

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REBUPLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 أوت 1955-سكيكدة

UNIVERSITE 20Aout 1955-SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

**Etude microbiologique d'agents phytopathogènes et évaluation de  
stratégies de lutte biologique en contexte oléicole**

**Présenté Par :**

SAIFI Rihab

SILINI Douriya

**Membre de Jury :**

Dr Benjazia Radia

MCA Présidente

Univ .du 20 Aout 1955-Skikda

Dr Labid Asma

MCA Promotrice

Univ .du 20 Aout 1955-Skikda

Dr Krouma Hamida

MBA Examinatrice

Univ .du 20 Aout 1955-Skikda

Année universitaire 2024/2025

# *Remerciement*

Nous remercions tout d'abord **بِسْمِ اللَّهِ** à la santé, la volonté , le courage qu'il nous a donné pour réaliser ce mémoire de fin d'étude.

Nous exprimons notre profonde gratitude à notre encadrante, **Dr Labid Asma (MCA)**, pour son soutien indéfectible et ses conseils tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à remercier chaleureusement **Dr BENJAZIA Radia (MCA)** pour l'honneur qu'elle nous fait en présidant notre jury de soutenance.

Nos remerciements s'adressent également à **Dr KROUMA Hamida (MCB)** pour avoir accepté d'être l'examinatrice de ce travail.

Nous souhaitons également exprimer notre sincère gratitude aux ingénieurs de laboratoire du Hall de technologie de l'université, **Mme Asma, Mme Ismahane**, ainsi qu'à la doctorante **FERAGUENA Imene**, qui nous ont aidés à travailler en laboratoire avec bienveillance et respect.

Enfin, nous remercions nos familles, nos amis et toutes les personnes, proches ou éloignées, qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

**Douriya et Rihab**

## *Dédicaces*

Avant tout , je tiens à remercier **ALLAH**, tout-puissant de m'avoir donné la volonté , la force , le courage et la patience afin d'accomplir ce travail modeste . Du profond de mon cœur et avec tous mes sentiments de respect et de ma reconnaissance, je dédie ce travail :

**À ma chère maman Hafida :** Affable , honorable, aimable , tu représentes pour moi le symbole de la bonté pae excellence , la source de tendresse et l'exemple du dévouement.

Tu n'as jamais cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour ses enfants , en me guidant sur le bon chemin dans ma vie et mes études . Je dédie ce travail en témoignage de mon profond amour .

**À mon cher papa abd el Aziz :** Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour , l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eus pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit mon éducation et mon bien-être.Ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation .

**À mes chères sœurs : Randa , Amina , Imene et Hind ,** ma source d'inspiration et de soutien inconditionnel. Votre amour et votre encouragement m'ont donné la force de poursuivre mes rêves et de réaliser mes objectifs . Merci pour votre présence précieuse dans ma vie ,que dieu vous garde pour moi.

**À mon binôme : Rihab ,** tu es plus qu'une amie , tu es une sœur , une confidente et une partie de moi-même, avec qui j'ai partagé les défis , les réussites et les moments inoubliables de ce parcours .je te remercie pour tes conseils , ton écoute , ton soutien , ta collaboration , ton amitié, et ton amour inconditionnel . Je suis chanceuse de t'avoir dans ma vie.

**À mes amies : Yasmine ,** amie et sœur avec qui j'ai vécu des moments inoubliables de joie et de folie au cours de ces années universitaires. Merci pour ton amour , ton soutien , ton écoute , tes conseils , ton amitié , et ta présence constante dans ma vie .

**À Dr bourafa soumaya ,** en témoignage de profonde gratitude pour votre soutien constant ,votre expertise précieuse , votre guidance et votre inspiration. Votre professionnalisme est une source de motivation pour moi, Merci pour tout .

Au-delà des noms cités , il existe un cercle précieux de personnes qui ont joué un rôle significatif dans mon parcours , je vous exprime ma reconnaissante pour votre présence et votre soutien qui ont marqué positivement ma vie.

Enfin , je dédie ce travail à moi-même , en célébration de ma force , de ma résilience de ma capacité à dépasser mes limites . j'ai appris , j'ai grandi et j'ai réussi . Je suis fier de moi et je suis prêt à affronter de nouveaux défis avec confiance et détermination .

SILINI DOURIYA

Je dédie ce travail a :

*Mes grands-mères Zakia et Malika* رحمكم الله وجمعنا بكم في جنات الفردوس الأعلى

Vous avez été les bâtisseurs invisibles de ma vie, vos éclats de rire résonnaient dans chaque recoin de notre maison, vos mains tissaient l'amour et la confiance qui m'ont guidé jusqu'à ce jour. Une lumière éternelle qui éclaire mes pas, maintenant et pour toujours.

*Mes parents* Grâce à vos sacrifices silencieux, à vos encouragements discrets et à votre confiance indéfectible, vous avez créé autour de moi un refuge où je peux grandir et m'épanouir. Vous m'avez montré que l'adversité fait émerger des ailes invisibles, et que l'amour offre des racines profondes. Ce mémoire est le fruit de votre dévotion, le reflet de votre foi en moi. Merci d'avoir été mes racines, mes ailes et la maison toujours présente dans mon cœur.

*Mes sœurs Dikra et Kawter* mes petites tulipes, vous avez partagé mes rires essuyé mes larmes, et porté mes rêves avec une douceur infinie. Je vous aime ...

*Mon binôme Doria* tu as été bien plus qu'un simple partenaire d'étude : tu as été le cœur battant de chaque instant partagé dans ce parcours. Ce mémoire, c'est notre aventure à deux : chaque chapitre porte ta trace, chaque succès te revient autant qu'à moi. Merci d'avoir partagé cette route avec moi, avec ton écoute, ta bienveillance et ta complicité inestimable. Tu as été mon roc, mon écho, et surtout... ma meilleure amie.

*Mon oncle Abd-El Waheb* Merci pour ton aide précieuse, tes conseils avisés et ton soutien inébranlable ont été déterminants à chaque étape de ce mémoire.

*Mes proches, Ma Yasminette*, ta présence, ta sincérité et ta joie de vivre ont illuminé ce parcours de manière inoubliable

A ton amour, tes encouragements et ton écoute. Merci d'être la raison pour laquelle mon sourire est plus sincère chaque jour. Je t'aime.

*Ma grande famille*, mes oncles, mes tantes, mon petit poussin Iskander, vous êtes les meilleurs, je vous aime.

SAIFI RIHAB

## Table des matières

<i>Remerciement</i> .....	2
<i>Dédicaces</i> .....	3
<b>La liste des figures</b> .....	<b>11</b>
<b>La liste des Tableaux</b> .....	<b>13</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>14</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>15</b>
<b>ملخص</b> .....	<b>16</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>17</b>
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	<b>2</b>
1. Généralités sur l'olivier .....	3
1. L'origine géographique et l'histoire de l'olivier .....	3
1.1. Description de l'olivier .....	3
1.1.1. Description botanique .....	3
1.1.2. Description morphologique.....	4
• Olivier sauvage ou Oléastre .....	4
• Olivier cultivé .....	4
1.2. Classification botanique de l'Olivier .....	4
1.3. Le cycle développement de l'Olivier .....	5
1.4. Le cycle végétatif annuel .....	5
1.5. L'Oléiculture en Algérie .....	6
1.6. Variétés les plus cultivées en Algérie .....	7
1.7. Les variétés les plus cultivées à Skikda .....	9
2. Généralités sur la tuberculose de l'olivier .....	11
2.1. Définition .....	11
2.2. Symptômes de la maladie .....	11
2.3. Mode de propagation de la maladie .....	12
2.5. Historique de l'agent causal .....	13

2.6.	Classification de <i>Pseudomonas Savastanoi</i> .....	14
2.7.	Pouvoir pathogène .....	14
2.8.	Le cycle de la maladie .....	14
2.9.	La lutte biologique contre la tuberculose de l'Olivier .....	16
2.9.2.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	17
2.9.3.	Traitement chimiques .....	17
2.10.	La lutte culturale contre la tuberculose de l'Olivier .....	18
2.11.	Présentation de la région d'étude .....	18
2.11.1.	Situation géographique de la région d'étude : wilaya de skikda .....	18
Chapitre02 .....		21
3.	Matériel et Méthodes .....	22
3.1.	L'Objectif .....	22
3.1.1.	Echantillonnage .....	22
3.1.2.	Prélèvement des échantillons .....	22
3.2.	L'isolement .....	24
3.2.1.	Technique directe .....	24
3.2.2.	Technique indirecte .....	24
3.3.	Purification et conservation des souches .....	25
3.3.1.	Purification .....	25
3.3.2.	Conservation des souches .....	26
3.4.	Identification phénotypique des échantillons .....	26
3.4.1.	L'observation macroscopique .....	27
•	Processus de coloration de gram .....	27
3.5.	Les tests biochimiques .....	28
3.5.1.	Test de catalase .....	28
3.5.2.	Test de coagulase .....	29
Protocole appliqué .....		29
3.5.3.	Le test d'oxydase .....	30
3.5.4.	Test sur la gélose Mac Conkey .....	30
3.5.5.	Test sur la gélose levane (levine EMB) .....	30
3.5.6.	Test de MEVAG(milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides) .....	31
•	Protocole appliqué .....	31
3.5.7.	Test de fluorescence et identification des souches de <i>Pseudomonas savastanoi</i> .....	32

3.5.8.	API 20 .....	32
•	API20E .....	32
3.5.9.	L'activité pectinolytique par les pommes de terres .....	34
3.5.10.	Le test de la mobilité bacterienne .....	35
•	Méthode utilisée .....	35
3.5.11.	Test d'hypersensibilité sur une plante non hôte (tabac) .....	35
3.5.12.	L'activité Anti-microbienne .....	36
3.6.12.1.	Évaluation de l'activité antimicrobienne par diffusion en puits .....	36
3.6.12.2.	Les extraits utilisés .....	37
•	Huile d'origan ( <i>Origanum vulgare</i> ) .....	37
3.6.12.3.	Mélanges expérimentaux d'extraits végétaux et chimiques .....	39
<b>Chapitre03.....</b>	<b>40</b>	
4.	Résultats et Discussions .....	41
4.1.	L'isolement des souches .....	41
4.2.	Purification des souches .....	41
4.3.	Observation macroscopique et microscopique .....	42
4.4.	Test catalase et test d'oxydase .....	44
4.5.	Test de coagulase .....	44
4.6.	Test de Mac conkey .....	45
4.7.	Test levane .....	46
4.8.	Test MEVAG .....	46
4.9.	Test de fluorescence .....	47
4.10.	Test mobilité .....	48
4.11.	Test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac et test de pectinase .....	49
4.12.	Api 20 E et Api 20NE .....	50
4.13.	Activité anti microbienne .....	51
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>54</b>	
<b>Références bibliographiques .....</b>		
<b>Annexes : .....</b>		

## Liste des abréviations

**J–C** : Jésus Christ

**M** : Mètre

**Mm** : Millimètres

**Ans** : Années

**%** : Pourcentage

**Cm** : Centimètres

**NCPPB 3335** : National Collection of Plant Pathogenic Bacteria “collection national britannique de bactérie phytopathogènes” , 3335 numéro de souche *Pseudomonas savastanoi* pv. Savastanoi

