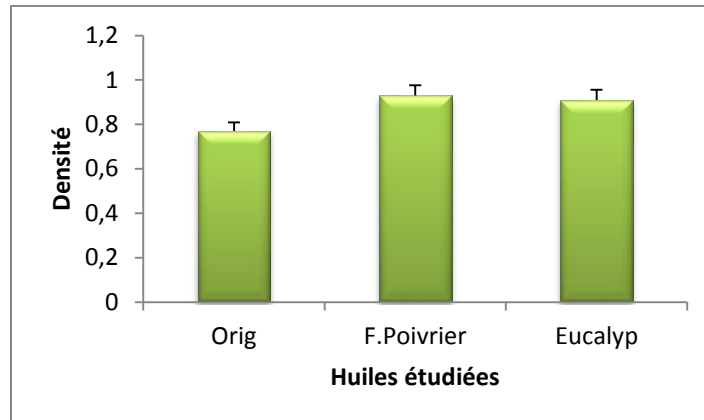


Figure 22: Représentation graphique de la densité des huiles testées

D'après les résultats obtenus, (**Fig.23**) la densité de l'EH de l'origan est un peu moins 0,77g/l que les deux autres huiles qui ont presque la même densité (Faux poivrier 0,93g/l et l'Eucalyptus 0,91g/l).

Ces résultats sont similaires avec ceux de (**Didi Amel et Koull Manal ,2021**) qui ont travaillé sur le faux poivrier de la région du Sud Algérien (0,92 g/l)

En ce qui concernant l'huile nos résultats sont différents avec ceux de **Boulaghmen, (2012)** qui a travaillé sur l'origan (0,97 g/l).

Indice réfraction

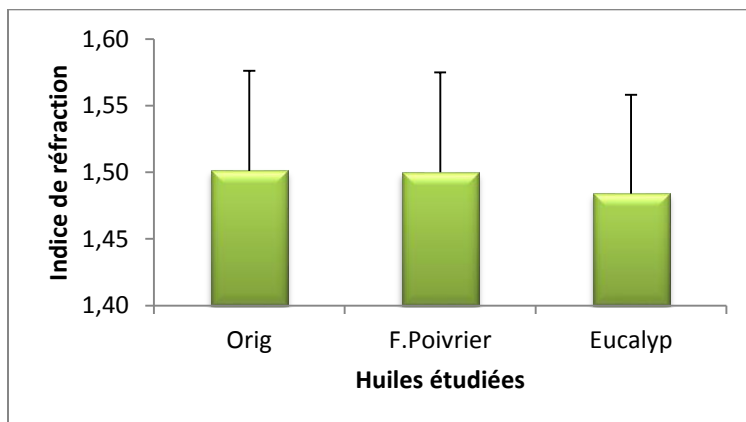


Figure 23: Représentation graphique de l'indice de réfraction des huiles testées

L'indice de réfraction des trois huiles essentielles est presque le même. Il est normatif selon les standards français des huiles essentielles. Cet indice indique la capacité de l'HE à réfléchir la lumière. Ce rapport est généralement élevé, il est supérieur à ceux de l'eau à 20°C= 1.3356 (**Fig .24**) .

2.4 L'évaluation de l'activité Antibactérienne des huiles essentielles

2.4.1 Résultats de l'aromatogramme

Afin d'interpréter nos résultats, nous nous sommes basés sur l'échelle d'interprétation de **Duraffourd (1990)** ; selon laquelle, une souche bactérienne est considérée comme résistante (-) à un extrait végétal si son diamètre d'inhibition est égal à 6 mm ou inférieur à 8 mm, elle serait de sensibilité limitée (+) si son diamètre d'inhibition est compris entre 8 et 14 mm, de sensibilité moyenne (++) si son diamètre d'inhibition est compris entre 14 mm et 20 mm et enfin très sensible (+++) si son diamètre d'inhibition est supérieur à 20 mm.

Activité antibactérienne des trois huiles essentielles (*Origanum vulgare*, *Schinus molle* et *Eucalyptus radiata*) est obtenue par la mesure du diamètre de la zone (Fig.26) (en mm) après 24h d'incubation à une température adéquate de 27 °C.

