



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE  
ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département : Microbiologie**

**قسم : الميكروبيولوجيا**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes**

Intitulé :

---

**Etude sur la tuberculose de l'olivier ; isolement et identification  
présomptifs de quelques isolats bactériens à partir des tumeurs.**

---

**Présenté et soutenu par :**

**Boulssen Bouthaina Zahra**

**Bouraoui Nour El Houda**

**Soutenu le : 04/07/2016**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mme. Guergouri Ibtissem (MAA- UFM Constantine).

**Rapporteur :** Dr. Boubekri Karima (MCA- UFM Constantine).

**Examinatrice :** Mme. Bouzeraib Latifa (MAA- UFM Constantine).

**Tutrice :** Mlle. Tir Radja

**Année universitaire  
2015 – 2016**

## **Remerciements**

*Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Biologie Moléculaire du département de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université des frères Mentouri.*

*Le grand Merci nous le réservons à DIEU le tout puissant pour le courage et la volonté qu'il nous a accordé pour mener à bien notre travail.*

*Nous remercions le Directeur de l'INPV, Monsieur le Kikout pour son soutien et de nous avoir donné la chance et le privilège de donné le droit pour visualisé comment travaillé au niveau de votre laboratoire bactériologique.*

*Nous tenons à exprimer nos remerciements à tous les membres du l'institut national de protection des végétaux (INPV) de Constantine à leur tête Madame Akila qui nous a énormément aidé. Merci pour votre noblesse. Aussi merci à Monsieur Boukhayoute pour sa gentillesse et pour ses efforts avec nous.*

*Merci à Madame Nadjate la responsable du laboratoire de Biologie Moléculaire qui nous a beaucoup aidé tout au long de notre stage ainsi que l'ingénieur du laboratoire Monsieur Sadak.*

*Nous remercions profondément notre encadreur madame Boubekri, K. (Maitre de conférences à l'université de Constantine 1), pour son soutien et les efforts fournis pour nous diriger vers la bonne voie et n'oublions jamais ses critiques bénéfiques pour nous diriger vers un esprit scientifique.*

*Nous remercions également les membres du jury qui nous ont fait un grand honneur en acceptant de participer à l'évolution de notre travail de mémoire.*

*Merci à tous nos enseignants pour leurs efforts puissants au cours de toutes ces années et nous leur exprimons toute notre gratitude pour leur aide. Nous saluons également toutes leurs qualités humaines si rares de nos jours.*

*Nous adressons également un profond remerciement à la doctorante Tír Radja, pour ses encouragements, son support et ses conseils tout au long de notre stage. Merci pour la richesse des échanges et toute l'aide précieuse que vous nous avez apporté et nous vous souhaitons beaucoup de succès dans votre recherche.*

*Nous tenons à remercier également Mr Bounouare Farid, et Monsieur Larraba Djamel, pour leur générosité et leur disponibilité.*

*Nous remercions le propriétaire du verger de Sid Ali Monsieur Alali Mourad, de nous avoir permis de prélever les échantillons nécessaires pour nos études. Nous le remercions pour son humilité et pour son accueil chaleureux.*

*Nous tenons à remercier également le responsable du laboratoire de biotechnologie Monsieur Benhiziya de nous avoir donné le droit d'utiliser le matériel qui nous manquait au niveau de laboratoire de biologie moléculaire.*

*Un grand merci chaleureux pour tous nos collègues. Nous avons partagé ensemble nos doutes et nos craintes, nous n'oublierons jamais tous les moments que l'on a partagés ensemble.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents, « Amar » et « Fatíha » que Dieu me les gardent et Protègent et qui m'ont donné le droit d'être dans ce monde.*

*A mes chères sœurs : Hadjer et Malek.*

*A mes chers frères : Issam et Mohamed et Waíl.*

*A mes très chers amis sans citer les noms pour leur amitié sincère, leur disponibilité, leur gentillesse sans borne.*

*A toute ma famille je leur remercie du fond du cœur pour leurs encouragements et leur soutien.*

*Bouthaina Zahra*

## *Dédicace*

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

*Mes très chers parents « Larbi » et « Samira » qui m'ont soutenu, encouragé pour que je puisse mener à bien mes études, et qui attendu ce jour avec impatience.*

*Mes chère frères : Amar, Houcine et Youcef.*

*Mes chère soeurs : Maïssa, Kawther et Khadidja.*

*Mon binome : Bouthaina*

*A tous mes amis et mes collègues :*

*Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.*

*A tout ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail*

*Nour el Houda*

---

**Table des matières**

Liste des abréviations .....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Introduction.....	1
I. Généralités sur l'arbre de l'olivier.....	3
I.1. L'origine de l'olivier.....	3
I.2. Description morphologique.....	3
I.3. Les forme De l'olivier.....	4
I.3-1. L'olivier sauvage.....	4
I.3-2. L'olivier domestique.....	4
I.4. Systématique de l'olivier.....	4
I.5. Cycle végétatif.....	5
I.6. Répartition de l'olivier dans le monde .....	6
I.7. Intérêt de l'olivier.....	8
I.8. Variétés d'olive dans le monde.....	8
I.9. Variété algérienne de l'olivier.....	9
II .Tuberculose de l'olivier.....	10
II.1. Définition.....	10
II.2. Les symptômes.....	11
II.3. Classification de <i>Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi</i> .....	13

II.4. Pouvoir pathogène.....	14
II.5. Les interactions entre <i>Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi</i> et d'autres bactéries présentes dans la tumeur.....	14
II.6. Le cycle de la maladie.....	17
II.7. Impact de la maladie.....	18
II.8. Gestion de la maladie.....	18
II.9. La répartition géographique de la tuberculose d'olivier.....	19
III. Matériel et méthodes.....	20
III.1. Echantillonnage.....	20
III.2. Isolement des échantillons.....	21
III.3. Purification et conservation des souches isolées.....	21
III.4. Identification phénotypique des isolats.....	22
III.3.1. Examen microscopique.....	22
III.3.2. Tests biochimiques.....	22
IV. Résultats et Discussion.....	27
V. Conclusion et perspectives.....	42
VI. Références bibliographiques.....	44
Annexe.....	50
Résumé.....	54

## **La liste des abréviations**

ADH : Arginine Déshydrolyase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AHLs : N-acylhomosérine lactones

AIA : Acide Indole Acétique

AMX : Amoxicilline

AN : Amikacine

C : Chloramphenicol

C.O.I: Conseil Oléicole International

CIT: Citrate

CS : Colistin

CTX : Cefotaxime

DSP : direction des services agricoles

DspA/E : protéine de défense suppressive

EDS : Eau Distillée Stérile

FAO: Food and Agricultural Organisation

Gel: Gelatine

GLU: Glucose

GN: Gélose Nutritive

H<sub>2</sub>S: Sulfate d'Hydrogène

ha : Hectare

Hrp : Hypersensitive response and pathogenicity

iaaH : indolacetamide hydrolase

iaaM : tryptophane monooxygénase

IND: Indole

INPV : Institut Nationale de Protection des Végétaux

IPM: Imipenem

μl : microlitre

K: Kanamycine

LAB : lactic Acid bacteria

LDC: Lysine Décarboxylase

MAMP : Microbial associated molecular patterns

NAS: saccharose agar nutritive

ODC: Ornithine Décarboxylase

ONPG: Ortho-NitroPhényl-β-Galactoside

PCR : Polymérase Chain Réaction

PIP : Piperacilline

PT : Pristinamycine

Pv: pathovar

QS : Quorum Sensing

RA : Rifampicine

SA : salicylique acide

SM: Solution mère

SOR: Sorbitol

SP: Spiramycine

SPT : Spectinomycine

TDA: Tryptophane Désaminase

Ti : tumeur induisant

UV : Ultra Violet

VP: Voges-Proskauer

**La Liste des figures**

**Figure 01** : des plantes d'oliviers cultivés.....05

**Figure 02** : cycle annuel de l'olivier.....06

**Figure 03** : Superficie en oliviers par classes de densité dans l'UE en 2012.....07

**Figure 04** : Superficie en oliviers par classes d'âge dans l'UE en 2012.....07

**Figure 05** : Répartition de l'olivier dans le monde.....08

**Figure 06** : des tumeurs formées sur le tronc.....13

**Figure 07** : des tumeurs formées sur les tiges.....14

**Figure 08** : une image représentant les interactions entre *Pseudomonas pv. savastanoi* (Psv, cellule bactérienne vert) et *Pantoea agglomerans* (Pa, jaune), *Erwinia toletana* (Et, rose), et *Erwinia oleae* (Eo, bleu).....15

**Figure 09** : cycle de la maladie tuberculose d'olivier causée par *Pseudomonas pv. Savastanoi* .....17

**Figure 10** : verger de Sid Ali.....25

**Figure 11** : les deux tumeurs utilisées pour l'isolement.....26

**Figure 12** : résultat de test KOH de la souche P1T1K2(1).....29

**Figure 13** : aspect macroscopique de la souche P1T1K2(1).....31

**Figure 14** : l'observation microscopique (100X à immersion) après coloration de Gram de la souche P1T1K2(1), Gram (+) coccobacilles.....32

**Figure 15** : résultats de l'identification des isolats P1T1K2(1) par la galerie API 20E.....32

**Figure 16** : résultats de l'identification des isolats P1T1K2(1) par la galerie API 20E.....32

**Figure 17** : les observations microscopiques (X100) après coloration de Gram des souches P1T1K2(2) C<sub>b</sub>, P1T1K2(2) C<sub>t</sub>, et P1T1K1(3) respectivement.....35

**Figure 18** : les catégories cliniques S, I, R selon les valeurs critiques (Vincent Jarlier DIU Mal Inf).....39

**Figure 19** : l'antibiogramme de la souche *Enterobacter cloacae* P1T1K2(1).....40

**Figure 20** : l'antibiogramme de la souche P1T1K1(3).....41

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 01</b> : les principales variétés d'olivier cultivées dans les pays méditerranéens.....	<b>09</b>
<b>Tableau 02</b> : les principales variétés nationales.....	<b>10</b>
<b>Tableau 03</b> : résultats macroscopique des quatre isolats.....	<b>26</b>
<b>Tableau 04</b> : Résultats de la morphologie des isolats.....	<b>27</b>
<b>Tableau 05</b> : Résultats de test de LOPAT.....	<b>28</b>
<b>Tableau 06</b> : les résultats de test KOH.....	<b>29</b>
<b>Tableau 07</b> : la lecture de la galerie API 20 E pour les souches bactériennes à Gram négatif.....	<b>29</b>
<b>Tableau 08</b> : les résultats des cultures à Gram négatif obtenus sur milieux sélectifs.....	<b>31</b>
<b>Tableau 09</b> : les résultats de la galerie API20E des souches à Gram positif.....	<b>34</b>
<b>Tableau 10</b> : les résultats des cultures à Gram positif obtenus sur milieux sélectifs.....	<b>34</b>
<b>Tableau 11</b> : les résultats de lecture d'antibiogramme des souches isolées.....	<b>37</b>
<b>Tableau 12</b> : les profils de résistance des souches caractérisées.....	<b>38</b>

# **INTRODUCTION**

## Introduction

L'olivier et son huile est cité dans le saint Coran et Hadith comme étant un arbre béni ; un arbre de multiples donations et bienfaits.

Les travaux scientifiques ont dévoilé l'importance d'huile d'olive par sa structure chimique qui est composé d'un pourcentage élevé d'acides gras insaturés essentiels qui sont indispensable à notre organisme, et par conséquent ils doivent être apportés par le régime alimentaire, ce qui la distingue des autres huiles. Plusieurs recherches ont aussi montré que cette huile a un grand intérêt préventif contre différents types de cancer. Les feuilles de l'olivier sont utilisées pour lutter contre les infections virales, bactériennes ou fongiques, prise en tisane le soir au coucher soignerait le cholestérol et surtout l'hypertension artérielle légère.

La culture de l'olivier, l'arbre image de la méditerranée, occupe dans le monde 8,6 millions d'hectares. En Algérie, il reste toujours l'espèce fruitière la plus dominante du verger arboricole algérien. Il occupe une superficie de 226 337 ha (33% de la surface arboricole) ce qui présente un nombre de 24.000.000 arbres (Anonyme, 2006). Les vergers oléicoles de la wilaya de Constantine occupent, en 2013, une superficie de 1.400 hectares, concentrés dans les communes d'Ain Smara, de Hamma-Bouziane et d'Ouled Rahmoun.

Malheureusement, l'olivier est sujet à différents types d'attaques d'origine fongique ou bactérienne ou ravageurs qui peuvent réduire la capacité de production, par conséquent, causer de lourdes pertes économique. C'est l'exemple de la tuberculose de l'olivier, une maladie incurable, causée par *Pseudomonas savastanoi*. En cas d'infestation, la seule solution est de déraciner les arbres atteintes, les brûler afin d'éviter la propagation et de stériliser les outils de taille des oliviers après chaque usage.

*Pseudomonas savastanoi* est une bactérie largement répandue dans le sol, l'eau et l'air, c'est un bâtonnet Gram négatif, mobile endophyte, phytopathogène causant des excroissances, dénommé galle, des nœuds ou des tumeurs, principalement sur les parties aériennes des plantes, leur incidence sur les feuilles et les fruits étant rares (Benjama, 2003 ; Young, 2004). Résident commun dans la phyllosphère d'olive. Elle a la capacité de passer d'un mode de vie épiphytique à un mode de vie parasite à chaque fois que des blessures de nature diverse lui permettent d'envahir les tissus de l'hôte (Ercolani, 1978). Le résultat macroscopique est la formation de nœuds.

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. En 2012, plus de 5.000 oliviers ont été touchés par la tuberculose à Tébessa, et en 2013, 16% des oliviers à Oran et 45% à Ain-Temouchent ont été enregistrés. Jusqu'à présent, et en absence de statistique officielle, les régions atteintes par l'infection pourraient être beaucoup plus vaste.

Depuis la création de l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV, Alger) en février 1975, et en collaboration avec la direction des services agricoles (DSA) et la Chambre de l'agriculture, importants efforts ont été déployés pour dépister et lutter contre cette maladie. Ici à Constantine, la station régionale de la protection des végétaux est l'organisme qui mène des enquêtes phytosanitaires après forte signalisation de maladie dans la région de l'est (Constantine, Mila, Jijel, Sétif et Bordj), à pour but de dépister d'éventuels organismes nuisibles dont certains ne peuvent être décelés par voie macroscopique, de vérifier l'étendue de certaines maladies déjà localisées, et prendre les mesures urgentes pour stopper leur propagation et éviter qu'elle ne s'étende vers des vergers avoisinants.