**Pv** : pathovar

**GPF** : Green Fluorescent Protein ‘ protéine fluorescente verte’

**SCLM** : Scanning Confocal Laser Microscopy “Microscopie Confocale à balayage laser”

**P** : *Pseudomonas*

**Dpi** : Days post inoculation ‘jours après inoculation’

**°C** : Degrés Celsius

**Lb** : Lysogeny Broth

**LOPAT**: Levane, oxydase, Pectinolyse, Arginine, tabac

**IVe** : An 301 à 400

**IAA** : Acide indole-3-acétique

**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**Psv** : *Pseudomonas Savastanoi* pv.Savastanoi

**RHEST** : Root Hair–Endophyte STacking

**PGPR** : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria ‘rhizobactéries favorisant la croissance des plantes’

**Spp** : Species ‘espèces’

**B.** : Bacillus

**h** : Heures

**KA:** King A

**KB:** King B

**ML** : Millilitres

**E** : Echantillon

**GN** : Gélose nutritive

**H2O2:** Peroxyde d'hydrogène

**SCN** : Staphylocoques à coagulase négative

**FRC** : Facteur de réaction à la coagulase

**BGN** : Bacilles gram négatif

**BGP** : bacilles gram positifs

**CGP** : coccis gram positif

**EMB:** Eosin Methylene Blue

**MEVAG** : Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides

**pH** : Potentiel hydrogène

**BBT** : Bleu de bromothymol

**Nm** : Nanomètre

**API** : Index de Profil Analytique

**20 NE** : Non-Enterobacteriaceae

**20 E** : Enterobacteriaceae

**CIT** : Citrate

**VP** : Voges-Proskauer

**GEL** : Gelatinase

**ADH** : Arginine Dihydrolase

**LDC** : Lysine Decarboxylase

**ODC** : Ornithine Decarboxylase

**H<sub>2</sub>S**: Sulfure d'hydrogène

**URE**: Uréase

**TDA**: Tryptophan Deaminase

**IND**: Indole

**μl** : Microlitre

**NO<sub>3</sub>** : Nitrate

**PNPG** : P-nitrophényl-β-d-glucopyranoside

**TRP** : Tryptophan désaminase

**Nit 1** : Acide parasulfanilique

**Nit 2** : Alpha-naphtylamine

**G** : Gramme

**OC** : Oxychlorure de cuivre

**ST** : *Savastanoi*

**TB** : Très bonne

**CF** : Prélèvement respiratoire d'un patient atteint de fibrose kystique.

**Fig** : Figure

**HE** : Huile essentielle

**OLE** : Extrait alcoolique des feuilles d'olives

## La liste des figures

<b>Figure 1:</b> Répartition géographique des six-espèces d' <i>Olea europaea</i> (Julca <i>et al.</i> , 2023) .....	5
<b>Figure 2 :</b> Schéma représentant le cycle annuel de l'olivier (prise personnelle) .....	5
<b>Figure 3 :</b> les stades phénologiques de l'Olivier (Bergon Nature & Jardin, n.d.) .....	6
<b>Figure 4:</b> Classement mondial des 10 plus grands producteurs d'olives de table ((FAO, 2018) .....	6
<b>Figure 5:</b> Évolution du secteur oléicole en Algérie de 2000 à 2023 (FAO, 2018) .....	7
<b>Figure 6:</b> les phases 1 et 2 dans les symptômes (centre technique de l'olivier, 2019).....	11
<b>Figure 7:</b> Echantillon enlevé il y a 5ans .....	12
<b>Figure 8:</b> Echantillon enlevé en 2025 (prise personnelle).....	12
<b>Figure 9:</b> Symptômes produits par <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> dans les plantes d'olivier et pathogène visualisation au sein des nœuds (Ramos <i>et al.</i> , 2012a).....	12
<b>Figure 10 :</b> Activité inhibitrice de <i>Bacillus subtilis</i> contre <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> par diffusion en puits (Krid <i>et al.</i> , 2012).....	17
<b>Figure 11:</b> Formation de tumeurs sur des plants d'olivier issus de culture <b>in vitro</b> , après inoculation avec <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (Psv), en présence (A) ou en absence (B) de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . Des tumeurs observées dans une seconde expérience, également après inoculation avec Psv, en présence (C) ou en absence (D) de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Maldonado-González <i>et al.</i> , 2013) .....	17
<b>Figure 12:</b> Carte des communes de la wilaya de Skikda.....	19
<b>Figure 13:</b> Présentation de la météo mensuelle de la wilaya de skikda(Weather Spark, n.d.)	20
<b>Figure 14:</b> Les deux zones d'échantillonnage a et b ( <i>Google Earth</i> , n.d.) .....	23
<b>Figure 15:</b> Olivier infecté par la tuberculose à Aïn Kechra (photo prise sur le terrain).....	23
Figure 16: branche de 20 cm présentant des galles (prise personnelle) .....	23
<b>Figure 17:</b> Étapes de l'ensemencement direct à partir de la galle : <b>(a)</b> Désinfection de la galle, <b>(b)</b> Découpe aseptique en deux parties, <b>(c)</b> Ensemencement direct sur les milieux King A et King B (prise personnelle). .....	24
<b>Figure 18:</b> Étapes de l'ensemencement indirect à partir de la galle : <b>(a)</b> Écrasement du tissu tumoral, <b>(b)</b> Transfert dans un écouvillon pour l'obtention d'un macérât, <b>(c)</b> Ensemencement sur les milieux King A et King B. (Prise personnelle).....	25
<b>Figure 19:</b> Boîtes de Pétri contenant le milieu GN utilisées pour le repiquage des souches (prise personnelle) .....	26
<b>Figure 20:</b> Souches conservées sur gélose nutritive en tubes inclinés (prise personnelle) .....	26
<b>Figure 21:</b> Des lames contiennent les souches étudiées (prise personnelle) .....	27
<b>Figure 22:</b> Séchage des lames après coloration de Gram (prise personnelle).....	28
<b>Figure 23:</b> Étapes du test de catalase : <b>(a)</b> Ajout du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , <b>(b)</b> Mélange avec la colonie bactérienne prélevée (prise personnelle). .....	28
<b>Figure 24 :</b> Le test de coagulase <b>(a)</b> : ajout de la colonie bactérienne, <b>(b)</b> : incorporation du plasma. (prise personnelle).....	29
<b>Figure 25:</b> Boîtes de Pétri ensemencées sur gélose MacConkey (réalisation personnelle). ...	30
<b>Figure 26:</b> Les boites de pétri contenant la gélose levane (levine EMB) (prise personnelle). 31	

<b>Figure 27:</b> Les tubes contenant la gélose MEVAG (prise personnelle).....	32
<b>Figure 28:</b> Les étapes d'Api 20E avant incubation (prise personnelle).....	33
<b>Figure 29:</b> (a) Feuilles de tabac avant incubation ; (b) feuilles injectées avec les suspensions bactériennes ; (c) feuilles témoins injectées avec de l'eau distillée (prise personnelle). .....	36
<b>Figure 30:</b> Étapes de l'étalement des boîtes selon la méthode des quadrants (prise personnelle). .....	36
<b>Figure 31:</b> Étapes de la dilution de l'huile d'origan (prise personnelle) .....	37
<b>Figure 32:</b> Méthode de diffusion en puits à base d'oxychlorure de cuivre : (a) préparation de la dilution ; (b) ajout du diluant dans les puits (prise personnelle). .....	38
<b>Figure 33:</b> Préparation de l'extrait d'ail : <b>(a)</b> Écrasement de l'ail avec de l'eau distillée ; <b>(b)</b> Pressage manuel pour l'extraction du liquide (prise personnelle). .....	38
<b>Figure 34:</b> Mélange de la poudre des feuilles et éthanol à 70% (prise personnelle).....	39
<b>Figure 35:</b> Préparation des mélanges d'extraits (prise personnelle) .....	39
<b>Figure 36:</b> Résultats obtenus après repiquage (rise personnelle) .....	42
<b>Figure 37:</b> Souches conservées après 24heures d'incubation (prise personnelle).....	42
<b>Figure 38:</b> Résultats Du test sur gélose levane (prise personnelle).....	46
<b>Figure 39:</b> Résultats du test MEVAG après 24h, 48h et 72h d'incubation (prise personnelle) .....	47
<b>Figure 40:</b> Résultats du test de fluorescence (prise personnelle) .....	47
<b>Figure 41:</b> Résultats du test de mobilité (prise personnelle) .....	48
<b>Figure 42:</b> Les résultats de test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac (a) Après 24heures (b) Après 48heures (c) Après 72heures (prise personnelle) .....	49
<b>Figure 43:</b> Résultats du test de pectinase sur tranches de pommes de terres (prise personnelle) .....	50
<b>Figure 44:</b> Les résultats d'Api 20NE (prise personnelle) .....	51
<b>Figure 45:</b> Illustration des tests d'activité antimicrobienne selon les différents extraits et combinaisons utilisés : .....	52

## La liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : la classification botanique de l'olivier (Julca <i>et al.</i> , 2023).....	4
<b>Tableau 2</b> : Cycle de développement de l'olivier (Sanz-Cortés <i>et al.</i> , 2002).....	5
<b>Tableau 3</b> : Quelques exemples des variétés d'olivier en Algérie (Rabiha <i>et al.</i> , 2023).....	8
<b>Tableau 4</b> : Classification de <i>Pseudomonas Savastanoi</i> (Ramos <i>et al.</i> , 2012) .....	14
<b>Tableau 5</b> : Résultats obtenus après 24 heures d'incubation selon deux techniques d'isolement (prise personnelle) .....	41
<b>Tableau 6</b> : Résultats des observations macroscopiques et microscopiques des isolats (prise personnelle) .....	42
<b>Tableau 7</b> : Réactions catalase et oxydase des bacilles Gram négatif isolés (prise personnelle) .....	44
<b>Tableau 8</b> : Résultats du test de coagulase pour les cocci à Gram positif (CGP) .....	44
<b>Tableau 9</b> : Résultats du test sur gélose Mac Conkey (prise personnelle) .....	45
<b>Tableau 10</b> : Les résultats d'Api 20E et 20NE (prise personnelle) .....	50
<b>Tableau 11</b> : Résultats de l'activité Anti-microbienne (prise personnelle) .....	51

## Résumé

La tuberculose de l'olivier est une maladie bactérienne provoquée par *Pseudomonas savastanoi*, se manifestant par la formation de tumeurs (galles) sur les parties aériennes des arbres. Le présent travail a porté sur l'isolement et l'identification de bactéries à partir de galles prélevées sur des oliviers infectés dans la région d'Aïn Kechra (wilaya de Skikda), l'étude de leurs caractéristiques biochimiques à l'aide de tests classiques et de galeries API, ainsi que l'évaluation de leur sensibilité à divers extraits naturels et chimiques.

Au total, 21 souches bactériennes ont été isolées, dont treize bacilles à Gram négatif, trois bacilles à Gram positif, deux coques à Gram positif identifiées comme *Staphylococcus* (test de coagulase positif) et trois coques à Gram négatif. Parmi ces isolats, *Pseudomonas savastanoi* s'est distinguée par un profil biochimique typique : bacille à Gram négatif, aérobie strict, mobile, oxydase et catalase positives, production de pigments fluorescents, induction d'une réaction hypersensible sur feuille de tabac, et résultats négatifs aux tests de Levin et de pectinase.

L'analyse via les galeries API a permis d'identifier d'autres souches appartenant aux genres *Serratia marcescens*, *Moraxella spp.* et *Chryseobacterium indologenes*. Une seule souche (R1S4) a été confirmée comme étant *Pseudomonas savastanoi*. Les tests de sensibilité ont révélé que cette souche est inhibée par certains extraits naturels (ail, *Ocimum basilicum*, huile essentielle concentrée d'*Origanum vulgare*), mais résistante à d'autres (huile diluée d'origan, extrait de feuille d'olivier - OLE). Le recours aux outils de la génomique est fortement recommandé pour affiner l'identification des isolats. Par ailleurs, l'utilisation de plants certifiés constitue une mesure préventive essentielle contre la propagation de la maladie.

**Mots clés :** *Chryseobacterium indologenes*, Extraits naturels, Galles, Huile Essentielle , *Moraxella spp.*, Olivier, *Pseudomonas savastanoi*, Tuberculose de l'olivier.

## Abstract

Tuberculosis of the olive tree is a bacterial disease caused by *Pseudomonas savastanoi*, manifested by the formation of tumors (galls) on the aerial parts of trees. The present work focused on the isolation and identification of bacteria from galls collected from infected olive trees in the region of Aïn Kechra (wilaya of Skikda), the study of their biochemical characteristics using classical tests and API galleries, as well as the evaluation of their sensitivity to various natural and chemical extracts.

A total of 21 bacterial strains were isolated, including thirteen Gram-negative bacilli, three Gram-positive bacilli, two Gram-positive cases identified as *Staphylococcus* (coagulase positive test) and three Gram-negative cases. Among these isolates, *Pseudomonas savastanoi* was distinguished by a typical biochemical profile: Gram-negative bacillus, strict aerobic, mobile, positive oxidase and catalase, production of fluorescent pigments, induction of a hypersensitive reaction on tobacco leaf, and negative results in Levin and pectinase tests.