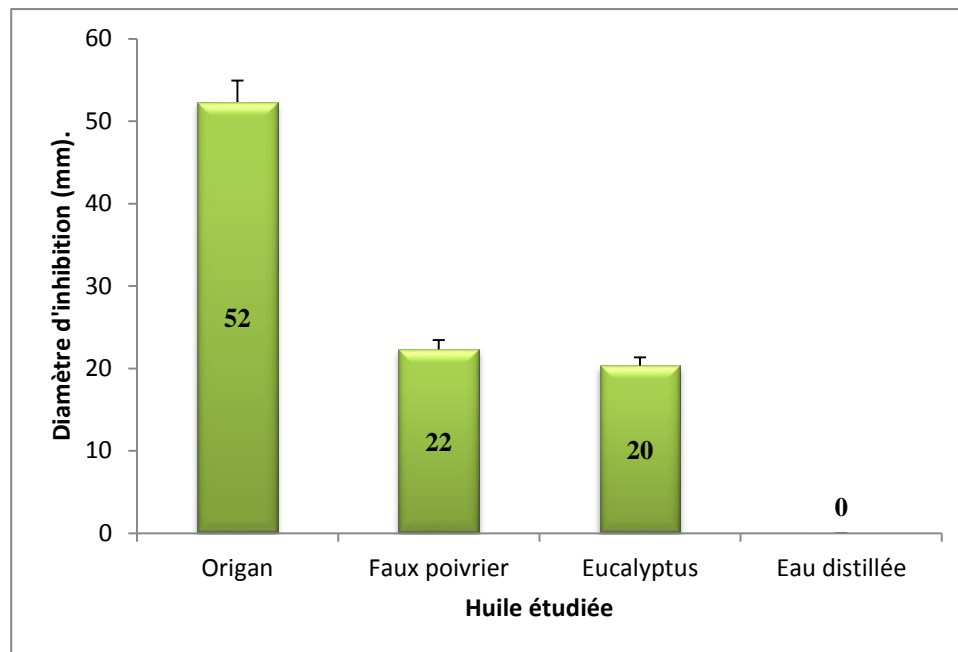


Figure 24: Représentation graphique de l'aromatogramme

Les résultats obtenus (Fig.25) montrent que la bactérie *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* est très sensible (+++) pour les trois huiles essentielles ces résultats sont conformes avec ceux de Duraffourd (1990).

En effet, ces résultats sont similaires à ceux menées par Bekka, 2009 sur l'effet de l'origan sur *Pseudomonas aeruginosa* et par Ahmed Serier, 2016 sur l'effet d'eucalyptus sur *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*. Concernant le l'effet de faux poivrier sur *Pseudomonas* aucun travail n'est indiqué.



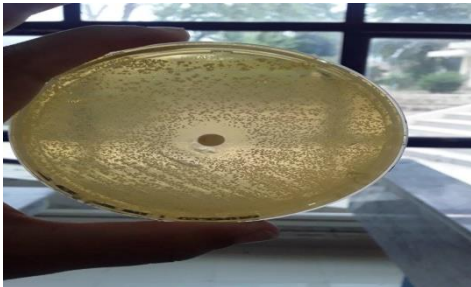
Huile Essentielle	Photos de l'effet antibactérien des huiles testées
Origan	
Faux poivrier	
Eucalyptus	

Figure 25: Photo des résultats de l'aromatogramme

2.5 Résultats et discussion de l'évaluation de l'activité Antibactérienne des antibiotiques

2.5.1 Résultats de l'antibiogramme

Le test d'antibiogramme permet d'analyser l'effet des molécules antibiotiques sur une souche bactérienne en utilisant un milieu de culture. Ainsi il donnera des indications sur l'efficacité in vitro de ces antibiotiques.

Pour effectuer cette analyse selon la méthode standard, la culture bactérienne est ensemencée sur la surface d'une gélose Mueller-Hinton. Des disques de papier buvard pré-imprégnés d'une quantité connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose.