Les objectifs de ce travail sont de fournir des connaissances sur la tuberculose de l'olivier, l'observation et l'analyse des symptômes de cette maladie sur le terrain en effectuant des sorties en collaboration avec l'INPV de Constantine. L'échantillonnage à partir des oliviers infectés et l'identification présomptive de l'agent pathogène et autres bactéries vivant en communautés à l'intérieur des tumeurs en s'appuyant sur des tests phénotypiques ; coloration de Gram, morphologie et tests biochimiques.

**REVUE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. Généralités sur l'arbre de l'olivier**

### **1. L'origine de l'olivier :**

L'olivier a été l'un des premiers arbres cultivés par l'homme, il y a des preuves que les oliviers sauvages ont été utilisés depuis l'ère néolithique (entre 12500 et 7500 av. J.-C.). Le Néolithique est caractérisé par la naissance de l'agriculture et de l'élevage ainsi que la mise au point de techniques raffinées pour la taille des outils en pierre.

Une nouvelle étude réalisée en 2013 par Besnard et ses collaborateurs a mis en lumière quand et où l'olivier a été domestiqué et est devenu la source actuelle de beaucoup d'olives et d'huile d'olive comestibles.

Ces chercheurs ont étudié la propagation des géotypes les mieux cultivées en examinant l'ADN de 1.797 arbres sauvages (oléastres) et cultivées du bassin méditerranéen et en analysant leurs génomes, ils ont été en mesure de créer la généalogie des arbres et de déterminer comment la diffusion de l'arbre d'olive a progressé. Trois «pools génétiques» ancestraux de l'olivier ont été identifiées, à savoir le Proche-Orient, la région de la mer Egée et le détroit de Gibraltar.

Selon l'étude, le degré de diversification entre les olives sauvages et cultivées a indiqué que la transformation de l'olivier sauvage en celui cultivé a été d'abord produite dans la région du Levant nord-est du Proche-Orient, plus susceptible aux frontières de la Syrie et la Turquie, pour se propager aux territoires voisins et l'ensemble du bassin.

Bien que cette diversité génétique soit plus élevée dans la population d'arbres de Gibraltar, les civilisations avancées qui ont occupé le territoire Levant étaient plus compétentes et avaient assez de ressources génétiques pour réussir à domestiquer l'olivier. Le processus de domestication a eu lieu il y a environ 6.000 ans (Besnard et al., 2013 ; Vasilopoulos, 2013).

### **2. Description morphologique**

L'olivier est un arbre de 3 à 10 mètres de haut à des branches tortueuses au nombreux rameaux arrondis enchevêtrés les uns dans les autres, les tiges portent des feuilles opposées, entières, ovales allongées, portées par un court pétiole, persistantes, enroulées sur les bords, fleurit entre Mai et Juillet. Donnant des fruits drupes ovoïdes à noyau dur dont le mésocarpe

peut renfermer plus de 30 % de lipides. Ils sont utilisés par l'industrie agroalimentaire (Pangol, 1975).

L'olivier est cultivé essentiellement pour son fruit, consommé ou confi ou sous forme d'huile, mais cet arbre est aussi médicinal par ses feuilles. S'adapte bien à des conditions d'environnement extrêmes telles que la sécheresse et la chaleur. Bien qu'il exige un sol léger et aéré pour un bon développement, l'olivier tolère un large éventail de types de sols différents et résiste à des faibles températures (Kasraoui, 2016).

### 3. Les formes de l'olivier

**3-1. L'olivier sauvage :** c'est un arbre très rameux et épineux à branches quadrangulaires et à feuilles très petites. Ses fruits sont petits et produisent peu d'huile. Cette espèce est bien adaptée aux conditions de stress hydrique, par conséquent elle est utilisée comme porte greffe et dans le reboisement des zones arides et semi arides. Plus rustique, résiste mieux aux excès de température. Sa longévité et les qualités de son bois surpassent celles de l'olivier cultivé. Sa racine pivotante va chercher la nourriture à de grandes profondeurs (Maillard, 1975).

**3-2. L'olivier domestique :** il est constitué par un grand nombre de variétés améliorées, ayant une diversité phénotypique importante et qui donnent une teneur en huile assez variables selon la variété considérée. Estimé actuellement à plus de 2000 variétés d'oliviers recensées dans le monde. Selon la destination des fruits de cet arbre, elles ont été classifiées en variétés à olives de table ou variétés à olives à huile ou variétés dites à deux fins (Loussert et al., 1978).

### 4. Systématique de l'olivier

La classification classique de l'olivier est représentée comme suit selon Conquist (1981):

Règne : *Plantae*.

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*.

Classe : *Magnoliopsida*.

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Scrophulariales*.

Famille : *Oleaceae*.

Genre : *Olea*.

Espèce : *Olea europea*

La famille des oléacées comporte environ 30 genres et 600 espèces. L'espèce *Olea europaea* a longtemps été subdivisée en deux sous-espèces, *Olea europaea* var. *Europeaea* pour l'olivier domestique, et *Olea europaea* var. *sylvestris* pour l'oléastre, ou olivier sauvage (Guignard et al., 2004 ; Tourte et al., 2005).

Il existe cependant six autres sous-espèces:

*Olea europaea* subsp. *africana* (Afrique, Madagascar, Arabie)

*Olea europaea* subsp. *cerasiformis* (Canaries, Madère)

*Olea europaea* subsp. *cuspidata* (Afrique et Asie, de l'Iran jusqu'en Chine)

*Olea europaea* subsp. *guanchica* (Canaries)

*Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Algérie, Argentine, Niger, Soudan)

*Olea europaea* subsp. *maroccana* (Maroc)



Figure 01: des plantes d'olivier cultivées (Jean, 2015).

## 5-Cycle Végétatif

Tout le monde connaît la grande longévité de l'olive, et l'on peut observer des arbres millénaires avec une relative fréquence. Néanmoins, du point de vue agricole, on doit nous centrer dans la période qui va dès sa naissance à la diminution notable de sa production.

Ainsi, selon sa productivité on peut diviser la vie de l'olivier en trois étapes :

- **Étape juvénile** : de 1 à 7 ans (sans production).
- **Étape de production** : de 7 à 150 ans.

- **Étape sénile** : après les 150 ans (production basse) (AOP, 2010).

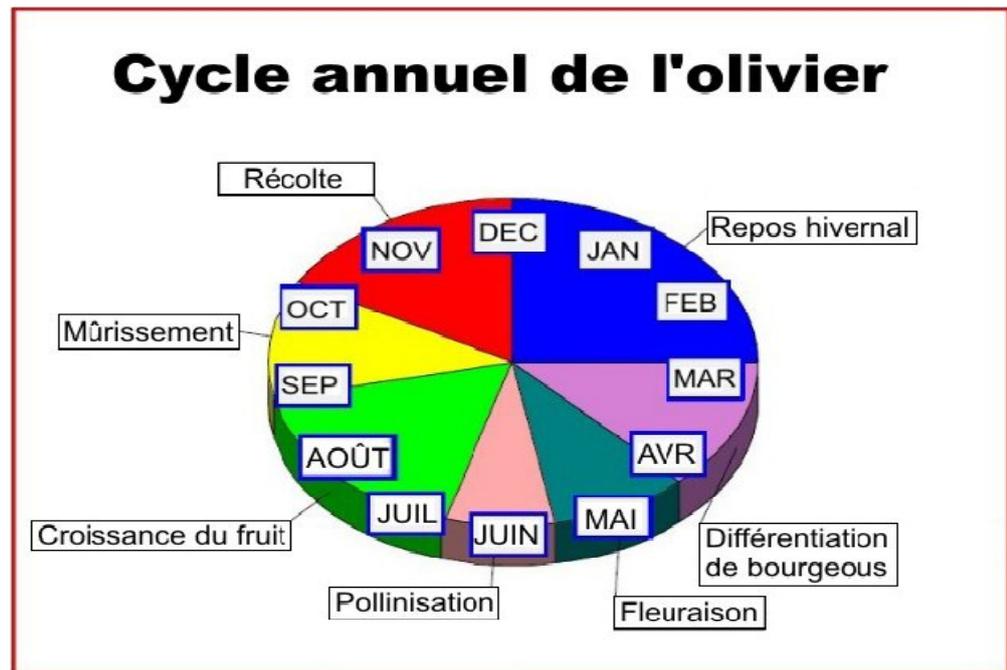


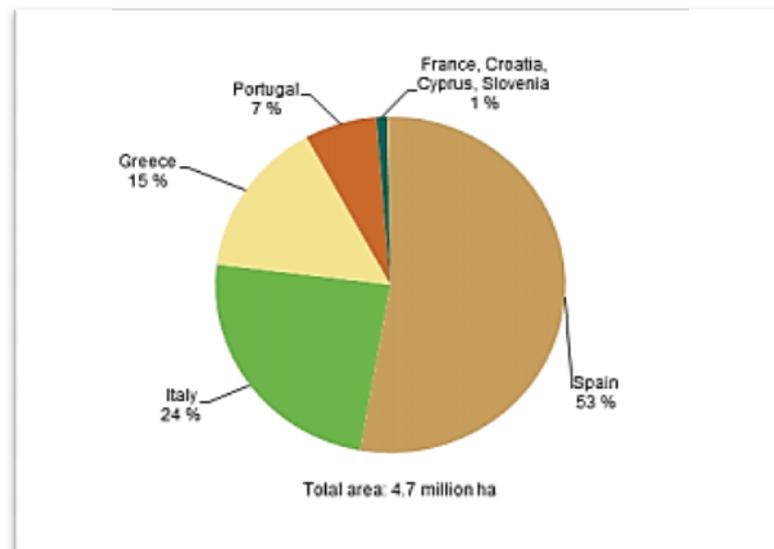
Figure 02 : cycle annuel de l'olivier (AOP, 2010).

## 6. Répartition de l'olivier dans le monde

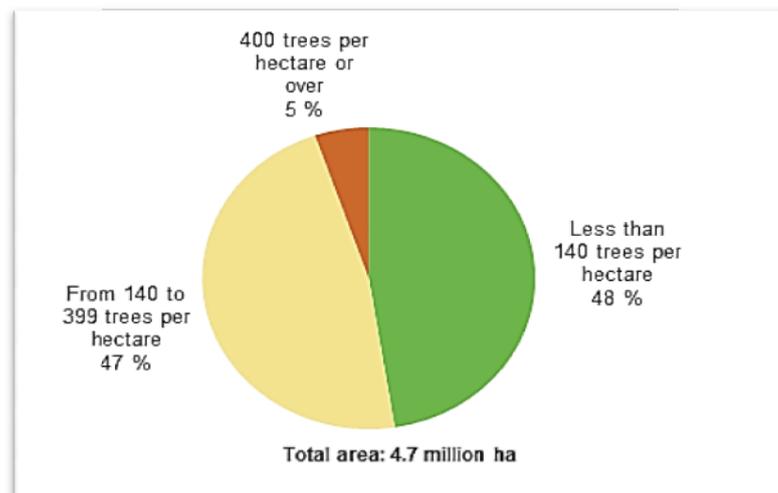
Le nombre mondial d'oliviers est évalué à 784 millions, dont 754,2 millions dans le bassin méditerranéen, l'Europe représente 66% du verger oléicole mondial.

La superficie de culture d'oliviers représentait environ 4,65 millions d'hectares dans l'UE en 2012, l'Espagne occupe 53% et l'Italie 24% de la surface totale, ils sont suivis par la Grèce et le Portugal avec 15% et 7%, la France, Croatie, Chypre et Slovénie occupent ensemble 1% de la superficie totale de plantation des oliviers (Figure 03).

La plupart des zones cultivées des oliviers en Europe sont vieux. Près de 2,7 millions d'hectares sont âgés d'au moins 50 ans, près de 1,5 millions d'hectares sont âgés de 12-49 ans, 313 000 ha sont entre 5 et 11 ans et environ 130 000 ha sont moins de 5 ans (Figure 04) (Eurostat, 2016).



**Figure 03 : Superficie en oliviers par classes de densité dans l'UE en 2012 (Eurostat, 2016).**



**Figure 04 : Superficie en oliviers par classes d'âge dans l'UE en 2012 (Eurostat, 2016).**

L'Asie méditerranéenne représente (17%) du verger oléicole mondial, la Turquie est le verger oléicole dominant avec 83millions d'arbres.

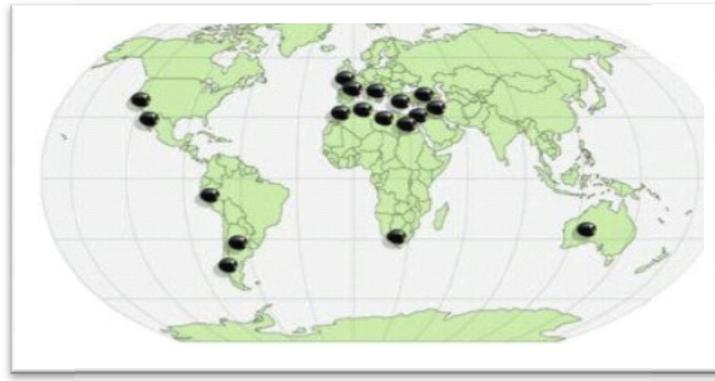
L'oléiculture syrienne est en pleine croissance et occupe 405 000 ha pour 46 millions d'arbres, principalement dans le Sud Ouest. Au Liban, les oliviers sont cultivées dans le Koura et au sud de Beyrouth.

L'Afrique du Nord représente (14%) du verger oléicole mondial, L'oléiculture nord-africaine est largement dominée par le verger oléicole tunisien avec 55 millions d'arbres et plus de 1.4 millions ha. La Tunisie présente une vaste monoculture sur 800 000h.

En 2014 la Tunisie occupe la 2<sup>ème</sup> place derrière l'Espagne dans la production mondiale d'huile d'olive (Nicole, 2015).

Le Maroc a une oléiculture en rapide extension et concentrée dans 3 secteurs : les provinces du sud (31%), dans le Rif (28%) et au centre (22%).

En Algérie, coexistent une oléiculture traditionnelle (Kabylie, 55%) et une oléiculture moderne d'origine européenne en Oran (20%) (Agroconsult, 2008).



**Figure 05 : Répartition de l'olivier dans le monde (www.Olives.com, 2005).**

Le 17 Mars 2015, le directeur de l'institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFV) a déclaré que la superficie du secteur d'oléiculture est passée de 165 000 ha à 380 000 ha avec une pourcentage de 130%, cette augmentation du secteur est due à l'extension de la surface cultivée vers le Sahara sans oublier la zone traditionnelle primaire.

Il parle aussi de la production d'huile où elle subit une élévation de la quantité produite allé de 19000 tonnes à 45000 tonnes avec des pics de 74000 tonnes.

Ce qui concerne la production d'olives de tables, une augmentation bien marquée où de 80 000 tonnes à 200 000 tonnes avec une notion de prévalence de produire 300 000 tonnes en 2020.