The analysis via the API galleries allowed identifying other strains belonging to the genera *Serratia marcescens*, *Moraxella spp.* and *Chryseobacterium indologenes*. A single strain (R1S4) was confirmed to be *Pseudomonas savastanoi*. The sensitivity tests revealed that this strain is inhibited by some natural extracts (garlic, *Ocimum basilicum*, concentrated essential oil of *Origanum vulgare*), but resistant to others (diluted oil of oregano, olive leaf extract - OLE). The use of genomic tools is strongly recommended to refine the identification of isolates. In addition, the use of certified plants is an essential preventive measure against the spread of the disease.

**Keywords:** *Chryseobacterium indologenes*, Essential oil, Galls, *Moraxella spp.* , Natural extracts, Olivier, *Pseudomonas savastanoi*, Tuberculosis of the olive tree.

## ملخص

داء السل في الزيتون هو مرض بكتيري تسببه بكتيريا, يظهر على شكل اورام على الاجزاء الهوائية من الاشجار .

*Pseudomonas Savastanoi*

تضمن هذا العمل عزل و تحديد البكتيريا من الاورام المستخرجة من اشجار الزيتون المصابة في منطقة عين قشرة (ولاية سكيكدة), و دراسة خصائصها الكيميائية الحيوية باستخدام الاختبارات التقليدية , باضافة الى تقييم حساسيتها لمستخلصات طبيعية و كيميائية.

في المجموع , تم عزل 21 سلالة بكتيرية , منها 13 عضية سالبة الغرام , و 3 عصيات موجبة الغرام , و 2 مكورات موجبة الغرام (اختبار الكواغولاز ايجابي) و 3 مكورات سالبة الغرام.

من بين هذه العزلات تميزت بلامح بيوكيميائية نموذجية : عضية سالبة غرام , هوائية صارمة , متحركة , اكسيداز و كاتالاز موجب , منتجة اصباغ فلورية , تحريض تفاعل فرط الحساسية على اوراق التبغ , ونتائج سلبية لاختبارات ليفين و البكتيناز.

API سمح التحليل عبر مجموعة بتحديد سلالات اخرى تنتمي الى الاجناس:

*Serratia marcescens, Chryseobacterium indologenes, Moraxella spp.*

*Pseudomonas Savastanoi* ( R1S4 ) تم تأكيد سلالة واحدة فقط ك :

كشفت اختبارات الحساسية و أن هذه السلالة تتأثر ببعض المستخلصات الطبيعية ( مستخلص الثوم , زيت الاوريغانو المركز) و لكنها مقاومة للبعض الآخر (زيت الاوريغانو المخفف , مستخلص اوراق الزيتون) يوصى بشدة باستخدام أدوات الجينوميات لتحسين تحديد العزلات . بالاضافة الى ذلك , فان استخدام النباتات المعتمدة يشكل اجراء وقائيا اساسيا ضد انتشار المرض.

**الكلمات المفتاحية:**

أورام , زيت أساسي , مستخلصات طبيعية , زيتون , مرض السل في الزيتون ,

*Serratia marcescens, Chryseobacterium indologenes, Moraxella spp.*

# Introduction

L'olivier (*Olea europaea* L.) est un arbre fruitier ancestral, emblématique du bassin méditerranéen, où il est largement cultivé pour ses fruits et son huile. Il joue un rôle majeur sur les plans nutritionnel, économique et social (Hassouna *et al.*, 2022) L'Algérie figure parmi les dix premiers producteurs mondiaux d'olives de table et d'huile d'olive (FAO, 2018) avec une richesse variétale estimée à environ 159 cultivars appartenant à l'espèce *Olea europaea* L. (Zeghba, 2014)

Cependant, cette culture est confrontée à plusieurs contraintes phytosanitaires, dont la tuberculose de l'olivier, une maladie bactérienne redoutée, causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Oulebsir-Mohandkaci *et al.*, 2017). Cette bactérie phytopathogène opportuniste (Nguyen *et al.*, 2017) capable de survivre à l'état épiphyte sur les oliviers (Ercolani, 1978) induit la formation de tumeurs (galles) par hypertrophie et hyperplasie des tissus végétaux, affectant les brindilles, le tronc, les feuilles et parfois les fruits (Sisto *et al.*, 2004). Ce processus est lié à la production de phytohormones, telles que l'acide indole-3-acétique et les cytokinines (Surico *et al.*, 1985), ainsi qu'à l'accumulation d'opines.

Dans la wilaya de Skikda, l'olivier occupe une place importante, avec plus de 10 000 hectares cultivés, représentant 46 % de la surface arboricole totale (Zeghba, 2014). C'est dans ce contexte que la présente étude a été menée, à partir d'échantillons prélevés sur des arbres symptomatiques dans la région d'Aïn Kechra. Les objectifs principaux de ce travail sont d'identifier l'agent pathogène responsable, d'analyser ses caractéristiques biochimiques, et d'évaluer l'efficacité d'extraits naturels comme alternative de lutte, afin de proposer une stratégie plus respectueuse de l'environnement et bénéfique pour la filière oléicole locale.

# **Chapitre01**

## **Synthèse**

### **bibliographpique**

## **1. Généralités sur l'olivier :**

### **1. L'origine géographique et l'histoire de l'olivier :**

L'olivier est mentionné depuis des temps immémoriaux et son récit s'entrelace progressivement avec celui des civilisations. En effet, l'oléastre (sa forme sauvage ou primaire) daterait d'environ 60 000 ans (Fabbri, 2023)

Son origine remonterait à l'Asie mineure, plus précisément au Nord-Levant, une région frontière entre la Syrie et la Turquie. Il aurait progressivement émergé en Égypte, en Palestine et en Grèce.(Besnard *et al.*, 2018)

#### **➤ Entre XIVème et le XIIème siècle avant J.-C :**

les Phéniciens ont commencé à cultiver de l'olivier dans les îles grecques, puis l'ont introduit sur le continent grec où sa culture a pris une grande importance à cette époque.(D'Auria *et al.*, 2017)

#### **➤ À partir du VIème siècle avant J.-C :**

L'olivier s'est propagé dans les pays méditerranéens jusqu'à Tripoli, Tunis et l'île de Sicile par l'empire romain. En Afrique du Nord, les Berbères avaient la capacité de planter des oliviers sauvages et avaient véritablement développé la culture de l'olivier sur tout leur territoire.(D'Auria *et al.*, 2017)

Dans le Coran, Allah fait référence à l'olivier comme étant une source de bénédiction. En effet, l'huile d'olive est décrite comme ayant une lumière propre, même sans être touchée par le feu. Ceci illustre à quel point cet arbre est précieux.(la librairie musulmane, 2024)

### **1.1. Description de l'olivier :**

#### **1.1.1. Description botanique:**

l'olivier appartient à la famille des Oléacées et au genre *Olea* qui comprend une trentaine d'espèces différentes dans le monde La seule espèce portant des fruits comestibles est *Olea europaea* (olivier)(Dupin *et al.*, 2020), laquelle se divise en 2 sous espèces :

*Olea europaea sylvestris* ou oléastre (l'olivier sauvage)

*Olea europaea sativa* ou l'olivier cultivé (Hoaoune *et al.*, 2009)

### 1.1.2. Description morphologique:

- **Olivier sauvage ou Oléastre :**

En règle générale, l'oléastre est un arbuste buissonnant et épineux, avec des feuilles rondes ou légèrement allongées, et des fruits sphériques contenant peu d'huile. Il se trouve dans les maquis des régions méditerranéennes, et il a même formé des forêts authentiques en Espagne, en Algérie et en Asie Mineure.(Gianguzzi & Bazan, 2019)

- **Olivier cultivé :**

L'olivier cultivé est un arbre de 5 à 10 m de haut au tronc sinueux dont l'écorce crevassée présente des feuilles lancéolées et des fruits de forme et de teneur en huile assez variables selon la variété considérée (Gianguzzi & Bazan, 2019)

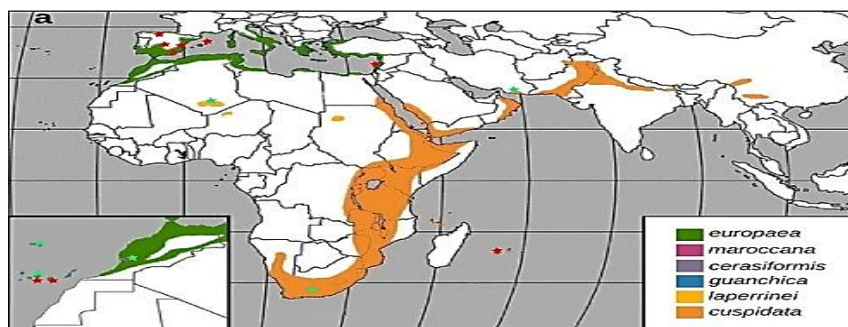
### 1.2. Classification botanique de l'Olivier :

**Nom binomial :** *Olea europaea*(Linnaeus, 1753)

➤ L'olivier appartient:

**Tableau 1 :** la classification botanique de l'olivier (Julca *et al.*, 2023)

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Classe</b>	<b>Magnoliopsida</b>
<b>Ordre</b>	<b>Scrophulariales (Cl. Classique) Lamiales (Cl. Phylogénétique)</b>
<b>Famille</b>	<b>Oleaceae</b>
<b>Genre</b>	<b><i>Olea</i></b>
<b>Espèce</b>	<b><i>Europaea</i></b>
<b>Sous –Espèces</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ <i>Olea europaea subsp. europaea</i> (l'olivier cultivé)</li><li>○ <i>Olea europaea subsp. cuspidata</i> (Afrique de l'Est, Asie)</li><li>○ <i>Olea europaea subsp. laperrinei</i> (Sahara)</li><li>○ <i>Olea europaea subsp. Maroccana</i></li><li>○ <i>Olea europaea subsp. Cerasiformis</i></li><li>○ <i>Olea europaea subsp. Guanchica</i></li></ul>



**Figure 1:** Répartition géographique des six-espèces d'Olea europaea (Julca *et al.*, 2023)

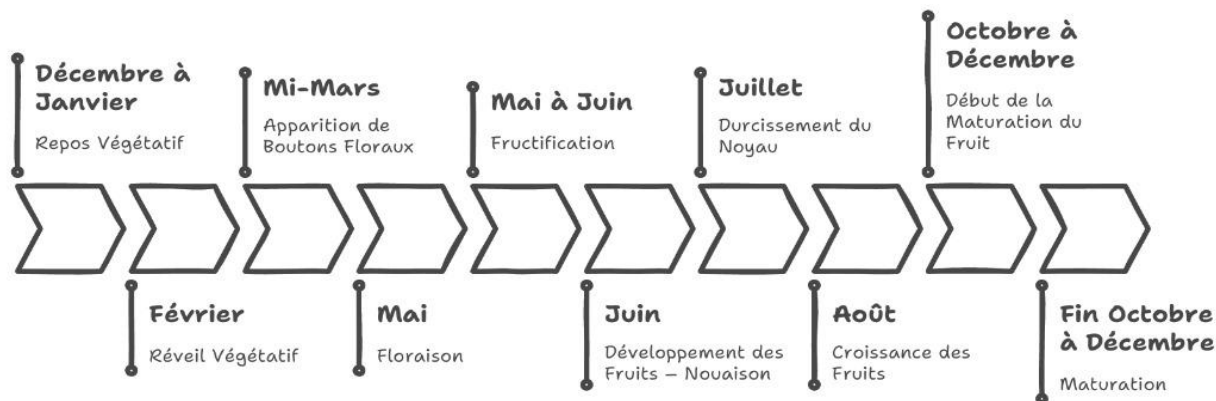
### 1.3. Le cycle développement de l'Olivier :

Voici le cycle de développement de l'olivier durant la vie :

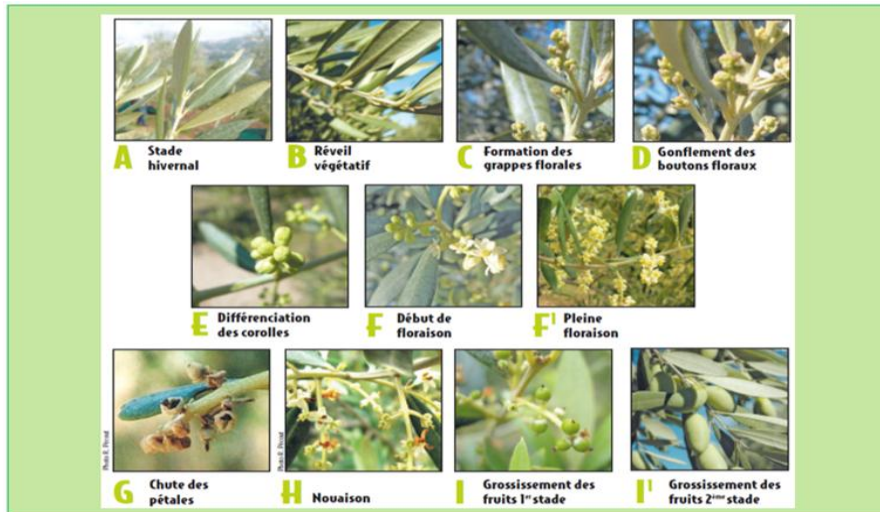
**Tableau 2 :** Cycle de développement de l'olivier (Sanz-Cortés *et al.*, 2002)