L'antibiotique se diffuse à partir du disque en créant une zone d'inhibition. En mesurant les diamètres d'inhibition avec une règle graduée (mm) et en les comparant aux valeurs de référence, il est possible de définir la catégorie de la souche étudiée.

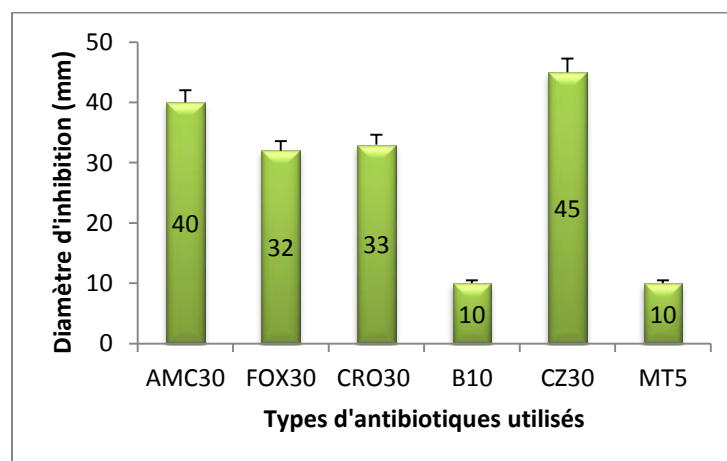


Figure 26: Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme

Selon les recommandations du CA-SFM (2015), en comparant les valeurs mesurées avec les diamètres critiques, on peut classer la souche bactérienne selon

leurs diamètres d'inhibition pour chaque antibiotique en deux catégories bien définis sensible ou résistantes.

Les résultats obtenus nous ont permis (**tab. n°4**) de donner le degré de résistance ou sensibilité de la bactérie envers les antibiotiques testés.

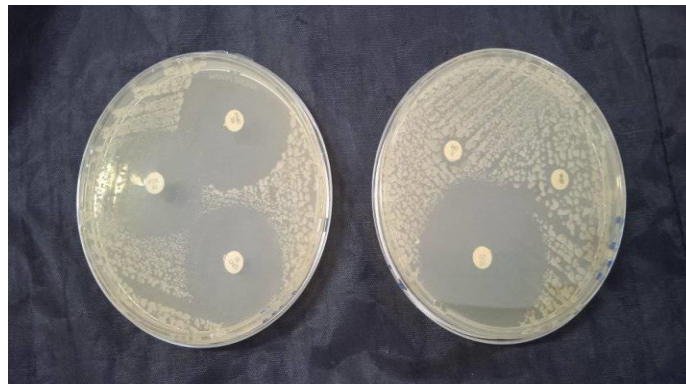


Figure 27: Photo des résultats de l'antibiogramme

Tableau 04: Profils de résistance des souches caractérisées

Table 4: Résultat du profil de résistance de la bactérie aux antibiotiques testés

ATB	Profils de résistance
AMC30	S
FOX30	S
CRO30	S
B10	R
CZ30	S
MT5	R

(S : la souche est sensible ; R : la souche est Résistance)

Les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès Thérapeutique est forte et les souches catégorisées R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement d'antibiotique utilisé.

D'après les résultats d'antibiogramme (**Fig.27**) on remarque que la souche bactérienne *Pseudomonas savastanoi* est sensible à l'ensemble des antibiotiques utilisés (**Amoxicilline, Cefoxitin, Ceftiaxon, Cefazolin**). Et résistante aux autres antibiotiques (**Amphotéricine et Metrnid**).

Ces résultats sont différentes de ceux de **Malki et Guelab, 2019 ; Boulssen et Bouraoui, 2016**) qui ont trouvé que la bactérie *Pseudomonas savastanoi* est résistante à l'Amoxicilline ; Ainsi aucune étude n'a travaillé par les autres antibiotiques qu'on a utilisé.

Les substances antibactériennes sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les bactéries ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques, les huiles essentielles et le sulfate de cuivre.

