



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-Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة1
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 : Biologie moléculaire des microorganismes

Intitulé :

Caractérisation de la bactériose de l'olivier à *Pseudomonas savastanoi* et autres bactéries endophytes à partir de l'oliveraie située à Amira Arrès, Wilaya de Mila.

Présenté et soutenu par : *FATMI Feryal*

Le : 14/07/2019

SAMMAR Malek

Jury d'évaluation :

Président du jury : BOUDEMAGH Allaoueddine (Professeur - UFM Constantine1).

Encadreur : BOUBEKRI Karima (MCA - UFM Constantine1).

Examinatrice : MIHOUBI Ilhem (Professeur - UFM Constantine1).

Tutrice : Mme. TIR radja (Doctorante - UFM Constantine1).

*Année universitaire
2018 - 2019*

Remerciements

Avant tout développement sur ce travail, il est primordial de commencer par remercier notre encadreur Dr Boubekri Karima, maitre de conférences A à l'université Frères Mentouri-Constantine 1, pour sa présence et son orientation.

Nous tenons particulièrement à exprimer notre gratitude envers la doctorante Tir Radja qui nous a formés et guidés durant cette expérience, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Un très grand merci à tous ceux et celles qui nous ont beaucoup appris et aidés tout au long de cette recherche effectuée au Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Frères Mentouri-Constantine 1.

A tout membre de la Direction de l'Agriculture de la wilaya de Constantine et de Mila.

Un très grand merci à l'équipe du département de Microbiologie pour leur aide, gentillesse et précieux conseils.

Nos vifs remerciements à l'oléiculteur M. Boucheboura Mesaoud qui nous a accueillis chaleureusement et rendu ce travail possible.

A Mme Guergouri, Mme Bouzeraib, Mme Boucheloukh et M.Chabbi pour leur bonté et disponibilité.

On exprime notre gratitude à M. le Pr Boudemegh d'avoir accepté de présider le jury ainsi qu'à Mme la Pr Mihoubi de l'importance qu'elle nous a accordée et d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Enfin, on remercie vivement chacune de nos deux familles respectives pour leur soutien et perpétuel encouragement

Dédicace

Je dédie cet événement marquant dans ma vie à mes chers parents pour leur soutien, patience et encouragement durant tout mon parcours scolaire. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes l'expression de mes sincères gratitude et reconnaissances.

A ma grand-mère qui n'a cessé de prier pour moi ainsi qu'à toute ma famille.

A mes chères amies et camarades et à tous ceux qui m'ont aidé, conseillé et soutenu pour que ce travail soit accompli.

Malek

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents, précisément ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A mon frère FADHEL, à ma sœur CHAHINEZ et à tous mes amis, camarades et collègues.

A Mr.Boudemagh qui m'a appris d'aimer cette spécialité, le professeur qui a élargi et encore élargit nos perspectives et surement va élargir les perspectives des promotions prochaines ; je vous dis cher monsieur : MERCI.

A mes précieux élèves que j'adore et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis MERCI.

Feryal

Table des matières

Liste des abréviations	iii
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	vi
Introduction	1
I. Généralité sur l'olivier	3
1. Origine et historique de l'olivier	3
2. Description botanique de l'olivier	4
2. 1. Différents types d'oliviers	7
3. Classification botanique de l'olivier	7
4. Formes de l'olivier	8
5. Critères de différenciation	9
6. Cycle de développement de l'olivier	10
7. Cycle végétatif annuel de l'olivier	11
8. Répartition géographique de l'olivier dans le monde	11
8. 1. Répartition géographique de l'olivier en Algérie	13
8. 1. 1. Variétés les plus cultivées en Algérie	13
9. Intérêt de l'olivier	14
II. Fruit et Huile	14
1. Structure et composition chimique du fruit	14
1. 1. Structure de l'olive	14
1. 2. Composition chimique de l'olive	16
2. Définition de l'huile d'olive	16
3. Composition des huiles d'olive	17
4. Catégories d'huiles	18
5. Données physico-chimiques d'huile d'olive	19
6. Critères de détermination d'une huile d'olive vierge de haute qualité	20
7. Intérêt de l'huile	20
III. Tuberculose de l'olivier	21
1. Historique	21
2. Symptômes de la tuberculose de l'olivier	23
3. Agent causal	24
4. Classification de <i>Pseudomonas savastanoi</i>	25

5. Pouvoir pathogène de l'agent causal	25
6. L'effet des tumeurs sur le rendement de l'olivier	26
7. Les bactéries existant en nœuds d'olivier	27
8. Cycle de la maladie	27
9. Impact de la maladie	29
10. Gestion de la maladie	30
11. Répartition géographique de la maladie	30
12. Mesures de lutte biologique contre la tuberculose de l'olivier	31
Chapitre II. Expérimentation	
Partie 1 : Matériel et méthodes	32
L'échantillonnage	33
L'isolement	34
Purification et conservation des souches	35
Identification phénotypique des isolats	37
Partie 2 : Résultats et discussion	43
Conclusion et perspectives	62
Références bibliographiques	63
Annexe	
Résumé	

Liste des abréviations

AC-AG : anti corps-anti gène	ODC : ornithine Décarboxylase
ADN : acide désoxyribonucléique	OEPP : organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes.
AGMI : acide gras mono insaturé	OF/F : fermentatif
CIT : citrate	OF/O : oxydatif
E : enterobacteriaceae	OKA : oleander knot agar
FAO : food and Agricultural Organisation	ONPG : ortho-NitroPhényl-β-Galactoside
Gel : gélatine	Ox : oxydase
GLU : glucose	pv : pathovar
GN : gélose nutritive	RHA : rhamnose
ha : hectare	SAC : saccharose
IAAL : indole 3 acide acétique lysine synthétase	S.C.A.H : société centrale d'agriculture de Nice et des Alpes
IAA : auxines ou indole 3acide- acétique	SOR : sorbitol
IND : indole	spp : plusieurs espèces possibles
INO : inositol	SSR : simple sequence repeats
INPV : institut national de la protection des végétaux	TDA : tryptophane Désaminase
J.C : jésus-christ	URE : uréase
KB : milieu B de King	VP : piruvate de sodium
Kg F/ cm² : kilogramme-force par centimètre carré	
LDC : lysine Décarboxylase	
LOPAT : tests Levane-NAS, Oxydase, Pectinase, Agrinine dihydrolase, hypersensibilité du Tabac.	
LPGA : milieu Levure Peptone Glucose	
Man : mannitol	
McC : Mac Conkey	
Mel : melibiose	
MOB : mobilité	
NAS : saccharose agar nutritive	
N.E : non enterobacteriaceae	

Liste des figures

Figure 01 : champ d'oliviers	4
Figure 02 : feuilles d'olivier	5
Figure 03 : fleurs d'olivier	6
Figure 04 : fruit d'olivier	6
Figure 05 : champ d'olivier cultivé	9
Figure 06 : cycle végétatif annuel de l'olivier	11
Figure 07 : carte géographique de la répartition mondiale de l'olivier	12
Figure 08 : secteur graphique montrant le verger oléicole mondial	12
Figure 09 : les zones oléicoles en Algérie	13
Figure 10 : coupe longitudinale et transversale d'une olive	15
Figure 11 : olive et huile d'olive	16
Figure 12 : diverses qualités d'huiles d'olive	19
Figure 13 : tumeur sur branche d'olivier du verger situé à Amira Arrès	24
Figure 14 : tumeurs sur feuilles d'olivier	24
Figure 15 : tumeurs sur tronc d'olivier du verger situé à Amira Arrès	24
Figure 16 : <i>Pseudomonas savastanoi</i> vue en microscope électronique à balayage	25
Figure 17 : cycle de la bactériose de la tuberculose d'olivier causée par <i>Pseudomonas savastanoi</i>	29
Figure 18 : carte géographique des régions les plus touchées par la tuberculose de l'olivier	31
Figure 19 : localisation d'Amira Arrès, Wilaya de Mila	33
Figure 20 : jeune olivier du verger situé à Amira Arrès	34
Figure 21 : jeune tumeur d'olivier du verger situé à Amira Arrès	35
Figure 22 : conservation cryogéniques des isolats	36
Figure 23 : aspects microscopiques des 45 isolats bactériens à partir des galles	44
Figure 24 : la coloration de Gram. Bacille à Gram positif (isolat AFM 17), bacille à Gram négatif (isolat AFM 41)	45
Figure 25 : le test de potasse indicateur de Gram	45
Figure 26 : résultats de l'observation microscopique	47
Figure 27 : résultat du test catalase de la souche AFM 6	48

Figure 28 : résultat du test oxydase de la souche AFM 6	48
Figure 29 : résultats du test mannitol-mobilité	49
Figure 30 : résultat du test Levane de la souche AFM 6 sur milieu NSA	50
Figure 31 : résultats du test Mac Conkey	50
Figure 32 : résultats positif du test pectinase sur pomme de terre de la souche AFM6	51
Figure 33 : résultat négatif du test pectinase sur pomme de terre de la souche AFM4	51
Figure 34 : résultat positif de fluorescence de la souche AFM 6 à Gram négatif	52
Figure 35 : résultat négatif du test de fluorescence d'une souche d' <i>E.coli</i> à Gram positif testée comme témoin	52
Figure 36 : résultats du test d'hypersensibilité sur feuilles de Tabac	53
Figure 37 : résultats des galeries API 20 E des souches AFM 6 et AFM 9	57
Figure 38 : résultats de la galerie API 20 NE des souches AFM 11, 27,28	Annexe 03
Figure 39 : résultats de la galerie API 20 NE des souches AFM 1, 33, 26	Annexe 03
Figure 40 : résultats de la galerie API 20 NE des souches AFM 25, 29, 35,8	Annexe 03
Figure 41 : résultats de la galerie API 20 E des souches 38, 27', 4, 43	Annexe 03
Figure 42 : résultats de la galerie API 20 E des souches 24, 30, 38', 37, 7, 9	Annexe 03

Liste des tableaux

Tableau 01 : critères morphologiques de classement des oliviers en olivier cultivé, sauvage ou féral	10
Tableau 02 : les variétés majoritaires de l'olivier en Algérie	13
Tableau 03 : composition physique de l'olive	16
Tableau 04 : différents composants de l'olive	16
Tableau 05 : principaux triglycérides de l'huile d'olive	18
Tableau 06 : données physico-chimiques de classification des huiles	19
Tableau 07 : noms scientifiques et noms communs internationaux de l'agent causal de la tuberculose de l'olivier	21
Tableau 08 : noms scientifiques de l'agent causal	23
Tableau 09 : réduction du rendement suite au nombre de tumeurs par branche d'olivier	27
Tableau 10 : les aspects macroscopiques des souches isolées sur King B	44
Tableau 11 : description de l'aspect microscopique des souches étudiées par la coloration de Gram et le test de potasse	46
Tableau 12 : résultats des tests ; Catalase, Oxydase, Mannitol-mobilité, MEVAG, culture sur milieu McConkey et sur le milieu Levane	50
Tableau 13 : résultats du test LOPAT des souches AFM 6 et 9	51
Tableau 14 : résultats des tests API 20 NE (partie 1)	54
Tableau 14 : résultats des tests API 20 NE (partie 2)	55
Tableau 15 : Tests API 20 NE-Identification des souches par le logiciel APIWEB™ de l'API 20 NE	56
Tableau 16 : résultats des tests API 20 E (partie 1)	58
Tableau 16 : résultats des tests API 20 E (partie 2)	59
Tableau 17 : tests API 20 E –identification des souches par le logiciel spécifique de l'API 20 E	60
Tableau 18 : tableau comparatif des résultats des différents tests entre la souche référence <i>Pseudomonas savastanoi</i> (NCPPB 3318) et les souches AFM 6 et 9	60

Introduction

Introduction

L'olivier sauvage, appelé oléastre, est présent dans de nombreuses régions du pourtour méditerranéen (oriental et occidental). Il a été cultivé pour la première fois en Anatolie il y a environ 8000 ans. Par la suite, il s'est répandu progressivement au Moyen-Orient, en Afrique du Nord et en Europe du Sud grâce à la colonisation des grecs et des romains.

Actuellement, plusieurs pays non méditerranéens ont eu tendance à développer cette culture dans certaines régions spécifiques de leur territoire. Les pays méditerranéens restent prédominants avec plus de 95 % de la production d'huile d'olive et avec environ 90 % de sa consommation (F.A.O, 2003). L'olivier a une importance majeure économique, grâce à sa grande valeur diététique et médicinale. En effet, plusieurs recherches ont montré que l'huile d'olive a un grand intérêt préventif contre différents types de maladies.

En Algérie, l'olivier est 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). C'est l'un des pays du bassin méditerranéen avec des conditions climatiques idéales pour la culture de l'olivier. Il est à préciser aussi que même pendant la période coloniale l'oléiculture était une filière totalement algérienne (Zoubir, 2017).

Éventuellement, cet arbre est une cible de différents types d'attaques d'origine fongique, bactérienne ou ravageurs. La tuberculose de l'olivier, aussi connue sous le nom de bactériose d'olivier, est une maladie qui a été décrite pour la première fois au IV^e siècle avant J.C par le philosophe grec Theophrastus. Or, ce n'est qu'en 1885 que G. Arcangeli a soupçonné une cause bactérienne à cette maladie. Une année plus tard, Savastano a réussi à isoler pour la première fois cette bactérie, d'où le nom *Pseudomonas savastanoi*.

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* est largement répandue dans le sol, l'eau et l'air. Elle a la forme d'un bâtonnet Gram négatif, oxydase négative, mobile, endophyte, phytopathogène, causant des excroissances, nommées galles, des nœuds ou des tumeurs principalement sur les parties aériennes des plantes (Benjama, 2003 ; Young, 2004). Résidente commune dans la phyllosphère d'olive (Ercolani, 1971), 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 (Ciccarone, 1950).

Les conclusions d'une enquête lancée en 2017 à Oran a révélé que la tuberculose de l'olivier, qui peut avoir des retombées catastrophiques sur la production oléicole et la croissance des oliviers, n'est perceptible que plusieurs années après la plantation des arbres (Hamdouche, 2017). La seule solution lors d'une infection est de déraciner l'olivier, le brûler afin d'éviter la propagation et de stériliser les outils de taille des oliviers en cas de doute, estime un spécialiste (Bouarissa, 2016). 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, d'autres wilayas comme : Mila, Sétif, Constantine et Jijel sont touchées, mais rien n'est officiellement déclaré et pourraient être beaucoup plus vaste.

Ce travail est une continuation du projet de recherche lancé en 2014 qui porte sur l'étude de la bactériose de l'olivier à partir de plusieurs variétés d'arbres existant en Algérie. Cette recherche a pour objectifs de fournir une revue bibliographique récente des différentes informations sur l'olivier et sa maladie bactérienne. De plus, l'agent pathogène responsable de la maladie chez la variété Sigoise ainsi que d'autres bactéries présentes dans les tissus végétaux affectés seront isolées et identifiées par le test LOPAT et d'autres tests bactériologiques conventionnels.

Revue Bibliographique

I. Généralité sur l'olivier

1. Origine et historique de l'olivier

Symbole de paix et de longévité, l'olivier (Figure 01) est un arbre prophétique aux bienfaits indénombrables, il a été cité dans le saint Coran à plusieurs reprises, ainsi que dans d'autres livres comme la Bible. L'existence de cet arbre remonte à la préhistoire mais son origine reste toujours incertaine, sauf que l'hypothèse la plus répandue indique la Syrie et l'Iran comme régions d'origines grâce aux vestiges datant du milieu du III^e millénaires av. J.-C. trouvés à Alep (localisée au nord de la Syrie), (Loussert et Brousse, 1978).

Le mot olivier vient du grec dont eux même l'ont emprunté à la langue pré-indoeuropéenne. Les linguistes ont remonté son origine au terme « Elaiwon », devenu « Elaia » chez les grecs antiques jusqu'à devenir « olea » chez les romains. Cet arbre a toujours été désigné d'une même racine commune à toutes les langues (Rieu *et al.*, 2007).

Les olives étaient cultivées il y a environ 8 000 ans en Anatolie, où elles se sont répandues au Moyen-Orient, en Afrique du Nord et en Europe du Sud. L'olive s'est répandue très tôt dans toute l'Europe méditerranéenne et l'Afrique du Nord, en raison de sa facilité de multiplication végétative et de culture sous des climats secs (Efe *et al.*, 2012).

L'expansion de l'espèce cultigène commune *Olea europaea*, connue depuis des siècles dans la région méditerranéenne se fit de l'est en ouest et se répandit dans tout le territoire grâce aux Grecs et aux Romains suite à leur colonisation du bassin méditerranéen (Loussert et Brousse, 1978 ; Breton *et al.*, 2006 ; Artaud, 2008).

Les musulmans ont propagé les olives et la culture qui les entourent lorsque l'empire romain est tombé et que les Omeyyades l'ont transportée à Gibraltar en 711, où les grandes oliveraies d'Andalousie ont commencé. Les Arabes qui sont restés en Espagne pendant environ huit siècles (711–1492) ont contribué au développement et à l'établissement de la culture de l'olivier dans ce pays (Efe *et al.*, 2012).

Les premières preuves enregistrées de la culture d'olivier se trouvaient dans les fouilles en Palestine et en Jordanie, qui remontent à 3750 av. JC. Des olives ont été découvertes dans d'anciennes tombes et pyramides égyptiennes, notamment des outils servant à presser les olives découverts dans la plus ancienne pyramide à gradins de Saqqarah (2500 ans av. J.-C.)

et des images illustrant le processus de compression des olives (Efe *et al.*, 2012) ; (Jordi, 2006).

Les premières preuves enregistrées de la culture d'olivier se trouvaient dans les fouilles en Palestine et en Jordanie, qui remontent à 3750 av. J.-C. Des olives ont été découvertes dans d'anciennes tombes et pyramides égyptiennes, notamment des outils servant à presser les olives découverts dans la plus ancienne pyramide à gradins de Saqqarah (2500 ans av. J.-C.) et des images illustrant le processus de compression des olives (Efe *et al.*, 2012).

En Algérie, les paysans s'y consacraient avec art durant plusieurs siècles (Alloum, 1974). Au sein du Tassili les hommes du néolithique ont archivé l'histoire de l'olivier sous forme de rupestres sur les roches qui remonte de 5000 à 2500 ans avant J.C, illustrant des hommes, portant des rameaux d'olives comme sorte de couronnes (Perret et Robert, 1935).

L'oléiculture constitue l'une des activités économiques essentielles de notre population étant donné que le commerce d'huile d'olive entre l'Algérie et Rome était intense durant l'époque romaine, dès lors l'histoire de l'olivier se confond avec l'histoire de l'Algérie et les différentes invasions ont eu un impact certain sur la répartition géographique de l'olivier dont nous avons hérité à l'indépendance du pays (Mendil et Sebai, 2006).



Figure 01 : champ d'oliviers (Boulssen et Bouraoui, 2016)

2. Description botanique de l'olivier

L'olivier est un arbre massif, à croissance plutôt lente mais d'une longévité légendaire, très rameux, il dispose d'un tronc au bois dur, dense, noueux et tortueux souvent strié et d'une écorce brune crevassée pouvant atteindre jusqu'à 20 mètres de hauteur.

Racines

Le système racinaire de l'olivier est à développement latéral, permet à l'arbre de résister en sols pauvres et secs grâce à sa régulation métabolique, peu profond d'environ 1,25 à 1,80m, cependant les racines qui dépassent les premiers mètres sont celles qui alimentent l'arbre en eau en cas de forte sécheresse. Il faut noter que l'olivier peut s'adapter à tous types de sols saufs lourds (argileux), compacts ou humides (Afidalo, 2019).

Les observations réalisées sur la dynamique du système racinaire (Fernandez *et al.*, 1990) ont permis de montrer que l'olivier développe ses racines dans les zones les plus dépourvues en eau.

Feuilles

Feuillage (Figure 02) persistants et coriaces, d'une durée de vie moyenne de deux ans et demi, mesurent 4 à 8 cm de long, d'une forme ovale allongée, peu enroulée et portées par un court pétiole. La couleur des feuilles est d'un vert foncé sur la surface supérieure et vert clair argenté avec nervures sur la surface inférieure. Leur coloration qui tend légèrement vers le bleu leur permet de refléter la lumière et de mieux résister à la sécheresse. En cas de mauvaises conditions telles que l'orage ou autres, les feuilles se retournent automatiquement pour être exposées à la pluie leur face inférieure qui peut capter l'eau à l'aide de ses nervures, tandis que leur deuxième face est mise en évidence lors de la photosynthèse.



Figure 02 : feuilles d'olivier (Anonyme, 2015)

Fleurs

La floraison de l'olivier (Figure 3) ne dure qu'une semaine entre mai et juin sur les rameaux âgés de deux ans et cela par autofécondation de la plupart des oliviers autofertiles. Ces fleurs hermaphrodites se présentent en grappes de 10 fleurs allant jusqu'à 40, blanches ou blanches jaunâtres, petites, avec une corolle et un calice à quatre pétales ovales, elles sont très légèrement odorantes et très sensibles au froid et au vent. Seulement 5% des fleurs donneront naissance à un fruit, l'olive.



Figure 03 : fleurs d'olivier (Anonyme, 2017)

Fruit

L'olive (Figure 04) est le fruit comestible de l'olivier dont on peut tirer l'huile, se présente sous forme d'une drupe ovoïde de 1,5 à 2 cm, et d'un poids qui varie entre 2 et 20 gramme selon la variété. Il est à peau lisse et d'un noyau dur contenant une graine. La période de formation de l'olive se situe entre le mois de juin et le mois de novembre, verte au début de sa croissance puis se teint en rouge violet, garde sa couleur initiale ou vire vers le noir en sa pleine maturité, cela dépend de la variété de l'arbre en question.



Figure 04 : fruit d'olivier (Anonyme, 2011)

2. 1. Différents types d'oliviers

Olivier de production

Destiné à la production fruitière, peut être planté dans une oliveraie, intégré dans un parc ou même dans un jardin.