Age	Niveau de développement	Qualité de production
1 à 7 ans	Enracinement de l'arbre	Aucune production
7 à 35ans	Croissance	Production des fruits en augmentation
35 à 150 ans	Pleine force de l'age	Production régulière
150 ans et plus	Sénescence	Rendement en diminution voire incertain

### 1.4. Le cycle végétatif annuel :



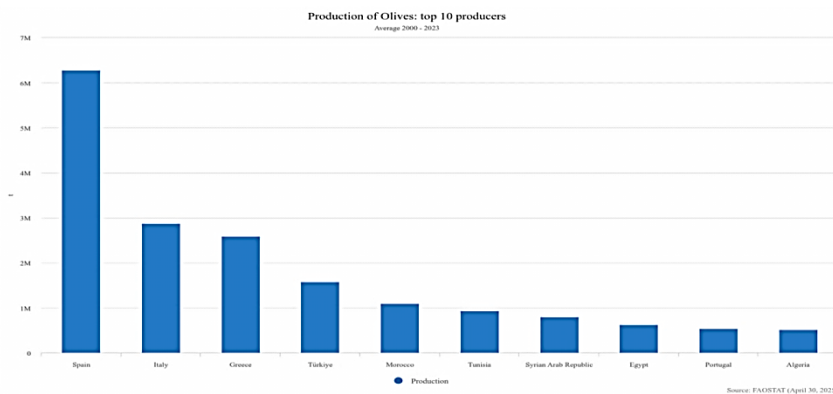
**Figure 2 :** Schéma représentant le cycle annuel de l'olivier (prise personnelle)



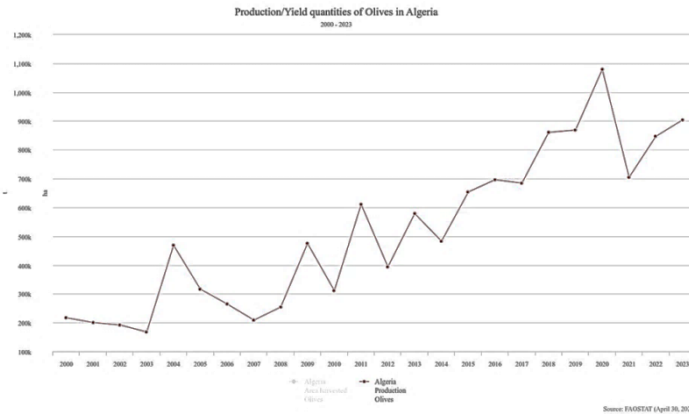
**Figure 3 :** les stades phénologiques de l’Olivier (Bergon Nature & Jardin, n.d.)

### 1.5. L’Oléiculture en Algérie :

En raison de son climat méditerranéen favorable à l'olivier, l'Algérie est un pays prospère depuis des millénaires pour cet arbre emblématique.(Titouh *et al.*, 2020) Elle fait partie des dix plus grands producteurs d'olive de table et l’huile d’olive derrière l’Espagne, l’Italie, la Grèce la Turquie ,le Maroc, La Tunisie,, la Syrie,Portugal(FAO, 2018)



**Figure 4:** Classement mondial des 10 plus grands producteurs d’olives de table ((FAO, 2018)



**Figure 5:** Évolution du secteur oléicole en Algérie de 2000 à 2023 (FAO, 2018)

### 1.6. Variétés les plus cultivées en Algérie :

L'Algérie possède une grande diversité génétique en matière d'oliviers, avec un total de 174 variétés (Falek *et al.*, 2022). Cette collection comprend 36 variétés locales et 138 variétés étrangères. Le choix de la variété pour l'oliviericulture repose sur plusieurs critères importants, tels que l'objectif de la production (huile d'olive ou olives de table), les caractéristiques climatiques spécifiques de la région de culture (comme la période de gel, les vents et la répartition des précipitations) (Rabiha *et al.*, 2023), ainsi que le système de culture choisi (extensif, semi-intensif ou intensif) (Hadjloune *et al.*, 2021)


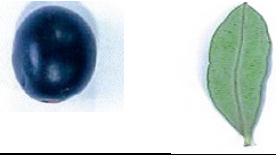


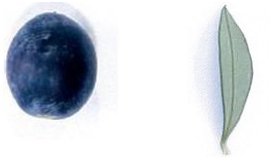




Près de **83%** des oliveraies se trouvent en zones montagneuses, sur des terrains irréguliers avec une moyenne annuelle de précipitations variant entre **400 et 900mm.** (Sidhoum, 2020.)




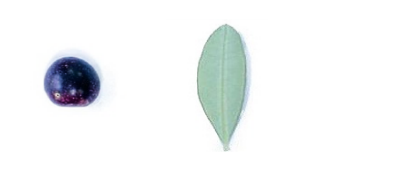
En Algérie, l'oléiculture est concentrée dans trois régions majeures. (Zeghba, 2014)

- **Est : 26,1%** d'héritage national est répartie entre les Wilayas de Jijel, Skikda, Mila et Guelma.
- **Centre : 57,5%** du patrimoine oléicole national entre les Wilayas de Ain Defla, Blida, Boumerdes, Tizi Ouzou, Bouira et Bejaia.
- **Ouest : 16,4%** du verger oléicole national entre les wilayas de Tlemcen, Ain Temouchent, Mascara, Sidi Bel Abbes et Relizane.

Voici un tableau qui représente 13 variétés les plus cultivés en Algérie :

**Tableau 3** :Quelques exemples des variétés d'olivier en Algérie (Rabiha *et al.*, 2023)

Type d'olivier	Région	Morphologie
ABANI(Laabani) et plein de variétés	Valée de Oued El Arab, Cherchar, Khenchela	
AIMEL (Haimel – Ayemel ) et plein de variétés	Ait aimel , Wilaya de Béjaia	
BOUGNENFOUS	Bouandas , Wilaya de Sétif	
BLANQUETTE	Guelma	
BOUKAILA	Constantine	
BOURICHA (olive d'El Arrouch)	El Harrouch, Wilaya de Skikda	
CHEMLAL (Achamlal - Achamli – Achemlal)	Kabylie :occupe une grande partie du verger oléicole algérien	
FERKANI (Ferkane)	Ferkane , Wilaya de Tebessa	
HAMRA (Rougette – Roussette)	Jijel	

ROUGETTE DE MITIDJA	plaine de Mitidja	
AGRAREZ (Aghenfous)	tazmalt , Wilaya de Béjaia	
RONDE DE MILIANA	valée de Miliana , Wilaya de Ain Defla	
SIGOISE (Olive de Tlemcen, Olive du Tel)	plaine de Sig, Wilaya de Mascara	

### 1.7. Les variétés les plus cultivées à Skikda :

La wilaya de Skikda joue un rôle significatif dans le domaine de l'oléiculture, abritant 73 huileries, dont 13 sont des pressoirs modernes, principalement localisés dans les communes d'El Harrouch, Tamalous, Aïn Kechra et Azzaba (Belaidi *et al.*, 2022). La production d'huile d'olive est estimée à 76.330 litres à l'issue de la campagne de cueillette en cours, sur un total de 9.912 hectares d'oliviers matures et productifs. Le reste de l'olivieraie de la wilaya, qui s'étend sur une superficie totale de 16.000 hectares, est constitué d'arbres jeunes qui n'ont pas encore atteint leur pleine capacité de production. Les variétés d'olivier les plus cultivées dans la wilaya sont BOURICHA ( el harrouche ) , (Nora *et al.*, 2016)ZEMOUCHE ( skikda ville ) .(Maghreb Emergent, 2013)

### 1.8. Intérêt de l'olivier pour la santé humaine :(oliocarli.fr, 2021)

Les olives partagent avec l'huile d'olive vierge extra un étonnant patrimoine de vertus nutritionnelles précieuses pour le bien-être de notre organisme (Alasmari *et al.*, 2020)

- **75 % d'acides gras monoinsaturés** : appelée acide oléique, aident à **baiss**er le « mauvais » cholestérol (LDL) ainsi la protection contre le risque de maladies cardiovasculaires.(Jabbarzadeh-Ganjeh *et al.*, 2023)
- **Une source de substances antioxydantes** : ont une action protectrice contre le vieillissement cellulaire causé par les radicaux libres(Bender *et al.*, 2021)
- **L'hydroxytyrosol** , : un composé phénolique aux propriétés anticancéreuses(Kumar *et al.*, 2024)
- **un bon apport en fer**(Sadighara, 2021)

Et enfin grâce au pouvoir émulsifiant qu'elles exercent sur les graisses comestibles ingérées, en améliorant la digestibilité de l'ensemble du repas, Elles ont un impact bénéfique sur la digestion.(Bermúdez et al., 2004)

## 2. Généralités sur la tuberculose de l'olivier :

### 2.1. Définition :

La Tuberculose de l'olivier est aussi appelée Chancre bactérien, au Rougne (Boutkhil, 2017) Elle est l'une des maladies de l'olivier. Elle se caractérise par l'apparition d'excroissances de couleur marron, appelées chancres ou galles (Hassouna *et al.*, 2022) ses dernières sont causées par l'infection de la bactérie *Pseudomonas savastanoi* ou *pv. Savastanoi*. (Benjama, 2003)

### 2.2. Symptômes de la maladie :

Cette infection entraîne un **affaiblissement** général de l'olivier, une **défoliation** intense, des **branches sèches** et de développement des galles (University of California Agriculture and Natural Resources, 2011), ce dernier se déroule en trois phases principales :

- **La phase01 :( initiale)** des *petites excroissances* de forme irrégulière et de *couleur verdâtre* et à la surface lisse se forment (Benjama , 1999).et changent de couleur pour prendre des teintes brunes.
- **Phase 02** : Après quelques mois, les excroissances hyperplasiques atteignent généralement une taille de 2 à 3 cm et acquièrent un aspect spongieux et irrégulier, devenant dur et brun sur les petites pousses (Barguigua et al., 2025)
- **La phase03 :( finale )**: les tumeurs se fissurent et s'assombrissent.

Ces chancres se développent généralement sur les rameaux, mais également au niveau des charpentières et du tronc dans des cas plus sévères .