2.6 L'évaluation de l'activité Antibactérienne des huiles essentielles, des antibiotiques et du sulfate de cuivre

Concernant le produit curatif CuSo_4 , son effet sur la souche de *Pseudomonas savastanoi* est un peu plus faible par rapport aux huiles essentielles et les antibiotiques (la zone d'inhibition est 10 mm). (**Fig.29**) .

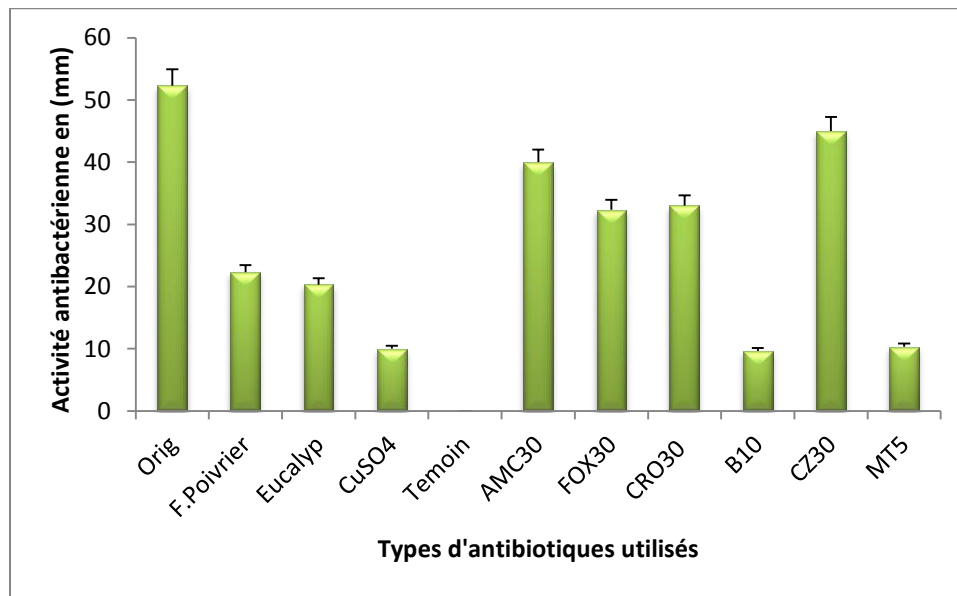


Figure 28: Représentation graphique globale de l'activité antibactérienne

En effet, d'après L'histogramme représentatif du global de l'aromatogramme et le l'antibiogramme (**Fig .29**) des résultats obtenus montre clairement que l'huile essentielle de l'origan a donné les meilleurs résultats et que les huiles et les antibiotiques ont un effet inhibiteur sur la bactérie *Pseudomonas savastanoi* ce qui a été confirmé par les études menées par **duraffourd, (1990)**.

Alors que la grande sensibilité de la bactérie *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* a été enregistrée sous l'effet de l'huile essentielle de l'origan avec une zone d'inhibition d'environ 52mm, suivie par l'antibiotique de *cefazolin* d'environ 45mm, *Amoxicilline* (40mm), *le Cefoxitin et Ceftiaxon* une activité modéré avec une zone d'inhibition presque la même est égal à (33mm) ;

L'huile essentielle de *Schinus molle* et *d'eucalyptus radiata* montre un effet antibactérien un peu plus faible par rapport au reste des tests avec zone d'inhibition respectivement d'environ 22 et 20mm.

Alors que le sulfate de cuivre, la *Amphotéricine* et *Metrnid*, ont donné une activité antibactérienne négligeable sur la bactérie *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*.

*Conclusion générale et
perceptives*

Conclusion

Cette étude a porté sur l'isolement et l'identification de quelques isolats bactériens à partir des tumeurs d'oliviers plantés en isolés dans une exploitation arboricole de la wilaya de Tiaret. C'est l'une des maladies les plus dangereuses qui touchent l'oléiculture causée par (*pseudomonas savastanoi pv.savastanoi*), cette bactérie s'attaque également à d'autres plantes comme (laurier rose, le frêne, le jasmin, le fusain...etc).