Olivier d'ornement

Se présente généralement dans des pots de différentes formes et de couleurs, destinés à la décoration de l'espace extérieur ou même intérieur des maisons. Peut toujours produire des olives mais à une basse productivité à cause du remaniement de ses branches et de sa taille.

Olivier repiqué

Livré dans des pots, qui pourront par la suite être replantés ou laissés dans la terre cuite pour embellir les terrasses et balcons ; sont généralement des oliviers de moins de trente ans (Louchet, 2015).

3. Classification botanique de l'olivier

L'olivier selon Cronquist (1981), classification classique des angiospermes:

- **Règne :** Plantae
- **Sous-règne :** Traheobionta
- **Division :** Magnoliophyta
- **Classe :** *Magnoliopsida*
- **Sous-classe :** Asteridae
- **Ordre :** Scrophulariales
- **Famille :** Oleaceae
- **Genre :** *Olea*
- **Espèce :** *Olea europea*
- **Sous-espèce:**

cupsidata (de l'Afrique du sud jusqu'au sud de l'Égypte, du sud de l'Arabie Saoudite
Jusqu'en Chine)

africana (Afrique, Arabie et Madagascar)

cerasiformis (iles Canaries, Madère)

guanchica (iles Canaries)

laperrinei (Algérie, Argentine, Niger et Soudan)

maroccana (Maroc)

L'*Olea europaea*, est la principale espèce produisant suffisamment de fruits comestibles (Vossen, 2007) et l'unique espèce dont le fruit produit de l'huile d'olive (Rabiei *et al.*, 2012). Elle comporte six sous-espèces (Chiappetta et Muzzalupo, 2012 ; Kailis, 2017) dont la sous-espèce *europaea* qui est cultivée en méditerranée. Cette dernière comprend deux formes qui coexistent : la forme sauvage « oléastre », également appelée « *Sylvestris* » ou « variété *sylvestris* » et la forme cultivée, appelée sous-espèce « *europaea* » ou « variété *europaea* /*sativa*» (Chiappetta et Muzzalupo, 2012).

4. Formes de l'olivier

L'olivier sauvage

L'olivier sauvage ou oléastre, est un arbre d'une incroyable longévité qui peut dépasser les 1000 ans grâce à sa forte résistance aux conditions indésirables de sécheresse, froid, stress hydrique, sol pauvre ou autres (Chiappetta et Muzzalupo, 2012).

Connu sous deux formes différentes "l'oléastre vrai" qui est purement naturel et "l'oléastre féral" qui est une forme cultivée mais retournée à l'état sauvage (Besnard *et al.*, 2000). Il se caractérise par ses nombreux rameaux épineux à branches quadrangulaires et à feuilles plutôt petites. L'oléastre produit des olives de petite taille et par conséquent un faible rendement d'huile d'olive (Pagnol, 1996). Son importance réside dans son bois, réputé pour être immortel, résistant et antibactérien, utilisé dans toutes sortes de fabrications (Maillard, 1995).

L'olivier cultivé

L'olivier cultivé (Figure 05) est un arbre fruitier, qui contrairement à l'arbre sauvage produit de grosses olives bien charnues dont on peut fabriquer une quantité non négligeable d'huile d'olive (Pagnol, 1996). Cet arbre peut atteindre plusieurs mètres de hauteurs cela dépend du cultivar et des conditions environnementales du milieu (Pagnol, 1996).

Dans le but de conserver les caractéristiques de l'olive et de son huile, l'olivier est multiplié par voie végétative : bouturage et greffage. Le greffage est la technique la plus utilisée en raison de son gain de temps sur le délai d'entrée en production, et des propriétés bénéficiées par le porte greffon. Le greffage sur oléastre est pratiqué dans plusieurs pays

méditerranéens facilitant l'adaptation afin d'obtenir une réponse rapide des nouveaux cultivars introduits aux conditions locales (Breton *et al.*, 2006).



Figure 05 : champ d'olivier cultivé (Charlottess, 2010)

5. Critères de différenciation

Les deux formes d'olivier se distinguent facilement par leur morphologie. L'olivier sauvage se présente comme un arbrisseau, aux rameaux épineux, avec des fleurs plus petites et des feuilles étroites et courtes; l'écorce quant à elle est plutôt fine et grise que celle de l'olivier sauvage (Bolmont *et al.*, 1998).

Les deux oliviers sont d'une longue durée de vie, ils montrent également des exigences climatiques similaires et de grandes zones de distribution, comme ils ont le même nombre de chromosome ($2n = 46$) (Lumaret *et al.*, 2004). Cependant, les oléastres (sauvages) diffèrent par leurs fruits qui sont plus petits, leur faible teneur en huile et souvent par leurs feuilles plus courtes (Green, 2002). Par ailleurs, les branches sont nombreuses, présentant des épines dans le cas des jeunes plantes (Chiappetta et Muzzalupo, 2012; Lumaret *et al.*, 2004).

Du fait du flux génétique entre olivier sauvage et olivier cultivé, les caractères morphologiques (Tableau 01) sont insuffisants pour distinguer entre les cultures et les espèces sauvages. Ainsi, les sélectionneurs se tournent vers des marqueurs moléculaires (Hannachi *et al.*, 2013).

Tableau 01: critères morphologiques de classement des oliviers en olivier cultivé, sauvage ou féral
(Hannachi *et al.*, 2013)

Critères	Olivier cultivé	Oléastre vrai	Oléastre féral
Architecture de l'arbre	Arbre allant jusqu'à 15 mètres de haut avec un à plusieurs troncs.	Arbuste souvent dense, ramifié et épineux ou arbre jusqu'à 15 mètres de haut.	Arbuste ou arbre
Taille du fruit (cm)	1,2 à 4	< 1,5	1,2 à 2
Mésocarpe	Epais et charnu	Charnu	Charnu
Ecosystème	Agro	Naturel	Agro-naturel
Teneur en huile (%)	>10	< 15	>10

6. Cycle de développement de l'olivier

On distingue quatre périodes défini par l'ITAF (l'Institut Technique de l'Arboricole Fruitière et de la Vigne :

- 1. Période de jeunesse:** de la première année jusqu'à la septième, marquée par une grande multiplication cellulaire.
- 2. Période d'entrée en production:** où l'arbre commence à produire ses premières olives.
- 3. Période adulte:** période de production fruitière maximale.
- 4. Période de sénescence:** se caractérise par le vieillissement de l'arbre suivi d'une baisse de la récolte.

La durée de chacune de ses périodes variera selon les conditions de cultures des arbres, et selon des variétés. L'amélioration des techniques de production (taille, fertilisation, irrigation) et l'amélioration du matériel végétal (sélection clonale) ont permis de modifier la durée de chacune de ces périodes (Alcalca *et al.*, 1992).

7. Cycle végétatif annuel de l'olivier

Le déroulement annuel du cycle végétatif de l'olivier (Figure 06) est en étroite relation avec les conditions climatiques de son aire d'adaptation caractérisé essentiellement par le

climat méditerranéen (Villemur *et al.*, 1976; Pal *et al.*, 1983).

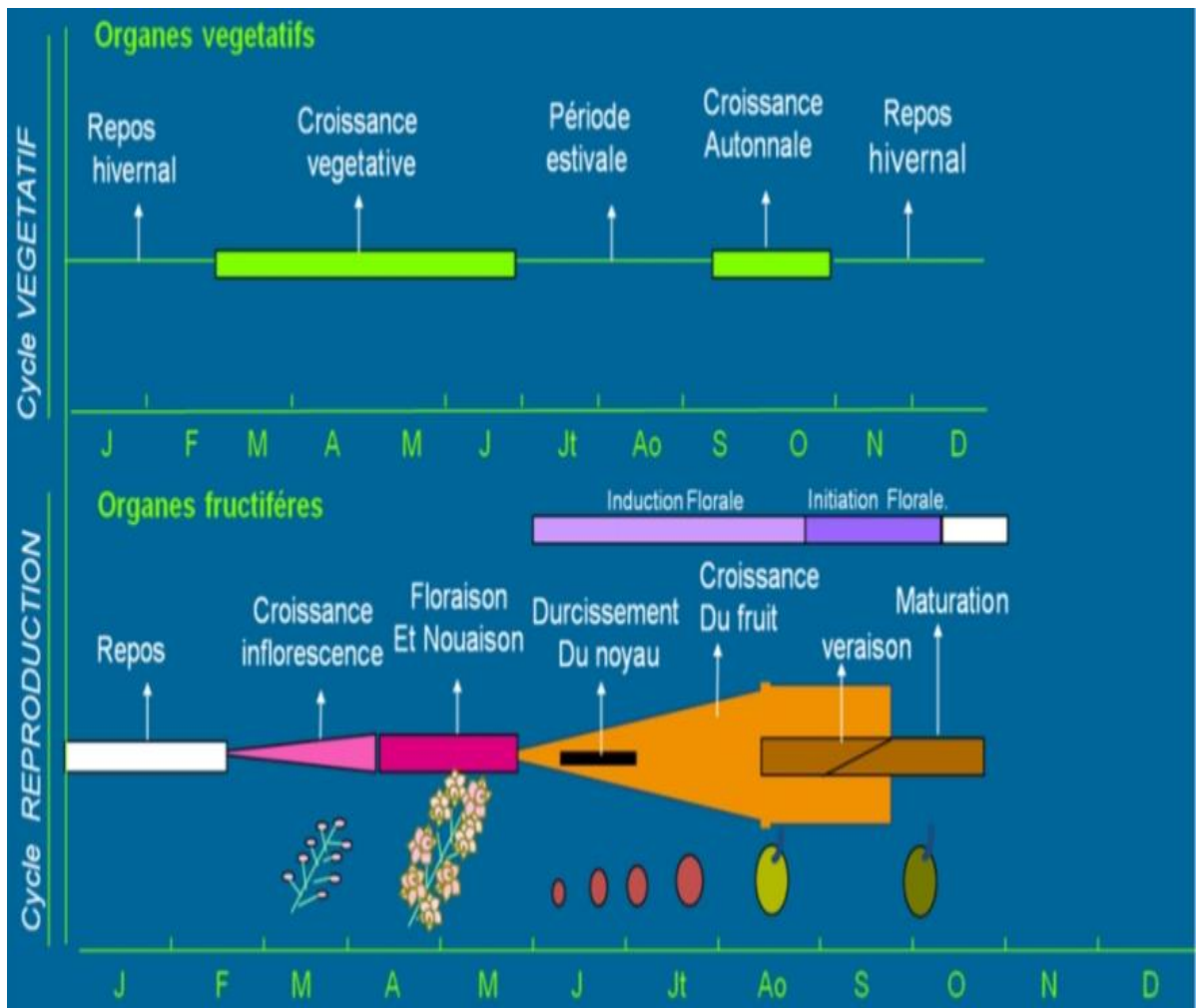


Figure 06 : cycle végétatif annuel de l'olivier

(Source : Tous, 1990; Rallo, 1998; Girona, 2001)

(J → D) les 12 mois de l'année.

8. Répartition géographique de l'olivier dans le monde

L'olivier est pratiquement présent aux quatre coins du monde, (sur les 6 continents), mais c'est qu'au pourtour méditerranéen qu'on retrouve plus de 90% des oliviers (Espagne 31%, Italie 20%, Grèce 16%, Turquie 8%, Portugal 6,5%, Tunisie 4%, Maroc 3%, Algérie 1,5%, France 0,5% et autres représentant les 9,5%).

La carte géographique ici suivante (Figure 07) montre la répartition des oliviers dans le monde.

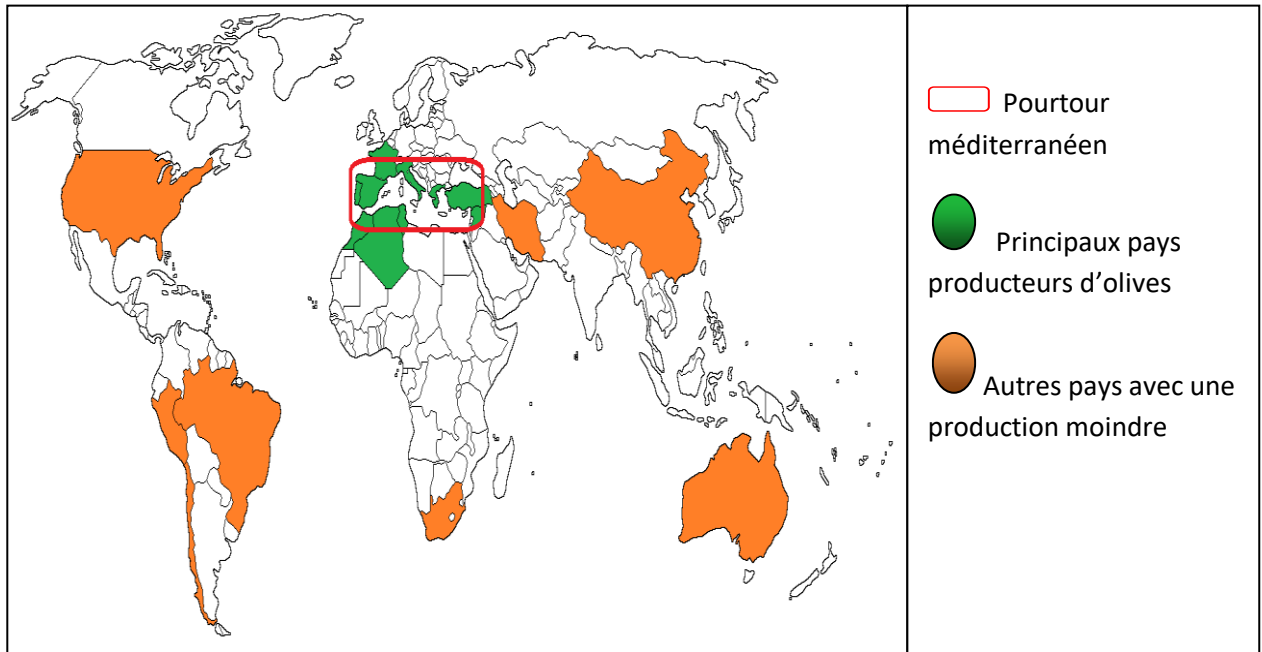


Figure 07 : carte géographique de la répartition mondiale de l'olivier

(Outline-world-map.com, ©2009)

Donc l'union Européenne représente 50% de l'oléiculture mondiale, le Moyen-Orient est à 20%, l'Afrique du nord 25%, et les autres représentent le reste qui se résume en 5% (Figure 08).

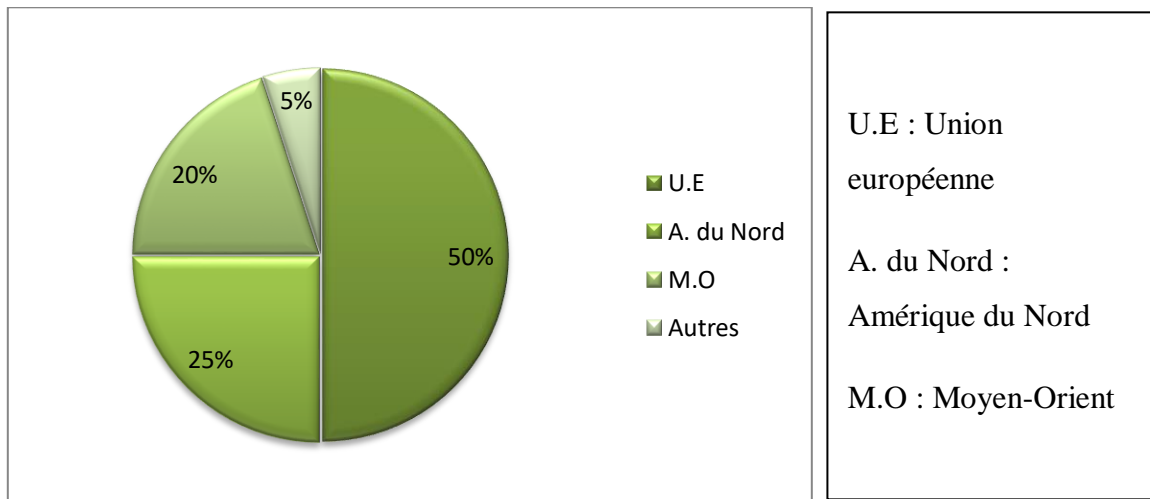


Figure 08 : secteur graphique montrant le verger oléicole mondial (Tramier, 1863)

8. 1. Répartition géographique de l'olivier en Algérie

Le centre d'Algérie et la Kabylie représente la surface majoritaire d'oléiculture en Algérie (Figure 09).

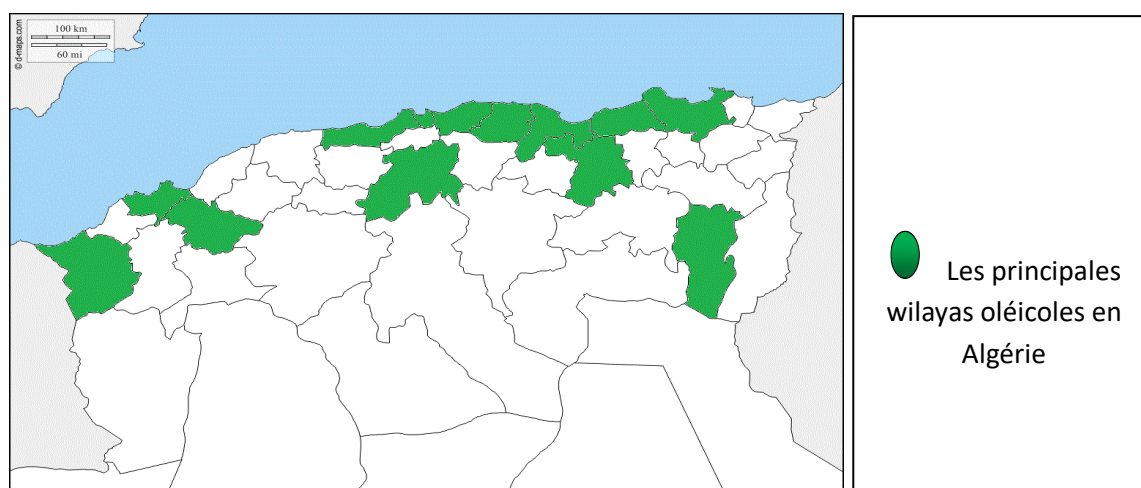


Figure 09 : les zones oléicoles en Algérie (© d-maps.com)

8. 1. 1. Variétés les plus cultivées en Algérie

L'Algérie dispose de plus d'une trentaine de variétés d'olives, selon les wilayas productrices de ce produit. Mais ce qui est à tenir, c'est qu'il ya des variétés qui dominant par apport à d'autres. Le tableau ci-dessous le démontre (Tableau 02).

Tableau 02 : les variétés majoritaires de l'olivier en Algérie (Info soir, 2007)

variété	Importance	Air de culture
Chemlel	40%	Centre Algérien e Kabylie
Sigoise	25%	Ouest Algérien (w 29,13 ,31)*
Azeradj	10%	Centre Algérien
Bouricha	Restreinte	Est Algérien (Colo-oued Elkbir)
Limli (Rougette)	8%	Est Algérien (Jijel-Sidi-Aich)
Ferkani	Restreinte	Est Algérien (Khenchla)
Blanquette de Guelma	Restreinte	Est Algérien (Guelma)
Abani	Restreinte	Est Algérien (Khenchla)
Hamra (Rougette)	Restreinte	Est Algérien (Jijel, nord de Constantine)
Rougette de Mitidja	Restreinte	Centre Algérien (Médéa)
Aghchren d'Alqusser Aghchren de titest Aghenfas Aguenaou Bouchouk	Restreinte	Est Algérien (Sétif)
Oueld Ethour	Restreinte	Est Algérien (Hamma)

* : Mascara, Tlemcen, Oran.

9. Intérêt de l'olivier

L'olivier est très connu pour ses vertus thérapeutiques qui agissent de manière naturelle sur différentes maladies souvent dangereuses pour l'homme. Une bonne exploitation de ses feuilles permet de lutter contre les infections virales, bactériennes ou fongique, de favoriser l'excrétion urinaire, d'équilibrer le diabète de type II et de réduire l'hypertension légère. Elles peuvent même être utilisées comme une sorte de drogue végétale pour de multiples manipulations. Son bois, fortement utilisés en ébénisterie ; Ses fleurs, très légèrement odorantes sont recommandées pour traiter certains maux chroniques ; Ses rameaux et feuilles, utilisées dans l'alimentation du bétail, ainsi que pour la restitution de la matière verte aux sols (Boussen et Bouraoui, 2016) ; Ses grignons d'olives, consacrés pour la fabrication d'huile de table, savons naturels bio ou même pour l'alimentation du bétail ; Il ne faut pas oublier le miracle de tous les temps, l'huile d'olive extraite à partir des fruits d'olivier, à l'importance primordiale et aux bienfaits illimités.

II. Fruit et huile

1. Structure et composition chimique du fruit

1. 1. Structure de l'olive

La structure du fruit de l'olivier (Figure 10) est divisée en trois composants. Allant de l'extérieur à l'intérieur :

L'épicarpe (la peau du fruit), est un tissu protecteur, représente 1 à 3% du poids de l'olive, recouvert d'une matière cireuse et cuticule imperméable à l'eau.

Le changement de couleur de l'épicarpe lors de la maturation, est dû aux différents niveaux de pigments chlorophylles, caroténoïdes et anthocyane qui le composent (Bianchi, 2003 ; Kailis, 2017).

Le mésocarpe (la pulpe du fruit), charnu et huileux, constitué d'un parenchyme lacuneux qui renferme des sclérites ramifiés, contenant des sucres dissous, des acides, des polyphénols, des colorants hydrosolubles, des substances et composés inorganiques, ainsi que des gouttelettes d'huile. La chaire d'olive contient la plus grande partie de l'huile (95%). Le mésocarpe constitue avec la peau, la partie comestible des olives en comprenant 70-80% du fruit entier (Kailis, 2017).