En conséquence, les dommages se traduisent par une moindre vigueur des arbres et par une baisse de la production d'olives (Nguyen *et al.*, 2017b). même éventuellement sur la qualité de l'huile d'olive vu de caractéristiques organoleptiques inférieures telles qu'une odeur désagréable ainsi qu'un goût amer et rance (Bouaichi *et al.*, 2019)



phase01



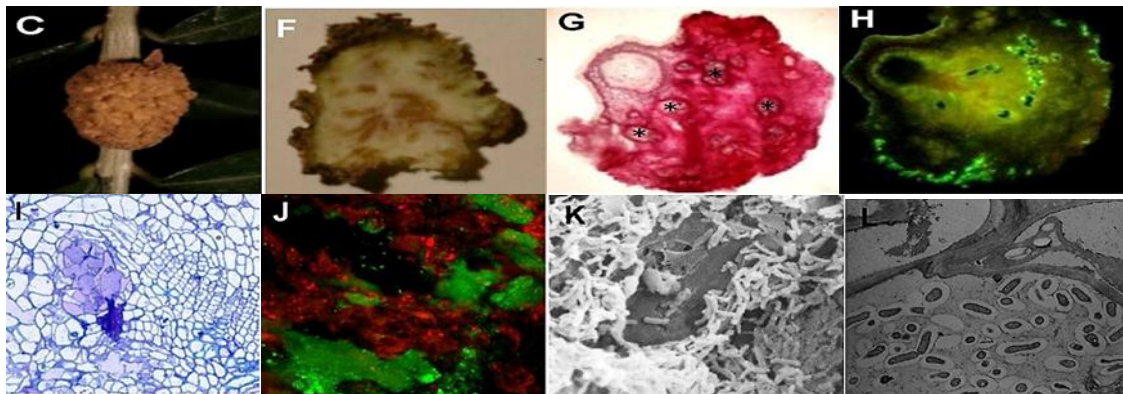
phase 02

**Figure 6:** les phases 1 et 2 dans les symptômes (centre technique de l'olivier, 2019)



**Figure 7:** Echantillon enlevé il y a 5 ans

**Figure 8:** Echantillon enlevé en 2025 (prise personnelle)



**Figure 9:** Symptômes produits par *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* dans les plantes d'olivier et pathogène visualisation au sein des nœuds (Ramos *et al.*, 2012a)

### 2.3. Mode de propagation de la maladie :

L'infection se produit par le biais des blessures présentes sur l'olivier. Ces lésions peuvent être causées par l'activité des *insectes*, des *grêlons*, des *gelées*, de la *taille*, des dommages lors de Une fois l'infection déclenchée, la bactérie perturbe les niveaux hormonaux de sa zone d'influence. Cela entraîne l'olivier dans un processus d'hyperplasie (multiplication cellulaire désordonnée) qui finit par développer les tumeurs ou verrues caractéristiques de la tuberculose de l'olivier. (Buonauro *et al.*, 2015)

Au printemps, ces infections peuvent développer des tumeurs en seulement deux semaines avec des conditions optimales pour la bactérie responsable de température comprise entre **21 et 24 °C**, associée à une **très forte humidité**.(Zucchini *et al.*, 2023)

**2.4. Agent causal de la tuberculose de l'olivier :** La bactérie à l'origine de la tuberculose de l'olivier est *Pseudomonas savastanoi*, un phytopathogène à Gram négatif, de forme bâtonnet, doté d'un flagelle polaire qui lui confère sa motilité. (Ramos *et al.*, 2012)

Sa propagation se fait principalement par le biais de vecteurs tels que les insectes porteurs de l'agent pathogène, ainsi que par l'intervention humaine lors des diverses opérations culturales (greffage, taille, cueillette traditionnelle, etc.)(Hassouna *et al.*, 2017).

Durant les périodes de chaleur et de sécheresse estivales, ainsi qu'en hiver, *Pseudomonas savastanoi* trouve refuge à l'intérieur des galles, où près de 90 % des parasites peuvent survivre et reprendre leur activité l'année suivante. (Quesada *et al.*, 2010)

## **2.5. Historique de l'agent causal :**

La maladie de la rogne de l'olivier, également appelée tuberculose de l'olivier, a été décrite pour la première fois par le philosophe grec Théophraste au IV<sup>e</sup> siècle avant J.-C. (Panagopoulos, 1993)

En 1885, G. Arcangeli a émis l'hypothèse d'une origine bactérienne pour ces excroissances anormales. Cette hypothèse a été validée par Savastano en 1886, qui a réussi à isoler la bactérie et à reproduire les symptômes de la maladie en inoculant des oliviers sains. En 1908, Smith a reconnu l'importance des travaux de Savastano et a nommé l'agent pathogène *Bacterium savastanoi* en son honneur (Smith, 1908.). En 1913, Stevens a classé cette bactérie dans le genre *Pseudomonas*, lui attribuant le nom de *P.savastanoi* (Stevens, 1913). Par la suite, des maladies analogues ont été observées sur le frêne (*Fraxinus*) et le laurier-rose (*Oleander*), causées par des bactéries similaires mais distinctes, désignées respectivement sous les noms de *P.savastanoi var.fraxini* et *P.savastanoi var.nerii* (Caballo-Ponce *et al.*, 2017)

### **Taxonomie et Nomenclature :**

les souches pathogènes étant regroupées sous *P. syringae*, désignées comme *P.syringae pv. savastanoi*. À partir d'une étude de souches issues de divers hôtes, (Janse, 1982) a suggéré la reconnaissance de trois pathovars de *P. syringae subsp. savastanoi*. Ces désignations de pathovars étaient initialement considérées comme invalides et n'ont été validées qu'après la publication de (Gardan *et al.*, 1992) et la proposition de reconnaissance de l'espèce *P. savastanoi* (Janse, 1982) (Gardan *et al.*, 1992). La reconnaissance des différentes gammes d'hôtes a ainsi été établie. Les pathogènes de la famille des *Pseudomonas* sont désignés officiellement par les appellations *P. savastanoi pv. savastanoi*, *P. savastanoi pv. nerii* et *P. savastanoi pv. fraxini*

## 2.6. Classification de *Pseudomonas Savastanoi* :

**Tableau 4** : Classification de *Pseudomonas Savastanoi* (Ramos *et al.*, 2012)

Domaine	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Savastanoi</i>

**Le nom scientifique:** *Pseudomonas savastanoi*

**Le synonyme de nom scientifique :** *Pseudomonas syringae ssp .savastanoi* (Bonkowski et al., 2021)

## 2.7. Pouvoir pathogène:

L'infection des plantes requiert la présence d'ouvertures telles que celles générées par des cicatrices foliaires, des blessures causées par la taille, des fissures résultant du gel ou de la grêle, ainsi que des interventions liées à la récolte. ((Benjama , 1999); (Bouaichi *et al.*, 2019). Les zones d'abscission des feuilles, des fleurs et des fruits constituent également des points d'entrée pour les bactéries. (Benjama , 1999). Les tumeurs se forment en réponse aux phytohormones synthétisées par la bactérie, notamment l'acide indole-3-acétique (IAA) et les cytokinines.(Ramos *et al.*, 2000) ((Benkirane *et al.*, 2015); ,Ce pouvoir pathogène est provoqué par un plasmide « Ti » (tumeur induisante) qui s'intègre dans le génome de la cellule végétale hôte. L'ADN nouvellement formé entraîne une production autonome d'acide indole-acétique, substance qui joue un rôle crucial dans l'élargissement des cellules, ainsi que des cytokinines qui stimulent la division cellulaire(Ramos *et al.*, 2000) . En outre, il y a des mécanismes de virulence identifiés présents chez le pathogène, en particulier un système de sécrétion de type IV ainsi qu'un ensemble de gènes liés à la tolérance et à la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

## 2.8. Le cycle de la maladie :

La maladie provoquée par les populations de *Psv* suit un cycle de type épiphyte-pathogène. Les bactéries connaissent une phase épiphyte durant laquelle elles se multiplient sur les surfaces des troncs et des feuilles d'olivier sans manifester de symptômes (Ercolani, 1978)

Il est intéressant de noter que des populations de *Psv* ont été isolées sur des pousses asymptomatiques provenant d'arbres témoins non inoculés avant l'apparition des symptômes, ce qui indique que ces bactéries épiphytes pourraient constituer une source d'inoculum pour l'infection des plantes saines (Quesada *et al.*, 2010)

La plage de températures permettant à *Psv* de déclencher une infection se situe entre 5 et 37 °C (M. *et al.*, 2012), ce qui permettrait aux bactéries de causer des infections tout au long de l'année. Toutefois, les conditions idéales pour le développement de la maladie se trouvent autour de 22-25 °C, et les périodes suivantes présentent une forte probabilité. Les périodes d'infection se situent principalement à l'automne et au printemps (Godena *et al.*, n.d.)

Le *Psv* a la capacité d'infecter les oliviers à n'importe quel moment de l'année, mais la formation de nœuds ne se produit que lorsque les conditions sont propices. Par conséquent, si un olivier est infecté à l'automne, le développement des nœuds ne commencera que plusieurs mois plus tard.

En revanche, une infection au printemps peut entraîner la formation de nœuds en seulement deux semaines (Wilson, 1935). Des études de terrain menées en Californie ont révélé que les inoculations d'oliviers par *Psv* réalisées en avril entraînaient des niveaux de maladie des nœuds d'olives plus élevés que celles effectuées en décembre

Il a été proposé que la dissémination des bactéries *Psv* se fasse des arbres infectés (ou inoculés) vers ceux qui ne le sont pas (ou non inoculés) (Quesada *et al.*, 2010)

Ces bactéries pourraient se propager sur de grandes distances en raison de leur introduction, et par la mise en place de matériel contaminé, ou par le transport sur de courtes distances via la pluie éclaboussante, les aérosols véhiculés par le vent, les insectes et les méthodes culturales (Wilson, 1935). À l'heure actuelle, la propagation des bactéries est encouragée par les pratiques agricoles, les nouvelles plantations d'arbres à forte densité, les tailles fréquentes et sévères, ainsi que par la proximité entre les jeunes plants .

Les blessures résultant de la récolte et de la taille, ainsi que celles causées par la grêle, le gel et les cicatrices foliaires, créent des environnements propices à l'infection ((Wilson, 1935) ; (Janse, 1982), et l'infection de l'olivier par *Psv* est directement corrélée au niveau de blessure des arbres . Dans le cadre d'une étude visant à analyser la dissémination naturelle de la

bactérie sur de jeunes plants, aucun nœud n'a été constaté chez les arbres inoculés ou non inoculés jusqu'à 3 et 10 mois après l'inoculation. L'interaction entre *Psv* et l'olivier, qui est compatible, favorise l'invasion, l'infection et la multiplication, entraînant une hypertrophie et une hyperplasie des tissus végétaux, ainsi que la formation de nodules. Ces bactéries ont la capacité de persister à l'intérieur des nodules d'une saison à l'autre. Lorsque l'humidité est suffisamment élevée, elles produisent des exsudats riches en bactéries, où elles peuvent vivre en tant qu'épiphytes (Wilson, 1935). par contre, leur survie dans le sol est limitée à quelques jours seulement .

## **2.9. La lutte biologique contre la tuberculose de l'Olivier :**

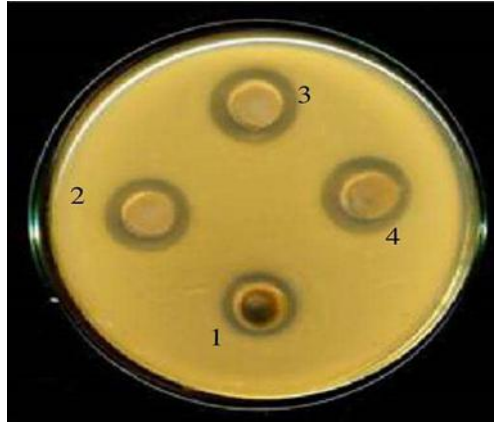
Dans le cadre du traitement de cette maladie les PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) ont démontré une capacité antagoniste envers les micro-organismes phytopathogènes grâce à divers mécanismes, notamment la production de sidérophores, la synthèse d'antibiotiques et d'enzymes, ainsi que la libération de composés antifongiques et de nutriments. De plus, ils exercent une compétition pour les sites de fixation et exploitent le mécanisme RHESt récemment identifié (Gamez *et al.*, 2019), *Bacillus spp* et *Pseudomonas fluorescences* se sont révélées être des agents de biocontrôle de premier plan, affichant une efficacité avérée dans la lutte contre une large gamme de pathogènes végétaux. (Shoda, 2000)

Les résultats ont montré que l'application d'un traitement combinant les deux types de bactéries entraînait la diminution la plus significative de la sévérité de la maladie, atteignant 89,58 %.(Ali *et al.*, 2024)

**2.9.1. *Bacillus spp* :** Les espèces de *Bacillus* synthétisent une variété de métabolites secondaires, incluant des antibiotiques ainsi que des composés volatils et non volatils en plus d'enzymes lytiques.(Krid *et al.*, 2010)

D'après les études, Les résultats ont indiqué que la souche *B. subtilis* entraînait une diminution significative du poids des tumeurs induites par le pathogène, avec une réduction de 70 % du poids tumoral et une inhibition de 34 % des zones infectées.(Krid *et al.*, 2012)

Cette souches produit des substances inhibitrices produites par *B. subtilis* sont principalement des protéines ou des peptides.(Krid *et al.*, 2010)



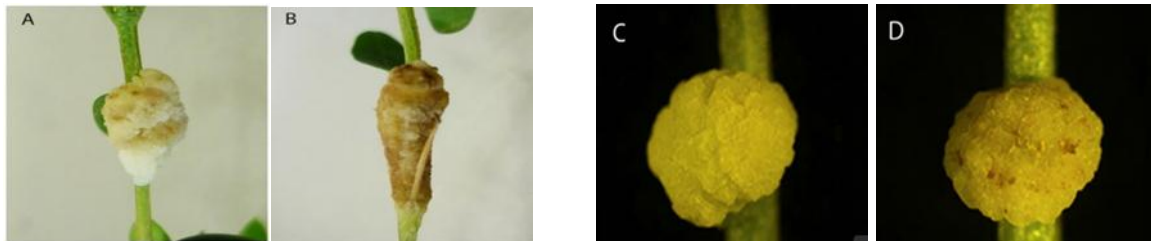
**Figure 10 :** Activité inhibitrice de *Bacillus subtilis* contre *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* par diffusion en puits (Krid *et al.*, 2012)

### 2.9.2. *Pseudomonas fluorescens* :

La colonisation des racines d'olivier par *P. fluorescens* a suscité une variété significative de réponses défensives, engendrant notamment l'expression de gènes associés à la biosynthèse des phénylpropanoïdes, des terpènes et des hormones végétales. (Maldonado-González *et al.*, 2013)

Les résultats obtenus avec *P. fluorescens* seule ont révélé une réduction de 69,38 %.