## **7. Intérêt de l'olivier**

Bien que l'olivier ne soit recommandé ni pour la beauté de son feuillage, ni pour le parfum de ces fleurs, il représente un très grand intérêt dans la production des huiles : huiles d'olive pour lesquelles les spécialistes ont confirmé leurs vertus thérapeutiques et de leurs bien faits sur la santé de l'homme.

- La production d'olive de table : olive de conservation comme produits alimentaires.

- Les produits de la taille : rameaux ou feuilles de la récolte qui sont utilisées dans l'alimentation du bétail, ainsi que pour la restitution de matière verte aux sols.
- Les grignons d'olives : qui sont utilisés dans l'alimentation du bétail, comme amendement organique en agriculture et pour la fabrication du savon.
- Le margine : « eau de végétation » utilisées comme eau de boisson (à la place de l'eau potable pour les poules). Ces nombreuses utilisations permettent d'améliorer toujours la valorisation de ces sous produits (Anonyme, 2006).

## 8- Variétés des olives dans le monde

Il y a actuellement plus de 2000 variétés d'olivier recensées dans le monde et chaque pays privilégie certains cultivars (Breton, 2006).

**Tableau 02 : les principales variétés d'olivier cultivées dans les pays méditerranéens (C.O.I, 2006).**

Pays producteurs	Variétés principales
Espagne	Picaul, cornicabra, hojibianca, gordal, manzanilla.
Italie	Trantoio, leccino, moraiolo, ascolona, tenera.
Grèce	Koroneiki, mastoidis, concerviola, kalamata.
Portugal	Verdal, carrasquenha, galega, redonli.
France	Sabina, verdal, picholin, tanche, lucques.
Turquie	Ayvalik, cakir, gemilk.
Syrie	Sorani, zaiti.
Maroc	Picholine marrocaïne.
Algérie	Chemlal, limli, azeradj, sigoise.
Tunisie	Chemlal, chetoui, ouslati, meski.

**En rouge** : variétés à huile. **En bleu** : variétés mixtes. **En vert** : variétés d'olives de table.

## 9- Variété Algérienne de l'olivier

L'oléiculture algérienne est caractérisée par une large gamme de variétés, les variétés cultivées en Algérie sont représentés essentiellement par des variétés à huile, et un degré moindre, des variétés de table (Loussert et al., 1978 ; Mendil et al., 2007).

Tableau N°03 : les principales variétés nationales (Saad, 2009).

Variétés	Origine et diffusion	Caractéristiques
Azzeradj	Petit kabylie (oued soummam), occupe 10% de la surface oléicole nationale.	Arbre rustique et résistant à la sécheresse ; fruit de poids élevé et de forme allongée utilisée pour la production d'huile et olive de table, rendement en huile de 24% à 28%.
Chemlal	Occupe 40% des verges oléicole national, « présente surtout en kabylie » s'étend des monts Zekkar à l'ouest aux Bibans à l'est.	Variété rustique, et tardive, le fruit et de poids faible et de forme allongée, destiné à la production d'huile, le rendement d'huile de 18% à 22%.
Limli	Originnaire de sidi-aiche (Bejaia), occupe 8% du verger oléicole national, localisée sur les versants montagneux de la base vallée de Soummam jusqu'au littoral.	Variété précoce, peu tolérante au froid, résistante à la sécheresse, le fruit et de poids moyen et de forme sphérique, utilisée pour la production d'huile et olive de table, rendement de 16% à 20%.
Sigoise ou olive de Tlemcen ou olive de tell	Elle est dominante depuis Oued rhiou jusqu'à Tlemcen	Variété rustique, le fruit et de poids moyen et de forme ovoïde, produit une olive à deux fins est très recherchée pour la conserverie et donne un bon rendement en huile de 18% à 22%.
Rougette de Mitidja	Plaine Mitidja	Variété rustique : le fruit est moyen et allongé, utilisé pour la production d'huile, rendement de 18 à 20%.
Grosse de Hamma, Oueld Ethour	Hamma (Constantine)	Variété précoce, rustique, résistante au froid et à la sécheresse, fruit de poids très élevé et de forme allongée, double aptitude : huile et olive de table, le rendement de 16 à 20 %.
Blanquette de Guelma	Originnaire de Guelma, assez répandue dans le Nord-est Constantinois, Skikda et Guelma.	Sa rigueur est moyenne, résistante au froid et moyennement à la sécheresse ; le fruit de poids moyen et de forme ovoïde, destiné à la production d'huile, le rendement de 18 à 22 %.
Hamra, Rougette ou Rousette.	Origine de Jijel, diffusée au nord constantinois.	Variété précoce, résistante au froid et à la sécheresse, le fruit est de poids faible et ovoïde, utilisée pour la production d'huile, rendement 18 à 22 %.
Bouriche, olive d'El-Harrouch.	El-Harrouch, Skikda.	arbre rustique, résistante au froid et à la sécheresse, poids faible de fruits et de forme allongée, production d'huile, rendement 18 à 22 %.

## II-La tuberculose de l'olivier

### 1-Définition

C'est une maladie bactérienne omniprésente dans le bassin méditerranéen, en Italie elle est appelée «Rogne» de l'olivier, en Espagne « Verru» ou «Tuberculos» de l'olivier, en France et en Afrique du Nord on lui donne le nom de «Tuberculose» ou chancre de l'olivier. Il est considéré comme l'un des plus graves maladies affectant les oliviers (*Olea europaea L*) dans la plupart des régions de culture d'olive.

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<sup>ème</sup> siècle par Smith et Rorer 1904 (Guido, 2005).

L'agent causal est le *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* (Zohary et al., 1975). Il est considéré comme le seul pathogène responsable de la formation des nœuds (tumeurs) bactériennes des oliviers (*Olea europa L*) (Smith, 1908 ; Young et al., 1996 ; Janse, 1982 ; Bradbury, 1986).

L'attaque commence timidement sur brindilles des rameaux et n'épargne pas les charpentes et le tronc, à l'occasion de 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 réceptivité et la sensibilité des oliviers sont différentielles selon les variétés :

Variétés résistantes : Canino, Grignan, Kalamon

Variétés sensibles : Chemllal, Frantoio ; meslala

La maladie peut conduire à de graves dommages dans les oliveraies, affecte également la taille et la qualité des fruits et donnant naissance à des odeurs indésirable, causant de graves perte dans le terme de production (Hall et al., 2004 ; Quesada et al.,2008).

## 2- Les symptômes

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, en raison de l'infection des cicatrices foliaires par la bactérie; cependant, ils peuvent également être formés à d'autres points d'entrée des agents pathogènes, tels que les plaies de taille ou de blessures causés par le gel ou la grêle. L'infection de par *Pseudomonas savastanoi* dans les plaies fraîches commence par une petite cavité sur les sites d'infection résultant de la prolifération des tissus végétaux.

*Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* entraîne la formation d'une croissance hyperplasique des tissus de l'hôte, l'hyperplasie qui se manifeste par l'apparition de tumeurs d'abord sur le tronc (Figure 06), puis sur les rameaux (Figure 07) et parfois sur les feuilles et les fruits (Surico, 1986 ; Lavermicocca et al., 2002 ; Young et al., 2004).

Les bactéries peuvent se propager sur de longues distances en raison de l'introduction et la plantation de matériel infecté, ou sur de courtes distances transportés par les éclaboussures de pluie, aérosols chablis, insectes et pratiques culturelles (Horne et al., 1912).

Lorsque les bactéries infectent un olivier à l'automne, les tumeurs vont commencer à se développer plusieurs mois plus tard, mais si l'infection se produit au cours du printemps, le temps nécessaire pour la formation des tumeurs peut être seulement deux semaines (Wilson, 1935).



Figure 06 : des tumeurs formées sur le tronc (verger de Sid Ali).



**Figure 07** : des tumeurs formées sur les rameaux (verger de Sid Ali).

### 3- 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*

Cette espèce à 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*

#### 4. Pouvoir pathogène

Dans les plaies fraîches d'oliviers, l'agent pathogène colonise initialement les tissus autour de l'infection et à travers des enzymes pectolytiques et hémicellulolytiques, la bactérie perturbe l'intégrité des cellules hôtes, produisant des cavités dans lesquelles le pathogène peut se regrouper; par conséquent, il peut envahir directement les vaisseaux du xylème (Marchi et al, 2009; Rodríguez-Moreno et al., 2009; Maldonado-González et al., 2013).

Successivement, Les facteurs de virulence bactérienne, principalement de l'acide indole-3-acétique (AIA), les cytokinines qui sont codés par le plasmide pIAA1 et les gènes *hrp* de *Psv* et autres bactéries coexistant en nœuds, provoquent une augmentation de la taille de la cellule végétale (hypertrophie) suivie d'une division cellulaire anormale (hyperplasie; Marchi et al., 2009; Rodríguez- Moreno et al., 2008; Quesada et al., 2012 ; Buonauro et al., 2015).

En plus des phytohormones, qui jouent un rôle crucial, d'autres facteurs de virulence sont impliqués dans le développement de la maladie.

#### 5. Les interactions entre *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* et d'autres bactéries présentes dans la tumeur

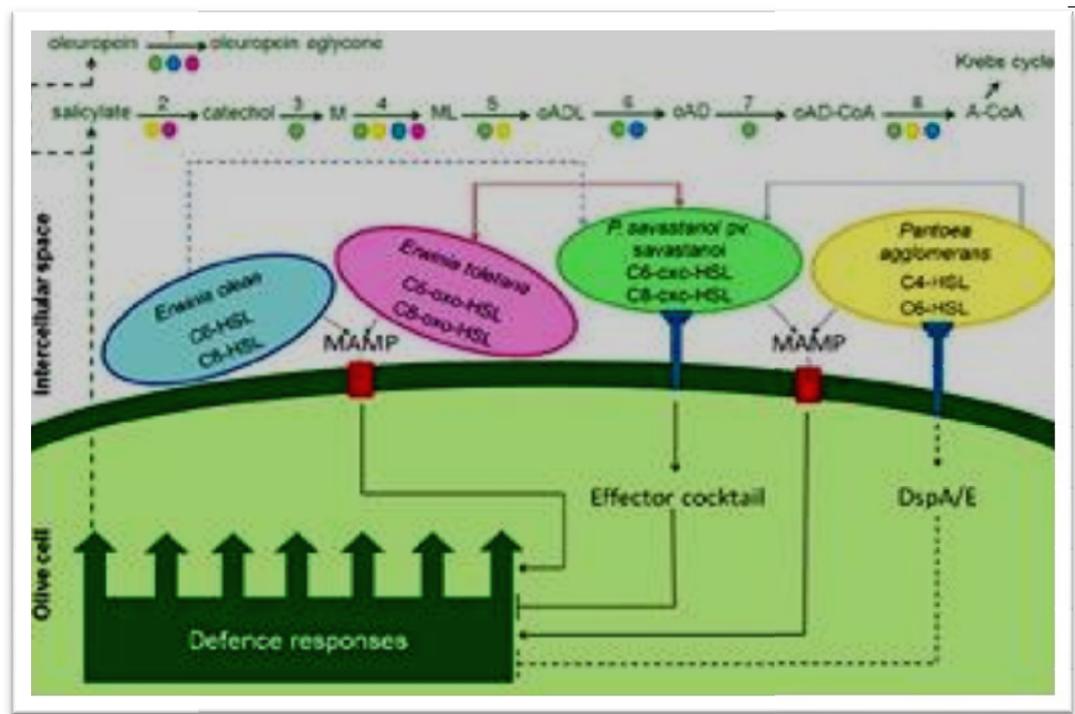
La grande majorité des bactéries trouvées dans la nature vivent dans des communautés complexes. Les tumeurs de l'olivier sont l'un des communautés complexes où les espèces bactériennes non pathogènes (par exemple *Erwinia toletana*, *Pantoea agglomerans* et *Erwinia oleae*) coexistent avec l'agent pathogène *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* et ils forment communément des biofilms multispécifiques (Rodriguez et al, 2008 , Roberto et al., 2015), Les bactéries dans les biofilms sont sessiles et sont bien protégés contre divers stress, y compris les défenses de l'hôte, cet effet protecteur peut être plus renforcée de manière synergique dans un biofilm multispécifique par rapport à un biofilm monospécifique. La localisation de ces espèces dans le nœud facilite l'échange de signaux et de métabolites de détection de quorum (Daniel et al., 2014).

Les populations de *P. pv. savastanoi* sont associés à des bactéries non pathogènes, à la fois épiphytes et endophytes, pouvant former des consortiums mutualisme avec *Erwinia toletana*, *Pantoea agglomerans*, *Erwinia oleae*, ces derniers peuvent synthétiser des quantités relativement élevées de l'acide 3-indole acétique (AIA) ce qui pourrait entraîner une

augmentation significative de la taille des nœuds et de la progression de la maladie (Comai et al., 1980 , Quasada et al, 2008).

L'AIA est aussi synthétiser dans les tissus végétaux, c'est l'auxine naturelle prédominante des plantes. Les auxines sont une classe importante de phytohormones essentiels pour de nombreux aspects de la croissance et développement des plantes, y compris l'organogénèse; réponses tropique; processus cellulaires tels que l'expansion cellulaire, la division et la différenciation; et la régulation des gènes.

La localisation de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* avec *E. toletana*, *Pantoea agglomerans* et *Erwinia oleae* permet de partagés entre elles des molécules de signalisation qui sont des lactone de N-acyl (LAH), et aussi la dégradation complète de plusieurs composés liées à la plante, y compris saccharose, salicylate et les utiliser comme sources de carbone, les salicylates et phénols sont impliqués dans la réponse de défense de la plante (Hosni et al., 2011).



**Figure 08** : image représentant les interactions entre *Pseudomonas pv. savastanoi* (Psv, cellule bactérienne vert) et *Pantoea agglomerans* (Pa, jaune), *Erwinia toletana* (Et, rose), et *Erwinia oleae* (Eo, bleu) (Roberto et al., 2015).

*Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* et *Erwinia toletana* mettent en place un partage symétrique des signaux de détection de quorum, alors que *Pseudomonas savastanoi*

*pv savastanoi* met en place un partage asymétrique avec *Pantoea agglomerans* et *Erwinia oleae*. Ces dernières bactéries endophytes produisent avec *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* des motifs moléculaires associées à des microbes (MAMPS; Microbial Associated Molecular Patterns) elles sont reconnues par des récepteurs spécifiques de la plante (site rouge), qui déclenchent la réponse de défense dans la plante hôte.

Parmi les réponses de défense des plantes, l'accumulation de l'acide salicylique (SA) et d'autres composés phénoliques (par exemple, l'oleuropéine) qui sont catabolisées dans l'espace intercellulaire des tissus de l'olivier par les enzymes présents dans le génome des bactéries endophytes : (1)  $\beta$ -glucosidase (EC3.2.1.21); (2) salicylatehydroxylase (EC1.14.13.1); (3) catechol1,2-dioxygénase1(EC1.13.11.1);(4) muconate cycloisomerase (EC5.5.1.1);(5) muconolactoneisomerase (EC5.3.3.4);(6)  $\beta$ -keto adipate enol-lactonehydrolase (EC3.1.1.24); (7) 3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC2.8.3.6) ; et (8) acetyl-CoAC-acyltransferase (EC 2.3.1.16).

*Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* injecte un cocktail de protéines effectrices dans les cellules d'olive à travers le système de sécrétion de type III (pilusHrp) et *Pantoea agglomerans* injecte la protéine de défense suppressive DspA/E, Les agents pathogènes ont développé plusieurs stratégies qui sont impliquées dans la suppression de la réponse de défense des plantes (Roberto et al., 2015).

## 6. cycle de la maladie

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

### Phase épiphyte

*Pseudomonas savastanoi pv. 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°-25 ° C et les périodes subséquentes subissent

une forte probabilité d'infection en l'automne et au printemps (Protta, 1995). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* peut infecter des oliviers au tout moment de l'année et la formation des tumeurs se déclenche seulement quand les conditions sont favorables.

### Phase endophyte

Les bactéries endophytes sont définies comme des bactéries vivant dans les tissus végétaux sans faire un préjudice matériel ou en retirant les avantages autres que la résidence (Kado, 1992).

Certaines rares études ont décrit la phase endophytes de *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* dans les plantes d'oliviers (Wilson et al., 1964). Selon d'autres auteurs, Psv 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 (Penyalver et al., 2006 ; Schiff Giorgini, 1906 ; Smith, 1920 ; Wilson et al., 1964 ; 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).

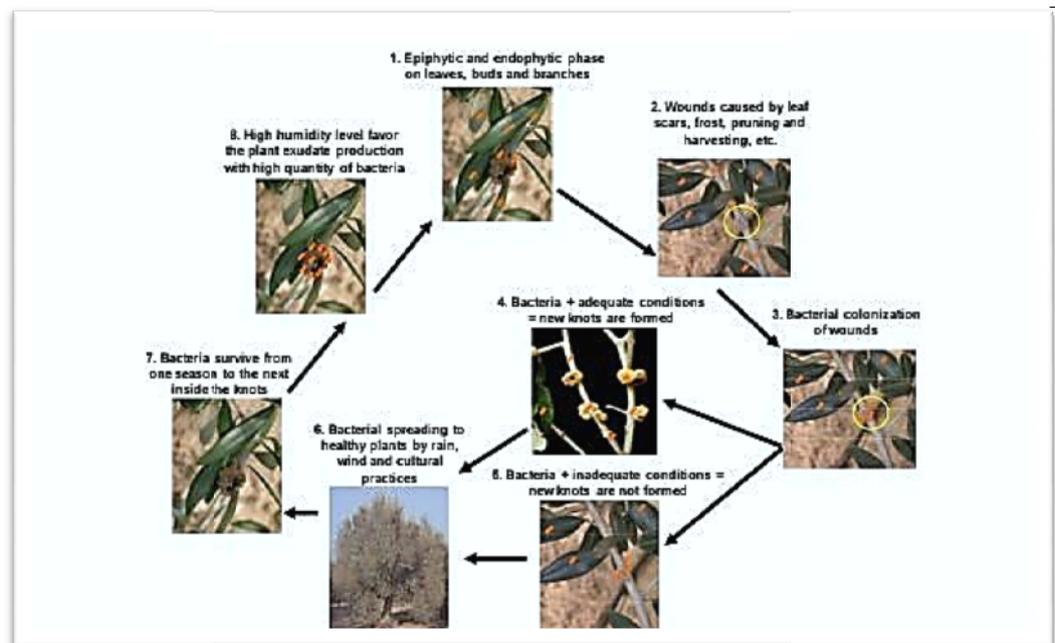


Figure 09 : cycle de la maladie tuberculeuse d'olivier causée par *Pseudomonas* pv. *savastanoi* (Bertolini, 2003).

## 7. Impact de la maladie

Il se traduit sous divers aspects :

- Perte de feuilles des brindilles du fait de l'étranglement mettant hors circuit l'alimentation des feuilles en aval.
- Dessèchement de bois par suite d'une photosynthèse défailante.
- réduction même de la taille des arbres
- Réduction du rendement d'olive et sur la qualité de son huile grâce à des caractéristiques organoleptiques inférieures, telles que une odeur désagréable et un goût amer rance (Senhaji, 1999 ; Lavermicocca et al., 2002)

## 8. Gestion de la maladie

Les conditions climatiques semblent avoir un effet sur la dissémination et la virulence de la maladie. Les zones à pluviométrie importante sont généralement plus affectées par la tuberculose que les zones à faible pluviométrie. Les variétés d'oliviers semblent présenter des sensibilités différentes à la maladie. Actuellement, il n'existe 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. Préventivement on ne peut que conseiller (Loussert et al., 1978) :

- ❖ principalement est de désinfecter soigneusement tous les outils de taille.
- ❖ Toutes les parties atteintes seront arrachées sectionnées et incinérées par le feu.
- ❖ Eviter les excès d'irrigation de l'arbre.
- ❖ Eviter les blessures au moment de la taille.
- ❖ Utiliser des bactéricides à base de cuivre au moins deux fois pour protéger les blessures.
- ❖ Appliquer une bactériocine produite par *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* utilisé à différents niveaux de concentrations, a empêche la multiplication de *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*.

## 9- La répartition géographique de la tuberculose d'olivier

Elle est répandue actuellement dans tous les pays où l'on cultive l'olivier.

- **Europe** : France ; Germanie, Grèce, Italie, Portugal, Spain, Norwid, Suède, Yougoslavie.

- **Asie:** Iran, Iraq, Palestine, Lebanon, Turquie.
- **Afrique :** Algérie, Libye, Maroc, sud d'Afrique, Tanzanie, Tunisie.
- **Nord Amérique :** Mexique, USA (Arizona, Californie, Texas, Arkansas).
- **Sud Amérique :** Argentine, Brésil, Colombie, Pérou, Uruguay.
- **Australasie :** Australie, New Zélande (Bradbury, 1986).

# **MATERIEL ET METHODES**

## **MATERIEL ET METHODES**

### **1. L'échantillonnage**

Deux sorties ont été organisées en collaboration avec l'équipe INPV de Constantine dans le but de diagnostiquer le chancre de l'olivier et réaliser l'échantillonnage.

La première sortie a été réalisée le 08/02/2016 au verger de Belabjaoui située à Chettaba, commune de Ain Smara. L'oléiculteur possède une grande exploitation d'olivier de variétés européenne, bien entretenue et non infectée. Le diagnostic était négatif.

La deuxième destination (le 16/04/2016) était vers le verger de Mr. Alali Mourad, commune d'Aïn Roua daira de Bougaa. Aïn Roua est une commune de la wilaya de Sétif, situé en nord-ouest de l'Algérie, à moins de 28 km du Sétif caractérisé par un climat continental froid et humide à l'hiver et sec humide en été. C'est une zone de haut plateau partiellement montagneuse et contient beaucoup de sources d'eau.

Le verger oléicole de Mr. Alali s'étale sur une superficie de 3 hectares, ce qui présente un nombre de 400 arbres de variété Chemlal infectés à 100%. Les plantes non certifiées ont été achetées à bon prix à partir de deux marchés noirs un à Alger et l'autre à Bejaia.

Les prélèvements ont été réalisés à partir de trois oliviers infectés et collectés sur des distances chronologiquement espacées, des petites branches contenant des tumeurs ont été coupées à l'aide d'un sécateur désinfecté à l'alcool 90% après chaque usage. Les échantillons ont été placés dans un sac en papier et transportés directement au laboratoire dans des conditions isothermes de 4°C.



**Figure 10 : verger de Sid Ali à Ain Roua, Sétif (Algérie)**

## **2. L'isolement des germes**

Deux branches (T1, T2) de la première plante (P1) possédant au moins deux tumeurs (K1, K2) ont été choisies pour l'isolement des bactéries présentes dans les tumeurs.

Les deux tumeurs ont été désinfectées à l'aide d'un papier filtre stérile imbibé à l'éthanol 96%. Le tissu interne a été découpé et les fragments obtenus ont été écrasés dans des tubes eppendorfs stériles contenant un ml d'eau distillée stérile (EDS).

Après trente minutes à température ambiante, 100 µl de la suspension ont été ensemencées par la technique de trois quadrants sur deux boîtes de Pétri contenant le milieu semi sélectif le King B (Institut Pasteur d'Algérie) et deux boîtes de GN (gélose nutritive), les boîtes ont été ensuite incubées à 26°C pendant 3 à 5 jours.



**Figure 11 : les deux tumeurs utilisées pour l'isolement.**

## **3. Purification et conservation des souches isolées**

Neuf aspects différents ont été sélectionnés sur les deux milieux GN (gélose nutritive) et King B après l'isolement, six souches ont été désignées par le code suivant sur le milieu GN :

P1T1K1(1), P1T1K1(2), P1T1K1(3) : isolats prélevés à partir de la tumeur 1.

P1T1K2(1), P1T1K2(2) C<sub>b</sub>, P1T1K2(2) C<sub>t</sub> : isolats prélevés à partir de la tumeur 2.

Trois souches ont été désignées par le code suivant sur le milieu King B :

P1T1K1(1)', P1T1K1(2)' : isolats prélevés à partir de la tumeur 1.

P1T1K2(1)' : isolat prélevé à partir de la tumeur 2.

Les colonies qui ont poussé après 72 h d'incubation à 26°C ont été purifiées par repiquages successifs sur le milieu GN (gélose nutritive). Une mise en culture en milieu liquide (bouillon nutritif) a été effectuée pour entamer le contrôle de pureté de la souche et qui consiste à des observations macroscopiques à l'œil nu et microscopiques après coloration de Gram. Une fois un aspect microscopique homogène obtenu, la souche est considérée pure.

Les souches obtenues sont ensemencées sur GN (gélose nutritive) inclinée puis incubée et conservée à 4°C.

#### **4. Identification phénotypique des isolats**

L'identification présomptive est basée sur les caractères macroscopiques, morphologiques, biochimiques et sur la détermination du profil de résistance aux antibiotiques (antibiogramme) selon les méthodes mentionnées ci-dessous. La souche *E. coli* a été utilisée comme souche de référence. La composition des milieux de culture utilisés dans cette étude est mentionnée en annexe 01.

##### **4-1. Examen microscopique des frottis colorés :**

Des étalements minces et homogènes de chaque isolat bactérien purons été fixés sur une lame, puis colorés par la méthode de Gram, l'observation a été réalisée sous microscope optique (Optec) avec caméra intégrée (Canon).

##### **4-2. Tests biochimiques**

###### **➤ Test de LOPAT**

###### **Levane (NAS)**

L'ensemencement se fait par des stries séries sur le milieu levane puis incubées à 26 ° C pendant 3 à 5 jours, la production de levane-sucrase se traduit par la présence de colonies blanchâtre et convexes luisante.

La plupart des *Pseudomonas fluorescens* qui utilisent le saccharose comme seule source de carbone, produisent l'enzyme.

### **Oxydase**

Le test a été réalisé en utilisant des disques d'oxydase (Himedia laboratoires, Mumbai, India). 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 au préalable. 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.

### **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 26° C pendant sept à quatorze jours, l'odeur indésirable et l'apparition de nécrose signifie la présence de l'enzyme pectinase.

### **Arginine Déhydrolase (ADH)**

Les inoculums ont été transférés à un tube stérile de bouillon arginine dihydrolase. Le tube a été incubé à 26 ° C pendant 3 à 5 jours.

La bactérie doit utiliser d'abord le glucose présent dans le milieu provoquant une acidification de milieu (traduit par un changement de couleur du milieu violet au jaune). Le virage de la couleur indique un test positif pour l'arginine déhydrolase.

### **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.

➤ **Tests biochimiques**

**Hugh et Leifson**

Chaque isolat bactérien a été ensemencé dans deux tubes contenant le milieu Hugh et Leifson. Après homogénéisation l'un des deux tubes est recouvert d'huile de vaseline en vue de condition d'anaérobiose. Les tubes sont incubés à 26°C pendant 3 à 5 jours.

Le résultat positif se traduit par le virage de l'indicateur bleu de bromothymol au jaune du milieu.

**Catalase**

Sur une lame propre une goutte (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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.

**Milieu TSI**

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.

A l'aide d'une anse de platine une colonie et a été prélevée et ensemencée sur la pente du milieu TSI (Triple Sugar Iron Agar, Institut pasteur d'Algérie) par stries et le culot par piqure centrale, puis incubé à 26 C° pendant 3 à 5 jours.

**Mannitol-mobilité**

L'ensemencement du milieu mannitol et mobilité (Institut pasteur d'Algérie) s'est fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une pipette pasteur. Puis incubé à 26 C° durant 3 à 5 jours. La fermentation du mannitol provoque un virage au jaune du milieu. Les bactéries mobiles envahissent tout le milieu à partir de la piqûre centrale.

**Test de solubilité par KOH**

Le but de cette méthode est de déterminer rapidement si une bactérie est gram positive ou négative sans passer par les étapes de coloration habituelles et sans utiliser un microscope. Une colonie isolée a été mélangé dans une goutte d'une solution de KOH à 3% à l'aide d'une pipette pasteur. Quelques secondes plus tard, on tire le mélange vers le haut; si un filament se forme entre la pipette et la lame, la colonie isolée est alors constituée de bactéries Gram négatifs. Si rien n'est entraîné par la pipette, les bactéries sont Gram positifs.

### **Bouillon nitrate**

Ce milieu liquide permet de mettre en évidence la présence d'une enzyme du métabolisme énergétique «la nitrate réductase» qui catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites. Une colonie isolée a été déposée dans le milieu, homogénéiser et incubé à 26°C pendant 3 à 5 jours. Après l'incubation les réactifs nitrate de réductase 01 et 02 ont été ajoutés respectivement, si il y a changement de couleur jaune vers le rouge indique que la bactérie possède une nitrate-réductase qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrites. L'absence de coloration rouge ne signifie pas obligatoirement que la bactérie testée ne possède pas de nitrates-réductase en ajoutant la poudre de zinc qui est un composé capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites. L'apparition d'une teinte rouge indique la formation d'ions nitrites par l'action du zinc.

### **Test de fluorescence**

Les cultures bactériennes en boîte de Pétri du milieu King B 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.

### **La galerie API 20**

Le système API Biomerieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des Bacilles à Gram négatif dont les *Entérobactéries*.

Les cinq isolats bactériennes ont été identifiés par la galerie API 20E (Biomerieux, SA., Marcy-L'étoile, France), cette dernière comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période de 3 à 5 jours d'incubation à 26°C se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Annexe 01).