L'endocarpe qui est le noyau, composé d'une enveloppe et d'une amande à l'intérieur, possédant deux ovaires dont l'un est stérile et l'autre fertile contenant un embryon qui dans les conditions favorables peut donner un nouvel olivier. Ces principaux composants sont : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

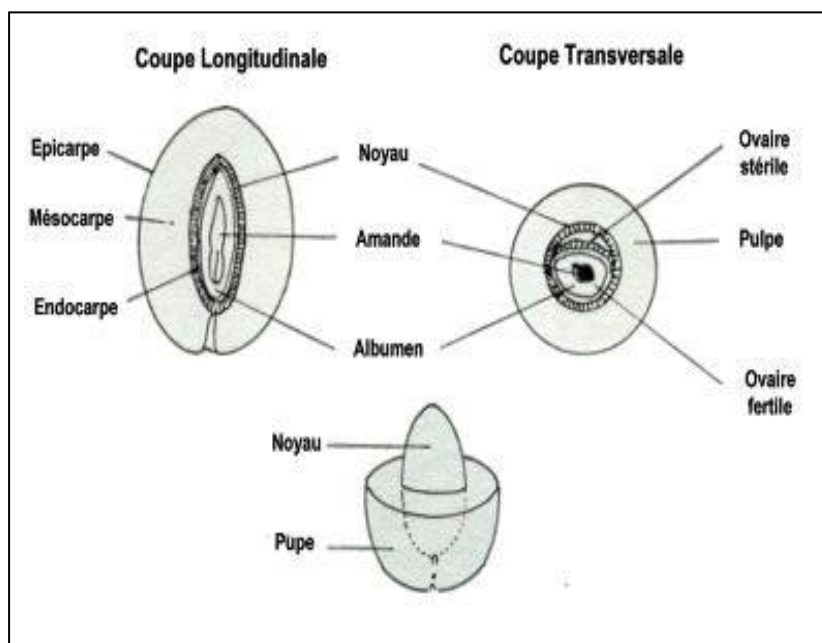


Figure 10 : coupe longitudinale et transversale d'une olive (Lomenech, 2010)

Tableau 03 : composition physique de l'olive (Nefzaoui, 1983)

Composition	% poids de l'olive
Epicarpe	2,0 à 2,5
Mésocarpe	71,5 à 80,5
Endocarpe	17,5 à 23,0
Amandon	20 à 5,5

1. 2. Composition chimique de l'olive

L'olive est composée principalement d'un grand pourcentage d'eau, de glucides et d'huile. Il y a aussi des protéines, de la cellulose, des acides organiques, pigments, minéraux et polyphénols (Tableau 04).

Tableau 04 : différents composants de l'olive (Nefzaoui, 1983)

Composants	Pourcentage (%)
Eau	70 %
Huile	5-30 %
Glucides	20 %
Cellulose	6 %
Protéines	1,5 %
Minéraux	1,5 %
Autres composés	Traces

2. Définition de l'huile d'olive

On peut le définir comme étant un pur jus de fruit (Figure 11), extrait d'olives fraîches, composé d'une forte teneur en matière grasse. Cette huile est obtenue par des procédés mécaniques ou physiques et à des conditions bien définies n'altérant pas sa qualité.



Figure 11 : olive et huile d'olive (Anonyme, 2016)

3. Composition des huiles d'olive

La composition d'huile d'olive peut fluctuer selon la variété, l'origine géographique de l'arbre en question, les conditions climatiques dans lesquelles il est soumis et le stade de maturité du fruit. On distingue deux grands groupes : des composants majoritaires et des composants minoritaires.

Composants majoritaires

Un grand pourcentage de lipides (triglycérides et acides gras), environ 96 à 98% de la composition totale de l'huile. Dans le cas de l'huile d'olives ce sont des acides gras mono-insaturés (AGMI) essentiellement l'acide oléique d'environ 78%. Parmi les acides gras polyinsaturés, l'acide linoléique qui représente 4,9 à 22 % des acides gras totaux. Les principaux acides gras saturés sont l'acide stéarique et l'acide palmitique qui représentent 8,9 à 19,5 % des acides gras totaux (Tableau 05), (Ruiz *et al.*, 1998).

Ces composants majoritaires représentent la partie saponifiable qui est une réaction chimique transformant l'ester en ion carboxylate.

Tableau 05 : principaux triglycérides de l'huile d'olive (Ruiz *et al.*, 1998)

Nature	% des triglycérides
OOO	40-59
POO	12-20
OOL	12,5-20
POL	5,5-7
SOO	3-7

O : acide Oléique ; P : acide Palmitique ; L : acide Linoléique ; S : acide Stéarique.

Composants minoritaires

D'autres composés appartenant à la catégorie des lipides insaponifiables sont aussi présents, on les regroupe également sous l'appellation de composé mineurs ; la richesse de l'huile d'olive en ces derniers constitue l'une de ces caractéristiques principales (Jacotot, 1996). Ces composants sont des hydrocarbures, des vitamines liposolubles principalement A et E, des alcools, des stérols, ainsi que des pigments (chlorophylles et carotène) à un pourcentage de 2 à 4% de l'huile).

4. Catégories d'huiles d'olive

On peut compter trois différentes catégories d'huile d'olive vierges (Figure 12), tout en se basant sur l'acidité comme facteur principal de distinction et en mettant en œuvre, uniquement des moyens mécaniques ou physiques (Conseil oléicole international, 2019).

Huile d'olive vierge extra : l'acidité, exprimée en acide oléique est doit être inférieure à 0,8 g/100 g d'huile, possède une présence d'un gout fruité au niveau de ses caractéristiques organoleptiques et peut avoir de légers défauts (Conseil oléicole international, 2019).

Huile d'olive vierge : l'acidité, exprimée en acide oléique doit être inférieure à 2 g/100 g d'huile, possède une présence d'un gout fruité au niveau de ses caractéristiques organoleptiques et peut avoir de légers défauts (Conseil oléicole international, 2019).

Huile d'olive vierge lampante : l'acidité supérieure à 2g/100g d'huile. Destinée au raffinage et non pas à la consommation (Conseil oléicole international, 2019).

Huile de grignons d'olives : l'acidité inférieure à 1g/100g. Obtenue par traitement des grignons d'olive à l'aide de solvants ou d'autres procédés physiques (Conseil oléicole international, 2019).



Figure 12 : diverses qualités d'huiles d'olive (Anonyme, 2016)

5. Données physico-chimiques d'huile d'olive

Les données physico-chimiques des différentes catégories d'huiles d'olive selon Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (2011) et le livre Codex Alimentaire (1989) sont mentionnées dans le tableau ci-dessous (Tableau 06).

Tableau 06 : données physico-chimiques de classification des huiles (FAO), 2001 et Codex Alimentarius, 1989)

	Densité relative (à 20 °C)	Acidité (% acide oléique)	Indice peroxyde (meq O ₂ /Kg)	Extinction spécifique à 270 nm	Acides gras saturé en position 2 (%)
Huile vierge extra	0,910-0,916	< 1	< 20	< 0,25	< 1,5
Huile vierge		< 2	< 20	< 0,3	< 1,5
Huile vierge ordinaire		< 3,3	< 20	< 0,3	< 1,5
Huile raffinée		< 0,3	< 5,0	< 1,1	< 1,8
Huile d'olive		< 1,5	< 15	< 0,9	-
Huile de grignon d'olive raffinée		< 1,5	< 5,0	< 2,0	< 2,2
Huile de grignon d'olive		< 1,5	< 15	< 1,7	-

6. Critères de détermination d'une huile d'olive vierge de haute qualité

Les spécialistes se réfèrent aujourd'hui à trois critères pour détecter la qualité de l'huile d'olive : l'acidité, l'indice peroxyde, la note organoléptique.

Seules les analyses en laboratoire signalent l'acidité. Une huile de bonne qualité n'a pas nécessairement une bonne saveur, d'où la mise au point par le Conseil Oléicole International d'une méthode de dégustation par un jury d'experts avec établissement de profils de notation des huiles (Lazzeri, 2009).

7. Intérêt de l'huile

En médecine, l'huile d'olive est utilisée depuis des antiquités en raison de sa valeur incontestable.

Selon les études de (Motard-Bélanger *et al.*, 2008 ; Rotondo et De Gaetano, 2000) cette huile joue un rôle majeur dans la prévention des facteurs à risques des maladies cardiovasculaires, hypertension et diabète.

La forte teneur de l'huile en acide oléique lui donne un grand intérêt nutritionnel et sera mieux toléré par l'estomac de l'être humain. Suite aux recherches de (Keys *et al.*, 1986 ; Jacotot,

1999 ; Kratz et al 2002), il s'est avéré que les acides gras mono-insaturés ont une influence sur le métabolisme des lipoprotéines de haute densité qui ont un effet protecteur contre l'athérosclérose. Les propriétés digestives de l'huile d'olive ont conduit à son utilisation dans le traitement des troubles gastriques, biliaires, et de la constipation. La motricité gastrique est stimulée d'avantage les acides gras monoinsaturés comparativement que par les acides gras saturés (Addou, 2017).

L'huile d'olive joue un rôle important dans l'augmentation de l'espérance de vie à cause de sa richesse en vitamine E qui joue un rôle biologique positif pour déplacer les radicaux libres, molécules impliquées dans certaines maladies chroniques et dans le processus de vieillissement. De plus, la consommation d'huile d'olive protège les individus contre la détérioration des fonctions cognitives provoquée par le vieillissement et contre la perte de mémoire liée à l'âge (Rosa *et al.*, 2004).

L'huile d'olive est aussi très conseillée pour la friture à cause de sa composition en acides gras mono insaturés qui la rendent plus résistante à la chaleur (Terdazi *et al.*, 2010).

III. Tuberculose de l'olivier

1. Historique

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

Tableau 07 : noms scientifique et noms commun internationaux de l'agent causal de la tuberculose de l'olivier (EPPO Global data base, 2002)

Le code EPPO	Nom	Langue
PSDMSA	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Scientifique
PSDMSA	Bacterial canker of olive	Anglais
PSDMSA	Bactériose de l'olivier	Français
PSDMSA	Krebs : Olive	Allemand
PSDMSA	Olive knot	Anglais
PSDMSA	<i>Pseudomonas syringae</i> sub sp. <i>savastanoi</i>	Scientifique
PSDMSA	<i>Pseudomonas syringae</i> sub sp. <i>Savastanoi. oleae</i>	Scientifique
PSDMSA	Tuberculosis de lolivo	Espagnol

En 1886, dans son article intitulé “ Les maladies de l’olivier et la tuberculose en particulier) le bactériologiste Italien Luigi Savastano a mentionné qu’une bactérie (identifiée par la suite comme étant *Pseudomonas savastanoi*) était l’agent en cause des tumeurs d’olivier, comme il a été le premier à avoir réussi à reproduire la maladie en inoculant à des plantes saines la bactérie qu’il avait isolée à partir des galles. Cette même maladie a également été étudiée par E. F Smith en 1904 aux États-Unis ainsi que par L. Petri en 1970 en Italie. Ces deux chercheurs ont confirmé les travaux de Savastano, mais ils ont rejeté l’identité de la bactérie qu’il a isolée. En effet, selon Petri, la bactérie isolée et décrite par Savastano n’était pas le seul agent causal de la maladie mais une autre bactérie fréquemment associée à *Pseudomonas savastanoi* sur les tumeurs qui est l’*Ascobacterium luteum* (= *Bacterium herbicola*, maintenant *Pantoea agglomerans*). *Pantoea agglomerans* a également été isolé et identifié à tort comme *Pseudomonas savastanoi* par Peglion en 1905 à partir des nœuds de Laurier-rose. Les trois chercheurs Petri, Savastano et Peglion ont reproduit la maladie, respectivement sur l’olivier et Laurier-rose, en utilisant des cultures de *Pantoea agglomerans* et de *Pseudomonas savastanoi* et ont déduit par la suite que ces deux dernières étaient toutes les deux derrière la formation de nœuds (Surico et Marchi, 2003).

Tableau08 : noms scientifiques de l’agent causal

Nom scientifique	Référence
<i>Agrobacterium savastanoi</i> (Smith),	(Starr et Weiss, 1943)
<i>Agrobacterium tonellianum</i> (Ferraris),	(Starr et Weiss, 1943)
<i>Bacterium savastanoi</i> ,	(Smith, 1908)
<i>Bacterium tonellianum</i> ,	(Ferraris, 1926)
<i>Phytomonas savastanoi</i> (Smith),	(Bergey <i>et al.</i> , 1923)
<i>Phytomonas tonellianum</i> (Ferraris),	(Adam et Pugsley, 1934)
<i>Pseudomonas oleae</i> (Arcangeli),	(Duggar, 1909)
<i>Pseudomonas savastanoi</i> ,	(Smith et Petri 1908)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> ,	(Smith, 1908 ; Young <i>et al.</i> , 1978)
<i>Pseudomonas syringae</i> sub sp. <i>savastanoi</i> ,	(Smith, 1908 ; Janse, 1982)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> pv. <i>oleae</i> ,	(Janse , 1981)
<i>Pseudomonas tonelliana</i> (Ferraris).	(Burkholder, 1948)

2. Symptômes de la tuberculose de l’olivier

Elle se manifeste par l’apparition de tumeurs (ainsi connues sous le nom de galles ou même nœuds) aériennes (Figures 13, 14 et 15), typiques très caractéristiques sous forme d’excroissances fissurées, sur les organes végétatifs de l’olivier, feuilles et rameaux mais non

pas sur ses fruits (olives). Ces tumeurs deviennent dures et de couleur brune avec le temps. L'intensité des dégâts provoqués est fortement liée au nombre de tumeurs par arbre.



Figure 13 : tumeur sur branche d'olivier du verger situé à Amira Arrès



Figure 14 : tumeurs sur feuilles d'olivier (Anonyme, 2011)



Figure 15 : tumeurs sur tronc d'olivier du verger situé à Amira Arrès lors de l'échantillonnage

3. Agent causal

La bactérie responsable de la tuberculose d'olivier est *Pseudomonas savastanoi* (Figure 20), qui est une phytopathogène à Gram négatif.

La dissémination de cette bactérie s'effectue essentiellement par des vecteurs tels que : des insectes contaminés par l'agent pathogène. Ceux-ci récupèrent la maladie quand ils s'installent sur des blessures fraîches, au niveau de l'arbre, causées éventuellement par des

phénomènes naturels (vent, grêle...), ou encore par l'intervention de l'homme au cours des différents travaux culturaux (greffage, taille, cueillette...).

Après pénétration du *Pseudomonas savastanoi*, on assiste généralement à une période d'incubation variant de 1 à 3 mois, en fonction des conditions environnementales. Les conditions optimales de développement de la bactérie se résument à : une température comprises entre 25 et 30°C, et une humidité relative supérieure à 80%. Vu que notre bactérie préfère plutôt la chaleur que le froid, durant la saison hivernale, elle fait des galls son refuge et ne poursuit son activité qu'à l'année suivante.

4. Classification de *Pseudomonas savastanoi*

Selon (Janse, 1982) :

- **Règne** :Bacteria
- **Division** :Proteobacteria
- **Classe** :*Gammaproteobacteria*
- **Ordre** :Pseudomonadales
- **Famille** :Pseudomonadaceae
- **Genre** : *Pseudomonas*
- **Espèce** :*Pseudomonas savastanoi*

Dont 5 pathovars (Young, 1996) :

Pseudomonas savastanoi pv *savastanoi*

Pseudomonas savastanoi pv *nerii*

Pseudomonas savastanoi pv *fraxini*

Pseudomonas savastanoi pv *glucinea*

Pseudomonas savastanoi pv *phaseolicola*

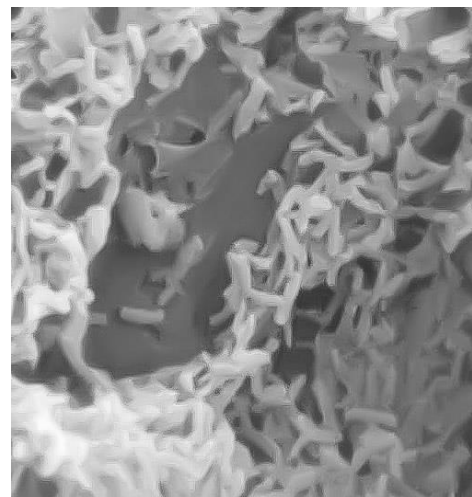


Figure 16: *Pseudomonas savastanoi* vue en microscopie électronique à balayage (Ramos *et al.*, 2012)

5. Pouvoir pathogène de l'agent causal

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).

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

Actuellement, les seuls déterminants connus de *Pseudomonas savastanoi* impliqués dans le développement des galles sont l'acide phytohormone indolacétique et les cytokinines (Smidt et Kosuge, 1978 ; Comai et Kosuge, 1980 ; Surico *et al.*, 1985 ; Rodrigue-Moreno *et al.*, 1985) ainsi que la biosynthèse d'un système de sécrétion de type III (effecteur type III) fonctionnel (TTSS), codé par les grappes de gènes hrp / hrc (Sisto *et al.*, 2004).

La production de cytokinines et d'AIA contribue à la formation de nœuds en interférant avec les signaux endogènes pour une prolifération rapide sur le site d'infection (Surico, Iacobellis et Sisto, 1985).

Diverses études génétiques confirment l'importance de l'AIA et des cytokinines pour une parfaite virulence bactérienne car il a été prouvé que les mutants dépourvus de ces deux derniers sont largement moins symptomatiques et provoquent seulement des nécroses sur feuilles et gonflements sur tiges (Iacobellis *et al.*, 1994).

6. L'effet des tumeurs sur le rendement de l'olivier

L'effet des tumeurs du nœud d'olivier sur le rendement et la qualité de l'olivier n'est pas clair, sauf en cas de maladie grave et destruction ou dénudage du bois fruitiers. Etant donné que la maladie ne provoque généralement pas de dégâts inesthétiques, de nombreux producteurs la considèrent peu importante et déclarent qu'ils n'adopteraient pas de procédures de contrôle si elles étaient disponibles en raison des dépenses et du temps nécessaire. Un groupe de contrôle de goût ont constatés que les olives des membres atteints avaient un mauvais goût, cela a été répété avec des résultats similaires à chaque fois. Après l'examen des olives sains et atteints, ils ont constatés que la taille et le nombre étaient moindres sur les sujets noués. D'autres études indiquées également que le nœud de l'olivier réduit considérablement le rendement (Tableau 09), (Schroth *et al.*, 1973).

Tableau 09 : réduction du rendement suite au nombre de tumeurs par branche d'olivier (Schroth *et al.*, 1973)

Nombre de branches	Nombre de tumeurs	Nombre moyen d'olives
80	0	5,5
55	1	3,4
34	2	2,8
30	3	2,6
38	4	2,2
25	5	1,7
26	6	1,6

7. Les bactéries existant en nœuds d'olivier

Pseudomonas savastanoi est l'une des espèces phytopathogènes prouvée comme étant un résident commun de la phyllosphère de l'olivier (Ercolani, 1971).

Pseudomonas savastanoi pv *savastanoi*, *nerii* et *fraxini* (Gardan *et al.*, 1992) sont en cause de la formation de galles chez les différents genres d'*Oleaceae* dont (l'olivier, le jasmin et la *Phyllirea spp*) ainsi que Laurier-rose (*Nerium oleander* L.).

Il a été démontré que les populations de *Pseudomonas savastanoi* se trouvent associées à d'autres bactéries non pathogènes (épiphytes et endophytes) en formant des consortiums mutualistes avec *Erwinia toletana* et *Pantoea agglomerans*, ce qui pourrait augmenter la population bactérienne sur le site d'infection et par conséquent l'augmentation des symptômes de la maladie de l'olivier (Ramos *et al.*, 2012).

Trois pathovars de *Pseudomonas agglomerans*, le pathovar *gypsophilae* ((Brown, 1932), le pathovar *batae* (Burkholder *et al.*, 1994) et le pathovar *milletiae* (Opgenorth *et al.*, 1994) ont été signalés comme étant des provocateurs de galles similaires aux nœuds causés par *Pseudomonas savastanoi*.

8. Cycle de la maladie

Pseudomonas savastanoi peut être présente tout au long d'un verger : les rameaux, les feuilles, la tige etc, mais il ne peut inciter à la maladie qu'après l'entrée passive de l'hôte par

des blessures ou des cicatrices foliaires (Savastanoi, 1987). Le cycle de vie de la bactérie *Pseudomonas savastanoi* se compose de deux phases : l'une épiphyte et l'autre endophyte.

La phase épiphyte

Le terme "épiphyte" est dérivé du grec épi (sur) et phyte (plante), ce qui signifie : sur la plante car l'agent pathogène survit mieux sur des surfaces d'écorce rugueuse que sur les autres parties de la plante. De plus, les populations de cette bactérie pathogène sont plus élevées et concentrées 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 phase endophyte

Le terme "endophyte" est dérivé du grec endo (dans) et phyte (plante), ce qui signifie : dans la plante.

Les bactéries endophytes sont définies comme des bactéries vivant dans les tissus végétaux sans faire un préjudice matériel (Kado, 1992). Cette bactérie joue le rôle d'un endophyte en se déplaçant à travers les espaces intercellulaires et même dans les vaisseaux du bois de la première zone infectée (Penyalver *et al.*, 1964 ; Wilson *et al.*, 1979).

Les plaies de taille peuvent rester sensibles à l'infection pendant au moins 14 jours et les cicatrices foliaires eux peuvent rester sensibles à l'infection jusqu'à 7 jours.

La transmission de la maladie est liée à la pluie : un événement qui stimule la croissance de l'agent pathogène et facilite sa circulation. Après la chute des feuilles en mai et juin laissant des cicatrices foliaires sensibles aux agents pathogènes, les pluies de printemps tombent et favorisant la transmission de la maladie. Les cicatrices sont plus sensibles à l'infection dans les deux premiers jours et peuvent rester sensibles pendant sept jours après une pluie.

Une fois la plante est infectée par la bactérie, cette dernière produit des hormones de croissance des végétaux, l'auxine et cytokinines qui stimulent la prolifération des tissus résultants en une galle (Suriko, 1989 ; Smidt et Kosuge 2000), (Figure 17).