Par ailleurs, des améliorations notables de la croissance des plants d'olivier ont été constatées, en particulier en ce qui concerne la hauteur des pousses et la longueur des racines. ( Ali *et al.*, 2024)



**Figure 11:** Formation de tumeurs sur des plants d'olivier issus de culture **in vitro**, après inoculation avec *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), en présence (A) ou en absence (B) de *Pseudomonas fluorescens*. Des tumeurs observées dans une seconde expérience, également après inoculation avec Psv, en présence (C) ou en absence (D) de *Pseudomonas fluorescens* (Maldonado-González *et al.*, 2013)

### 2.9.3. Traitement chimiques :

Les traitements écologiques à base de cuivre contribuent à la prévention de la tuberculose de l'olivier. Ces interventions permettent de diminuer les populations bactériennes, ce qui restreint leur potentiel infectieux .

## **2.10. La lutte culturelle contre la tuberculose de l'Olivier :**

- Éliminez les branches et rameaux porteurs de tumeurs caractéristiques, puis incinérez-les pour détruire les foyers infectieux(López *et al.*, 2012).
- Il est essentiel de ne pas récolter les olives sur des oliviers humides ou susceptibles de subir des précipitations imminentes, car la pluie constitue un facteur de risque pour le développement de la maladie. (Licciardello *et al.*, 2023)
- Il est conseillé de ne pas utiliser de méthodes de récolte agressives comme le gaulage et vibrateurs à peigne, afin de réduire le risque d'intrusion (University of California Agriculture and Natural Resources, 2011)
- Il est essentiel de nettoyer et de désinfecter rigoureusement les outils de taille entre chaque arbre pour éviter la dissémination de la maladie dans les périodes de temps secs (Nguyen *et al.*, 2017)
- Pour préserver la santé des plantes, optez pour une fertilisation équilibrée en évitant l'excès d'azote, susceptible d'affaiblir les tissus végétaux(López *et al.*, 2012)
- Pour la mise en place de nouvelles plantations, utilisez des plants certifiés indemnes de maladies, provenant de pépinières agréées.(Samoa, 2005)

Il est important de rester attentif et de mettre en œuvre ces mesures de façon régulière afin de préserver la santé et la productivité de vos arbres.

## **2.11. Présentation de la région d'étude :**

### **2.11.1. Situation géographique de la région d'étude : wilaya de skikda :**

Skikda est une wilaya située en Algérie, dans la région de l'Afrique du Nord. Cette wilaya est organisée en treize daïras, qui sont des circonscriptions administratives, et comprend un total de trente-huit communes. Parmi ces communes, Aïn Kechra et Ouldja Boulballout se distinguent comme les plus grandes villes de la daïra d'Aïn Kechra, qui est composée de ces deux localités. (DB-city, 2025)



ain kechra

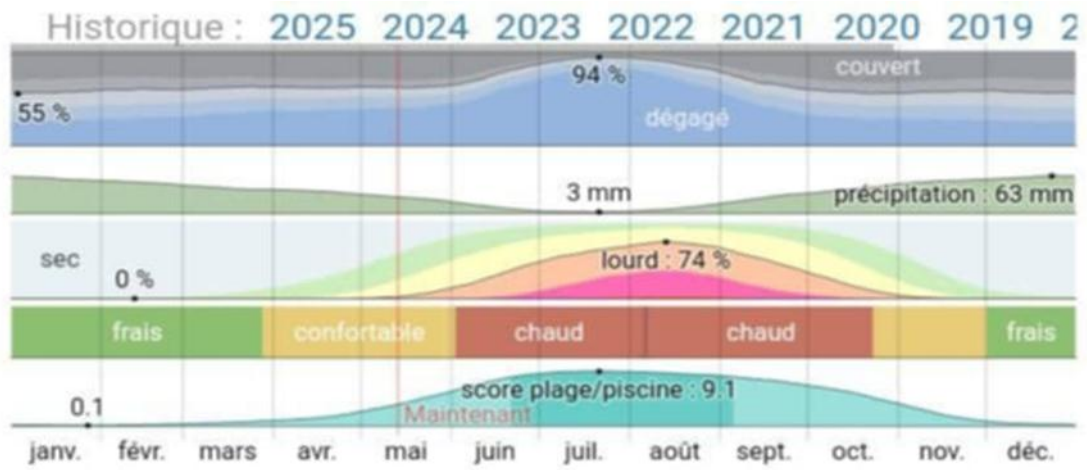
**Figure 12:** Carte des communes de la wilaya de Skikda  
(Ministère de l'Intérieur et des Collectivités Locales [MICL], 2012)

### 2.11.2. Caractéristiques climatiques: (Weather Spark, n.d.)

Skikda présente un climat marqué par des étés chauds et humides, ainsi que des hivers longs et frais. Les températures tout au long de l'année varient généralement entre **9 °C** et **29 °C**, avec des rares exceptions où elles descendent en dessous de **5 °C** ou dépassent **33 °C**.

La période estivale, qui s'étend du **23 juin** au **24 septembre**, est particulièrement intense, avec des températures maximales quotidiennes dépassant souvent **27 °C**. **Août** se distingue comme le mois le plus chaud, avec une température moyenne maximale atteignant **29 °C** et une minimale de **23 °C**.

En revanche, la saison fraîche s'étale sur quatre mois, du **30 novembre** au **29 mars**, durant laquelle les températures maximales quotidiennes restent en dessous de **18 °C**. **Janvier** est le mois le plus froid de l'année à Skikda, affichant une température moyenne minimale notable.



**Figure 13:** Présentation de la météo mensuelle de la wilaya de skikda(Weather Spark, n.d.)

# **Chapitre02**

## **Matériel et Méthodes**

### 3. Matériel et Méthodes :

#### 3.1. L'Objectif :

Cette étude avait pour objectif principal l'isolement, l'identification, la caractérisation ainsi que l'évaluation de l'activité antimicrobienne de la bactérie *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, agent pathogène responsable de la tuberculose de l'olivier. Les échantillons analysés ont été collectés à partir d'arbres d'olivier infectés, présentant des symptômes caractéristiques de la maladie, notamment la formation de galles ou tumeurs.

Les travaux expérimentaux ont été réalisés au laboratoire de microbiologie de l'Université du 20 Août 1955 de Skikda, situé dans le hall de technologie, sur une période de six à sept semaines, allant du 26 février au 29 avril.

#### 3.1.1. Echantillonnage :

L'échantillonnage a été réalisé le **21 février 2025** dans la commune de **Aïn Kechra** (wilaya de Skikda), sur des oliviers présentant des symptômes caractéristiques de la tuberculose.

- **L'échantillon A** a été prélevé à **15 h 30** dans la région de **Oued Zégar**. Le prélèvement s'est déroulé dans des conditions climatiques clémentes, avec une température d'environ **22 °C**.
- **L'échantillon B** quant à lui a été collecté plutôt dans la journée ; à **11 h** dans un secteur localement désigné sous le nom de « **Stade** », également situé à **Aïn Kechra**. Le temps était ensoleillé, avec une température avoisinant **27 °C**.

#### 3.1.2. Prélèvement des échantillons :

Des rameaux d'environ 20 cm de longueur, portant des galles caractéristiques de la tuberculose de l'olivier, ont été prélevés à l'aide d'un sécateur soigneusement désinfecté avant et après chaque utilisation, afin de prévenir toute contamination croisée.

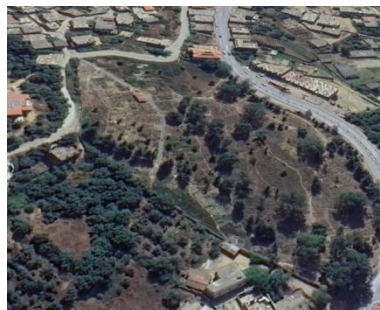
Le **premier échantillon** a été transporté et déposé au laboratoire le lendemain du prélèvement, vers midi, tand

is que le **second échantillon** est arrivé le jour même à 21 h.

Chaque prélèvement a été conditionné dans un sachet en plastique propre, puis acheminé sans délai vers le laboratoire de microbiologie situé dans le Hall de technologie de l'Université 20 Août 1955 de Skikda, où il a été stocké à 4 °C en attendant les analyses.



**a** : Zone01 oued zegar



**b** :Zone 02 ain kechra centre (échantillonB)

ain kechra (échantillonA)

**Figure 14:** Les deux zones d'échantillonnage a et b (*Google Earth*, n.d.)



**Figure 15:** Olivier infecté par la tuberculose à Ain Kechra (photo prise sur le terrain)



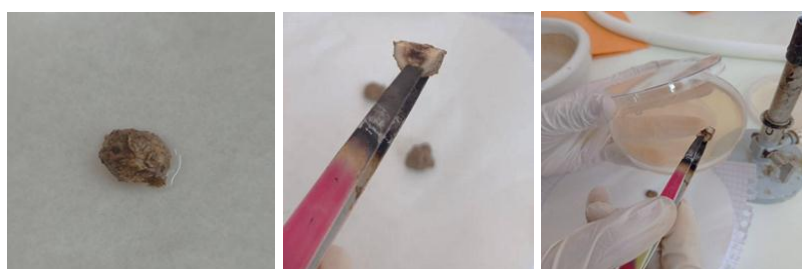
**Figure 16:** branche de 20 cm présentant des galles (prise personnelle)

### 3.2. L'isolement :

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

#### 3.2.1. Technique directe :

Les galles ont d'abord été désinfectées à l'aide d'un papier filtre stérile imbibé d'éthanol à 70 %. Elles ont ensuite été coupées en deux à l'aide d'un couteau stérile, préalablement passé à la flamme d'un bec Bunsen. À l'aide d'une pince stérile, une moitié de galle a été prélevée et directementensemencée dans des boîtes de Pétri contenant les milieux King A et King B. Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 24 heures.



(a)

(b)

(c)

**Figure 17:** Étapes de l'ensemencement direct à partir de la galle :

(a) Désinfection de la galle,

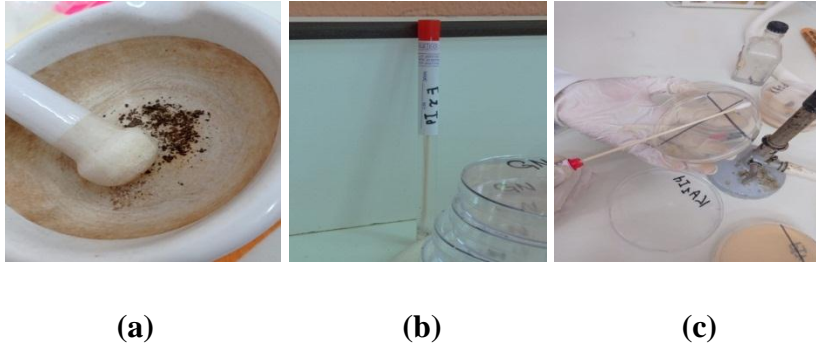
(b) Découpe aseptique en deux parties,

(c) Ensemencement direct sur les milieux King A et King B (prise personnelle).

#### 3.2.2. Technique indirecte :

Le tissu interne des galles a été découpé en petits fragments, puis broyé à l'aide d'un mortier et d'un pilon stériles. Le broyat obtenu a été placé dans un écouvillon contenant 1 mL d'eau distillée stérile afin de préparer un macérât. Ce mélange a été laissé à température ambiante pendant 20 minutes.