Pour arriver à isoler *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* il faut choisir des oliviers possédant un grand nombre de tumeurs jeunes (fraîches) et répéter l'isolement plusieurs fois

Les résultats de cette étude révèlent d'abord une certaine diversité des espèces bactériennes identifiées. Au total, six isolat ont été isolées à partir des tumeurs d'olivier, deux souches ont été identifiées comme *pseudomonas savastanoi pv.savastanoi* (A1 et A2) et Le reste des souches n'ont pas été identifiées comme *pseudomonas savastanoi pv.savastanoi* .

Les résultats de cette étude montrent que *Pseudomonas. Savastanoi PV Savastanoi* est une bactérie de type bacille, Gram négatif, catalase positif, oxydase négatif, mobile, elle n'a pas la capacité de fermenter le sucre mannitol.

Les huiles essentielles de *l'origanum vulgare*, *Schinus molle* et *l'eucalyptus radiata* ont été obtenues par hydrodistillation avec les rendements de 1.68 %,1.66% et0.45% La détermination des caractères organoleptiques et physicochimiques (densité, indice de réfraction) a donnée des résultats pour la plupart différents de ceux donnés par la littérature.

Les résultats de l'aromatogramme ont démontré que l'huile essentielle de *l'origanum vulgare* présente un important pouvoir inhibiteur contre *Pseudomonas savastanoi*

La sensibilité aux antibiotiques a été démontrée par l'application d'un antibiogramme qui permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne. Il permet donc de juger l'efficacité d'un antibiotique et selon lequel les bactéries ont été divisées en deux catégories différents: résistantes, ou sensibles.

Les résultats d'antibiogramme ont révélé que la souche bactérienne *Pseudomonas savastanoi* est sensible à certains antibiotiques utilisés, (*Amoxicilline, Cefoxitin, Ceftriaxon et Cefazolin*)

Perspectives

- Penser à utilisation des antibiotiques naturels à base des plantes à la place des antibiotiques synthétiques.
- Compléter notre étude par la quantification des teneurs en polyphénols des huiles essentielles.

Références

Bibliographiques:

Références bibliographiques:

1. **Ahmed Serier Asma, (2016).** Evaluation de quelque activité biologique de l'huile essentielle de l'Eucalyptus radié (Mémoire de Master) Université de Blida
2. **APP. (2010).** Projet arboriculture fruitière, Évaluation Environnementale Stratégique du PAF dans les secteurs de bours et irrigués. L'Agence du Partenariat pour le progrès, TC-1A et TC-1B, 145.
3. **Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G. et Karadogan, T. (2004).** Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. Food Control. 15: 169–172.
4. **Benyoub, khkira. (2011).** 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'ADNplasmidique .Mémoire du magister .université des sciences et de la technologie d'Oran « Mohamed Boudiaf ,33p.
5. **Bendahou M., Benyoucef M., Benkada D., Soussa Elisa M.B.D., Galvao E.L., Marque M.M.O., Muselli A., Desjobert J.M., Bernardini A.F., Costa J. (2007).** Influence of the processus extraction on essential oil of Origanum glandulosum. Journal of applied sciences 7(8): 1152-1157.
6. **Benzeggouta N. (2005)** Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments. Mémoire de Magister, Université Mentouri- Constantine.
7. **Bekka Fahima.,(2009).** Effet des huiles essentielles d'Origanum glandulosum Desf. et d'Artemisia herba alba Asso. sur des bactéries multirésistantes (Mémoire de Magister) Université Abderrahmane MIRA de Béjai .
8. **Bensaber Dalila et Fortas Warda, (2021).** Isolement, identification et traitement de pseudomonas savastanoi, agent causal de tuberculose d'olivier (Mémoire de Master) Université YAHIA FARES DE MEDEA
9. **Benjama A. (1990).** Isolement et identification de l'agent pathogène de la tuberculose d'olivier au Maroc. Al Awamia, 72 : 57-69.