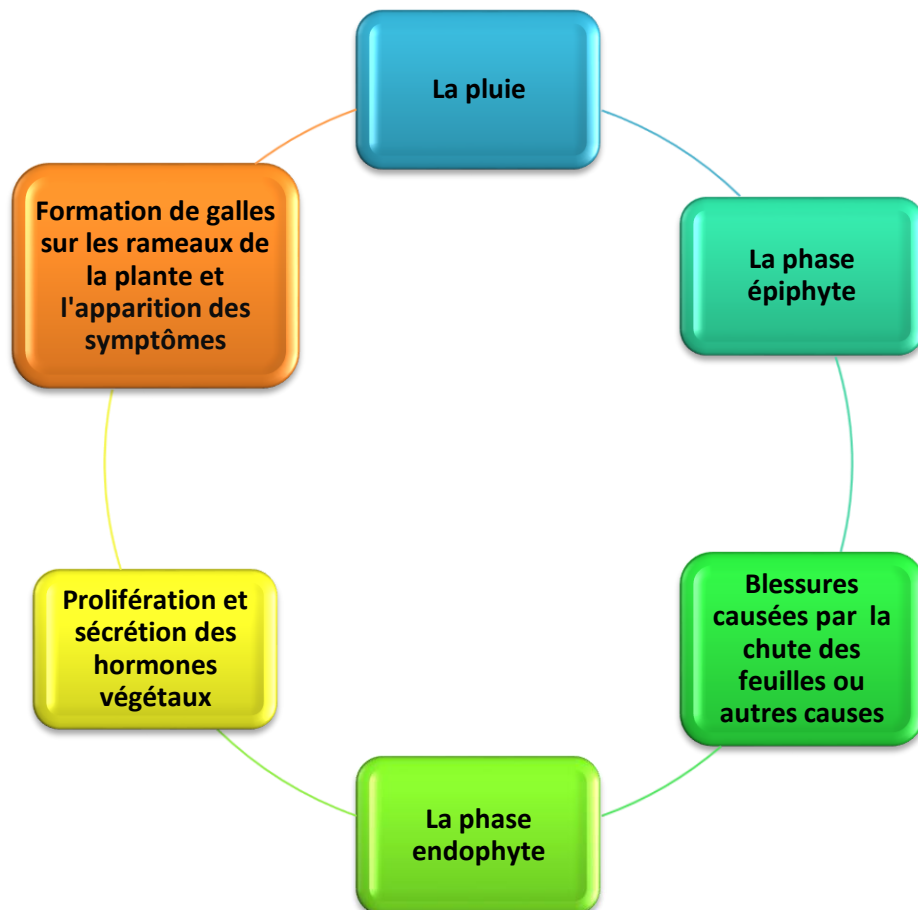


Figure 17 : cycle de la bactériose de la tuberculose d'olivier causée par *Pseudomonas savastanoi*

9. Impact de la maladie

Selon Nielson (1990)

Perte de feuilles l'étranglement mettant hors circuit l'alimentation des feuilles en aval ;

Dessèchement du bois à cause d'une photosynthèse défailante ;

Réduction de la production d'olives;

Dans une phase ultérieure, peut même y avoir une diminution de la taille des arbres à la suite d'une végétation désordonnée. Réduction du rendement d'olive et de la qualité de son huile grâce à des caractéristiques organoleptiques inférieures, telles que une odeur désagréable et un goût amer rance (Senhaji, 199; Lavermicocca *et al.*, 2002).

10. Gestion de la maladie

Suivant le décret exécutif 93-28623 /11/1993, la tuberculose de l'olivier est considérée comme une quarantaine et malheureusement il n'ya à ce jour là aucun remède connu et efficace contre cette maladie.

Il faut donc suivre quelques recommandations pour limiter et minimiser la propagation de cette bactérie phytopathogène dans les vergers oléicoles (Serdoun, 2013) :

Désinfecter soigneusement tous les outils de la taille ;

Toutes les parties atteintes seront arrachées, sectionnées et incinérées par le feu ;

Eviter les excès de l'irrigation de l'arbre ;

Eviter les blessures au moment de la taille ;

Utiliser des bactéricides à base de cuivre au moins deux fois afin de protéger les blessures (en cas d'avoir de présence de blessures) ;

Selon les conseils locaux de la société centrale d'agriculture de Nice et des Alpes-Maritimes (SCAH) il faut appliquer des produits cupriques au printemps et à la fin de l'automne tel que la bordelaise à 1% afin de désinfecter et cicatrifier les plaies de taille.

11. Répartition géographique de la maladie

La tuberculose d'olivier est une maladie répandue dans les pays où on cultive l'olivier (tout le pourtour méditerranéen, ainsi qu'en Californie), (Figure 18). La variété de : Chemlel est celle qui est la plus altérée par La tuberculose de l'olivier causée par *Pseudomonas savastanoi*.

Les pays concernés (Boulssen et Bouraoui, 2016) :

Europe : France, l'Allemagne, Grèce, Italie, Portugal, Espagne, Norvège, Suède, Yougoslavie.

Asie: Iran, Irak, Palestine, Liban, Turquie.

Afrique : Algérie, Libye, Maroc, l'Afrique du Sud, Tanzanie, Tunisie.

Amérique du Nord: Mexique, USA (Arizona, Californie, Texas, Arkansas).

Amérique du Sud : Argentine, Brésil, Colombie, Pérou, Uruguay.

Australasie : Australie, Nouvelle-Zélande (Bradbury, 1986).

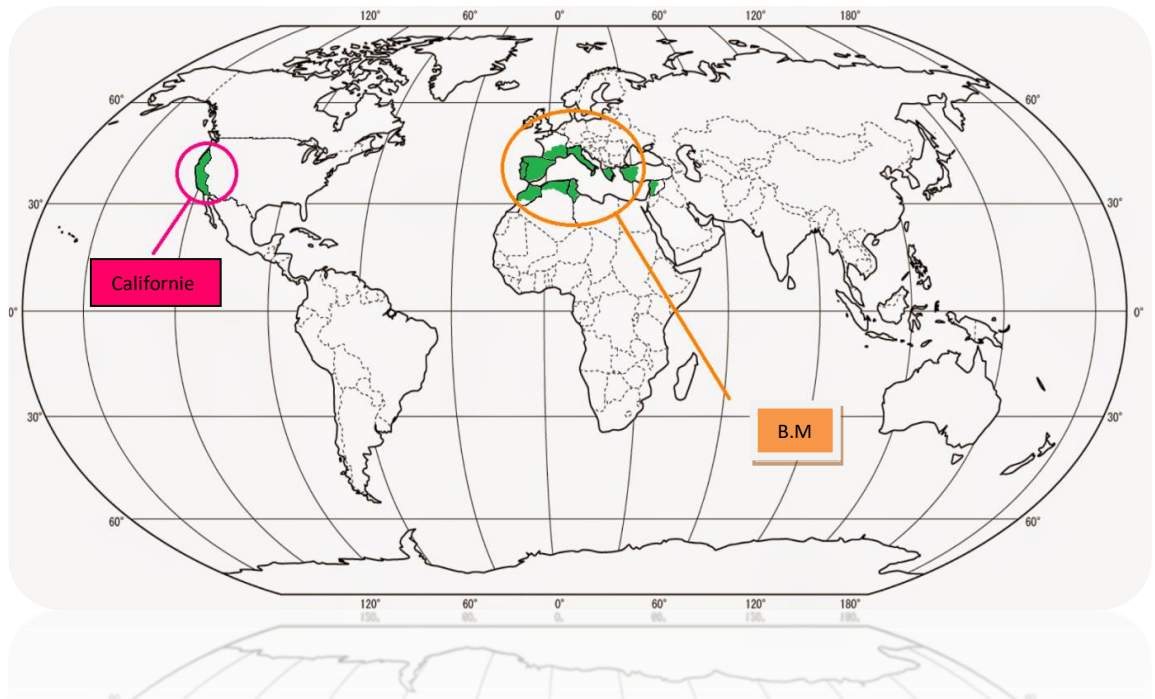


Figure 18: carte géographique des régions les plus touchées par la tuberculose de l'olivier

B.M : Bassin méditerranéen

12. Mesures de lutte biologique contre la tuberculose de l'olivier

Comme pour la plupart des maladies bactériennes, une lutte biologique est essentielle contre l'agent pathogène.

Traitement chimique : au cuivre, les ions de ce dernier peuvent être toxiques pour *Pseudomonas savastanoi* et peut également induire un état viable non cultivable, les polyphénols qui bloquent la formation des nœuds plus efficacement que le cuivre ;

Traitement biologique : l'application de *Bacillus subtilis* est autre développement promoteur dans la lutte biologique contre le transfert d'olive. *Bacillus subtilis* produit des antibiotiques tels zwittermicine-A et la Kanosamine, ainsi que d'autres lipoprotéines antimicrobiennes. Il a été démontré qu'une protéine produite à partir de *Bacillus subtilis* réduit la taille des nœuds d'olives causée par *Pseudomonas savastanoi* (Krid *et al.*, 2012).

MATERIEL ET METHODES

Matériel et méthodes

1. L'échantillonnage

L'échantillonnage n'était pas facile à réaliser en raison de la combustion déclarée ces dernières années par l'équipe INPV (institut national de la protection des végétaux) d'Algérie, sur les vergers d'oliviers atteints par la tuberculose.

Dès le premier champ atteint déclaré (le 17/04/2019), une sortie sous autorisation a été organisée en compagnie d'un membre de la Direction de l'Agriculture Constantine.

La destination était vers le verger de M. Boucheboura Mesaoud (Figure 20), situé aux montagnes d'El Wasta, commune d'Amira Arrès de la wilaya de Mila en Algérie (Nord-Est Algérien), (Figure 19).

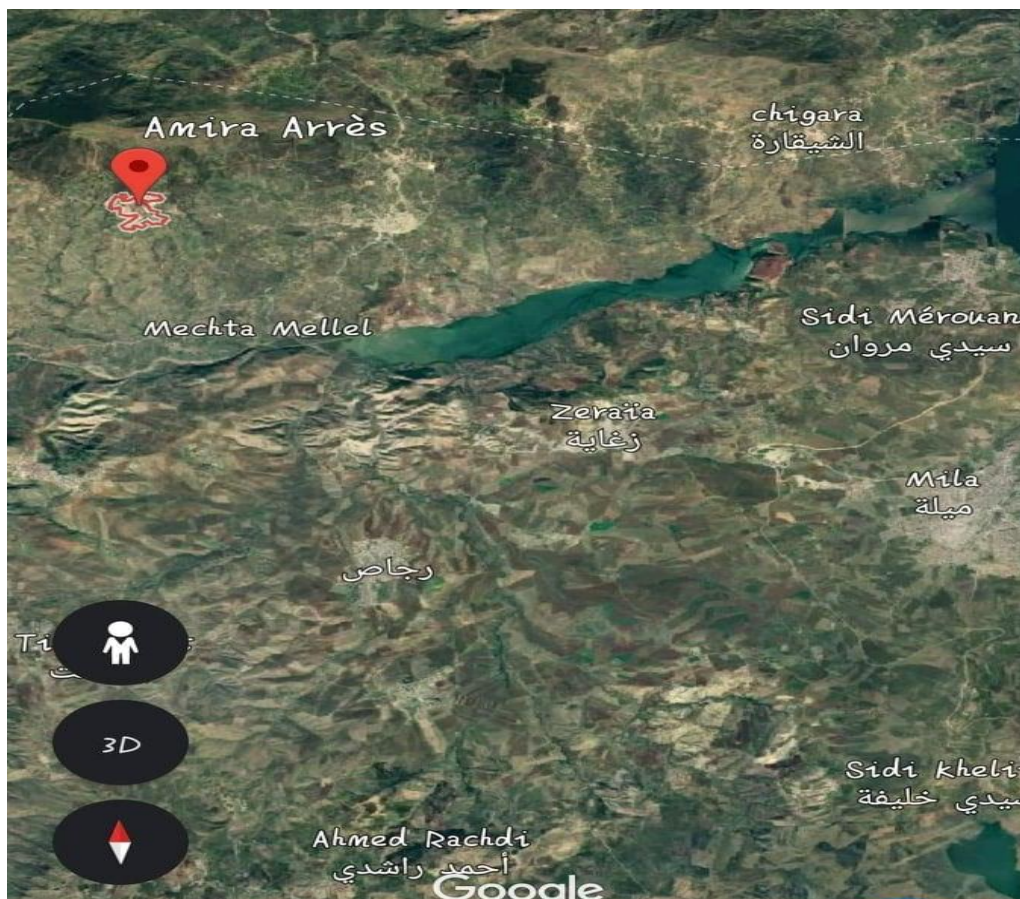


Figure 19: localisation d'Amira Arrès, Wilaya de Mila (Nord-Est Algérien), (Google earth, 2019)

Le propriétaire des lieux possédait un champ de 600 jeunes oliviers, d'une variété Sigoise dont la totalité est infectée, plantés en 2011 et couvrant une superficie de 2 hectares.

D'après le témoignage de l'oléiculteur en personne qui nous a fait l'honneur de nous accompagner tout le long de notre sortie, le climat de la région reste modéré tout au long de l'année mais nettement froid en hiver, pluvieux et se caractérise par une forte chute de neige. Les plantes quant à eux sont non certifiées, achetées à bon prix à partir d'une pépinière de la wilaya de Mila.

Equipées de tout le nécessaire, les rameaux ont été effectués à partir de trois oliviers infectés et bien espacés, les branches présentant les tumeurs ont été coupées à l'aide d'un sécateur désinfecté à l'alcool 90% après chaque usage. Les échantillons ont été transportés directement au laboratoire, dans des sacs stériles et dans des conditions isothermes de 4 °C.



Figure 20 : jeune olivier du verger situé à Amira Arrès

2. L'isolement

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

Première technique

Les nœuds ont été coupés des rameaux (Figure 21) à l'aide d'un bistouri stérile, nettoyés avec du papier filtre imbibé à l'éthanol 90 % puis découpés en deux. En utilisant une pince stérile, la moitié des tumeurs a été étalée sur le milieu King B (Pronadisa Micro & Molecular Biology, Spain) Voir (Annexe 1) coulé dans des boîtes de Petri. Les boîtes ont été ensuite étuvées à 26 °C pendant 3 à 5 jours.

Deuxième technique

Les nœuds ont été coupés des rameaux à l'aide d'un bistouri stérile, puis désinfectés en utilisant un papier filtre stérile imbibé à l'éthanol 90 %.

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

Après écrasement et obtention d'un broyat (20 minutes à température ambiante) et à l'aide d'une anse de platine flambée au bec bunsen, une goutte de la suspension a été étalée selon la technique des trois cadrans avec flambage de l'anse après chaque cadran sur le milieu semi-sélectif King B, puis incubées à 26 °C pendant 3 à 5 jours.

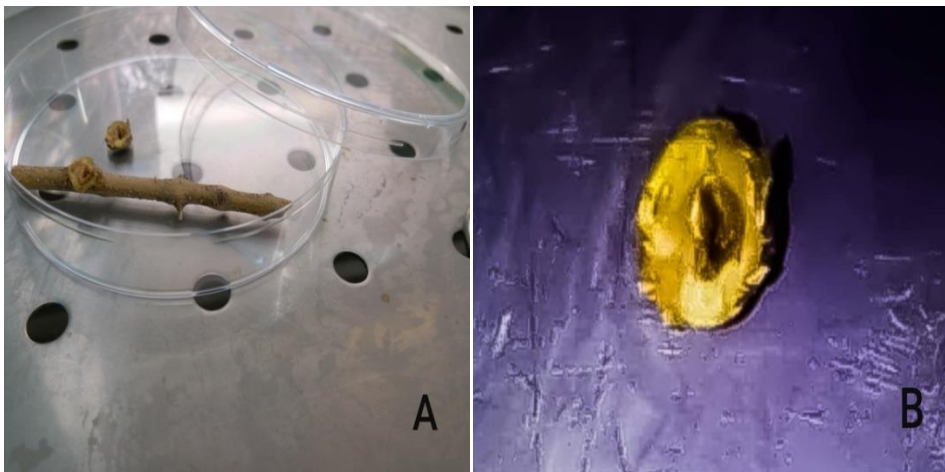


Figure 21 : jeune tumeur d'olivier coupée à partir d'un rameau (A). Coupe transversale de la même tumeur (B).

3. Purification et conservation des souches

Purification

Après l'étape de l'isolement, 45 isolats ont été désignés par un code (AFM) après purification pour chaque souche.

Plusieurs repiquages successifs par technique des trois cadrans sur milieu King B ont été effectués (12 repiquages avec anse de platine et cure-dent) afin d'obtenir des souches pures à la manipulation.

Vérification par observation macroscopique à l'œil nu si il existe un seul aspect par boîte de pétri ainsi qu'une observation microscopique des frottis après coloration de Gram. L'aspect homogène des lames indique que la souche est pure.

Conservation

Première technique

Conservation des isolats sur gélose inclinée (milieu King B) en tube à essai à 4 °C.

Deuxième technique

La technique de conservation (Figure 22) consiste à préparer une solution de glycérol à 30%, la mettre à l'autoclave 15 minutes à 121 °C puis aliquoter dans des tubes cryogéniques stériles pour conservation (Corning Incorporated, NY 14831, Mexico) 500 µl de la solution avec 500 µl de la suspension bactérienne préparée au préalable. Le mélange a été vortexé puis mis au congélateur à - 80 °C.

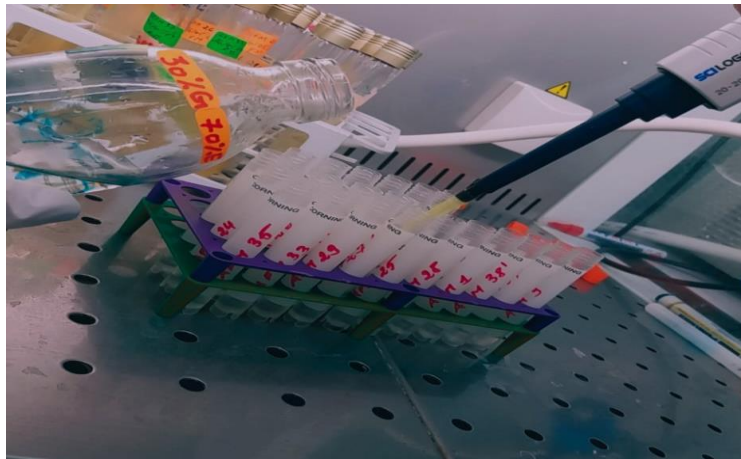


Figure 22 : conservation cryogénique des isolats

4. Identification phénotypique des isolats

Basée sur les caractères macroscopiques, morphologiques et biochimiques des souches étudiées.

Examen macroscopique des cultures

Premier examen effectué après l'isolement des souches. Il s'agit d'une observation à l'œil nu, en lumière naturelle et artificielle des colonies bien isolées sur milieu de culture King B après

incubation de 24 heures. Elle permet la détermination des différents caractères spécifiques à chaque espèce : couleur, aspect, taille, forme et pigmentation des colonies. Ceci nous permet de prélever et de sélectionner seulement les colonies possédant les caractéristiques culturales des bactéries phytopathogènes et plus spécifiquement du genre *Pseudomonas*.

Examen microscopique des frottis colorés

Fixation des isolats bactériens sous forme de couches minces et homogènes sur lame, suivie d'une coloration des frottis préparés par méthode de Gram. L'observation ce fait sous microscope optique (WETZLAR, Germany) à l'objectif 40X et à immersion 100X afin de vérifier la pureté des souches, étudier : la morphologie des bactéries (bacille, coccobacille ou cocci), le mode de regroupement ainsi qu'au Gram.

Les bactéries non décolorées par l'alcool-acétone sont dites à Gram positif et apparaissent en violet. Tandis que les bactéries à Gram négatif, décolorées par l'alcool-acétone et recolorées, apparaissent en rose.

Tests biochimiques

Test de solubilité par KOH

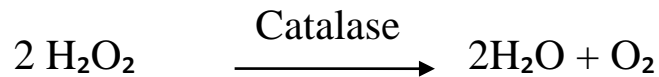
Dans le but de vérifier le Gram d'une bactérie d'une manière rapide et sans avoir recours à un microscope, une colonie isolée a été mélangée à une goutte d'une solution de KOH (Hydroxyde de potassium) à 3% à l'aide d'une anse flambée au bec bunsen. Après quelques secondes, le mélange est tiré vers le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

Catalase

L'enzyme catalase sert à la détoxification de l'eau oxygénée produite au cours de certaines réactions métaboliques. Elle est présente chez beaucoup de bactéries aérobies ou aéro-anaérobies et souvent absente chez les bactéries anaérobies.

Le but du test est de vérifier si la bactérie possède l'enzyme catalase dont le rôle est de catalyser la dégradation du peroxyde d'hydrogène (ou l'eau oxygénée H_2O_2) en eau et en oxygène (Levy *et al*, 1992). La technique consiste à prélever la crème bactérienne au moyen d'une boucle d'anse de platine stérile (ou bien à l'aide d'une pipette Pasteur) et la déposer dans une goutte d'eau oxygénée à 3% sur une lame stérile (Prescott *et al.*, 2007).

L'observation ce fait immédiatement. L'apparition des bulles (dégagement gazeux du dioxygène) veut dire que le test est positif et que la bactérie produit l'enzyme de catalase (Singleton, 2005).



Test de fluorescence

Les colonies isolées sur milieu King B en boîtes de Pétri ont été observées sous une lampe émettant une lumière ultraviolette ayant une longueur d'onde de 254 - 360 nm afin de noter la présence ou l'absence de pigments fluorescents bleus ou verts, permettant ainsi la mise en évidence de la pyoverdine des *Pseudomonas* du groupe fluorescent (Lelliott *et al.*, 1966). Les bactéries pathogènes des plantes produisent des pigments colorés qui leur sont caractéristiques.