Après ce temps de repos, une goutte de la suspension a été prélevée puisensemencée par stries sur les milieux King A et King B, ensuite incubée à 30 °C pendant 24 heures.



**Figure 18:** Étapes de l'ensemencement indirect à partir de la galle :

(a) Écrasement du tissu tumoral,

(b) Transfert dans un écouvillon pour l'obtention d'un macérât,

(c) Ensemencement sur les milieux King A et King B. (Prise personnelle)

### 3.3. Purification et conservation des souches :

#### 3.3.1. Purification :

Après une incubation de 24 heures, les colonies issues des échantillons E1 et E2 ont été observées sur les milieux King A et King B. Elles ont été caractérisées sur la base de leurs aspects macroscopiques, notamment la forme, la taille, la couleur et la texture.

Au total, 21 souches bactériennes ont été sélectionnées puis repiquées sur milieu GN par étalement en stries, afin d'obtenir des cultures pures. Ces repiquages ont été incubés à 37 °C pendant 24 heures.

Les isolats ont été codifiés selon un système combinant le numéro de l'échantillon, la zone de prélèvement et le numéro de la souche. Ainsi, les souches issues de l'échantillon E1 sont : **A1E1S1, A2E1S1, A3E1S1, A3E1S2, A4E1S1, A4E1S2** ; et celles de l'échantillon E2 : **D1E2S1, D1E2S2, D1E2S3, D2E2S1, D2E2S2, D2E2S3, D2E2S4, D2E2S5, D2E2S6, D3E2S1, D4E2S1, R1S1, R1S2, R1S3, R1S4.**



**Figure 19:** Boîtes de Pétri contenant le milieu GN utilisées pour le repiquage des souches (prise personnelle)

### 3.3.2. Conservation des souches :

Les souches bactériennes ont été conservées dans des tubes à essai stériles inclinés, contenant 5 mL de gélose nutritive solide. À l'aide d'une anse de platine stérilisée, une colonie isolée a été prélevée et ensemencée sur la surface du milieu selon la technique de l'étalement en stries.

Après une incubation de 24 heures à 37 °C, les tubes ont été placés au réfrigérateur à 4 °C pour assurer la conservation des souches à court terme.



**Figure 20:** Souches conservées sur gélose nutritive en tubes inclinés (prise personnelle)

### 3.4. Identification phénotypique des échantillons :

L'identification phénotypique a été réalisée à partir de l'analyse des caractères morphologiques (macroscopiques et microscopiques) ainsi que des propriétés biochimiques des isolats, selon les protocoles décrits ci-dessous. Les différents matériaux utilisés, ainsi que les milieux de culture, sont détaillés dans l'**Annexe A**.

### 3.4.1. L'observation macroscopique :

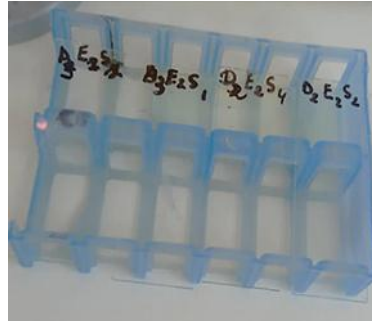
L'examen macroscopique, basé sur l'observation à l'œil nu, a permis de décrire les caractéristiques morphologiques des colonies bactériennes isolées sur milieux King A et B à partir des échantillons 1 et 2, en utilisant les méthodes directe et indirecte.

### 3.4.2. L'observation microscopique :

Pour l'analyse microscopique, 21 frottis bactériens ont été préparés. Chaque frottis a été réalisé en prélevant une colonie sur une lame propre avec une goutte d'eau distillée, puis fixé à la chaleur.

Les lames préparées comprennent :

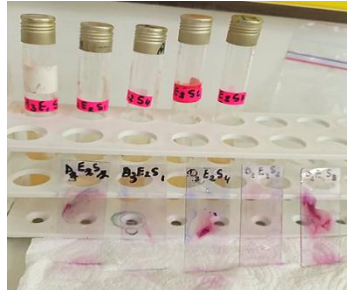
- **6 lames du premier échantillon** : A1E1S1, A3E1S1, A3E1S2, A2E1S1, A4E1S1, A4E1S2
- **15 lames du second échantillon** : D1E2S1, D1E2S2, D1E2S3, D2E2S1, D2E2S2, D2E2S3, D2E2S4, D2E2S5, D2E2S6, D3E2S1, D4E2S1, R1S1, R1S2, R1S3, R1S4



**Figure 21:** Des lames contiennent les souches étudiées (prise personnelle)

- **Processus de coloration de gram :**

La coloration de Gram est une méthode essentielle en microbiologie, utilisée pour différencier les bactéries Gram positives et Gram négatives tout en permettant d'observer leur forme et leur taille. La procédure détaillée de cette technique est présentée en **Annexe B**.



**Figure 22:** Séchage des lames après coloration de Gram (prise personnelle)

- **Observation microscopique :** Les 21 lames colorées ont été examinées au microscope optique (objectif  $\times 100$  à immersion) afin d'évaluer la forme, la coloration, la disposition et d'éventuelles structures spécifiques des bactéries observées.

### 3.5. Les tests biochimiques :

#### 3.5.1. Test de catalase :

Le test de la catalase est une technique biochimique rapide et simple employée en microbiologie pour identifier la présence de l'enzyme catalase dans les bactéries. Cette enzyme est essentielle pour protéger les cellules des effets nocifs du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui est un sous-produit du métabolisme aérobie. (Acharya, 2016)

Ce test présente diverses applications, mais il est principalement employé pour différencier les cocci Gram-positifs.

le test de catalase, réalisé sur 21 souches, consiste à détecter la production de l'enzyme catalase en observant la formation de bulles après contact avec du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).



(a)

(b)

**Figure 23:** Étapes du test de catalase : (a) Ajout du  $H_2O_2$ , (b) Mélange avec la colonie bactérienne prélevée (prise personnelle).

Un test positif se manifeste par une production rapide de bulles d'oxygène, ce qui signale la présence de l'enzyme catalase. En revanche, un test négatif se caractérise par l'absence de bulles ou par une formation très limitée de celles-ci, ce qui indique que la catalase n'est pas présente.

### 3.5.2. Test de coagulase :

différencier *Staphylococcus aureus* (coagulase positif) des autres staphylocoques à coagulase négative (SCN) comme *S. epidermidis* ou *S. saprophyticus*. *S. aureus* produit deux types de coagulase :

- **La coagulase liée**, détectée par le test sur lame, agit en agglutinant les bactéries via le fibrinogène.
- **La coagulase libre**, détectée par le test en tube, transforme le fibrinogène du plasma en fibrine, provoquant la coagulation. (Pradhan, 2013) (Coagulase Test, 2025)

#### Protocole appliqué :

Deux souches (A3E1S1 et D1E2S2) ont été testées par les deux méthodes :

- **Test sur lame** : Une goutte d'eau physiologique est déposée sur une lame propre, suivie de l'ajout d'une colonie bactérienne, puis d'une goutte de plasma. L'agglutination est observée après 10 à 15 secondes.
- **Test en tube** : 100 µL de plasma reconstitué sont transférés dans un tube stérile, puis une colonie est ajoutée. Les tubes sont ensuite incubés pour observer la formation d'un caillot.



(a)

(b)

**Figure 24** : Le test de coagulase (a) : ajout de la colonie bactérienne, (b) : incorporation du plasma. (prise personnelle)

### 3.5.3. Le test d'oxydase :

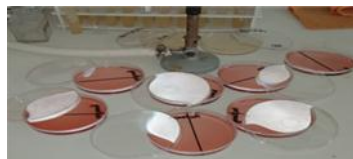
Le test de l'oxydase permet de détecter l'enzyme oxydase chez certaines bactéries, principalement les bacilles à Gram négatif. (Chavan *et al.*, 2022)

Il a été réalisé sur 13 souches : A3E1S2, D2E2S6, D4E2S1, A1E1S1, R1S3, R1S2, D1E2S1, D2E2S2, D2E2S4, A2E1S1, R1S4, D2E2S5, A4E1S1. L'apparition d'une coloration violette dans les 30 secondes indique un résultat positif. Le protocole complet est présenté en **Annexe B**.

### 3.5.4. Test sur la gélose Mac Conkey :

Milieu sélectif et différentiel, favorise la croissance des BGN et permet de distinguer les bactéries selon leur aptitude à fermenter le lactose. (Unicat, 2025)

Treize souches de BGN (A3E1S2, D2E2S6, D4E2S1, A1E1S1, R1S3, R1S2, D1E2S1, D2E2S2, D2E2S4, A2E1S1, R1S4, D2E2S5, A4E1S1) ont été ensemencées par striation sur ce milieu, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.



**Figure 25:** Boîtes de Pétri ensemencées sur gélose MacConkey (réalisation personnelle).

### 3.5.5. Test sur la gélose levane (levine EMB) :

Gélose EMB (Levine), développée initialement en 1916 puis modifiée en 1918 par Levine, est un milieu sélectif et différentiel utilisé pour détecter les bactéries Gram négatif fermentant le lactose. Ces dernières produisent une coloration violet foncé en acidifiant le milieu. (Microbiologie Clinique, 2025)

Treize souches de bacilles à Gram négatif (A3E1S2, D2E2S6, D4E2S1, A1E1S1, R1S3, R1S2, D1E2S1, D2E2S2, D2E2S4, A2E1S1, R1S4, D2E2S5, A4E1S1) ont été ensemencées sur ce milieu par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.



**Figure 26:** Les boîtes de pétri contenant la gélose levane (levine EMB) (prise personnelle)

### 3.5.6. Test de MEVAG(milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides) :

le milieu de Hugh Leifson (M.E.V.A.G.) permet d'identifier la méthode d'attaque du glucose, qui sert de source d'énergie pour la majorité des bactéries. Pour produire de l'énergie, les bactéries peuvent adopter deux approches :

- **La voie oxydative** : le glucose est métabolisé uniquement en présence d'oxygène, entraînant une faible production d'acides.
- **La voie fermentative** : le glucose est utilisé en l'absence d'oxygène, ou en présence d'oxygène mais uniquement en son absence, ce qui conduit à une forte production d'acides.

Pour analyser la méthode d'attaque d'un glucide, on recourt à des milieux contenant un seul type de glucide accompagné d'un indicateur de pH. L'étude de la méthode d'attaque du glucose s'effectue grâce à :

- La présence de glucose comme unique glucide et de BBT comme indicateur de pH. L'utilisation du glucose entraîne une acidification du milieu, ce qui se manifeste par le changement de couleur du bleu de bromothymol vers une teinte acide (jaune).
- L'étape de régénération qui permet d'établir un gradient d'oxygène (Hugh & Leifson, 2025)
- **Protocole appliqué :**

Après avoir préparé le milieu MEVAG ( décrit dans l'annexe A) et stérilisé les tubes à essai dans l'autoclave .

Environ 5ML de gélose sont versés dans chaque tube , puis laissés à refroidir pendant 30minutes . Ensuite, un ensemencement par piqure centrale est réalisé à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Ce test est effectué pour les 13 tubes BGN (A3E1S2 , D2E2S6, D4E2S1, A1E1S1, R1S3, R1S2, D1E2S1, D2E2S2, D2E2S4, A2E1S1, R1S4 , D2E2S5, A4E1S1) .

Enfin les tubes sont incubés à une température de 37°C pendant une durée 24 heures . Dans cette étude, seule la voie oxydative (sans huile de vaseline ) a été utilisée dans un environnement aérobie . (Microbiologie Clinique, 2025b)



**Figure 27:** Les tubes contenant la gélose MEVAG (prise personnelle)

### **3.5.7. Test de fluorescence et identification des souches de *Pseudomonas savastanoi* :**

Le test de fluorescence est une méthode clé pour identifier les bactéries du genre *Pseudomonas*, comme *P. savastanoi*. Cette technique repose principalement sur la production de pigments fluorescents, tels que la pyoverdine.

L'observation de ces pigments se fait dans le milieu King B sous une lumière ultraviolette, à une longueur d'onde de 366 nm, permettant de détecter la fluorescence bleu-vert. Ce test est effectué pour les 13 tubes BGN(A3E1S2 , D2E2S6, D4E2S1, A1E1S1, R1S3, R1S2, D1E2S1, D2E2S2, D2E2S4, A2E1S1, R1S4 , D2E2S5, A4E1S1).