Références bibliographiques

10. **Benjama A. (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*, 58 (4) : 213–219
11. **BOUKHATEM M N, HAMAIDI M S, SAIDI F, HAKIM Y. (2010)**-Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie)., *Nature & Technologie*.,3.,37-45p
12. **Boulssen Bouthaina Zahra et Bouroui Nour El Houda (2016)**. Etude de la tuberculose de l'olivier, isolement et identification présomptifs et quelques isolats bactériens à partir des tumeurs. Mémoire de master en Sciences biologique, sous la direction de Dr. Karima Boubekri, Constantine, Université des Frères Mentouri Constantine 1, 79p.
13. **Botelho G.R., Leda C.M. (2006)**. Fluorescent pseudomonas associated with the rhizosphère of Crops-an overview. *Brazilian journal of Microbiology*.37:401-416.
14. **Boulaghmen, (2012)**. Extraction des huiles essentielles de l'origan (Thèse de Doctorat) Université de Blida
15. **Boutkhil S. (2012)**. Les principales maladies fongiques de l'olivier (*Olea europea* L.) en Algérie : répartition géographique et importance. Mémoire de Magister en biotechnologie. Université d'Oran, faculté des sciences. 133 p
16. **Buonaurio, R., Moretti, C., Passos da Silva, D., , Cortese, C., Ramos, C., and Venturi, ,V. (2015)**. The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Frontiers in Plant Science*, 6:434.
17. **CA-SFM, (2010)** .Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
18. **CA-SFM, (2015)** .Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
19. **COI, (2007)**. Conseil oléicole international, Techniques de production en oléiculture. ISBN: 978-84-931663-8-0, <http://www.internationaloliveoil.org>, Première édition, 346.
20. **Derwich, E., Benzyane, Z., Mnar, A., Boukir, A., Taouil, R. (2010)**. Phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* from Morocco. *American Eurasian Journal of Scientific Research* .5(2), 120-129.

Références bibliographiques

21. **Didi Amel et Koull Manal ,(2021).** Etude comparative de deux huiles essentielles du Faux poivrier de la région du Sud Algérien (Mémoire de Master) Université KASDI MERBAH OUARGLA.
22. **Duraffourd, C., D’Hervicourt, L., Lapraz, JC. (1990).** Cahier de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique. Eléments Thérapeutiques Synergiques. 2ème édition, Ed., Masson (Paris), 87 p
23. **Ercolani, G.L. (1978).** *Pseudomonas savastanoi* and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field. *Journal of General Microbiology*, Vol. 109, (December 1978), pp. 245-257, ISSN 0022-1287.
24. **Fatmi Feryal et Sammar Malak, (2019).** Caractérisation de la bactériose de l’olivier à *Pseudomonas savastanoi* et autres bactéries endophytes à partir de l’olivieraie située à Amira Arrès, Wilaya de Mila (Mémoire de Master) Université des Frères Mentouri-Constantine1
25. **Fraser,J,T.(2002).** Two species of *Alternaria* cause early blight of potato(*Solanumtuberosum*) and tomato(*Lycopersiconesculentum*).thesis.Master of Science.Cornell University.72p
26. **Gardan; Shafik, H; Belouin, S; Broch, R; Grimont, F; Grimont, PA; et al. (Apr 1999).** "DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959)". *Int J Syst Bacteriol.* 49 (2): 469–78. doi:10.1099/00207713-49-2-469. PMID 10319466.
27. **Iacobellis, V., P. Claps, M. Fiorentino, (1998):** Sulla dipendenza dal clima dei parametri della distribuzione di probabilità delle pieneXIV Convegno di Idraulica e Costruzioni IdraulicheUniv. of CataniaCatania, Italy,.
28. **Janse, J. D. 1981.** The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*), caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fruxini*. I. History, Occurrence and symptoms. *Eur. J. For. Pathol.* 11:306-315.
29. **Janse, J. I). 1981.** The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*), caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv.*frarini*. 11. Etiology and taxonomic considerations. *Eur. J. For. Pathol.* 1k425-438.
30. **Karmiche, N., et Chaougui, M .A. (2013).** Les activités antifongiques et antioxydants des huiles essentielles d’artimisia herba alba et *Eucalyptus globulus*, mémoire de master, constantine .P46.