Galerie API 20

Une galerie API (Appareillage et procédé d'identification), commercialisée par (Biomérieux, SA., Marcy-L'étoile, France) est une série de cupules permettant chacune de réaliser un test biochimique différent, facile et rapide, afin de bien caractériser et identifier une bactérie donnée.

Il existe plusieurs types de galeries, cela dépend du microorganisme étudié, 11 galeries API 20E ont été utilisées (système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux) ainsi que 10 galeries API 20 NE (pour l'identification des souches non Enterobacteriaceae à Gram négatif).

A partir d'une culture pure et jeune de 24h à 78h, une suspension bactérienne est préparée dans 5 ml d'eau distillée stérile. La suspension a une concentration de 5×10^8 UFC/ml, ce qui correspond à une turbidité égale au standard McFarland N°5. A l'aide d'une micropipette, un volume de 150 µl de cette suspension a été déposé dans chaque microtube. Le volume pour les microtubes CIT (citrate), VP (piruvate de sodium) et GEL (gélatine), est de 300 µl par puits. Cela évite la formation de bulles d'air. Les microtubes ADH (arginine déshydrolase), LDC (lysine déshydrolase), ODC (ornithine décarboxylase), H₂S (sulfure d'hydrogène) et URE (uréase) sont recouverts d'huile de vaseline stérile pour assurer la condition

d'anaérobiose. La période d'incubation à 37°C est de 24-78h, dans une atmosphère humide permettant à la bactérie de réagir avec les substrats.

Lecture immédiate ou révélés par addition de réactifs (Annexe 01). Six additifs ont été utilisés au cours de cette étude :

- ✓ Nitrate réductase 1 : acide sulfanilique + Nitrate réductase 2 : NN-diméthyle-naphthylamine et la poudre de Zinc (Institut Pasteur d'Algérie), pour la recherche de l'enzyme nitrate réductase.
- ✓ Réactifs de Voges Prauskauer 1 : solution d'Alpha-naphtol à 6 % dans l'alcool absolu + Voges Prauskauer 2 : 40 % d'hydroxyde de potassium dans l'eau distillée (Institut Pasteur d'Algérie), pour la mise en évidence de la production de l'acétoïne.
- ✓ Réactif de Kovax (Kovacs, N. 1928. Eine vereinfachte methode zum nachweis der indolbildung duch bakterien. Z. Immunitats. Forsh. Exp. Ther. 55:311-315.) pour la mise en évidence de la production d'indole.
- ✓ Réactif TDA (Institut Pasteur d'Algérie) : chlorure de fer III, pour la recherche de l'enzyme tryptophane désaminase (TDA).

Les résultats sont interprétés à l'aide d'un tableau de lecture trouvé dans le guide de la galerie établi par les fournisseurs (Annexe 02) et l'identification est obtenue à l'aide du logiciel d'identification APIWEB™ (Biomérieux). Les tests sont regroupés en groupe de 3. Une réaction négative donne 0 point tandis qu'une réaction positive donne 1, 2 ou 4 points. On additionne à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient enfin un code de sept chiffres qui correspond à l'identification de la souche.

Test LOPAT

- **Test Levane (NAS)**

Ce test permet de vérifier la polymérisation du fructose en poly-fructose par la bactérie testée (Schaad, 1988). A l'aide de l'anse à inoculation, l'ensemencement d'une colonie bactérienne jeune se fait par une série de stries sur une boîte de Pétri contenant le milieu levane solide, puis incubées à 26 ° C pendant 3 à 5 jours. Une poussée de colonies blanchâtres et convexes avec un aspect plutôt crémeux indique que la bactérie possède une levane-sucrase (test positif) (Goszczyńska *et al.*, 2000), (Annexe 1).

- **Test d'oxydase**

Ce test permet de mettre en évidence la présence (ou non) du complexe enzymatique : cytochrome-oxydase (cytochrome C19) dans la chaîne respiratoire des bactéries (Schaad, 1988). Le test est réalisé en utilisant des disques d'oxydase (Bioscan Industrie, No. 452, Zea Ouled Saber, Sétif). Un de ces disques est placé dans une boîte de Petri vide. On dépose sur celui-ci une colonie bactérienne en utilisant une pipette Pasteur stérilisée au préalable. Après écoulement de 30 secondes, apparition d'un composé coloré en violet qui est l'indophénol suite à l'oxydation du réactif phénylènediamine (résultat positif). En cas d'absence de couleur, pas d'oxydation et le résultat est négatif (Steel, 1960).

- **Test de l'activité péctinolytique**

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

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

- **Test d'arginine dihydrolase (ADH)**

Ce test sert à déterminer la présence ou l'absence de l'arginine dihydrolase, réalisé sur milieu Moëller ou dans le micro-tube indiquant le test ADH sur la galerie API.

Apparition d'une couleur jaune (test négatif), la bactérie est non décarboxylante, utilisera les peptones du milieu, et produira des acides organiques ainsi que des bases faibles comme l'ammoniac.

Apparition d'une couleur rouge-orangé (test positif), la bactérie est décarboxylante, après avoir utilisé le glucose elle va produire du dioxyde de carbone et des amines. L'alcalinité des amines est importante, et le virage de l'indicateur de pH sera obtenu.

- **Test d'hypersensibilité sur feuilles de Tabac**

Réalisé par (Rathore *et al.*, 2000), met en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie suite au dessèchement des zones foliaires inoculées sur les feuilles de Tabac. Une suspension bactérienne de 1 ml ayant une concentration de 10 bactéries/ml d'une culture jeune (de 24 à 78h) est injectée, à l'aide d'une seringue à tuberculine, dans l'espace intercellulaire entre l'épiderme et le parenchyme palissadique d'une jeune feuille de tabac. L'eau distillée stérile (EDS) est utilisée comme témoin négatif. Le test est considéré positif s'il y a apparition d'une tache nécrotique correspondant à la zone infiltrée. La lecture ce fait après 3 à 5 jours à température ambiante. Le dessèchement des zones foliaires inoculées signifie que la bactérie est phytopathogène. Le résultat est négatif si aucune réaction n'est observée (Schaad *et al.*, 2001).

Examen de la mobilité

L'ensemencement du milieu mannitol mobilité (Institut Pasteur, Algérie) se fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec une colonie pure et jeune de 24h de la souche à tester. Après incubation pendant 24 - 78h, l'apparition d'une culture bactérienne le long de la piqûre centrale indique que la bactérie est immobile. Les bactéries mobiles envahissent tout le milieu à partir de la piqûre centrale qui sera observé sous forme d'un trouble et d'une culture bactérienne dans toute la surface du tube indiquant que la bactérie est très mobile. Après l'incubation à 27 C° durant 3 à 5 jours, la fermentation du mannitol provoque un virage au jaune du milieu. Si on ajoute quelques gouttes des réactifs de nitrate réductase I et II, le milieu change de coloration et devient rouge rose attestant la présence de la nitrate réductase (nitrates réduits en nitrites) et le test est positif. Si le test est négatif, il demeure incolore (Freney *et al.*, 1992).

Test sur gélose Mac Conkey

Afin de mettre en évidence la fermentation du lactose dont l'utilisation est révélée par l'indicateur coloré du milieu (le rouge neutre), les souches ont été ensemencées sur le milieu Mac Conkey (milieu sélectif pour bactéries à Gram -), ce dernier contient deux inhibiteurs de la flore à Gram + (les sels biliaires et le cristal violet). L'apparition de colonies rouges entourées d'un halo opaque avec virage du milieu vers le rouge du fait de son acidification, signifie qu'il y a eu une précipitation des sels biliaires et que la bactérie fermente le lactose

(Lactose +). Dans le cas où il y a apparition de colonies jaunes ou incolores cela signifie que la bactérie ne fermente pas le lactose (Lactose -), (Mac Conkey, 1990 et 1905).

Test MEVAG

Chaque isolat bactérien a été ensemencé dans deux tubes contenant le milieu MEVAG (Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides) additionné de glucose. Ce milieu Permet de caractériser les bactéries fermentaires (entérobactéries) de celles oxydatives (*Pseudomonas*) ou indifférentes.

Après l'ensemencement par pique centrale, l'un des deux tubes est recouvert d'huile de vaseline en vue de condition d'anaérobiose. Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 3 à 5 jours. Le métabolisme fermentatif, favorisé par l'anaérobiose, engendre de nombreux produits acides que l'on pourra détecter par le virage de l'indicateur de pH qui est le rouge de phénol au jaune. Par contre, Le métabolisme oxydatif ne donne naissance qu'à de petites quantités d'acides et uniquement en bonnes conditions d'oxygénation et le virage au jaune de l'indicateur de pH est seulement en surface du tube (acidification uniquement en aérobiose).

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

L'échantillonnage a été effectué à partir d'un verger localisé aux montagnes de la Wilaya de Mila, dont les arbres sont d'une variété Sigoise, la variété autofertile la plus connue en Algérie. Malheureusement les plants d'oliviers n'étaient pas certifiés et le verger était ravagé par la bactériose. Les galles utilisées dans cette étude étaient de quelques millimètres de diamètre avec une couleur vert pâle, dont quelques-unes virées vers le vert-brun. L'intérieur des nœuds se compose de tissus compacts et spongieux dans lesquels se forment des cavités lysogènes infestées de cellules bactériennes.

La bactérie recherchée est un bâtonnet à Gram négatif, aérobie, mobile, croissance plutôt lente à 26 °C, catalase positive, oxydase négative, arginine dihydrolase négative suscite la réponse hypersensible au tabac, la plupart des isolats sont fluorescents sur milieu King B et levane négatif, (bien que certains isolats soient non fluorescents) et levane positif.

Le protocole de détection de la bactérie *Pseudomonas savastanoi* était de faire cultiver le macérât et de faire passer le tissu intérieur de la galle sur milieu King B, milieu semi-sélectif de référence pour le genre *Pseudomonas*. Selon les études de Serdoun en 2013, le phytopathogène est facile à isoler sur les trois milieux de culture : King B, LPGA (levure peptone glucose agar) et levane, comme il peut aussi être cultivé sur les milieux PVF-1 et OKA selon (Surico et Marchi, 2003).

Les cultures pures et jeunes de chaque isolat ont été prélevées à partir du milieu KB. Une succession de tests ont été effectués pour identifier les espèces existantes. 45 isolats bactérien sont été isolés et purifiés (figure 23), 44,44% sont à Gram positifs et 55,55% sont a Gram négatifs. Parmi eux 53,33% des bacilles et 46,67% des coccobacilles. Une sélection de 21 souches était indispensable pour l'identification en raison du manque de disponibilité des réactifs. La base sur laquelle la sélection a été faite est de choisir les isolats faisant partie des Enterobacteriaceae avec un Gram négatif, catalase positive et oxydase négative, ainsi que d'autres souches non Enterobacteriaceae à Gram négatif, catalase positive et oxydase positive déjà mentionnées comme étant des endophytes qui cohabitent avec l'agent phytopathogène sur les nœuds formés (Marchi *et al.*, 2008 ; Quesada *et al.*, 2009). Le tableau 10 indique les différents caractères mis en évidence sur milieu King B.

Figure 23: aspects microscopiques des 45 isolats bactériens à partir des galles

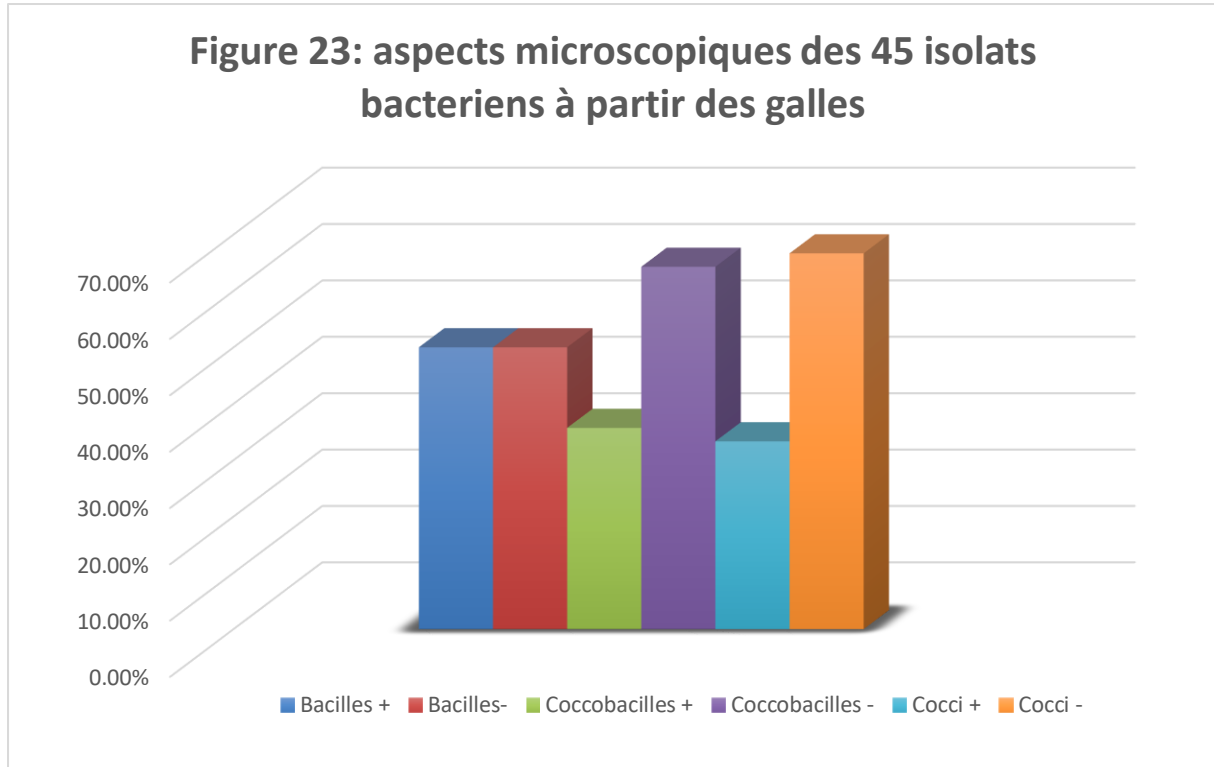


Tableau10: les aspects macroscopiques des souches isolées sur King B

Souche	Couleur	Aspect	Elévation	Centre	Forme
AFM 4	J	Crémeux	Convexe	+	Circulaire
AFM 6	J	Crémeux	Convexe	-	Circulaire
AFM 7	J	Crémeux	Convexe	+	Circulaire
AFM 9	J	Crémeux	Bombée	+	Circulaire
AFM 24	B	Crémeux	Convexe	-	Circulaire
AFM 27'	JC	Crémeux	Plate	+	Circulaire
AFM 37	J	Visqueux	Bombée	+	Circulaire
AFM 38	J	Visqueux	Bombée	+	Circulaire
AFM 38'	J	Visqueux	Bombée	+	Circulaire
AFM 43	B	Crémeux	Convexe	-	Circulaire
AFM 30	J	Visqueux	Bombée	+	Circulaire
AFM 1	JC	Crémeux	Convexe	-	Circulaire
AFM 8	JC	Crémeux	Plate	+	Circulaire
AFM 11	BC	Crémeux	Plate	-	Circulaire
AFM 25	BC	Crémeux	Plate	+	Circulaire
AFM 26	JC	Crémeux	Convexe	+	Circulaire
AFM 27	JC	Crémeux	Convexe	-	Circulaire
AFM 28	JC	Crémeux	Plate	-	Circulaire
AFM 29	BC	Crémeux	Convexe	-	Circulaire
AFM 33	BC	Crémeux	Convexe	+	Circulaire
AFM 35	J	Crémeux	Convexe	+	Circulaire

(B : Blanche, B.C : Blanc crème, J : Jaune, J.C : Jaune clair, + : Présence et - : Absence)

L'observation macroscopique des 21 isolats indique qu'il existe deux aspects (crémeux : 80,95 %, visqueux : 19,05 %), quatre couleurs (jaune : 42,85 %, blanc : 9,52 %, blanc crème : 19,04 % et jaune crème : 28,57 %), quatre genres d'élévation (convexe : 52,38%, bombée: 23,80%, plate : 23,80%) et le centre (présence : 61,90 %, absence : 38,1 %).

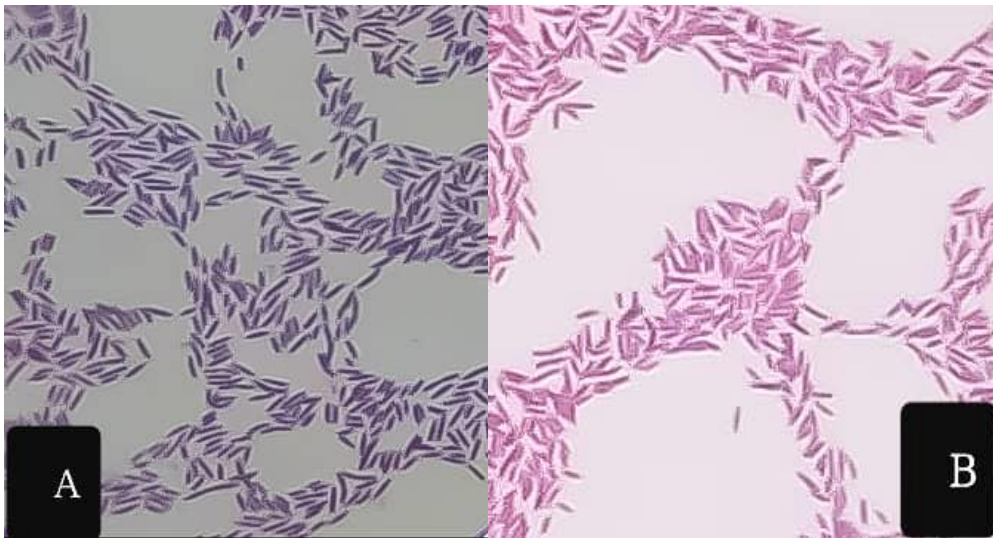


Figure 24 : la coloration de Gram. (A) Bacille à Gram positif (Isolat AMF17),
(B) Bacille à Gram négatif (Isolat AMF41)

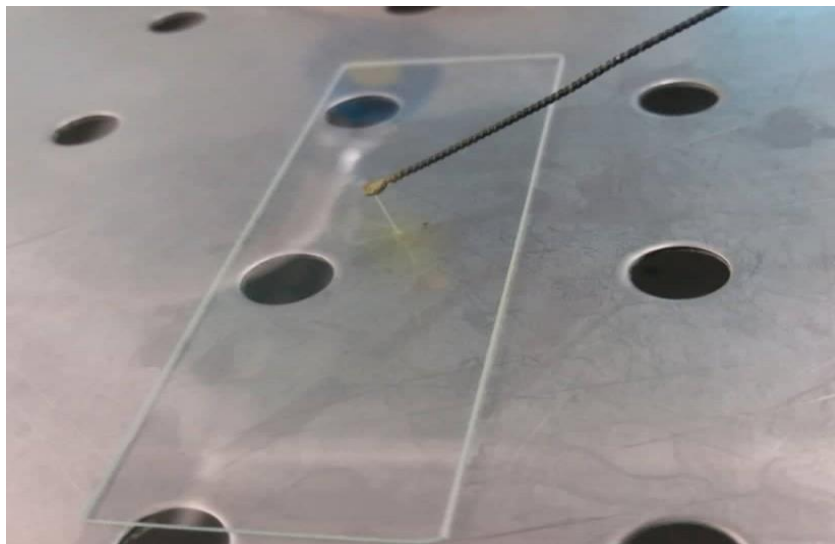


Figure 25 : le test de potasse indicateur de Gram
la formation d'un filament muscisé
confirme le Gram négatif (Souche AFM6)

Tableau 11 : description de l'aspect microscopique des souches étudiées par la coloration de Gram et le test de potasse.

Souche	Aspect microscopique			
	Gram	Aspect des cellules	Regroupement	KOH à 3%
AFM 4	-	Cocci	Amas	+
AFM 6	-	Bacilles	Amas	+
AFM 7	-	Bacilles	Amas	+
AFM 9	-	Cocco-bacilles	Amas	+
AFM 24	-	Bacilles	Amas	+
AFM 27'	-	Cocci	Amas	+
AFM 37	-	Cocco-bacilles	Amas	+
AFM 38	-	Cocco-bacilles	Amas	+
AFM 38'	-	Cocco-bacilles	Amas	+
AFM 43	-	Bacilles	Amas	+
AFM 1	-	Bacilles	Amas	+
AFM 8	-	Bacilles	Amas	+
AFM 11	-	Bacilles	Amas	+
AFM 25	-	Bacilles	Amas	+
AFM 26	-	Bacilles	Amas	+
AFM 27	-	Bacilles	Amas	+
AFM 28	-	Bacilles	Amas	+
AFM 29	-	Bacilles	Amas	+
AFM 30	-	Cocco-bacilles	Amas	+
AFM 33	-	Bacilles	Amas	+
AFM 35	-	Bacilles	Amas	+

(Gram -) : Gram négatif, (KOH à 3%) + : Formation d'un filament

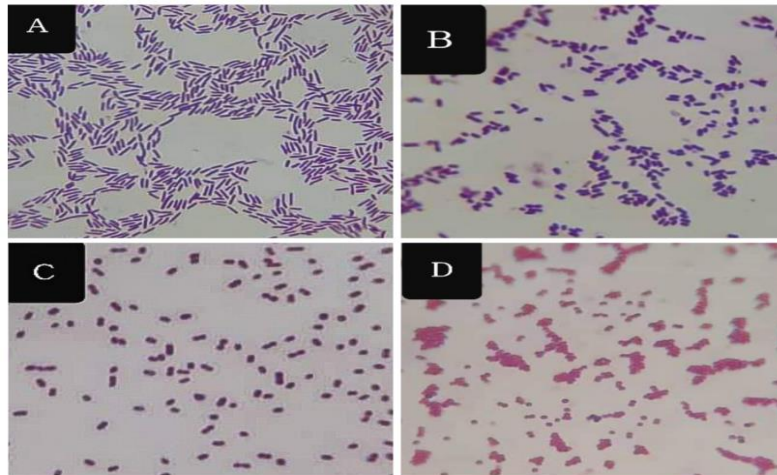


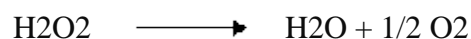
Figure 26 : résultats de l'observation microscopique. Forme bacille (A), coccobacille (B), Cocci (C) et le regroupement en amas (D)

Coloration de Gram et test de potasse

La coloration de Gram a révélée que toutes les souches sont à Gram négatif. Ce constat est vérifié par le test de potasse indicateur de Gram. L'augmentation de la viscosité du KOH et la formation d'un filament mucoïde confirme que ces bactéries sont à Gram négatif.