Faire une suspension bactérienne faible d'opacité 0,5 sur l'échelle McFarland, dans une ampoule de Suspension Medium à NaCl, 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 vaseline pour assurer la condition d'anaérobiose.

La lecture de ces réactions se fait après incubation à 26°C pendant 3 à 5 jours, à l'aide du tableau de lecture (annexe 02), les résultats des réactions obtenues sont notés sur une fiche de résultats standards.

Chaque trois test sont rassemblés pour avoir un seule chiffre. L'enchaînement des chiffres obtenus après chaque rassemblement constitue un code de sept chiffres qui servira par la suite à l'identification des souches, en faisant usage à un catalogue analytique spécifique de la galerie API 20E.

### **Le profil de résistance aux antibiotiques**

Un antibiogramme a été réalisé afin de tester la sensibilité ou la résistance des 5 isolats. Le principe consiste à placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotiques (disques) sur la culture bactérienne de la souche à tester préalablement.

L'ensemencement a été effectué par des stries extrêmement serrées, à l'aide d'une anse de platine stérile sur la surface du milieu Mueller-Hinton en boîte de Pétri. Enfin les disques d'antibiotiques ont été appliqués sur la gélose en pressant chaque disque à l'aide de pince bactériologique stérile pour s'assurer de leur application. Les zones d'inhibitions ont été mesurées après incubation à 26°C et comparées avec les valeurs critiques.

La liste des antibiotiques utilisés :

Amoxicilline, spiramycine, colistine, amikacine, piperacilline, chloramphenicol, pristinamycine, spectinomycine, cefotaxime, rifampicine, kanamycine, imipenème.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

Les nœuds formés sur l'arbre de l'olivier sont des niches idéales pour la croissance bactérienne non seulement de l'agent causal de la maladie (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*), mais aussi d'un nombre de *Gammaproteobacteria* endophytes tels que *Erwinia toletana*, *Pantoea agglomerans* et d'autres bactéries des genres *Burkholderia*, *Hafnia*, *Pseudomonas* et *Stenotrophomonas* (Marchi et al., 2008; Quesada et al., 2009).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* survit mieux sur les rameaux que sur les feuilles, l'arbre peut être plus sensible à l'infection lors d'événements du printemps de pluie en raison de la disponibilité accrue des cicatrices foliaires fraîches siégeant en tant que tribunaux d'infection, ou les points d'entrée des agents pathogènes. Le mois de Mai, où le taux d'humidité est élevé, est le temps approprié pour réaliser l'échantillonnage.

Afin d'arriver à la caractérisation phénotypique des souches isolées à partir des nœuds prélevés le 16 Avril 2016, le passage par les caractères macroscopiques a été indispensable. Les quatre souches P1T1K1(1), P1T1K1(2), P1T1K1(1)', P1T1K1(2)', après une croissance lente donnant des colonies a des caractères macroscopiques semblent proches des moisissures, la description des colonies a été représentés dans le tableau 03.

**Tableau 03 : résultats macroscopiques des quatre isolats.**

Souches	P1T1K1(1)	P1T1K1(2)	P1T1K1(1)'	P1T1K1 (2)'
<b>La forme</b>	Des grandes colonies avec des hyphes incrustés dans la gélose produisant de nombreuses conidies créant une surface d'apparence poudreuse	Des petites colonies circulaires avec un court mycélium aérien créant une surface d'apparence cotonneuse	Des grandes colonies avec des hyphes incrustés dans la gélose produisant de nombreuses conidies créant une surface d'apparence poudreuse	Des petites colonies circulaires avec un court mycélium aérien créant une surface d'apparence cotonneuse
<b>La couleur</b>	Blanchâtre	Blanche	Blanchâtre	Blanche
<b>L'aspect</b>	Plane	Surélevé	Plane	Surélevé

Les cinq isolats bactériens P1T1K1(3), P1T1K2(1), P1T1K2(2) C<sub>b</sub>, P1T1K2(2) C<sub>t</sub>, P1T1K2(1)', sont identifiées par les tests définissant les caractères morphologiques (tableau 04).

Les deux souches P1T1K2(1), P1T1K2(1)', sont des coccobacilles, mobiles a Gram négatif. Ces bactéries font partie donc de la famille des *Enterobacteriaceae* qui sont des bacilles Gram négatif, mobiles (cils périthriches) ou immobiles, aéro-anaérobies facultatifs

**Tableau 04 : Résultats de la morphologie des isolats.**

Caractères	P1T1K1(3)	P1T1K2(1)	P1T1K2(2) C <sub>b</sub>	P1T1K2(2) C <sub>t</sub>	P1T1K2(1)'
<b>Gram</b>	+	-	+	+	-
<b>Aspect</b>	Coques	coccobacilles	bacilles	Long Bacilles sporulant	Coccobacilles
<b>Mobilité</b>	-	+	-	-	+

+ : résultat positif - : résultat négatif

(AAF), oxydase négatif, catalase positif, nitrate positif et non sporulées. Les autres souches sont révélées de Gram positif (P1T1K1(3), P1T1K2(2) C<sub>b</sub>, P1T1K2(2) C<sub>t</sub>).

Parmi les tests biochimiques importants qui ont été effectués, le test LOPAT qui joue un rôle distinctif et permettent de différencier les souches appartenant au genre de *Pseudomonas*. Qui sont des bacilles Gram négatif, mobile par ciliature polaire, non sporulant, aérobie stricte.

		Tests					
		Levane	Oxydase	Pectinase	Arginine déshydrolase	Hypersensibilité sur tabac	Fluorescence
Espèces et groupes							
<i>Syringae</i>	I a	+	-	-/+	-	+	+

Les résultats de test LOPAT des cinq souches bactériennes isolées à partir des tumeurs de l'olivier sont mentionnés dans le tableau 05.

Ces résultats ne permet pas de révéler si les bactéries sont phytopathogènes, car le test de hypersensibilité sur les feuilles de tabac n'a pas été effectuée. Le dessèchement des zones foliaires inoculées signifie que la bactérie est phytopathogène.

**Tableau 05 : Résultats du test de LOPAT.**

Tests	P1T1K1(3)	P1T1K2(1)	P1T1K1(2) C <sub>b</sub>	PAT1K2(2) C <sub>t</sub>	P1T1K1(2)'
<b>Levane</b>	-	+	-	-	+
<b>Oxydase</b>	-	-	-	-	-
<b>Pectinase</b>	+	+	+	+	+
<b>ADH</b>	-	+	-	-	+
<b>L'hypersensibilité sur les feuilles de tabac.</b>	/	/	/	/	/

+ : positif

- : négatif

/ : le test ne réalise pas

Parmi les autres testes qui ont été effectués :

Le test de fluorescence utilisé principalement pour la détection et la différenciation des *Pseudomonas*, Les colonies présentant une fluorescence jaune verte détectable sous ultraviolets à 360 nm, sont considérées comme positives. La gélose King B favorise la production de pyoverdine et inhibe par ailleurs la production de pyocyanine, le phosphate dipotassique augmente la concentration en phosphore apporté par la peptone et stimule ainsi la production de fluorescéine, et le sulfate de magnésium apporte les cations nécessaires à la production de pyoverdine et inhibant la production de pyocyanine.

Les colonies des cinq isolats bactériens ne présentent pas une fluorescence sous une lampe à UV.

Les résultats de test de KOH sont représentés dans le tableau 06.

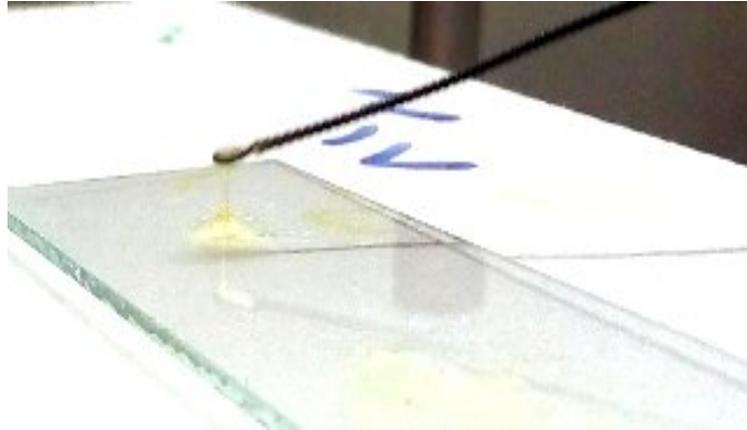
**Tableau 06 : les résultats de test KOH**

Souches	P1T1K1 (3)	P1T1K2 (1)	P1T1K2 (2) C <sub>b</sub>	P1T1K2 (2) C <sub>t</sub>	P1T1K2 (1)'
<b>KOH</b>	-	+	-	-	+

- : l'absence d'un filament

+ : la présence d'un filament

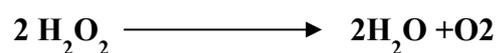
Les bactéries qui forment un filament entre la lame et l'anse de platine dans les 30 premières secondes. Sont des bactéries Gram négatives.



**Figure 12 : résultat de test KOH de la souche P1T1K2(1).**

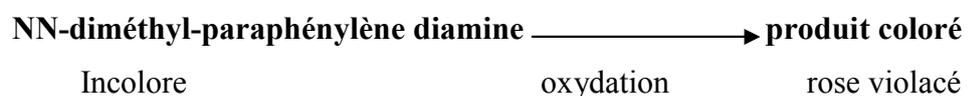
Le test de catalase qui présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram positif.

L'apparition de bulles due à un dégagement gazeux de dioxygène signifie que la souche possède le 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 ( $H_2O_2$ ) en  $H_2O$  et  $1/2 O_2$ , selon la réaction suivante :



La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram négatif.

L'apparition d'une tache rose violette après trente secondes signifie que la bactérie possède l'activité oxydase, elle dite oxydase +. Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé à l'air. Le cytochrome oxydase catalyse des réactions d'oxydation du type :



L'un des substrats qui peut constituer le réactif d'oxydase peut être l'oxalate de Ntétraméthylparaphénylène diamine.

Les résultats obtenus des tests de catalase et d'oxydase, signifie que les deux souches Gram négatif P1T1K2(1) et P1T1K2(1)' sont réparties dans la famille des *Enterobacteriaceae*. Cela a permis leur identification par la galerie API 20E (tableau 07). Les résultats des mêmes souches obtenus sur les milieux sélectifs TSI ont été pris en considération (tableau 08).

**Tableau 07 : la lecture de la galerie API 20 E pour les souches bactériennes à Gram Négatif.**

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND
P1T1K2(1)	-	+	-	-	+	-	-	-	-
P1T1K2(1)'	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Souches	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL
P1T1K2(1)	+	-	+	+	-	-	-	+	+
P1T1K2(1)'	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Souches	AMY	ARA	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MOB	OX	CAT	OF-O	OF-F
P1T1K2(1)	+	+	-	+	+	-	+	+	+
P1T1K2(1)'	+	+	-	+	+	-	+	+	+

**Tableau 08: les résultats des cultures à Gram négatif obtenus sur milieux sélectifs.**

Souches	Glucose	Lactose /saccharose	H <sub>2</sub> S	Gaz	Mannitol
P1T1K2(1)	+	+	-	-	+
P1T1K2(1)'	+	+	-	-	+

Sur le milieu sélectif TSI la croissance des isolats P1T1K2(1) et P1T1K2(1)'entraîne un changement de la couleur de l'indicateur coloré du milieu du rouge-brun vers le jaune cela est dû à une baisse de pH suite à la production d'acide. Les bactéries sont donc saccharose + et/ou

Lactose +, Glucose+, une absence de noircissement signifie la non production d'H<sub>2</sub>S, ainsi que l'absence d'une déformation de la gélose affirme la non production de gaz.

La lecture des résultats sur milieu mannitol-mobilité a montré que les deux souches P1T1K2(1) et P1T1K2(1)' ont la capacité de fermenter le sucre mannitol à 26°C, cela se traduit par le virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol) du rouge vers le jaune due à production d'acides.

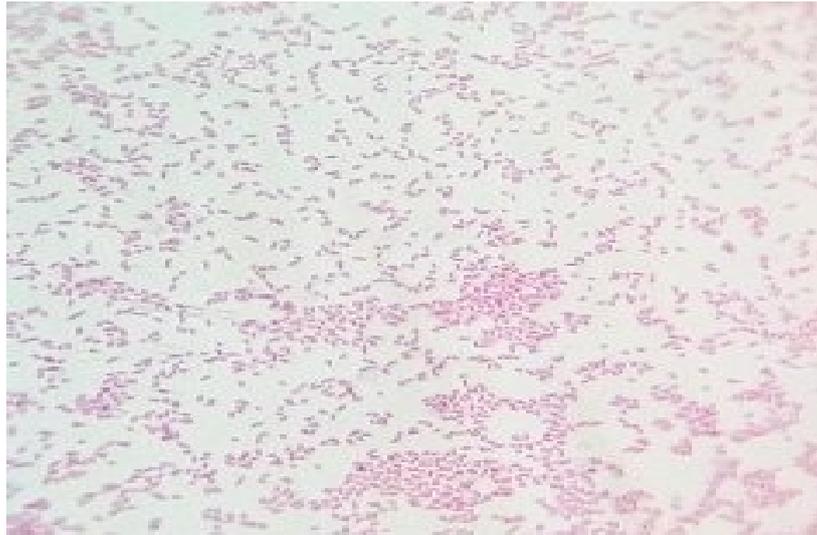
D'après le résultat de la coloration de Gram des souches en question (figure 11) et le catalogue d'identification des API 20 E (figure 13) et selon les résultats des tests biochimiques et morphologiques préalablement obtenus, les souches P1T1K2(1) et P1T1K2(1)' ont été identifiées comme *Enterobacter cloacae*.



**Figure 13 : aspect macroscopique de la souche P1T1K2(1)'.**

*L'Enterobacter cloacae* vit dans l'appareil gastro-intestinal de l'être humain. Il fait partie de la population microbienne normale qui aide à la digestion. Mais parfois, cette bactérie produit des infections, par exemple lorsque les défenses naturelles sont plus basses. D'autres fois, l'infection est une contamination externe. Cette bactérie peut provoquer une infection des voies urinaires, des plaies chirurgicales (infection nosocomiale lorsqu'elle se produit à l'hôpital) et une bactériémie (infection dans le sang).

En 2014 Passoda Silva a révélé que la classe de *Gammaproteobacteria* a été la plus présente dans les nœuds, représentant jusqu'à 90 % de la population bactérienne totale, en plus des enterobactériales les bactéries les plus abondantes sont le genre *Pantoea*



**Figure 14 :** l'observation microscopique (100X à immersion) après coloration de Gram de lasouche P1T1K2(1), Gram (-) coccobacilles.