Références bibliographiques

31. **Kheddache Khadidja et Bettayeb Fatma Zohra. (2018).** Recherche et identification préliminaire de *Pseudomonas savastanoi*, agent causal de la tuberculose dans quelque oliveraies de Bouira (Mémoire de Master) Université de Bouira
32. **KHOLKHAL F. (2014)-** Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus*, ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*, thèse doctorat., Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.
33. **Klement Z., Rudolph K., Sands D.C. (1990).** Methods in phytobacteriology, Kluwer Academic Publishers. Budapest. P.56
34. **Kouidri Mohamed, 2008.** (Mémoire magister) Université Hassiba Ben Bouali –Chlef. Extraction et caractérisation physico-chimique de l'huile d'Argan provenant d'arbres cultivés dans deux régions de l'Algérie.
35. **Krid, S., Rhouma, A., Quesada, J., Penyalver, R., & Gargouri, A. (2009).** Delineation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated in Tunisia by random-amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of applied microbiology*, 106(3), 886-894.
36. **Mahfouf Nora, 2018.** Étude de l'espèce *Origanum vulgare* L. (Thèse de Doctorat) Université CHADLI BENJEDID – EL TARF
37. **Malki Meriem et Guellab Sabrina. (2020).** La tuberculose de l'olivier (Mémoire de Master) Université de Medea.
38. **Mechergui, K., Coelho, JA., Serra, MC., Lamine, SB., Boukhchina, S., Khouja, ML. (2010).** Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *Glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.* 90:1745-1749.
39. **Meziani M. (2012).** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques: Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. Diplôme de magister, biochimique. P 8.
40. **OUIS N. (2015)-** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil, et de persil., thèse doctorat., Université Oran1.
41. **Penyalver, R., Garico, A., Bertolini, E. & Lopez, M. (2000).** Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Olive Plants by Enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*: 2673-2677.
42. **Philippe Lepoivre .(2007).** les procaryotes phytopathogènes chapitre 4 de phytopathologie .2nd ed., Freeman ,New York,432p

Références bibliographiques

43. **Quesada, J.M., Pérez-Martínez, I., Ramos, C., López, M.M., and Penyalver, R. (2008)** IS53: an insertion element formolecular typing of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savas-tanoi*. *Res Microbiol* 159:207–215.
44. **Rathore, M., Sharma, M., et Sharma, N., (2000)**. Microbial pectinase: sources, characterization and application, *Environmental Science and Biotechnology*, DOI 10. 1007/s11157-012-9276-9.
45. **Ryu, E. (1938)**. On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *Journal of the Japanese Society of Veterinary Science*
46. **Schiff-Giorgini, R. (1906)**. Untersuchungenüber die tuberkelkrankheit des oelbaumes. *Centralb. Bakteriol., Parasitenk. Abt. 2.* 15, pp. 200-211
47. **SerdounBekri, N. (2013)**. Détection de *Pseudomonas savastanoi*, agent 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. 2013, 58.
48. **Simmons, E. G. (2000)**. *Alternariathemes and variations (244-286) species on Solanaceae*. *Mycotaxon*, 75, 1-115.
49. **Vasseur, J. (2009)**. Séchage : principe et calcul d'appareils – séchage convectif par air chaud (parti 1). *Technique de l'ingénieur. Opérations unitaires : Evaporation et séchage, base documentaire (Ref : Article, j2451)*.
50. **Wilson, E.E. & Magie, A.R. (1964)**. Systemic invasion of the host plant by the tumorinducing bacterium, *Pseudomonas savastanoi*. *Phytopathology*, Vol. 54, pp. 576-579,
51. ISSN 0031-949X.
52. **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.
53. **Young, J. M., D. W. Dye, J. F. Bradbury, C. G. Panagopoulos, and C. F. Robbs. 1978**. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N.Z. J. Agric. Res.* 21:153-177.
54. **Zohary, D. & Spiegel-Roy, P. (1975)**. Beginning of fruits growing in the old world. *Science*, 187: 319- 27
55. **Zohary, d, (1973)** : domestication of pulses in old world, *science* 182: 887

Références bibliographiques