Test catalase et oxydase

Le test de la catalase permet de vérifier si une bactérie possède l'enzyme de la catalase ayant comme utilité de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) ainsi qu'en oxygène (O_2).



Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire (AS et AAF). La plupart des microorganismes aérobies possèdent une catalase, en particulier les bacilles Gram négatifs aérobies. Son absence est donc un critère d'identification intéressant.

Un test de la catalase jugé comme étant positif est observable si des bulles d'oxygène apparaissent lorsque la bactérie est exposée au peroxyde d'hydrogène. Dans le cas contraire, un test négatif ne permet pas de distinguer de réactions provoquant le dégagement d'oxygène. Introduite par Gorden et McLeod 1928 (Steel, 1961), la recherche de l'oxydase (le cytochrome oxydase) est un test fondamental pour l'identification des bacilles à Gram négatif. Cette enzyme fait partie de la chaîne respiratoire bactérienne et catalyse des réactions d'oxydation de type :

NN-diméthyl-paraphénylène diamine▶ Produit oxydé coloré

Substrat réduit incolore

rose violacé

L'apparition d'une tache rose violette après trente secondes signifie que la bactérie possède l'activité oxydase et dite oxydase + .

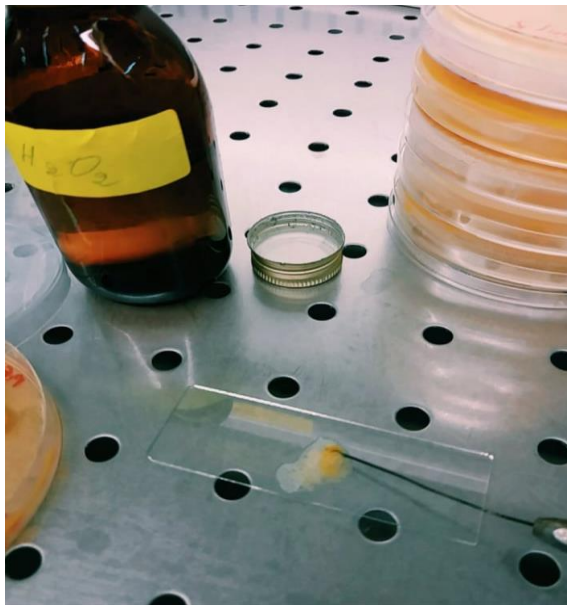


Figure 27 : résultat du test catalase de la souche AFM 6



Figure 28 : résultat du test oxydase de la souche AFM 6

Les bactéries de la famille des Enterobacteriaceae sont des bacilles à Gram négatif, mobiles ou immobiles, aéro-anaérobies facultatifs (AAF), oxydase négative, catalase positive, nitrate positif et non sporulées. Les résultats obtenus des Gram et tests de catalase et d'oxydase, signifie que nos souches appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae. Cela permet leur identification par la galerie API 20E.

Test Mannitol-mobilité

La mobilité et aussi un caractère morphologique indispensable à la caractérisation des Enterobacteriaceae qui sont des aérobie anaérobies facultatifs et mobiles avec des cils péritriches.

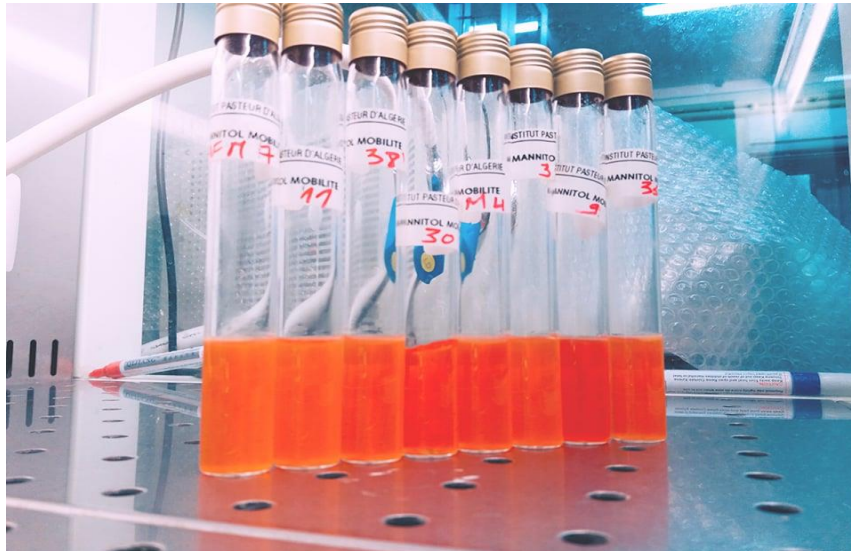


Figure 29 : résultats du test mannitol-mobilité

Toutes les souches testées sont mobiles et se diffusent dans la gélose molle, avec aucune acidification du milieu révélée, les 21 souches ne fermentent pas le mannitol donc elles sont dites mannitol négatif.

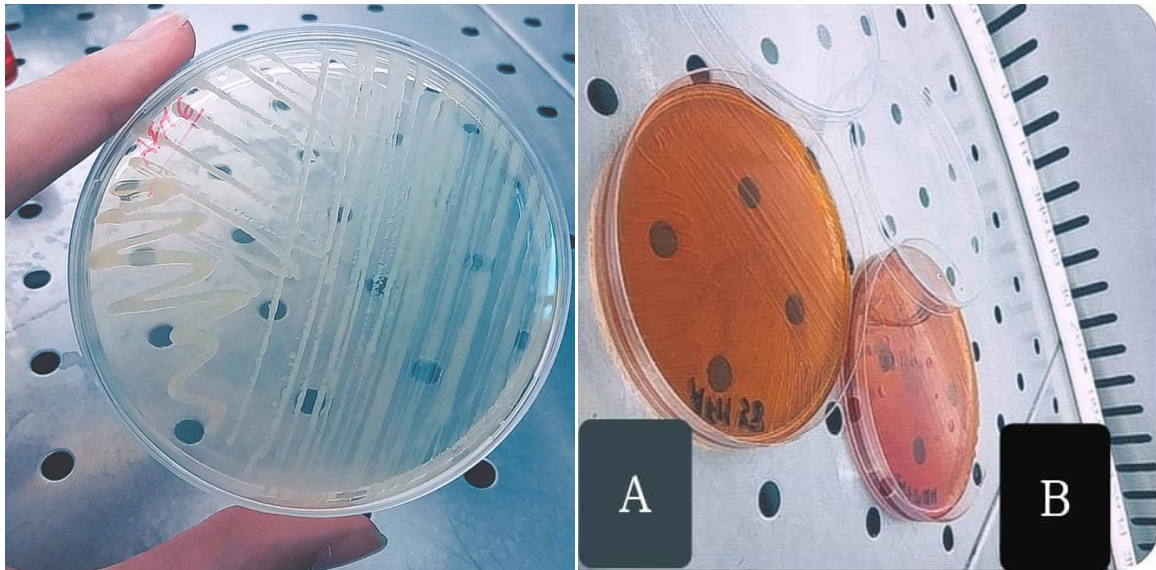
Test MEVAG

Les souches 6 et 9 ont été ensemencées dans le milieu MEVAG. Le résultat du test montre que : les deux tubes de la souche AFM 9 présente une coloration jaune qui signifie l'acidification du milieu avec une production de gaz dans le tube représentant le test en aérobiose donc elle est OF/ F, et pour la souche 6 le tube d'anaérobiose vire vers le jaune qui signifie une acidification de milieu tandis que le test en anaérobiose ne change pas.

Test Lactose et Levane

L'ensemencement des 21 souches sur milieu Mac Conkey a montré qu'il existe deux aspects : des colonies roses qui signifient que la souche est (Lactose positif), des colonies jaunes qui signifient que la souche est (Lactose négatif).

La lecture des résultats sur milieu levane (NSA), a montré que toutes les souches ensemencées sur ce milieu produisent du levane-sucrase en formant des colonies blanchâtres, bombées et brillantes.



AFM 30 : résultat du test Levane de la souche AFM 6 sur milieu NSA

AFM 31 : résultats du test Mac Conkey. Lactose négatif (A), Lactose positif (B)

Tableau 12 : résultats des tests : Catalase, Oxydase, Mannitol-mobilité, MEVAG, Culture sur milieu Mac Conkey et sur milieu Levane.

Souche	Catalase	Oxydase	Mannitol-mobilité		MEVAG		Levane	Mac Conkey
			Mannitol	Mobilité	Aérobiose	Anaérobiose		
AFM 4	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac+
AFM 6	+	-	-	Mobile	Rouge	Jaune	+	Lac+
AFM 7	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac+
AFM 9	+	-	-	Mobile	Jaune	Jaune	+	Lac-
AFM 24	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac +
AFM 27'	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac +
AFM 37	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac -
AFM 38	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac +
AFM 38'	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac+
AFM 43	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac +
AFM 1	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac +
AFM 8	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac +
AFM 11	+	-	-	Mobile	/	/	+	/
AFM 25	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac +
AFM 26	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac +
AFM 27	+	-	-	Mobile	/	/	+	/
AFM 28	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac+
AFM 29	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac +
AFM 30	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac -
AFM 33	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac +
AFM 35	+	-	-	Mobile	/	/	+	Lac -

Avec (+ : positif, - : négatif, / : Pas de pousser (pour le test Mac Conkey) et pas réalisé (pour le MEVAG) ; Lac + : Lactose positif, Lac- : Lactose négatif et - : la bactérie ne fermente pas le mannitol).

Test pectinase

La lecture des résultats du test pectinase sur pomme de terre a montré qu'il existe des souches à pectinase positif qui dégradent la pectine et formant des nécroses ainsi que d'autres qui ne la dégrade pas et sont déduite comme étant des souches à pectinase négatif.



Figure 32 : résultat positif du test pectinase sur pomme de terre de la souche AFM 6

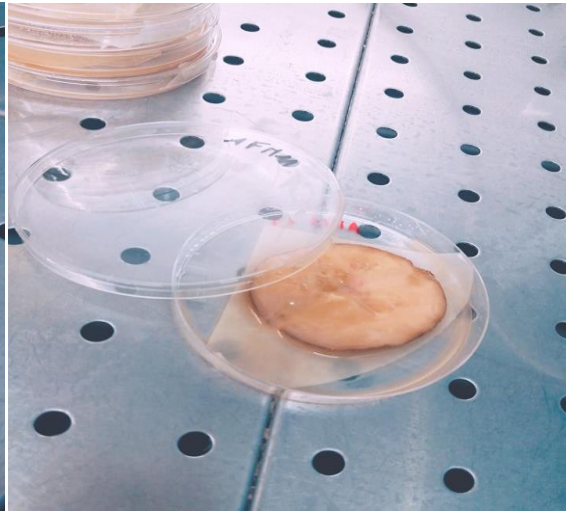


Figure 33 : résultat négatif du test pectinase sur pomme de terre de la souche AFM 4

Tableau 13 : résultats du test LOPAT des souches AFM 6 et 9

Les tests \ Les souches	AFM 6	AFM 9
Levane	+	+
Oxydase	-	-
Pectinase	-	-
ADH	-	-
L'hypersensibilité sur les feuilles de tabac.	+	+

Les résultats des tests compris dans le test L.O.P.A.T sur les souches (AFM 6 et AFM 9) montrent qu'elles sont compatibles à celles de *Pseudomonas savastanoi* à l'exception du test LEVANE qui se trouve être négatif selon (Lelliott, 1966). généralement *Pseudomonas savastanoi* forme des colonies Levane négatif sur milieu NSA, mais il existe également des souches Levane positif isolées à partir de cendres (Janse, 1981) et d'oliviers (Iacobellis *et al.*, 1993).

Test de la fluorescence et hypersensibilité du tabac

Les espèces «fluorescentes» se caractérisent par la production de pyoverdines, qui sont des pigments fluorescents jaune-verts avec une longueur d'onde d'excitation maximale de 370nm. Ces pigments sont synthétisés en grande quantité dans des conditions de cultures carencées en fer (Meyer, 1977). Pour la détection et la différenciation des bactéries à Gram négatif du genre *Pseudomonas*, le test de fluorescence sous ultraviolets à 360 nm a été réalisé afin de contrôler la fluorescence un jaune vert des souches sur gélose King B. la gélose King B favorise la production de la pyoverdine par augmentation de la concentration en phosphore apporté par la peptone. Le phosphate dipotassique joue le rôle de stimulateur de la production de la fluorescéine en augmentant la concentration en phosphore apporté par la peptone. Le sulfate de magnésium représente une source idéale pour la production de la pyoverdine et inhibe la formation de la pyocyanine.

Les résultats ont montrés que seulement 5 souches testées sont fluorescentes (AFM 6, 7, 29 et 37).



Figure 34 : résultat positif du test de fluorescence de la souche AFM 6 à Gram négatif

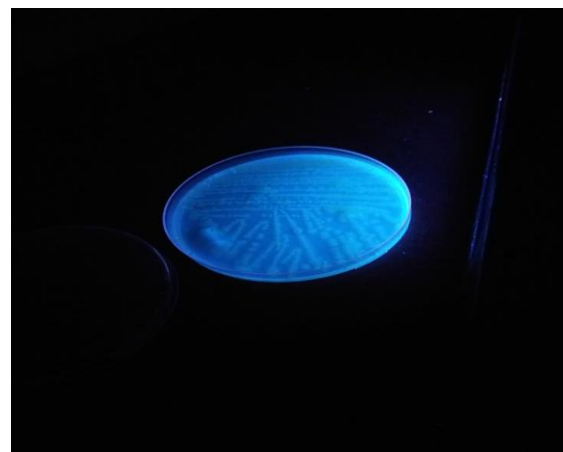


Figure 35 : résultat négatif du test de fluorescence d'une souche d'*E.coli* à Gram positif

La lecture du test de l'hypersensibilité sur feuilles de tabac a montré que toutes les souches utilisées sont phytopathogène en provoquant des dessèchements des zones foliaires inoculées.

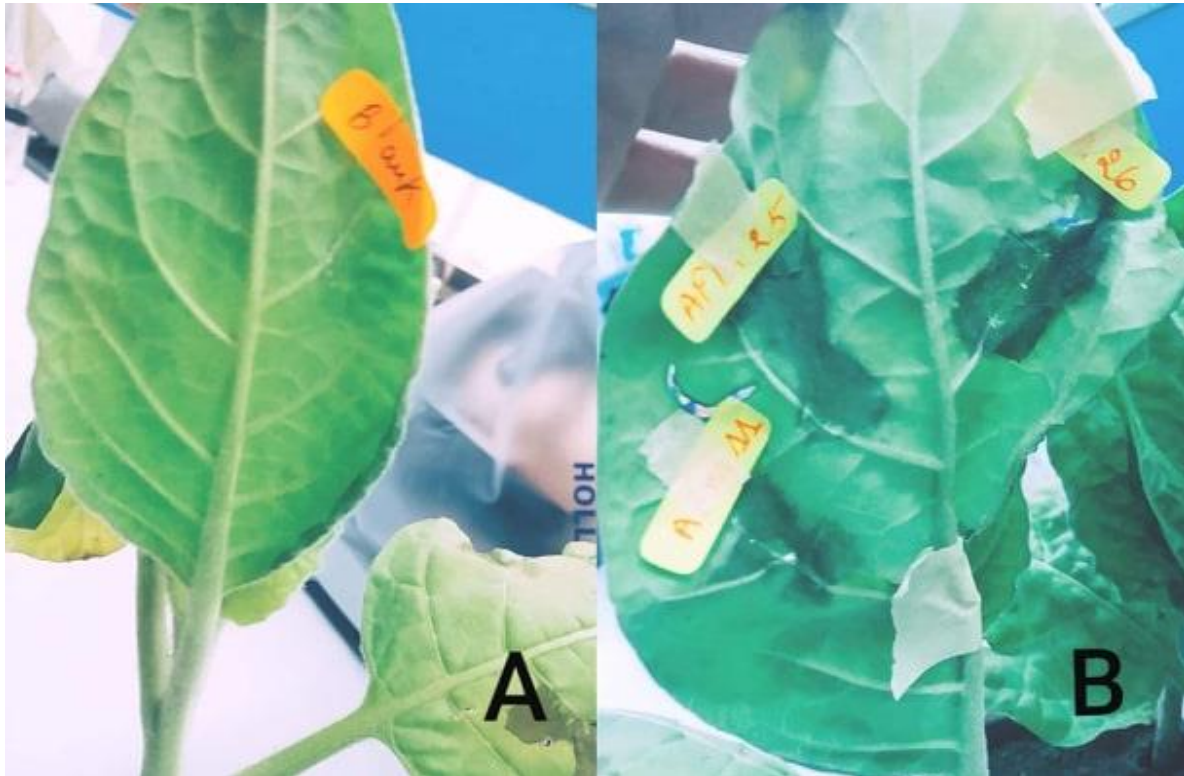


Figure 36 : résultats du test d'hypersensibilité sur feuilles de Tabac, le témoin (A),
les souches AFM 11, 25 et 26 (B)

Les galeries miniaturisées

Les suspensions bactériennes des différents isolats ont été introduites dans les microtubes des galeries et incubées à 26°C pendant 24 heures. La lecture des différentes galeries, nous a conduits aux résultats résumés dans le tableau 14. Plusieurs genres et espèces sont identifiées à l'aide des galeries API 20 NE depuis les 10 isolats, voir tableau 15, dont : *Burkholderia cepacia*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas luteola*, *Rhizobium radiobacter*, *Pasteurella ssp*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseobacterium indolegenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Chryseobacterium meningosepticum*. L'interprétation des codes d'identification est faite en utilisant un logiciel (APIWEB™) contenant le catalogue analytique des galeries API 20NE.

Tableau 14 : Résultats des tests API 20NE (partie1)

Tests	Souches				
	AFM1	AFM8	AFM11	AFM25	AFM26
Nitrate de potassium(No3)	+	-	-	-	+
L-tryptophane(TRP)	-	-	-	-	-
D-glucose(GLU)	-	-	-	-	-
L-arginine(ADH)	-	-	-	-	-
Urée(URE)	-	-	-	-	-
Esculine(ESC)	+	+	+	+	+
Gélatine de bœuf(GEL)	-	-	-	-	-
4-nitrophenyl ED galactopyranoside (PNG)	-	-	-	-	+
D-glucose (GLU)	+	-	+	-	-
L-arabinose (ARA)	+	+	-	-	+
D-mannose (MNE)	-	+	+	-	+
D-mannitol (MAN)	+	+	+	-	-
N-acétyle-glucosamine (NAG)	+	-	+	-	-
D-maltose (MAL)	-	+	-	-	-
Potassium gluconate (GNT)	+	-	+	-	+
Acide caprique (CAP)	-	+	-	-	-
Acide adipique (ADI)	+	+	-	-	-
Acide malique (MLT)	+	+	+	-	+
Trisodium citrate (CIT)	-	+	-	-	-
Acide phenolacétique (PAC)	+	+	-	-	-
Oxydase (OX)	+	+	+	+	+

- : Négatif + : Positif

Tableau 14 : Résultats des tests API 20NE (partie2)

Souches Tests	AFM27	AFM28	AFM29	AFM33	AFM35
	Nitrate de potassium (No3)	-	+	+	+
L-tryptophane(TRP)	-	-	-	-	-
D-glucose(GLU)	-	+	-	+	-
L-arginine (ADH)	-	-	-	-	-
Urée (URE)	-	-	-	-	-
Esculine(ESC)	+	+	+	+	-
Gélatine de bœuf(GEL)	-	+	-	-	+
4-nitrophenyl ED galactopyranoside (PNG)	-	+	-	-	+
D-glucose (GLU)	-	+	-	-	-
L-arabinose (ARA)	-	+	+	+	+
D-mannose (MNE)	+	+	-	+	+
D-mannitol (MAN)	-	+	-	-	+
N-acétyle-glucosamine (NAG)	-	+	-	+	+
D-maltose (MAL)	+	+	-	-	-
Potassium gluconate (GNT)	-	+	-	-	+
Acide caprique (CAP)	-	+	-	-	-
Acide adipique (ADI)	-	+	-	+	-
Acide malique (MLT)	-	+	-	+	+

+ : Positif - : Négatif

Tableau 15: Tests API20NE – Identification des souches par le logiciel APIWEB™ de l'API20NE

Souche	Code d'Identification	Bactérie	Probabilité
AFM 28	5477777	<i>Burkholderia cepacia</i>	99,9%
AFM 11	0446544	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	92,1%
AFM 1	1445566	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%
AFM 33	5403167	<i>Burkholderia cepacia</i> / <i>Ochrobactrum anthropi</i>	
AFM 26	1423444	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	94,7%
AFM 26	1423444	<i>Pseudomonas luteola</i>	2,1%
AFM 8	0407277	<i>Burkholderia cepacia</i> / <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	
AFM 35	1037544	<i>Rhizobium radiobacter</i> / <i>Vibrioparahaemolyticus</i>	
AFM 29	1401004	<i>Pasteurella spp</i>	50,6%
AFM 25	0400004	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	93,7%
AFM 27	0402207	<i>Chryseobacterium indologenes</i> / <i>Sphingomonas paucimobilis</i> / <i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	

Le genre *Pseudomonas*, longtemps connu comme étant le principale agent causale des nœuds d'oliviers cohabite le plus souvent avec un nombre de Gammaproteobacteria endophytes tels que *Erwinia toletana*, *Pantoea agglomerans* et d'autres bactéries des genres *Burkholderia*, *Hafnia* et *Stenotrophomonas* (Marchi et al., 2008; Quesada et al., 2009).