**Figure 15:** résultats de l'identification des isolats P1T1K2(1)' par la galerie API 20E.



**Figure 16:** résultats de l'identification des isolats P1T1K2(1) par la galerie API 20E.

*Clavibacter, Curtobacterium, Enterobacter, Erwinia, Hymenobacter, Kineococcus, Pectobacterium et Sphingomonas.*

*Enterobacter cloacae* naturellement sensibles et intermédiaire à de nombreux bêta-lactamines (par exemple carbapénèmes, aztréonam, acylaminopenicillins, ticarcilline, et certaines céphalosporines «modernes»), quinolones, aminoglycosides, tétracyclines, antifolates, le chloramphénicol et la nitrofurantoïne. Résistance naturelle uniforme a été trouvée dans benzylpénicilline, oxacilline, amoxicilline, amoxicilline / clavulanate, céfoxitine, rifampicine, lincosamides, glycopeptides, streptogramines et l'acide fusidique.

Les résultats des tests biochimiques obtenus avec les autres souches qui appartiennent aux bactéries Gram positive sont été regroupés ensemble dans le tableau (09).

**Tableau 09 : les résultats de la galerie API20E des souches à Gram positif.**

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE
P1T1K1(3)	+	-	-	-	-	-	-
P1T1K2(2) C <sub>b</sub>	-	-	-	-	-	-	-
P1T1K2(2) C <sub>t</sub>	+	-	-	-	-	-	-
Souches	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA
P1T1K1(3)	+	-	+	+	+	+	+
P1T1K2(2) C <sub>b</sub>	-	-	+	-	-	-	-
P1T1K2(2) C <sub>t</sub>	+	-	+	+	+	+	+
Souches	AMY	ARA	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MOB	OX	CAT
P1T1K1(3)	+	+	-	+	-	-	-
P1T1K2(2) C <sub>b</sub>	+	+	-	+	-	-	-
P1T1K2(2) C <sub>t</sub>	+	+	-	+	-	-	-

Les résultats de ces mêmes souches obtenus sur les milieux sélectifs TSI ont été pris en considération (tableau 10).

Les bactéries à Gram positif n'ont pas la capacité de former un filament visqueux. Cela a été confirmé par l'observation microscopique des isolats (figure 17). Ces souches à Gram positif n'ont pas pu être identifiées par la galerie biochimique API20E destinée principalement à l'identification des bacilles à Gram négatif, mais leurs résultats biochimiques obtenus à partir

de l'ensemencement de la galerie API20E ont été pris en considération. Il y a une possibilité de prédire les genres auxquels appartiennent ces souches à Gram positif en s'appuyant sur des organigrammes de Bergey's manual.

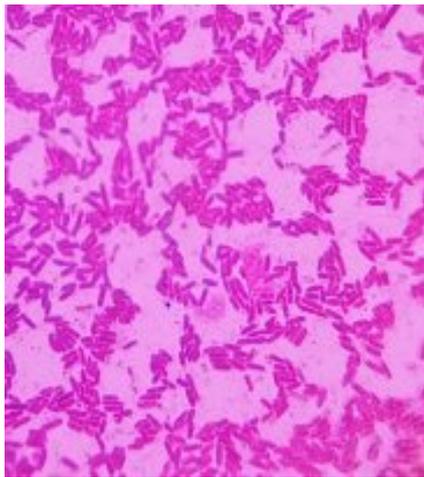
- La souche P1T1K2(2) C<sub>b</sub> représente des gros bacilles catalase négative, oxydase négative, des critères applicables au genre *Lactobacillus*.
- La souche P1T1K2(2) C<sub>t</sub> représente des long bacilles sporulant catalase négative, oxydase négative, des critères applicables au genre *Clostridium*.
- La souche P1T1K1(3) représente des gros bacilles, catalase négative, oxydase négative, cet isolat a été non identifiée selon les tests biochimiques utilisées.

Les *lactobacillus* (terme scientifique d'origine latine désignant les lactobacilles) sont des bactéries présentes en quantités importantes dans l'organisme. Les *lactobacillus* se retrouvent dans les muqueuses intestinales, buccales et vaginales, sur certaines plantes, et aliments d'origine végétale. Ce genre de bactérie est particulièrement présent dans les produits fermentés et les eaux usées. Les *lactobacillus* ne sont jamais pathogènes.

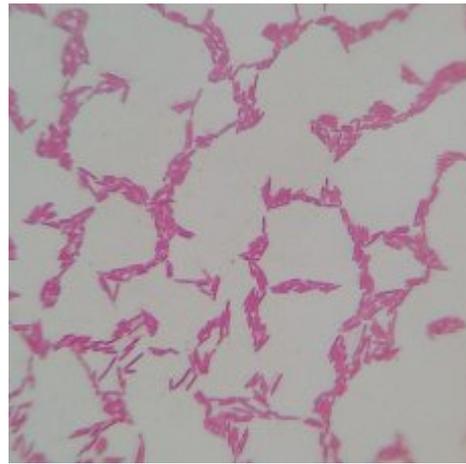
En 2013, Dilek Heperkana détecté la présence de *Lactobacillus* dans le microbiote d'olives pendant la fermentation. Ce genre prédominant joue un rôle majeur dans la production d'olives de table naturelles.

**Tableau 10 : les résultats des cultures à Gram positif obtenus sur milieux sélectifs.**

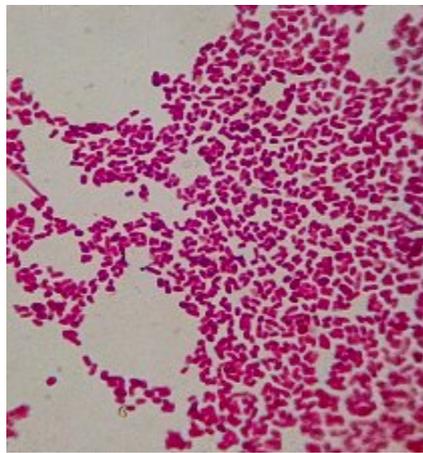
Souches	Glucose	Lactose/saccharose	H <sub>2</sub> S	Gaz	Mannitol
P1T1K2(2) C <sub>b</sub>	-	-	-	-	-
P1T1K2(2) C <sub>t</sub>	-	-	-	-	+
P1T1K1(3)	-	-	-	-	+



P1T1K2(2) C<sub>b</sub>



P1T1K2(2) C<sub>t</sub>



P1T1K1(3)

**Figure 17 : les observations microscopiques (X100) après coloration de Gram des souches P1T1K2(2) C<sub>b</sub>, P1T1K2(2) C<sub>t</sub>, et P1T1K1(3) respectivement.**

D'après les résultats obtenus, *Clostridium* est une bactérie de type bacille, Gram positif et sporulé. Elle représente la première cause de diarrhées infectieuses nosocomiales de l'adulte. Leur habitat naturel est le sol ou le tube digestif des animaux et de l'homme,

Macergens sont des bactéries capable de libérer des enzymes pectique (bactéries pectolytiques), ces action enzymatique donnent lieu à la séparation des tissus végétaux, les masergens appartiennent principalement au genre *Eruinia* et a une gamme d'agent pathogène opportuniste à savoir *Xanthomonas* spp ; *pseudomonas* spp ; *Clostridium* spp ; *Cytophaga* spp et *bacillus* spp, il se composent de taxons qui affichent une hétérogénéité considérable et entre mêlées avec des membres d'autres genres appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*.

Chez les bactéries Gram positives l'analyse phénotypique reste insuffisante pour pouvoir se prononcer au niveau de l'espèce, cependant certains germes ont pu être identifiés par les analyses génomiques.

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture l'action d'une molécule d'antibiotiques sur une souche bactérienne, il donnera donc des indications sur l'efficacité in vitro de ces antibiotiques. Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode standard, la culture bactérienne est ensemencée à 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 diffuse à partir du disque en créant une zone d'inhibition. Mesurées les diamètres d'inhibition avec une règle graduée (mm) en les comparant avec les valeurs de références permettent de définir la catégorie de la souche étudiée.

**Tableau 11 : les résultats de lecture d'antibiogramme des souches isolées**

<b>ATB / souche</b>	<b>P1T1K2(1)</b>	<b>P1T1K1(1)'</b>
<b>Amoxicilline (AMX)</b>	14	14
<b>Spiramycine (SP)</b>	18	18
<b>Colistine (CS)</b>	20	20
<b>Amikacine (AN)</b>	20	20
<b>Piperacilline (PIP)</b>	20	20
<b>Chloramphenicol (C)</b>	25	25
<b>Pristinamycine (PT)</b>	10	10
<b>Spectinomycine (SPT)</b>	Abs	Abs
<b>Cefotaxime (CTX)</b>	Abs	Abs
<b>Rifampicine (RA)</b>	16	16
<b>Kanamycine (K)</b>	13	13
<b>Imipenem (IPM)</b>	Abs	Abs

**abs** : absence d'une zone inhibitrice

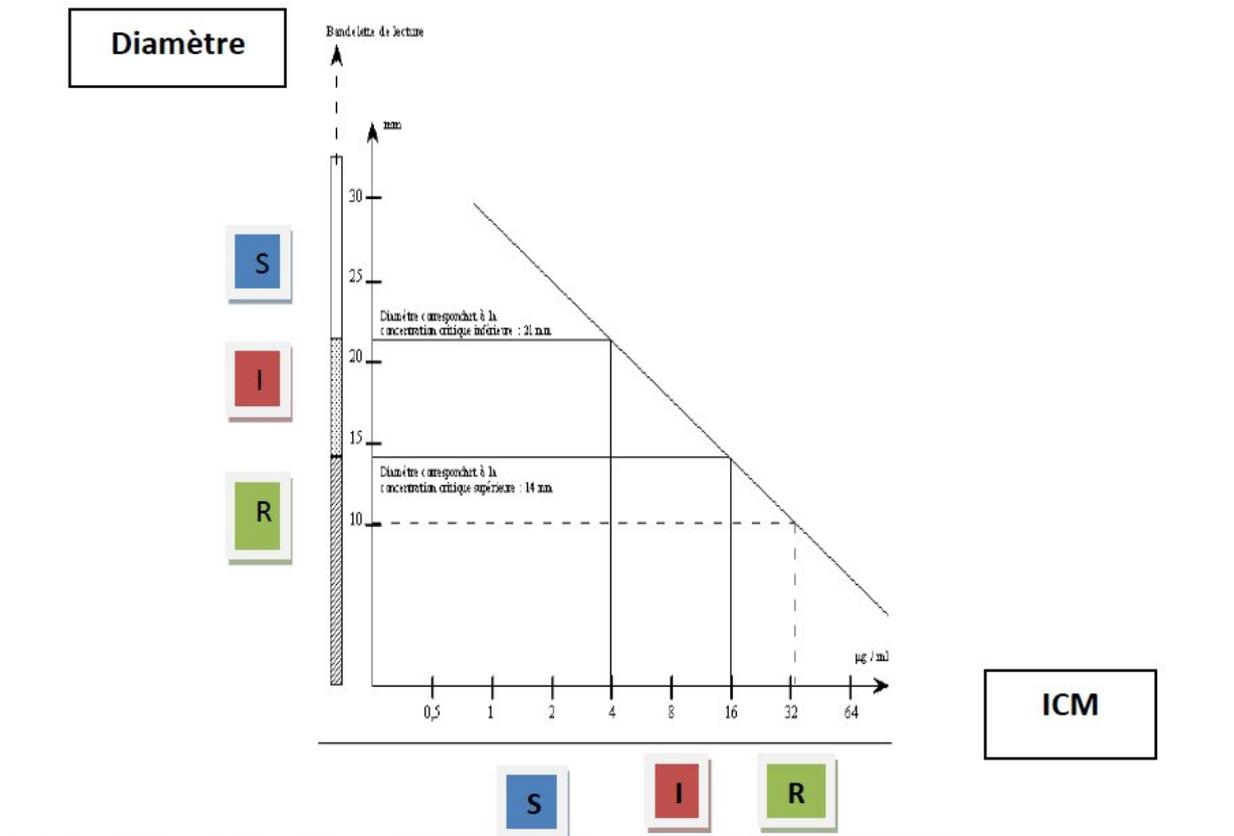
D'après les résultats obtenus et en comparant les valeurs mesurées avec les diamètres critiques (figure), on peut classer les souches bactériennes selon leurs diamètres d'inhibition pour chaque antibiotique en trois catégories bien définies (tableau 12).

**Tableau 12** : les profils de résistance des souches caractérisées.

<b>ATB / souche</b>	<b>P1T1K2(1)</b>	<b>P1T1K2(1)'</b>
<b>Amoxicilline (AMX)</b>	R	R
<b>Spiramycine (SP)</b>	I	I
<b>Colistine (CS)</b>	I	I
<b>Amikacine (AN)</b>	I	I
<b>Piperacilline (PIP)</b>	I	I
<b>Chloramphenicol (C)</b>	S	S
<b>Pristinamycine (PT)</b>	R	R
<b>Spectinomycine (SPT)</b>	/	/
<b>Cefotaxime (CTX)</b>	/	/
<b>Rifampicine (RA)</b>	I	I
<b>Kanamycine (K)</b>	R	R
<b>Imipenem (IPM)</b>	/	/

**R** : la souche est **R**ésistante    **S** : la souche est **S**ensible    **I** : la souche est **I**ntermédiaire  
/ : absence de la zone d'inhibition

Il existe pour chaque antibiotique une relation linéaire entre le logarithme de la concentration en antibiotique et le diamètre du cercle concentrique au disque d'antibiotique appelée droite de concordance (figure 18).



**Figure 18: les catégories cliniques S, I, R selon les valeurs critiques (Vincent Jarlier DIU Mal Inf)**

Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition ( $\emptyset$  mesuré) et le comparer aux diamètres des concentrations critiques inférieure et supérieure ( $d$  (CCsup) et  $D$  (CCinf)) et afin de déterminer la sensibilité et la résistance comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

$\emptyset$ mesuré $\geq D$ (CCinf)	Sensible
$\emptyset$ mesuré $< d$ (CCsup)	Résistant
$d$ (CCsup) $\leq \emptyset$ mesuré $< D$ (CCinf)	Intermédiaire

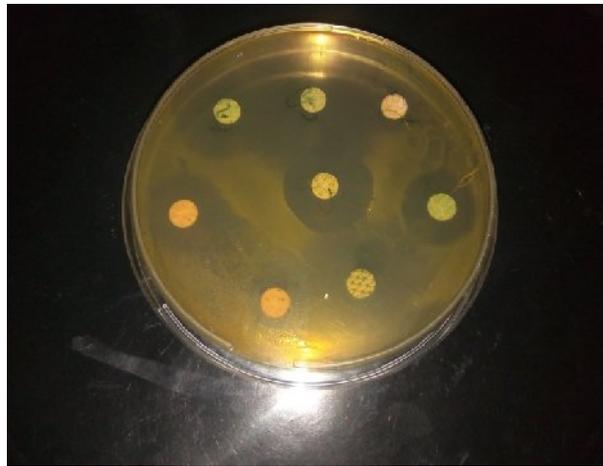
Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité in vitro : Sensible (S), Résistante (R) et Intermédiaire (I).