Les résultats montrent que Les souches phytopatogènes de *Burkholderia cepacia* anciennement dite synonyme de *Pseudomonas cepacia* (Gonzalez, 1997) Sont présentes chez quatre souches avec de grands pourcentages de 99,9 % et de 99 % Chez les souches (AFM 1 et AFM 28).

L'espèce type, *Sphingomonas paucimobilis* a été créée en 1977 sous le nom de *Pseudomonas paucimobilis* (Holmes et al., 1977). Cette bactérie trouvée chez quatre souches (AFM 11,

AFM 8, AFM 27 et AFM 26) est une des espèces de *Sphingomonas* présentes sur des tissus végétaux (graine, feuille et fleur) qui ont été détectées et énumérées par l'amplification d'une partie spécifique du gène de l'ARNr de petite sous-unité. Des *Sphingomonas* ont été trouvés sur 26 espèces de plantes appartenant à 11 familles (Kim *et al.*, 2004).



Figure 37 : résultats des galeries API 20E des souches AFM 6 et AFM 9

Brevundimonas vesicularis a été isolé d'une sangsue pour la première fois en 1954 et classé en tant que membre du groupe IV du genre *Pseudomonas* et nommé *Pseudomonas vesicularis* (Chi *et al.*, 2004). En 1994, il a été reclassé dans le genre *Brevundimonas*.

Les résultats montrent que la souche (AFM 27) a une probabilité d'être cette bactérie avec un pourcentage très élevé de 93,7%, cette bactérie est considérée comme non-phytopathogène selon les travaux de (Oyaizu et Komagata, 1982).

Le site indique aucun pourcentage pour les bactéries suivantes : *Ochrobactrum anthropi*, *Rhizobium radiobacter* / *Vibrio parahaemolyticus*, *Chryseobacterium indologenes*, *Chryseobacterium meningosepticum*, et un faible pourcentage pour *Pseudomonas luteola* et *Pasteurella spp.*

Faisant partie des Enterobacteriaceae, les souches AFM (4, 6, 7, 9, 24, 27', 30, 37, 38, 38', 43) ont été identifiées en utilisant la galerie API 20 E (Tableau 16, 17).

Tableau 16 : Résultats des tests API 20E (partie1)

Souches Tests	AFM4	AFM6	AFM7	AFM9	AFM24	AFM27'
Ortho- Nitro-phényl-Galactoside (ONPG)	+	-	+	+	-	-
Arginine dihydrolase (ADH)	-	-	+	-	-	-
Lysine décarboxylase (LDC)	-	+	+	-	-	-
Ornithine décarboxylase (ODC)	-	-	+	-	-	-
Citrate de Simmons (CIT)	-	-	-	-	-	-
Thiosulfate de sodium (H ₂ S)	-	-	-	-	-	-
Uréase (URE)	-	-	-	-	-	-
Tryptophane (TDA)	-	-	-	-	-	-
Indole (IND)	-	-	-	-	-	-
Pyruvate de sodium (VP)	+	-	+	+	-	-
Gélatinase (GEL)	+	-	+	+	-	+
Glucose (GLU)	+	+	+	+	-	-
Mannitol (MAN)	+	+	+	+	-	+
Inositol (INO)	+	-	+	+	+	-
Sorbitol (SOR)	-	-	-	-	-	-
Rhamnose (RHA)	+	-	+	+	-	-
Saccharose (SAC)	+	-	+	+	-	-
Melibiose (MEL)	+	+	+	+	-	-
Amygdalin (AMY)	+	-	+	+	-	-
Arabinose (ARA)	+	+	-	+	-	-
Oxidase (OX)	-	-	-	-	-	-
Nitrite (NO ₂)	+	+	+	-	-	-
Azote (N ₂)	-	-	-	+	-	-
Mobilité (MOB)	+	+	+	+	+	+
Mac Conkey (McC, remplacé par BCP)	+	+	+	-	+	-
Oxydatif (OF/O)	/	+	/	-	/	/
Fermentatif (OF/F)	/	-	/	+	/	/

/ : Test non réalisé + : Positif - : Négatif

Tableau 16: Résultats des tests API 20E (partie2)

Souches Tests	AFM30	AFM37	AFM 38	AFM38'	AFM43
	Ortho- Nitro-phényl-Galactoside (ONPG)	+	+	+	+
Arginine dihydrolase (ADH)	+	+	-	+	-
Lysine décarboxylase (LDC)	+	+	-	+	-
Ornithine décarboxylase (ODC)	-	+	-	+	-
Citrate de Simmons (CIT)	+	+	-	-	-
Thiosulfate de sodium (H ₂ S)	-	-	-	-	-
Uréase (URE)	-	+	-	-	-
Tryptophane (TDA)	-	-	-	-	-
Indole (IND)	-	-	-	-	-
Pyruvate de sodium (VP)	+	+	+	+	+
Gélatinase (GEL)	+	+	+	+	-
Glucose (GLU)	+	+	+	+	+
Mannitol (MAN)	+	+	+	+	+
Inositol (INO)	+	+	+	-	-
Sorbitol (SOR)	-	-	-	-	-
Rhamnose (RHA)	+	+	+	+	-
Saccharose (SAC)	+	+	+	+	-
Melibiose (MEL)	+	+	+	+	+
Amygdalin (AMY)	+	+	+	+	-
Arabinose (ARA)	+	+	+	+	-
Oxidase (OX)	-	-	-	-	-
Nitrite (NO ₂)	+	+	+	+	-
Azote (N ₂)	-	-	-	-	+
Mobilité (MOB)	+	+	+	+	+
Mac Conkey (McC, remplacé par BCP)	-	-	+	+	+
Oxydatif (OF/O)	/	/	/	/	/
Fermentatif (OF/F)	/	/	/	/	/

/ : Test non réalisé + : positif - : négatif

Tableau 17: Tests API20E – Identification des souches par le logiciel spécifique de l’API20E.

Souche	Code d’Identification	Bactérie	Probabilité
AFM 6	400414213	<i>Pasteurella pneumotropica</i> / <i>Mannheimia haemolytica</i>	100 %
AFM 9	100737354	<i>Aeromonas hydrophila</i>	

Les résultats ont montré que la souche (AFM 6) a une probabilité de 100% d’être *Pasteurella pneumotropica* / *Mannheimia haemolytica* aussi appelée : *Manheimia (pasteurella) haemolytica* elle été connu sous le nom de *Pasteurella bovisepitica* (Jones, 1921) avant d’être renommée *Pasteurella haemolytica* en 1932 (Newson, 1932).Aucune source consulté indique qu’elle est phytopathogène et pour la souche (AFM 9) le site de lecture montre aucun pourcentage avec la probabilité des bacteries suivantes : *Aeromonas hydrophila* gr 1 et gr 2, *Pasteurella pneumotropica* / *Mannheimia haemolytica*.

Tableau 18 : Tableau comparatif des résultats des différents tests entre la souche référence *Pseudomonas savastanoi* (NCPBP 3318) et les souches AFM 6 et 9 (Ignjatov *et al.*, 2007)

Tests biochimiques	Souche référence NCPBP 3318	Souche AFM 6	Souche AFM 9
Réaction de Gram (KOH)	+	+	+
Test LOPAT : Levane Oxydase Pectinase Arginine dehydrolase Hypersensibilité de tabac	+ - - - +	+ - - - +	+ - - - +
Hydrolyse de : Gélatine	-	-	+
Glucose	+	+	+
Mannose	+	+	+
INO	+	-	+
O/F	O	O	F
Catalase	+	+	+

+ : positif - : négatif

D'après le tableau comparatif suivant on constate que la souche (AFM 9) se diffère de la souche référence par deux tests qui sont : la voie d'attaque des glucides, elle fermente le glucose et ne l'oxyde pas comme le cas de la souche référence et par le test de l'hydrolyse de la gélatine, elle hydrolyse la gélatine contrairement à la souche référence. Par contre Les résultats des tests réalisés sur la souche (AFM 6) montrent qu'elle est compatible avec les résultats de la souche référence à l'exception d'un seul test de la fermentation/oxydation de l'inositol.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Cette étude préliminaire, à pour but d'isoler et d'identifier à la fois l'agent pathogène responsable du chancre de l'olivier, et d'autres bactéries endophytes, à partir des échantillons provenant du verger situé à la commune Amira Arrès, wilaya de Mila

Ce champ a été cultivé à partir des plants non certifiés d'oliviers de la variété Sigoise.

- Les plants non certifiés achetés à partir d'une pépinière étaient la cause de la propagation de la maladie dans tout le verger.
- Une diversité des espèces bactériennes a été isolée et identifiée, donnant des différents résultats ; dont trois souches ont été identifiées comme *Burkholderia cepacia*.
- La souche (AFM 6) présente des résultats relativement proches à ceux de l'agent causal de la maladie, une compatibilité presque totale des profils biochimiques et du test L.O.P.A.T a été notée entre la souche (AFM 6) et la souche de référence *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3318.
- Afin d'aller jusqu'à la confirmation et l'identification précise des isolats bactériens endophytes des galles, une étude géotypique des isolats est à réaliser.
- L'intervention de la génomique, en se servant des méthodes moléculaires. Ces méthodes peuvent être nécessaires pour les programmes de sélection sanitaires et de certification des oliveraies dans les régimes incluant *Pseudomonas savastanoi*, ainsi que pour des études épidémiologiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam, D.B., Pugsley, A.T, (1934).** Smooth-rough, variation in *Phytophthora medicaginis* phaseolicola Burk. *The Australian journal of experimental biology and medical science*, 12: 193-201.
- Addou, S. (2017).** Etude des paramètres physico-chimiques et organoleptiques de l'huile d'olives de la variété Siguoise dans la région de Tlemcen, Mémoire de magister en technologie des industries agro-alimentaires, sous la direction de Dr. Ghezlaoui Bahaeddine, Université de Tlemcen, 64p.
- Afido, (2019).** Association Française Interprofessionnelle de l'Olive, Bulletin de Santé du Végétal Olivier, <https://afidol.org/bulletin-de-sante-du-vegetal-olivier-2019/> (Consulté en Avril 2019).
- Alcalca, A.R., Barranco, D. (1992).** Prediction of flowering time in olive for the Cordoba olive collection, 27: 1205–1207.
- Alloum, D. (1974).** L'oléiculture algérienne, Options méditerranéennes n°24, 45-48p.
- 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, 60p.
- Artaud, M. (2008).** L'olivier sa contribution dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique. Ed. C.O.I., 30 p.
- Benjama, A. (2003).** Méthode d'évolution rapide du degré d'attaque de l'olivier par la tuberculose causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* en verger au Maroc, Fruits 58 : 213-219.
- Bergey, D.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W., Huntoon, F.M, (1923).** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams et Wilkins.
- Bernard, R., Alexia, R., Patrick, L., et Christian, P. (2007).** L'olivier dans les Pyrénées orientales, Canel Pyrénées-Orientales : Trabucaire, France, 174p.
- Besnard, G., Khadari, B., Villemur, P., et Bervillé, A. (2000).** Cytoplasmic male sterility in olive (*Olea europea L*), *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 1018-1024.

Bianchi, G. (2003). Lipids and phenols in table olives, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105: 229–242.

Bolmont, R., Buessler, L., et Jaubert, J.P. (1993). L'olivier. Publications de l'Ecole moderne française. Mouans-Sartoux, 1-41.

Bouarrissa, C. (2019). Des foyers de tuberculose de l'olivier détectés, L'Algérie profonde / Est, Bordj Bou-Argeridj.

Boulssen, B., Bouraoui, N. (2016). Etude de la tuberculose de l'olivier, isolement et identification présomptifs et quelques isolats bactériens à partir des tumeurs. Mémoire de master en Sciences biologique, sous la direction de Dr. Karima Boubekri, Constantine, Université des Frères Mentouri Constantine 1, 79p.

Breton, C., Medial, F., Pinatel, C., et Berville, A. (2006). De l'olivier à L'oléastre : Origine et domestication de l'*Olea europaea L* dans le Bassin méditerranéen, Cahiers agricultures vol.15, n°4.

Buonaurio, R., Moretti, C., Passosda, D., Cortese, C., Ramos, C., et Venturi, V. (2015). The olive Knit disease as amodelto study the role of interspecies bacterial communities in plant disease Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentarie Ambientali, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy.

Burkholder, W.H, (1948). Genus *Pseudomonas Migula*, 138p. In Breed, R.S., Murray, E.G.D., Hitchens A.P. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th. Baillibre, Tindall et Cox, London.

Caron, M. (2019). Planète Olivier, https://www.futura-sciences.com/planete/definitions/botanique_olivier8064/ (Consulté en Mai 2019).

Charlottesse, (2010). Champs d'oliviers à Cucuron. Provence-Alpes-Cote d'Azur-France. <http://www.weloveprovence.fr/Vaucluse/Cucuron/photo-5013026094-Champs-d-oliviers-a-Cucuron.html> (Consulté en Mars 2019).

Chi ,C., Fung, C., et Wong, W. (2004). *Brevundimonas* bacteremia: Two case reports and literature review. *Scand J Infect Dis*, 36: 59-77.

Chiappetta, A., Muzzalupo, I. (2012). Botanical Description, In Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry, ed. InTech, Italy.

Ciccarone, A. (1950). Alterazioni de freddo e da rognà sulgi olive, esemplifivate dai Danni osservati in alcune zone pulguese negli anni 1949-19500, Bollettino della stazione di Patologia vegetale Roma, 6: 141-174.

Codex Alimentarius, (1989). Norme codex pour les huiles d'olive vierges et raffinées et pour l'huile de grignons d'olive raffinée, Codex STAN 33-1981.

Comai, L., Kosuguge, T. (1980). Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*, *Journal of Bacteriology*, 128: 950-957.

Efe, R., Soykan, A., Curebal, I., et Sonmez, S. (2012). Olive and Olive Culture in the Mediterranean Basin. In: Efe R, Ozturk S, Ghazanfar (Eds.) Environment and Ecology in the Mediterranean Region, 5: 54-64. Cambridge Scholars Publishing. Newcastle, UK. ISBN: 1-4438-3757-1, ISBN: 978-1-4438-3757-6.

EPPO, (2019). European and Mediterranean Plant Protection Organization, Global Database, <https://gd.eppo.int/> (Cosulté en Juillet 2019).

Ercolani, G. (1971). *Pseudomonas savastanoi* and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field. *Journal of General Microbiology*, Vol. 109, ISSN 0022-1287, 245-257p.

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

FAO, (2003). Food and Agriculture Organisation of the United Nations, L'olivier contraintes et potentialities, Strategie et politique Agricole.

Freney, J.R., Denmead, O.T., Wood, A.W., Saffigna, P.G., Chapman, L.S., Ham, G.J., Hurney, A.P., et Stewart. R.L. (1992). Factors controlling ammonia loss from trash covered sugarcane field fertilized with urea. *Fert. Res*, 31: 341-349.

Ferraris, T. (1926). Trattato di patologia e terapia vegetale, vol.1, 3 rd ed. Hopli, Milan, Italy.

Gardan, L., Cottin, S., Bollet, C., et Hunault, G., (1991). Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas syringae* Van Hall. *Research in Microbiology*, 142: 995-1004.

Gonzalez, F., Petti, A., Valadez, A., et Provin, M. (1997). Mobilization, Cloning, and Sequence Determination of a Plasmid-Encoded Polygalacturonase from a Phytopathogenic *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*, Departement of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University, *College Station*, USA, 840-851p.

Green, P.S. (2002). A Revision of *Olea L. (Oleaceae)*. *Kew Bulletin* 57, 91.

Hamadouch, (2017). 180 ravagés par la tuberculose de l'olivier, L'Algérie profonde / Ouest, Oran.

Hannachi, H., Nasri, N., Elfalleh, W., Tlili, N., Ferchichi, A., et Msallem, M. (2013). Fatty Acids, Sterols, Polyphenols, and Chlorophylls of Olive Oils Obtained from Tunisian Wild Olive Trees (*Olea europaea L. Var. Sylvestris*), *International Journal of Food Properties*, 16: 1271–1283.

Hiroshi, O., Kazuo, K., (1982). Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the Quinone system with special references to the existence of 3-hydroxy fatty acids, *Istitute of Microbiology, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan*, 29: 17-40.

Holmes, B., Owen, R.J., Evans, A., Malnick, H., et Willcox, W.R. (1977). *Pseudomonas paucimobilis*, une nouvelle espèce isolée à partir d'échantillos cliniques humains, de l'environnement hospitalier et d'autres sources, *Journal International de Bactériologie Systématique*, 27: 133-146.

Iacobellis, N.S. (2001). Olive knot, *Encyclopedia of Plant Pathology*, Vol. 2, O.C. Maloy & T.D Murray, New York, USA, 713-715p.

Jacotot, B. (1999). L'huile d'olive, de la gastronomie à la santé, Editions Artulen, 224p.

Janse, J.D, (1981). The bacterial disease of ash, caused by *Pseudomonas syringae sub sp. savastanoi pv. fraxini II*. Etiology and taxonomic considerations. *European Journal of Forest Pathology*, 11: 425-438.

Janse, J.D, (1982). *Pseudomonas syringae sub sp. savastanoi*. The bacterium causing excrescences on Oleaceae and Nerium oleander L. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32: 166-169.

Jones, F. (1921). A study of *Bacillus bovisepiticus*. *J. Exp. Med*, 34: 561-577.

- Jordi, R. (2006).** "Olive". Horticulture. University of Florida Nassau Country Extension.
- 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, New York, USA. Vol. I, 659-674p, Springer-Verlag, ISBN 0387972587.
- Kailis, S.G. (2017).** Olives, In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, (Elsevier), 236–245p.
- Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M.J., Aravanis, C., Blachburn, H., Buzina, R., Diordjevic, B.S., Dontas, A.S., Fidanza, F., et Keys, M.H. (1986).** The diet and 15 year death rate in seven countries study. *American Journal of Epidemiology*, 124:903-915.
- Kratz, M., Cullen, P., Kannenberg, F., Kassner, A., Fobker, M., Abuja, P.M., Assmann, G., et Wahrburg, U. (2002).** Effect of dietary fatty acids on the composition, 56: 72-81.
- Lavermicocca, P., Lonigro, S., Valerio, F., Evidente, A., et Visconti, A., (2002).** Reduction of Olive Knot Disease by a Bacteriocin from *Pseudomonas syringae pv. ciccaronei*, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1403-1407. DOI: 10.1128/AEM.68.3.1403-1407.
- Lazzeri, Y., (2009).** Les défis de la mondialisation pour l'oléiculture méditerranéenne. L'olivier en méditerranée, Conférence centre culturel Français de Tlemcen, Algérie, 24p.
- Lelliot, R., Stead, D., (1987).** Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods in Plant Pathology. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection. Vol.2*, 182-193p.
- Louchet, A., (2015).** Les différents types d'oliviers, <https://www.olivierdeprovence.com/odpce-fr/production-ornement.php> (Consulté en Mai 2019).
- Loussert, R., Brousse, G., (1978).** L'olivier, coll. Des Techniques agricoles et Productions méditerranéennes, G.P. Maisonneuve et Larose, Paris, 447p.
- Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M.F., et Di Diusto, F. (2004).** Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea L.*) in the Mediterranean Basin. *Heredity*, 92: 343-351.
- MacConkey, A.T. (1900).** Note on a new medium for the growth and differentiation of the *Bacillus coli communis* and the *Bacillus typhi abdominalis*. *The Lancet*, Part II: 20. 2. MacConkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in faeces. *The Journal of Hygiene*, 5: 333-379.

3. Levine, M., and H.W. Schoenlein. 1930. A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms. *The Williams & Wilkins Company*, Baltimore.

Maillard, (1975). L'olivier, Ed comité technique de l'olivier, Paris, 75p.

Maldonado-Gonzalez, M.M., Prieto, P., Ramos, C., et Mercado-Blanco, J. (2013). From the root to the stem: interaction between the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescence* PICF7 and the pathogen *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 in olive knots, *Microbiology Biotechnology* 6: 275-287.

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

Mendil, M., Sebai, A., (2006). Catalogue des Variété Algériennes de l'Olivier. Ministère de l'agriculture et du développement rural, ITAF Alger, Algérie, 98p.

Motard-Bélangier, A., Charest, A., Grenier, G., Paguin, P., Chouinard, Y., Lemieux, S., Couture, P., et Lamarche, B. (2008). Study on the effects of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87: 593-599.

Nefzaoui, A. (1983). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par valorisation optimale des sous-produits, Option méditerranéens, 153-173p.

Pagnol, J. (1975). L'olivier, ed. Aubbanel, 95p.

Penyalver, R., Garcia, A., Ferrer, A., Bertolini, E., et Lopez, M.M. (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Olive plants by Enrichment an PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 2673-2677.

Perret, R. (1935), Annales de géographie, Ed. Separatcruck, 409p.

Quesada, J.M., Penyalver, R., Perez-Panades. J., Salcedo, C.I., et Cabolell, E.A. (2010). dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* populations ans subsequent appearance of olive knot disease, *Plant Pathology*, 9: 262-269.