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

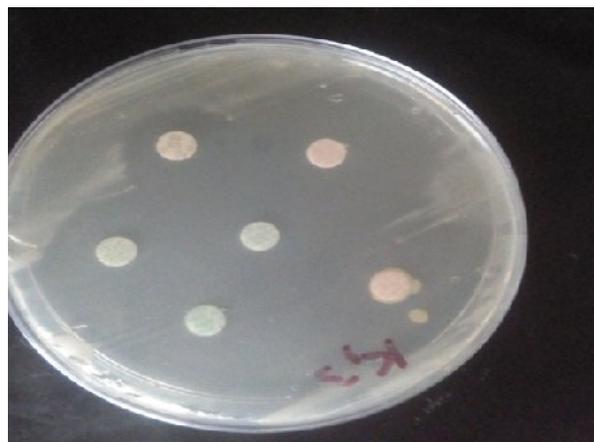
D'après les résultats d'antibiogramme ont révèlent que les deux souches P1T1K2(1) et P1T1K2(1) qui ont été identifiées comme *Enterobacter cloacae*, sont sensible aux amoxicillin, kanamycine, prestinamycine. Résistante au chloramphénicol et à une sensibilité intermédiaire aux spiramycine, rifampicine, piperacilline, amikacin, colestin.

Selon les références les infections dues à *Enterobacter cloacae* sont traités le plus souvent avec des antibiotiques bêta-lactamines (pipéracillinetazobactam) pendant 5 à 14 jours, des fluoroquinolones (ciprofloxacine) pendant 7 à 14 jours ou des aminoglycosides (gentamicine) pendant 7 à 10 jours, *Enterobacter cloacae* à une résistante à la céphalosporine.

Les souches P1T1K1(3), P1T1K2(2) C<sub>b</sub> ont été sensible aux 12 antibiotiques testés. La souche P1T1K2(2) C<sub>t</sub> n'ont pas été testé à cause du manque des disques d'antibiotiques



**Figure 19** : l'antibiogramme de la souche *Enterobacter cloacae* P1T1K2(2), P1T1K2(2)'.



**Figure 20** : l'antibiogramme de la souche P1T1K1(3).

Durant cette initiation à la recherche, l'échantillonnage a été réalisé le mois d'Avril, par conséquent les deux tumeurs utilisées dans cette étude étaient âgées, rigides, brunes et difficiles à découper. Les résultats de l'identification phénotypique des 5 isolats sur le milieu sélective King B, n'ont pas révélé la présence de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* dans nos échantillons, mais d'autres bactéries qui vivent dans les nœuds ont été bien isolées. Garcia de los Rios (1989) a démontré que l'agent étiologique de la tuberculose de l'olivier a été isolé seulement à partir de 5 à 10% des nœuds d'olive. Les bactéries de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* peuvent être isolées à partir des nœuds sur le milieu King B et cultivés en laboratoire avec une incubation nécessaire entre les deux à trois jours à 27 ° C, pour l'identification et la confirmation, mais les nœuds âgés contiennent généralement une grande variété d'envahisseurs secondaires (Yong, 2004).

# CONCLUSION

## Conclusion et perspective

Cette étude préliminaire a portée sur la recherche de la tuberculose de l'olivier ; une des maladies grave dans l'oléiculture.

Cette recherche est basée sur l'isolement et l'identification présomptive de quelques isolats bactériens à partir des tumeurs d'un olivier infecté du verger Sid Ali wilaya de Sétif.

Une étude réalisée en 2010 par Quesada et ses collaborateurs a été révélée que *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* survit mieux dans les tumeurs jeunes que sur les feuilles avec des populations varient plus en plus au cours de la saison des pluies et lorsque l'humidité est suffisamment élevée.

L'isolement a été prélevé a partir d'un seul verger sur les tumeurs âgées, brunes et dures, durant la période d'échantillonnage. Ces souches ont été purifiées par une série de repiquage successive et utilisées par la suite pour faire l'analyse phénotypique.

Les résultats de cette étude révèlent d'abord une certaine diversité des espèces bactériennes identifiées. Au total, cinq isolat ont été isolées a partir des tumeurs d'olivier, deux souches ont été identifiées comme *Enterobacter cloacae* ( P1T1K1(2) ; P1T1K1(2)') et Le reste des souches a Gram positif n'ont pas été identifiées jusqu'à l'espèce : *Clostridium* (P1T1K2(2) c<sub>t</sub>) ; *Lactobacillus* (P1T1K2(2) c<sub>b</sub>) ; l'isolat (P1T1K1(3)) n'a pas été identifie selon les testes utilisées, cela exige des techniques particulières comme les galeries API spécifiques aux Gram positif et autres méthodes génomiques qui basées principalement sur la PCR, permettant l'identification du microorganisme jusqu'au niveau de l'espèce.

Cette recherche n'a pas révélée la présence de *pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, cette absence est due à la nature des tumeurs, le petit nombre des tumeurs prélevés, un seul essai d'isolement et aussi la saison de l'échantillonnage. Pour arriver à isoler *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* il faut choisir des oliviers possédant un grand nombre de tumeurs jeunes (fraiches) et répéter l'isolement plusieurs fois, et appliquer des techniques sérologique (l'immunofluorescence) et génomique (PCR) pour la détection rapide et efficace de *Pseudomonas savastanoi*.

La sensibilité des 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 trois catégories différents: résistantes, intermédiaires ou sensibles.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Les références bibliographiques**

**Agroconsult. (2008).** L'olivier dans le monde. La méditerranée, édition du temps : « l'olivier, un arbre et une culture au cours de la méditerranée » ,pp 113-128.

**Albert, B., Hans, G., Truper, Dworkin, Harder, W. & Schleifer, K.H. (2013).** *The prokaryote* : A Handbook on the biology of bacteria. Page 78

**Anonyme, (2006).** Analyse statistique de l'évolution de la culture des principaux produits agricoles durant la période 1998-2006. Ministère de l'agriculture. Direction des statistiques agricoles et des enquêtes économiques, page 60.

**AOP, (2016).** Appellation d'origine Protégée, huile d'olive et olive. (Ph. D.). Universidad Politécnica de Valencia, Spain.

**Benjama, A.(2003).** Méthode d'évaluation rapide du degré d'attaque de l'olivier par la tuberculose cause par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* en verger au Maroc, Fruits, 58 : 213-219.

**Bertolini, E. (2003).** Virosis y bacteriosis del olivo: detección serológica y molecular. Thesis

**Besnard, B., Khadari, M., Navascués, M., Fernández, Mazuecos, A., ElBakkali, N., Arrigo, D., Baali-Cherif, V., Brunini-Bronzini de Caraffa, S. Santoni, P Vargas and V. Savolainen (2013).** The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. Proc R Soc B 280: 20122833. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.2833>,

**Bradbury, J.F. (1986).** Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International Mycological Institute, Kew, UK, p 332.

**Breton, C.(2006).** Adaptation et évolution de l'olivier et de l'oléastre dans diverses conditions d'isolement, de culture et d'environnement. Tela Botanica. [http://www.tela-botanica.org/page:adaptation\\_evolution\\_olivier?langue=fr](http://www.tela-botanica.org/page:adaptation_evolution_olivier?langue=fr) (consulté en Mai 2016),

**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.

**C.O.I, (2006).** Conseil Oléicole International, Techniques de production en oléiculture.

**Ciccaronei.** *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 3, (March 2002), pp. 1403-1407, ISSN 0099-2240.

**Comai, L. & Kosuge, T. (1980).** Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology* 143, 950–7.

**Cronquist, A. (1981).** An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, USA, Page 1262.

**Daniel, Ps., Maria, P., Chiaraluce, M., Roberto, B., Cayo Ramos & Vittorio, V. (2014).** Bacterial multispecies studies and microbiome analysis of a plant disease. *Microbiology* (2014), 160, 556–566, DOI 10.1099/mic.0.074468-0.

**De Barry, N. (1999).** L'Abécédaire de l'huile d'olive (Éd. Flammarion, France) ,39p.

**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.

**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, ISSN 0266-8254.

**Eurostat. (2016).** Agricultural production – orchards, Olive trees.

**FAO, (2006).** Food and Agriculture Organisation of the United Nations. World olive.

**Gardan, L., Bollet, C., Abu-Ghorrah, M.A., Grimont, F., & Grimont, P.A.D. (1992).** DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *Savastanoi*.

**García de los Ríos, J.E. (1989).** Estudio acerca de la tuberculosis del olivo. Thesis (Ph. D.). Universidad Complutense de Madrid, Spain.

**Guido, M., Carlo V., Luciana G & Guisepe S., (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* (2005). 112: 101-112.

**Guignard & Dupont, (2004),** Botanique : systématique moléculaire. 13<sup>ème</sup>Eds, Masson. Paris. France,P 164-179.

**Hall, B.H., Cothe, E.J., whattam, M.D., Noble, D., Luck, J. & Cartwright, D. (2004).** First report of olive knot caused by *pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* on olives (*Olea europea*) in Australia. *Australasian. Plant. Pathology.* 33 : 219-228 p.

**Horne, T., Parker, B., & Daines, L.L. (1912).** The method of spreading of the olive knot disease. *Phytopathology.* Vol. 2, pp. 101-105, ISSN: 0031-949X.

**Hosni, T., Moretti, C., Devescovi, G., Suarez-Moreno, Z. R., Fatmi, M. B., Guarnaccia, C., Pongor, S., Onofri, A., Buonauro, R. & Venturi, V. (2011).** Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease. *ISME J* 5, 1857–1870.

**Iacobellis, N.S. (2001).** Olive knot. In: *Encyclopedia of Plant Pathology*, Vol. 2, O.C. Maloy & T.D Murray (Eds.), pp. 713-715, John Wiley and sons, ISBN 0471298174, New York, USA.

**ITAF, (2013).** La culture de l'olivier. L'institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne. DFRV 2013. Tessa El Merdja. Birtouta. Alger.

**Janse, J.D. (1982).** *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* ex Smith subsp. nov., nom. rev., the bacterium causing excrescences on *Oleaceae* and *Nerium oleander* L. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 32, No. 2, (April 1982), pp. 166-169, ISSN: 1466-5026.

**Jardak, T. Jerraya, A &Mahjoub, M. (2004).** La protection intégrée dans l'oléiculture dans les pays de l'Afrique du Nord. FAO. Bureau sous régional pour l'Afrique du Nord, SNEA-Tunis. Tunisie, 69-71.

**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.

**Kasraoui, M.F. (2016).** L'olivier. <http://www.kasraoui.com>.

**Krid, S., Rhouma, A., Quessa J. M, Penyalver, R &Guargouri, A. (2009).** Delineation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated in Tunisia by random-amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

**Lavermicocca, P., Lonigro, S.L., Valerio, F., Evidente, A., & Visconti, A. (2002).** Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 3, (March 2002), pp. 1403-1407, ISSN 0099-2240.

**Loussert, L. & Brousse, G. (1978).** L'olivier techniques agricoles et production méditerranéennes, (Eds) Maisonneuve et Larousse, Paris, France, Page 480.

**Loussert, R. & Brousse, G. (1978).** L'olivier. ED. Maisonneuve et Larousse, Paris, page 464.

**Maillard, R. (1975).** L'olivier. Institut de vulgarisation pour les fruits, légumes et champignons. Paris, page 147.

**Maldonado-González, M.M. Prieto P., Ramos C., Mercado-Blanco J. (2013).** From the root to the stem: interaction between the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7 and the pathogen *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 in olive knots. *Microbial Biotechnology*, 6(3):275-87

**Marchi, G., Mori, B., Pollacci, P., Mencuccini, M. & Surico, G. (2009).** Systemic spread of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive explants. *Plant Pathology*, 58:152-158.

**Melotto, M. & Kunkel, B.N. (2013).** Virulence strategies of plant pathogenic bacteria. In: *The Prokaryotes – Prokaryotic Physiology and Biochemistry*, eds. E. Rosenberg et al. Springer-Verlag, Berlin, pp. 61-82.

**Mendil, M. & Sebai, A.(2007).** Aperçu sur le patrimoine génétique autochtone. Institut de l'arboriculture fruitière et de la vigne, Algérie. P 11-100.

**Muto, H., M.K. Watahiki, K.T. Yamamoto. (2007).** What makes each Aux/IAA gene unique in its gene family, expression pattern or properties of the gene product? *Plant Signaling and Behavior*, 2(5):390-392.

**Nicole, W. (2015).** Europe's Olive Trees Are Dying. Here's Why You Should Care

**Pangol, J. (1975).** Précis de botanique pharmaceutique TOME 2, édition librairie Maloine, Paris.

**Passosda Silva, D., PilarCastaneda-Ojeda, M., Moretti, C., Buonauro, R., Ramos,C., & Venturi,V. (2014).** Bacterial multispecies studies and microbiome analysis of a plant disease. *Microbiology* 160, 556–566.doi:10.1099/mic.0. 074468-0.

**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.

**Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., Quesada, J.M., Salcedo, C.I., Piquer, J., Pérez-Panadés, J., Carbonell, E.A., del Río, C., Caballero, J.M. & López, M.M. (2006).** Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology*, Vol. 96, No.3, (March 2006), pp. 313-319, ISSN 0031-949X.

**Protta, U. (1995).** Le malattie dell' olivo. *Informatore Fitopatologico*, No. 12, pp. 16-26, ISSN 0020-0735.

**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, ISSN 1365-3059.

**Quesada, J.M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C.I., Carbonell, E.A. & López, M.M. (2010b).** Comparison of chemical treatments for reducing epiphytic *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and for improving subsequent control of olive knot disease. *Crop Protection*, Vol. 29, No. 12, (December 2010), pp. 1413-1420, ISSN 0261-2194.

**Quesada J. M., Penyalver R., López M. M. (2012).** Epidemiology and control of plant diseases caused by phytopathogenic bacteria: the case of olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*,” in *Plant Pathology*, ed. Cumagun C. J., editor. (INTECH Open Access Publisher; ), 299–326.

**Rakan, H. & Hamid, K.(2005).** Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from Olive and Other Hosts by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Dirasat*, Agricultural Sciences, Volume 32, No. 1,

**Roberto, B., Chiaraluce, M., Daniel, P.S., Chiara, C., Cayo, R. & Vittorio V. ( 2015).** The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease, *Frontiers in plant science*, REVIEW published: 10 June 2015 doi: 10.3389/fpls.2015.00434.

**Rodriguez, M.L., Barcelo, M., A. & Ramos, C. (2008).** In vitro analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *nerii* with micropropagated olive plants. *Phytopathology* 98, 815–822.

**Rodriguez-Moreno, L., Jimenez, A.J. & Ramos, C. (2009).** Endopathogenic lifestyle of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive knots. *Microbial Biotechnology*, 2(4):476-488.

**Saad, D. (2009).** Etude des endomycorhizes de la variété sigoise d’olivier (*Olea europea L.*) et essai de leur application a des boutures semi-ligneuses, Mémoire de magister, université d’Oran, 2009, 98 P.

- Schiff-Giorgini, R. (1906).** Untersuchungen über die tuberkelkrankheit des oelbaumes. Centralb. Bakteriol., Parasitenk. Abt. 2. 15, pp. 200-211
- Senhaji, A. (1999).** Problématique de la tuberculose de l'olivier dans le plateau du Saiss. Journée national sur la protection de l'olivier, Marrakech le 27 mai 1999.
- 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.
- Sisto, A., Cipriani, M.G. & Morea, M. (2004).** Knot formation caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olives is hrp-dependent. *Phytopathology*, 94(5):484-489.
- Smith, E.F. (1908).** Recent studies on the olive-tubercle organism. U.S. Dept. Agr. Bur. Plant Indust. Bull. No. 131 Part, IV.
- Smith, E.F. (1920).** Pathogenicity of the olive knot organism on hosts related to the olive. *Phytopathology*, Vol. 12, pp. 271-278, ISSN 0031-949X.
- Smith, E.F. & Rorer, J.B. (1904).** The olive tubercule. *Science N.Y.*, 19, pp. 416-417.
- Surico, G., Iacobellis, N.S. & Sisto, A. (1985).** Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* sp. *savastanoi*. *Physiological Plant Pathology*, 26:309-320.
- Surico, G. (1986).** Indoleacetic acid and cytokinins in the olive knot disease. An overview of their role and their genetic determinants. In: Bailey J. (ed.). *Biology and Molecular Biology of Plant Pathogen Interactions*, Vol. H1, pp. 315- 329. NATO ASI Series. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Tourte, Y. & Bordonean, M. (2005).** Le monde des végétales : organisations, physiologie et génomique. Eds. DUNOD. Paris. France. 25-26 P.

**Lavermicocca, P., Lonigro, S. L., Valerio, F., Evidente, A., Visconti, A., (2002).** Reduction of Olive Knot Disease by a Bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, (3), 1403-1407. DOI: 10.1128/AEM.68.3.1403-1407.2002.

**Wilson, E.E. (1935).** The olive knot disease: its inception, development and control. *Hilgardia*, 9, pp 233-264.

**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, ISSN 0031-949X.

**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.

**Young, J. (2004).** Olive knot and its pathogens. *Australien Plant Pathology*, 33: 33–39.

**Zohary, D. & Spiegel-Roy, P. (1975).** Beginning of fruits growing in the old world. *Science*, 187: 319- 27 <http://www.fao.org/docrep/004/X6545F/X6545F01.htm>

# **ANNEXES**

---

**Annexe 01****1-Milieux de culture (g/l)****Bouillon Nutritif**

Tryptone .....	10g
Extrait de viande .....	05g
Chlorure de sodium.....	05g

PH= 7,2

**Hugh et Leifson**

Peptone.....	02g
Chlorure de sodium.....	05g
Hydrogénophosphate de potassium.....	0,3g
Glucose.....	10g
Bleu de bromothymol.....	0,03g
Eau distillée.....	1L

PH = 7,2

**Gélose nutritive**

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

PH = 7,2

**Levane (NAS)**

Agar.....	28g
Saccharose.....	50g
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

### **Mueller-Hinton**

Infusion de viande de bœuf .....	300ml
Peptone de caséine.....	17,5g
Amidon de maïs.....	15g
Agar.....	15g

PH : 7,4

## **2-Les réactifs utilisé dans la galerie biochimique API20E**

### **JAMES**

R1: HCl 1N .....	100 ml
R2: Compound J 2183.....	0,66 g

### **VP : Voge Proskauer**

- **VP1**

Hydroxydede potassium .....	40 g
H <sub>2</sub> O .....	100ml

- **VP2**

α-Naphtol.....	6 g
Ethanol .....	100ml

### **Nitrate réductase (NR)**

- **NIT 1**

Acide sulfanilique.....	0,4 g
Acidacétique.....	30g
H <sub>2</sub> O.....	70ml

- **NIT II**

AN, N-dimethyl-1-naphthylamine.....	0,6g
Acidacétique.....	30 g
H <sub>2</sub> O.....	70ml

**TDA: tryptophan desaminase**

Perchlorure de fer .....3.4g  
H<sub>2</sub>O.....100ml

**Huile de vaseline**

**Poudre de Zinc**

## Annexe 02

Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée API20.

Tests	Réactions	Composants actifs	Ajout de réactifs	Résultats	
				Négatif	Positif
<b>ONPG</b>	Béta-galactosidase	2-nitrophénil béta-D-galactopyranoside	Non	Incolore	Jaune
<b>ADH</b>	Arginine dihydrolase	L-arginine	Non	Jaune	Orange ou rouge
<b>LDC</b>	Lysine décarboxylase	L-lysine	Non	Jaune	Orange ou rouge
<b>ODC</b>	Ornithine décarboxylase	L-ornithine	Non	Jaune	Orange ou rouge
<b>CIT</b>	Assimilation de citrate	Citrate trisodique	Non	Vert pale ou jaune	Bleu vert ou bleu
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Thiosulfate réductase	Thiosulfate de sodium	Non	Incolore ou grisâtre	Dépôt noir
<b>URE</b>	Uréase	Urée	Non	Jaune	Orange ou rouge violacé
<b>TDA</b>	Tryptophane désaminase	L-tryptophane	TDA	Jaune	Marron ou brun foncé
<b>IND</b>	Production d'indole	L-tryptophane	James	Jaune	Rose ou rouge
<b>VP</b>	Production d'acétoïne	Pyruvate de sodium	VP1 VP2	Incolore	Rose ou rouge
<b>GEL</b>	Gélatinase	Gélatine de bœuf	Non	Non Diffusion du charbon	Diffusion du charbon
<b>GLU</b>	Glucose	D-glucose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
<b>MAN</b>	Mannitol	D-mannitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Inositol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
<b>SOR</b>	Sorbitol	D-sorbitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
<b>RHA</b>	Rhamnose	L-rhamnose	Non	Bleu ou bleu Vert	Jaune
<b>SAC</b>	Saccharose	D-saccharose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
<b>MEL</b>	Mélibiose	D-mélibiose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	Amygdaline	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
<b>ARA</b>	Arabinose	L-arabinose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune

# **RESUME**

## Résumé

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.

La tuberculose d'olivier est une maladie bactérienne affectant les oliviers (*Olea europea* L). L'agent causal est le *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* responsable de la formation des nœuds (galles) sur le tronc et les rameaux. Cette maladie fait des ravages sur l'oléiculture en Algérie.

Le but de ce travail est d'isoler des bactéries à partir des échantillons provenant des tumeurs formés sur les branches des oliviers cultivées dans le verger de Sid Ali commune d'Aïn Roua daïra de Bougaa wilaya de Sétif, d'établir le profil phénotypique des espèces microbiennes et tester leur pouvoir de résistance et sensibilité aux antibiotiques.

En se basant sur le test LOPAT et les galeries API 20E, aucun isolat n'a été révélé comme *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Par conséquent, deux bactéries Gram négatives P1T1K2(1) et P1T1K2(1)' ont été identifiées comme *Enterobacter cloaceae*, et deux autres isolats Gram positifs (P1T1K2(2) C<sub>b</sub>, P1T1K2(2) C<sub>i</sub>) ont été identifiées respectivement comme, *Lactobacillus*, *Clostridium*, l'isolat P1T1K1(3) a été non identifiée selon les tests biochimiques effectuées.

L'antibiogramme révèle que les souches d'*Enterobacter cloaceae* sont hautement sensible et intermédiaire à la majorité des antibiotiques testés, et résistant a l'amoxicilline, kanamycine, pristnamycine. Alors que les souches *Lactobacillus* et P1T1K1(3) ont été sensible aux douze antibiotiques testés.

Ces tests doivent être couplés par des techniques sérologiques ou génomiques pour effectuer la classification jusqu'à l'espèce.

**Les mots clés :** la tuberculose de l'olivier, tumeurs, galles, *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, *Enterobacter cloacea*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, verger de Sid Ali, LOPAT, antibiotiques, antibiogramme, phénotypique.

## **Abstract**

The olive tree is one of the oldest fruit trees grown mainly in Mediterranean countries; this tree is well known for its food and therapeutic interests.

The olive knot is a bacterial disease affecting olive trees (*Olea europea* L). The causative agent is *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* responsible for the formation of knots (galls) on the trunk and twigs. This disease wreaked havoc on olive growing in Algeria.

The purpose of this work is to isolate bacteria from knots formed on the twigs of olive trees grown at Sid Ali Olive Orchard, Ain Roua daira of Bougaa wilaya of Setif, and to establish the phenotypic profile of bacterial isolates and test their power of resistance and antibiotic sensitivity.

Based on LOPAT test and gallery API20E, no isolates have been revealed as *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Therefore, two Gram-negative bacteria P1T1K2(1) and P1T1K2(1) have been identified as *Enterobacter cloacae*, and two Gram-positive isolates (P1T1K2(2)<sub>C<sub>b</sub></sub> and P1T1K2(2)<sub>C<sub>t</sub></sub>) were identified respectively as *Lactobacillus* and *Clostridium*, the isolate P1T1K1(3) was not identified.

Antimicrobial susceptibility reveals that the *Enterobacter cloacae* strains were highly and intermediate sensitive to the majority of the tested antibiotics, and resistant to amoxicillin, kanamycin and Pristinamycin. While *Lactobacillus* strain and the isolate P1T1K1(3) were sensitive to all the 12 antibiotics tested.

These tests should be coupled with serological or genomic techniques to perform the classification to the species.

**Keywords:** olive knot, tumors, gall, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, orchard Sid Ali, LOPAT, antibiotic susceptibility, phenotypic.

## ملخص

تعتبر شجرة الزيتون من أقدم الأشجار المثمرة مزروعة أساسا في بلدان البحر الأبيض المتوسط، هذه الشجرة معروفة بفوائدها الغذائية والعلاجية.

*Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* هي بكتيريا ممرضة تصيب أشجار الزيتون و تسبب مرض يسمى سل

الزيتون. هذه البكتيريا مسؤولة على تشكيل عقد على مستوى الجذع و الأغصان. مما أدى الى تدهور زراعة الزيتون في الجزائر.

الغرض من هذه الدراسة هو عزل البكتيريا من عينات من الأورام تشكلت على فروع أشجار الزيتون المزروعة في بستان سيد علي بلدية عين روى دائرة بوقاعة بولاية سطيف، وأخذ لمحة عن النمط الظاهري للأنواع الميكروبية واختبار قوتها من المقاومة والحساسية للمضادات الحيوية.

لذلك نعتد على اختبار LOPAT و Galerie API 20E , الذي من خلالهما لم يتم الكشف على *Pseudomonas savastanoi*

اثنان من العزلات سالبة P1T1K2(1), P1T1K2(2) شخضت على أنها

*Enterobacter cloacae* . و الثلاث عزل موجبة الجرام شخض اثنان منها C<sub>t</sub>, P1T1K2(2) C<sub>b</sub>, P1T1K2(2) الجرام

على أنهما *Clostridium* و *Lactobacillus* على التوالي. و العزلة (3) P1T1K1 لم نستطع تشخيصها من خلال هذه الاختبارات.

*Enterobacter cloacae* لها حساسية و حساسية متوسطة لأغلب المضادات التي تم اختبارها، و مقاومة للأموكسيسيلين،

كاناميسين، بريستيناميسين. في حين كانت *Lactobacillus* و P1T1K1(3) لهما مقاومة عالية لجميع المضادات الحيوية

التي تم اختبارها.

هذه الاختبارات ينبغي أن نكملها بتقنيات مصلية أو جينية من أجل تحديد أنواع هذه العزلات.

**الكلمات المفتاحية:** سل الزيتون , ورم , *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* , *Enterobacter cloacae*

بستان LOPAT, *Clostridium* , *Lactobacillus*

سيد علي, مضاد حيوي, نمط ظاهري.

**Thème : Etude sur la tuberculose de l'olivier ; isolement et identification présomptifs de quelques isolats bactériennes à partir de tumeurs.**

**Nature du diplôme :** Master

**Domaine :** Science de la Nature et de la Vie

**Filière :** Science Biologiques

**Spécialité :** Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

**Résumé :**

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.

La tuberculose de l'olivier est une maladie bactérienne affectant les oliviers (*Olea europea* L). L'agent causal est le *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* responsable de la formation des nœuds (galles) sur le tronc et les rameaux. Cette maladie fait des ravages sur l'oléiculture en Algérie.

Le but de ce travail est d'isoler des bactéries à partir des échantillons provenant des tumeurs formés sur les branches des oliviers cultivées dans le verger de Sid Ali commune d'Aïn Roua daïra de Bougaa wilaya de Sétif, d'établir le profil phénotypique des espèces microbiennes et tester leur pouvoir de résistance et sensibilité aux antibiotiques.

En se basant sur le test LOPAT et les galeries API 20E, aucun isolat n'a été révélé comme *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Par conséquent, deux bactéries Gram négatives P1T1K2(1) et P1T1K2(1)' ont été identifiées comme *Enterobacter cloacae*, et deux autres isolats Gram positifs (P1T1K2(2) C<sub>b</sub>, P1T1K2(2) C<sub>i</sub>) ont été identifiées respectivement comme, *Lactobacillus*, *Clostridium*, l'isolat P1T1K1(3) a été non identifiée selon les tests biochimiques effectuées.

L'antibiogramme révèle que les souches d'*Enterobacter cloacae* sont hautement sensible et intermédiaire a la majorité des antibiotiques testés, et résistant a l'amoxicilline, kanamycine, pristinamycine. Alors que les souches *Lactobacillus* et P1T1K1(3) ont été sensible aux douze antibiotiques testés.

Ces tests doivent êtres couplées par des techniques sérologiques ou génomiques pour effectuer la classification jusqu'à l'espèce.

**Mots clés :** la tuberculose de l'olivier, tumeurs, galles, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, verger de Sid Ali, LOPAT, antibiotiques, antibiogramme, phénotypique.

**Lieu de travail :** Laboratoire de Biologie Moléculaire, FSNV, UFM Constantine  
Laboratoire de Biotechnologie, FSNV, UFM Constantine

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mme. Guergouri Ibtissem (MAA- UFM Constantine).

**Rapporteur :** Dr. Boubekri Karima (MCA- UFM Constantine).

**Examinatrice :** Mme. Bouzeraib Latifa (MAA- UFM Constantine).

**Tutrice :** Melle. Tir Radja