- 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.
- Ramos, C., Matas, M.I., Bardaji, L., Aragon, I., et Murillo, J. (2012).** *Pseudomonas savastanoi pv. Savastanoi* : some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13: 998-1009.
- Rosa, M., Gimeno, E., Fito, M., Castellote, A.I., Covas, M., Torre-Boronat, C., et Lopez-Sabater, C. (2004).** Interaction of Olive Oil Phenol Antioxidant Components with Low-density Lipoprotein. *Biological Research*, 247-252p.
- Rathore, M., Sharma, M., et Sharma, N., (2000).** Microbial pectinase: sources, characterization and application, *Environmental Science and Biotechnology*, DOI 10.1007/s11157-012-9276-9.
- Rodriguez-Moreno, L., Jimménez, A.J., et Ramos, C. (2009).** Endopathogenis lifestyle of *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* in olive knots, *Microbial Biotechnology*, 2: 476-488.
- Rotondo, S., De Gaetano, G. (2000).** Protection from cardiovascular disease by wine and its derived products, Epidemiological evidence and biological mechanisms, *World Review of Nutrition and Dietetics*, 87: 90-113.
- Ruiz-Gutiérrez, V., Perona, J.S., et Pacheco, YM. (1998).** Composition of human VLDL triacylglycerol after ingestion of olive oil and high oleic sunflower oil, *The Journal of Nutrition*, 128: 570-576.
- Ryu, E. (1938).** On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *Journal of The Japanese Society of Veterinary Science*, 17: 31.14.
- Ryu, E. (1940).** A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. *Kitasato Arch. Exp. Med*, 17: 58-63.
- Savastanoi, L. (1987).** Tuberculosis, iperplasie tumori dell' olive, *Annali della Regia Scuola Superiore di Agraria*, 1-117p.

Schaad, N.W., Jones, J.B., et Chun. W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, APS Press. Sr Paul, Minnesota (US). Third edition, 373p.

Schroth, M.N., Hildebrand, D.C. (1972). Identification of the fluorescence *Pseudomonas*. In: Proc of the 3rd Intern Conf on *Plant Pathogenic Bacteria*, Wageningen, 281-287.

Segers, P., Vancanneyt, M., et Pot, B. (1994). Classification de *Pseudomonas diminuta* Leifson et Hugh 1954 et de *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll et Freytag 1953 dans *Brevundimonas* gen. nov. Comme peigne *Brevundimonas diminuta*. nov. Et *Brevundimonas vesicularis* peigne. nov, respectivement. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44 : 499-10.

Serdoun, N., (2013). Détection de *Pseudomonas savastanoi*, agent causal de la tuberculose de l'olivier. Evaluation et comparaison d'une technique d'isolement sur milieux de cultures et d'une technique sérologique (immunofluorescence). Mémoire de magister en phytopharmacie, sous la direction de Dr. Tendjaoui Bakh, Oran, Université d'Ahmed Ben Bella, 83p.

Sidhoum, (2011). Contribution à l'étude pédologique et génétique de quelques variétés de l'olivier dans la wilaya de Tlemcen, Mémoire de magister, Université de Tlemcen, 144p.

Singleton, D.R., Powell, S.V., Sangaiah, R., Gold, A., Ball, L.M., et Aitken, M.D. (2005). Stable-isotope probing of bacteria capable of degrading salicylate, naphthalene, or phenanthrene in a bioreactor treating contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1202.

Sisto, G., Iacobellis, N.S., et 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* pv. *savastanoi*, *Physiological Plant Pathology*, 26: 309-320.

Smidt, M., Kosuge, T., (2000). Le role de l'indole-3-acétique par l'accumulation d'acide alpha-Méthyl-Tryptophane mutants résistants de *Pseudomonas syringae* dans la formation de galles au Laurier-rose. *Physiological Plant Pathology*, 13: 203-2014.

Smith, E.F, (1908). Recent studies on the olive-tubercle organism. *Plant Industrial US Department of Agriculture*, 131: 25-43.

- Starr, M.P., Weiss, J.E. (1943).** Groth of phytopathogenic bacteria in a synthetic asparagin medium . *Phytopathology*, 3: 314-318.
- Steel, K.J. (1960).** The oxydase Reaction as a Taxonomic Tool, National Collection of Type Cultures, *Journal of General and Applied Microbiology*, London N.W. 9, 25: 297-306.
- Surico, G., Lavermicocca, P. (1985).** Un milieu semi sélectif pour l'isolement de *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi*, *Phytopathology*, 185-190p.
- Surico, G., Marchi, G. (2003).** Olive Knot Disease, New insights into the Ecology, Physiology and Epidemiology of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, Dipartimento di Biotechnologie Agrarie, Sezione di Patologia vegetale, Università degli Studi, P.le delle Cascine 28, Firenze, Italy.
- Terdazi, W., Ait Yacine, Z., et Oussman, A. (2010).** Etude comparative de la stabilité de l'huile d'olive de la Picholine marocaine et de l'Arbéquine. *Olivae*, 113: 22- 26.
- Tous, J., Romero, A. (1990).** Variedades del olivo. Ed. "La Caixa" Foundation, Barcelona, Spain.
- Tramier, (1863).** France, <https://blog.tramier.fr> (Consulté en Juin 2019).
- Villemur, P., Gonzales, A., et Delmas, J.M. (1976).** A propos de la floraison et de la fructification de quelques variétés de l'olivier, 16: 45-47.
- Wilson, E.E., Gawa, J.M. (1979).** Fungal, bacterial, and certain non parasitic diseases of fruit and nut crops in California, Division of Agricultural Sciences, University of California, Berkeley, USA, ISBN 093187629X.
- Young, J.M., Dye, D.W., Bradbury, J.F., Panagopoulos, C.G., Robbs, C.F, (1978).** A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agriculture Research*, 21: 153-177.
- Young, J., Triggs, C.M. (1996).** L'évaluation des testes determinant pour Pthovar de *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. *Journal of Applied Bacteriology*, 195-207p.
- Young, J.M. (2004).** Olive knot disease and its pathogens. *Australasian Plant Pathology*, 33: 33-39.

Zoubir, M. (2017). Enquête sur la verticilliose de l'olivier dans la region de Tlemcen, Mémoire en master, sous la direction de Dr. Ghezlaoui B.D, Tlemcen, Université Abou Bekr Belkaid, 96p.

ANNEXES

Annexe 01**1-Milieux de culture (g/l)****King B :**

Mélange de peptone	20.0g/l
Phosphate dipotassique	1.5g/l
Sulfate de magnésium	1.5g/l
Agar bactériologique	14.0g/l
pH final : 7.0±0.2 at 25°C	

Mac Conkey :

Peptone	20g/l
Lactose	10g/l
Sels biliaires	5g/l
Chlorure de sodium	5g/l
Rouge neutre	0.075g/l
Agar	12g/l
pH final : 7.4±0.2 at 37°C	

Levane :

Extrait de levure	2g/l
Peptone	5g/l
Na Cl	5g/l
Saccharose	50g/l
Gélose	20g/l
Eau distillée	1L
Ph : 7.0-7.2.	

Mannitol mobilité :

Peptone trypsique de viande	20g/l
Mannitol	2g/l
KNO ₃	1g/l
Rouge de phénol 1%	4ml
Agar	4g/l

Gélose nutritive

Extrait de viande	03g
Peptone	05g
Chlorure de sodium	05g
Agar	15g
Eau distillée	1L
pH = 7,2	

MEVAG

Macération de viande	50mL
KCl	5g
Rouge de phénol	10mL
Agar	3g

(+ GLUCOSE), pH final =7-7,2

2-Les réactifs utilisés dans les galeries biochimiques API**VP : Voge Proskauer****VP1**

Hydroxyde de potassium	40 g
H ₂ O	100ml

VP2

Naphtol	6 g
Ethanol	100ml

Nitrate réductase (NR)**NIT 1**

Acide sulfanilique	0,4 g
Acide acétique	30g
H ₂ O	70ml

NIT II

AN, N-dimethyl-1-naphthylamine	0,6g
Acide acétique	30 g
H ₂ O	70ml

Truptionedésaminase (TDA)

Perchlorure de fer	3.4g
H ₂ O	100ml

Kovacs

p-diméthylamino-benzald	5,00 g
Alcool iso-amylque	75 ml
Acide chlorhydrique pur	25 ml

Huile de vaseline**Poudre de Zinc**

Annexe 02

Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée API20E


























Tests	Réactions	Composants actifs	Ajout de réactifs	Résultats	
				Négatif	Positif
ONPG	Béta-galactosidase	2-nitrophénil béta-Dgalactopyranoside	Non		
ADH	Arginine dihydrolase	L-arginine	Non		
LDC	Lysine décarboxylase	L-lysine	Non		
ODC	Ornithine décarboxylase	L-ornithine	Non		
CIT	Assimilation de citrate	Citrate trisodique	Non		
H₂S	Thiosulfate réductase	Thiosulfate de sodium	Non		
URE	Uréase	Urée	Non		
TDA	Tryptophane désaminase	L-tryptophane	TDA		
INDO	Production d'indole	L-tryptophane	kovacs		
VP	Production d'acétoïne	Pyruvate de sodium	VP 1 VP 2		
GEL	Gélatinase	Gélatine de boeuf	Non	Non Diffusion du carbone 	Diffusion du carbone 
GLU	Glucose	D-glucose	Non		
MAN	Mannitol	D-mannitol	Non		
INO	Inositol	Inositol	Non		
SOR	Sorbitol	D-sorbitol	Non		
RHA	Rhamnose	L-rhamnose	Non		
SAC	Saccharose	D-saccharose	Non		
MEL	Mélibiose	D-mélibiose	Non		
AMY	Amygdaline	Amygdaline	Non		
ARA	Arabinose	L-arabinose	Non		

Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée API NE

Tests	Composants actifs	Réactions	Ajouts de réactifs	Résultats	
				Négatif	Positif
NO3	Nitrate de potassium	Réduction de nitrates en nitrites	NIT1 NIT2	Incolore	Rose/ rouge
		Réduction de nitrates en azote	Poudre de zinc	Rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	Production d'indole	Kovacs	Vert pal/jaune	Rose
<u>GLU</u>	D-glucose	Fermentation du glucose	Non	Bleu vert	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	Arginine Dihydrolase	Non	Jaune	Orange/rose/rouge
<u>URE</u>	Urée	Urease	Non	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine. Ferrique. citrate	Hydrolyse de l'esculine	Non	Jaune	Gris /marron/noir
GEL	Gélatine de bœuf	Gélatinase	Non	Incolore	Dépôt noir
PNPG	4-nitrophenyl-EDgalactopyranoside	E-galactosidase (Para-NitroPhenyl-βDGalactopyranosidase)	Non	Incolore	Jaune
GLU ARA MNE MAN NAG MAL GNT CAP ADI MLT CIT PAC	D-glucose L-arabinose D-mannose D-mannitol N-acétyle-glucosamine D-maltose Potassium gluconate Acide caprique Acide adipique Acide malique Trisodium citrate Acide phenolacétique	Assimilation des substrats	Non	Transparence	Trouble
ox	Voir test oxydase	Cytochrome oxydase	Non	Incolore	Bleu /move

Annexe 03

Résultats de la galerie API NE

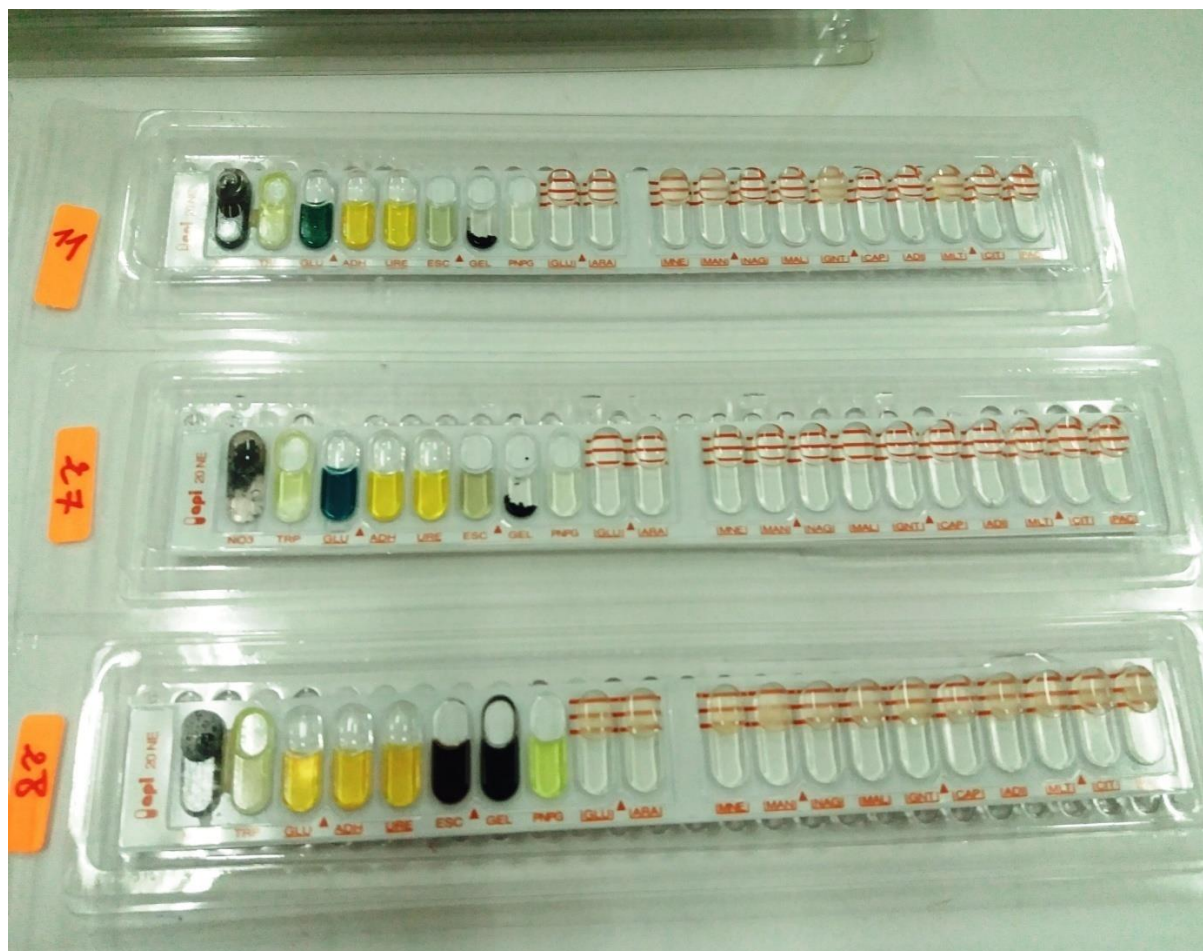


Figure 38 : résultats de la galerie API NE des souches AFM 11,27, 28.



Figure 39 : résultats de la galerie API NE des souches AFM 1, 33,26.



Figure 40: résultats de la galerie API NE des souches AFM 25, 29, 35, 8.

Résultats de la galerie API 20E



Figure 41 : résultats de la galerie API 20 E des souches 38,27', 4, 43.



Figure 42: résultats de la galerie API 20 E des souches 24, 30, 38',37, 7, 9.

Résumé

Le chancre bactérien de l'olivier est une maladie dont l'agent pathogène est *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*. Cette maladie fait des ravages sur l'oléiculture dans le monde et principalement en Algérie.

Les objectifs de ce travail sont d'isoler et identifier le phytopathogène ainsi que d'autres bactéries endophytes à partir des échantillons provenant des oliviers infectés de la variété Sigoise, cultivée au verger de la commune Amira Arrès, wilaya de Mila.

Les profils phénotypiques des isolats ont été réalisés en se basant sur le test LOPAT et les galeries API 20E et API 20 NE.

Par conséquent, 45 souches pures ont été isolées et seulement 21 souches ont été identifiées. Deux bactéries à Gram négatif (AFM 1, AFM 28) ont été identifiées comme *Burkholderia cepacia*, la souche AFM 26 comme *Sphingomonas paucimobilis* et l'isolat AFM 25 comme *Brevundimonas vesicularis*.

Les deux bacilles à Gram négatif et oxydase négatives (AFM 6 et AFM 9) ont été identifiés par la galerie API 20 E respectivement comme : *Pasteurella pneumotropica/Mannheimia* et *Aeromonas hydrophila*.

Par comparaison du test de LOPAT de la souche de référence *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* NCPPB3, l'isolat AFM 6 présente une compatibilité avec cette dernière.

Par comparaison du test de LOPAT de la souche de référence *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* NCPPB3, l'isolat AFM 6 présente une compatibilité avec cette dernière.

L'intervention de la génomique est indispensable pour la confirmation et l'identification précise des isolats, des plants de certification doivent être appliqués afin d'éviter tout risque d'infestation.

Mots clés : l'olivier, chancre, galles, Sigoise, *Pseudomonas savastanoi*, verger d'Amira Arrès, *Burkholderia cepacia*

ملخص

مرض سل الزيتون هو مرض بكتيري العامل المتسبب فيه هو *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*. هذا المرض يعيث فسادا في زراعة الزيتون حول العالم و خاصة في الجزائر.

تتمثل أهداف هذا العمل في عزل و تحديد العامل الممرض النباتي بالإضافة إلى البكتيريا الداخلية الأخرى من عينات أشجار الزيتون المصابة من صنف Sigoise المزروعة في بستان بلدية عميرة اراس ، ولاية ميله.

تم تحديد الأنماط الظاهرية للعزلات بناء على اختبار LOPAT و نظامي API 20 NE و API 20E.

نتيجة عن ذلك، تم عزل 45 عزلة نقية مع تحديد النمط الظاهري لـ 21 عزلة منها فقط. تم التعرف على اثنين من البكتيريا سالبة الجرام AFM 1 ، AFM 28 باسم *Burkholderia cepacia*، و العزلة AFM 26 باسم *Sphingomonas paucimobilis*، اما العزلة AFM 25 فتم تصنيفها كـ *Brevundimonas vesicularis*.

تم التعرف على العصيتين ذوات الجرام السالب و الأوكسيداز السالب AFM 6 ، AFM 9 بواسطة نظام API 20E بالتالي باسم:

Aeromonas hydrophila و *Pasteurella pneumotropica/Mannheimia*.

مقارنة مع نتائج اختبار LOPAT للسلاطة المرجعية *Pseudomonas savastanoi* NCPPB3، تظهر العزلة AFM 6 توافقا مع هذه السلاطة.

إن تدخل التقنيات الجينية أمر ضروري لتأكيد وتحديد دقيق للسلاطات المعزولة. وجوب استخدام شجيرات تحمل شهادات الجودة من أجل تجنب أي خطر إصابة ، أمر ضروري.

الكلمات المفتاحية: مرض الزيتون البكتيري ، أورام ، Sigoise، *Pseudomonas savastanoi* ، بستان عميرة اراس، *Burkholderia cepacia*.

Abstract

The bacterial canker of olive tree is a disease whose pathogen is *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*. This disease is wreaking havoc on olive growing around the world and mainly in Algeria.

The objectives of this work are to isolate and identify the phytopathogen as well as other endophytic bacteria from samples from infected olive trees of the Sigoise variety, grown in the orchard of Amira Arrès town Wilaya of Mila.

The phenotypic profiles of the isolates were analyzed based on the LOPAT test, the API 20E and API 20 NE test systems.

As a result, 45 pure strains were isolated and only 21 strains were identified. Two Gram-negative bacteria (AFM 1, AFM 28) were identified as *Burkholderia cepacia*, AFM strain 26 as *Sphingomonas paucimobilis* and AFM isolate 25 as *Brevundimonas vesicularis*.

The two Gram-negative and oxidase-negative bacilli (AFM 6 and AFM 9) have been identified by API 20 E respectively as: *Pasteurella pneumotropica* / *Mannheimia* and *Aeromonas hydrophila*.

By comparison of the LOPAT test results of the reference strain *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* NCPPB3, the AFM 6 isolate is compatible with the latter.

The application of genomics analysis is essential for the confirmation and the precise identification of the isolates. The certification for plants must be applied to avoid any risk of infestation.

Key words: Olive tree, canker, knot, Sigoise, *Pseudomonas savastanoi*, Amira Arrès orchard, *Burkholderia cepacia*.

THEME : Caractérisation de la bactériose de l'olivier à *Pseudomonas savastanoi* et autres bactéries endophytes à partir de l'oliveraie située à Amira Arrès, Wilaya de Mila.**Nature du diplôme :** Master**Domaine :** Science de la Nature et de la Vie**Filière :** Science Biologiques**Spécialité :** Biologie moléculaire des microorganismes

Le chancre bactérien de l'olivier est une maladie dont l'agent pathogène est *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*. Cette maladie fait des ravages sur l'oléiculture dans le monde et principalement en Algérie.

Les objectifs de ce travail sont d'isoler et identifier le phytopathogène ainsi que d'autres bactéries endophytes à partir des échantillons provenant des oliviers infectés de la variété Sigoise, cultivée au verger de la commune Amira Arrès, wilaya de Mila.

Les profils phénotypiques des isolats ont été réalisés en se basant sur le test LOPAT et les galeries API 20E et API 20 NE.

Par conséquent, 45 souches pures ont été isolées et seulement 21 souches ont été identifiées. Deux bactéries à Gram négatif (AFM 1, AFM 28) ont été identifiées comme *Burkholderia cepacia*, la souche AFM 26 comme *Sphingomonas paucimobilis* et l'isolat AFM 25 comme *Brevundimonas vesicularis*.

Les deux bacilles à Gram négatif et oxydase négatives (AFM 6 et AFM 9) ont été identifiés par la galerie API 20 E respectivement comme : *Pasteurella pneumotropica/Mannheimia* et *Aeromonas hydrophila*.

Par comparaison du test de LOPAT de la souche de référence *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* NCPPB3, l'isolat AFM6 présente une compatibilité avec cette dernière.

Par comparaison du test de LOPAT de la souche de référence *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* NCPPB3, l'isolat AFM6 présente une compatibilité avec cette dernière.

L'intervention de la génomique est indispensable pour la confirmation et l'identification précise des isolats. Des plants de certification doivent être appliqués afin d'éviter tout risque d'infestation.

Mots clés : la bactériose de l'olivier, galles, Sigoise, *Pseudomonas savastanoi*, verger d'Amira Arrès, *Burkholderia cepacia*.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, faculté SNV, UFM Constantine1.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Boudemagh Allaoueddine (Professeur - UFM Constantine 1),**Encadreur :** Dr. Boubekri Karima (MCA - UFM Constantine 1),**Examinatrice :** Mihoubi Ilhem (Professeur - UFM Constantine 1),**Tutrice :** Mme. Tir radja (Doctarante - UFM Constantine 1).**Date de soutenance :** 14/07/2019