L'incubation se déroule à une température de 28 à 30 °C pendant une durée de 24 à 48 heures.(Temsah et al., 2007)

### **3.5.8. API 20 :**

- **API20E :**
  - **Le principe de l'API20E :**

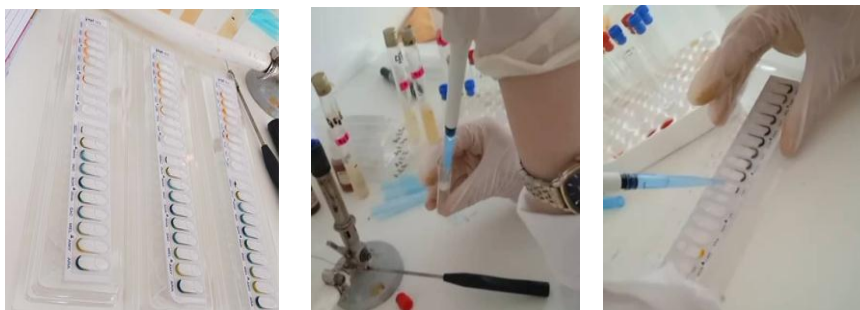
API 20 E est un système d'identification standardisé pour les Enterobacteriaceae et autres bacilles Gram négatifs non exigeants, qui utilise 21 tests biochimiques miniaturisés et une base de données. sa bandelette se compose de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Ces tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue le milieu. Lors de l'incubation, le métabolisme provoque des changements de couleur, soit spontanés,

soit révélés par l'ajout de réactifs. Les réactions sont lues selon le Tableau de Lecture et l'identification est obtenue en se référant à l'Indice de Profil Analytique ou en utilisant le logiciel d'identification. (bioMérieux, 2002)

○ **le protocole appliqué :**

Suite à la préparation de l'eau physiologique, comme décrit en annexe A, par une micropipette 2 ml de cette solution ont été introduit dans chacun des 13 tubes. Par la suite, des colonies de chaque isolat (D2E2S6 .A4E1S1.R1S2 R1S4 R1S3 A1E1S1 A2E1S1 D1E2S4 D2E2S5 A3E1S2 D2E2S2 D4E2S1) ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérilisée au moyen d'un bec Bunsen. ensuite les tubes ont été rempli ainsi que les cupules des tests CIT, VP et GEL avec cette solution, tout en complétant les tubes des tests restants (sans remplir les cupules).

Pour établir un milieu d'anarobiose, de l'huile de paraffine a été ajoutée aux tests ADH, LDC, ODC, H2S et URE. Puis Les 13 bandelettes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, des gouttes de réactifs VP1 et VP2 ont été ajoutées au test de VP, ainsi que le réactif Kovacs au test IND, et le réactif TDA au test de TDA. on a ensuite attendu 10 minutes avant de procéder à la lecture des résultats.



**Figure 28:** Les étapes d'Api 20E avant incubation (prise personnelle)

**API20 NE :**

○ **le principe d'API20NE :**

L'API 20 NE est un système standardisé conçu pour l'identification des bacilles Gram négatif non fermentants, comme *Pseudomonas*. Il se compose de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés : 8 tests biochimiques classiques et 12 tests d'assimilation. Les tests conventionnels sont réhydratés avec une suspension bactérienne saline, tandis que les tests

d'assimilation évaluent la capacité des bactéries à croître avec un substrat minimal. Les réactions sont interprétées selon un tableau de lecture, avec identification via un index ou un logiciel spécifique . (bioMérieux, 2003)

○ **Protocole appliqué :**

Trois isolats (A2E1S1, R1S3, D1E2S1) ont été testés. Une suspension bactérienne a été préparée dans 4 ml d'eau physiologique stérile. Cette suspension a été utilisée pour inoculer les microtubes de NO<sub>3</sub> à PNPG. Les autres cupules ont été remplies sans bulles, et de l'huile de paraffine a été ajoutée sur les tests GLU, ADH et URE. Les bandelettes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, les réactifs Nit 1, Nit 2 (NO<sub>3</sub>) et James (TRP) ont été ajoutés, et la lecture a été faite après 5 minutes. Pour éviter la formation de bulles, l'inoculation a été réalisée en inclinant légèrement la bandelette .

**3.5.9. L'activité pectinolytique par les pommes de terres :**

○ **Le principe :**

Les pectinases sont des enzymes qui agissent de manière spécifique sur les substances pectiques, en réduisant l'adhésivité intracellulaire ainsi que la rigidité des tissus((Kabir & Tasmim, 2019)). Les pommes de terre, en raison de leur teneur significative en pectine, constituent un substrat adéquat pour l'activité enzymatique) (Xu *et al.*, 2014) . Dans ce test l'activité de la pectinase engendre des halos clairs autour des colonies microbiennes, ce qui témoigne de la dégradation de la pectine.(Kabir & Tasmim, 2019)

○ **La méthode utilisée :**

Des tranches de pommes de terre d'une épaisseur de 5 mm ont été désinfectées à l'aide d'éthanol, puis rincées à l'eau distillée. Chaque deux tranches ont été placées dans trois boîtes, chacune divisée en deux compartiments, contenant 10 µl d'eau distillée. Par la suite, 100 µl de suspensions bactériennes provenant de six isolats (D4E2S1, A3E1S2, D1E2S1, A2E1S1, R1S3, R1S4) ont été déposés sur les tranches de pommes de terre à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille stérile. Les boîtes ont ensuite été scellées avec du Parafilm afin de limiter les échanges gazeux et incubées à 37 °C pendant une période de 24 à 48 heures. (Gerardin *et al.*, 2013)

### **3.5.10. Le test de la mobilité bactérienne :**

- **Principe :**

Ce test permet d'évaluer la capacité des bactéries à se mouvoir. Il repose sur l'utilisation d'un milieu semi-solide (0,3 à 0,4 % d'agar) qui autorise le déplacement des bactéries mobiles. Les bactéries immobiles forment une croissance limitée à la ligne d'inoculation, tandis que les bactéries mobiles diffusent dans tout le milieu . (Aryal, 2022) (Medical Laboratory Scientist, n.d.)

- **Méthode utilisée :**

Après préparation du milieu semi-solide (voir annexe A), 5 ml ont été versés dans deux tubes stériles. Une fois solidifiés, les isolats R1S3 et R1S4 ont été inoculés verticalement à l'aide d'une pipette Pasteur. Les tubes ont ensuite été incubés à 37 °C pendant 24 heures.

### **3.5.11. Test d'hypersensibilité sur une plante non hôte (tabac) :**

- **Principe du test :**

Ce test repose sur la capacité d'une bactérie pathogène à induire une réponse hypersensible (HR) chez une plante non hôte, ici *Nicotiana tabacum* (tabac). (Krzyszowska *et al.*, 2007)

Cette réponse de défense rapide, commune à la plupart des plantes supérieures, se traduit par une nécrose localisée au point d'infection, signe d'une réaction positive .

- **Méthode utilisée :**

Des suspensions bactériennes ont été préparées à partir de quatre isolats (R1S4, R1S3, D1E2S1, A2E1S1) dans des tubes contenant 5 ml d'eau distillée chacun. Après prélèvement d'une colonie, les suspensions ont été homogénéisées. Les feuilles de tabac ont été désinfectées à l'éthanol 70 %, rincées à l'eau distillée, puis placées dans deux boîtes de Pétri : l'une divisée en quatre sections pour les essais, l'autre utilisée comme témoin. À l'aide d'une seringue stérile, les suspensions ont été injectées dans le limbe foliaire, principalement sur la face inférieure. De l'eau distillée a été injectée dans la feuille témoin. Les boîtes ont été incubées à température ambiante (37 °C) et les résultats ont été observés après 24 à 48 heures.



(a)

(b)

(c)

**Figure 29:** (a) Feuilles de tabac avant incubation ; (b) feuilles injectées avec les suspensions bactériennes ; (c) feuilles témoins injectées avec de l'eau distillée (prise personnelle).

### 3.5.12. L'activité Anti-microbienne :

#### 3.6.12.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne par diffusion en puits :

La méthode de diffusion en puits sur gélose Mueller-Hinton permet d'évaluer l'activité antimicrobienne d'extraits en observant une zone d'inhibition autour des puits. (Boubric & Boussad, 2007)

La souche R1S4 a été ensemencée, puis les extraits ont été déposés dans des puits réalisés dans la gélose. Après incubation à 37 °C pendant 24 h, la présence ou non d'une zone d'inhibition indique l'efficacité antimicrobienne de l'extrait testé. (WOAH, 2024)



**Figure 30:** Étapes de l'étalement des boîtes selon la méthode des quadrants (prise personnelle).

- **lecture des résultats :**

Après 24 h d'incubation, le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré. Selon leur taille, les souches sont classées de résistantes (<8 mm) à extrêmement sensibles (>20 mm). (Benlahrache & Boudjema, 2022)

### 3.6.12.2. Les extraits utilisés :

- **Huile d'origan (*Origanum vulgare*) :**

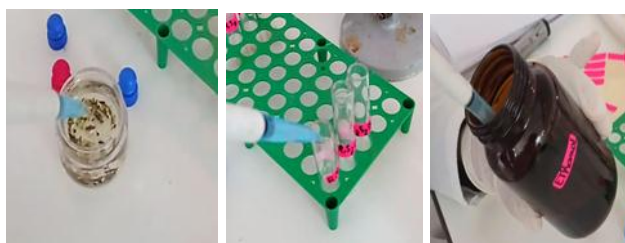
L'huile essentielle d'origan a été obtenue par expression à froid, une méthode mécanique sans chauffage, qui consiste à presser la matière végétale pour extraire l'huile contenue dans l'épicarpe (Purescence Aroma, 2019)

Deux formes de l'extrait ont été testées :

- **Pure** : 100  $\mu$ l d'huile directement déposés dans un puits.
- **Diluée** : un mélange de 100  $\mu$ l d'huile, 100  $\mu$ l d'éthanol et 800  $\mu$ l d'eau distillée, dont 100  $\mu$ l ont été ajoutés dans les puits.

Deux boîtes ont été préparées :

- **Boîte 1** : trois puits contenant respectivement l'huile diluée, l'éthanol, et l'eau distillée (témoins).
- **Boîte 2** : un puits contenant l'huile pure.



**Figure 31:** Étapes de la dilution de l'huile d'origan (prise personnelle)

- **Par l'oxychlorure de cuivre :**

Une suspension d'oxychlorure de cuivre (1 g/100 ml d'eau distillée) a été préparée, puis 100  $\mu$ l ont été déposés dans un puits. Un second puits a reçu 100  $\mu$ l d'eau distillée comme témoin.



(a)

(b)

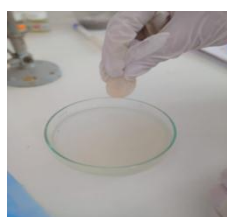
**Figure 32:** Méthode de diffusion en puits à base d'oxychlorure de cuivre : (a) préparation de la dilution ; (b) ajout du diluant dans les puits (prise personnelle).

- **Par extrait d'ail : (*Allium sativum*)**

Dix grammes d'ail pelé ont été écrasés à l'aide d'un mortier et d'un pilon avec 10 ml d'eau distillée. Après 30 minutes de repos à température ambiante, le mélange a été filtré à l'aide d'une compresse stérile pour obtenir l'extrait. Ensuite, 100  $\mu$ l d'extrait concentré ont été déposés dans un puits d'une boîte de Pétri.



(a)



(b)

**Figure 33:** Préparation de l'extrait d'ail : (a) Écrasement de l'ail avec de l'eau distillée ; (b) Pressage manuel pour l'extraction du liquide (prise personnelle).

- **Par les feuilles d'olivier :**

Des feuilles fraîches d'olivier ont été lavées, séchées au soleil, puis réduites en poudre. Un gramme de cette poudre a été macéré dans 10 ml d'éthanol à 70 %, dans un récipient en verre, pendant 24 heures à l'abri de la lumière. Ensuite, 100  $\mu$ l de l'extrait obtenu ont été versés dans un puits d'une boîte de Pétri préparée à cet effet.



**Figure 34:** Mélange de la poudre des feuilles et éthanol à 70% (prise personnelle)

### 3.6.12.3. Mélanges expérimentaux d'extraits végétaux et chimiques :

Afin d'amplifier l'efficacité des extraits naturels et de limiter l'usage de pesticides chimiques, plusieurs combinaisons ont été testées dans le but de maximiser l'effet synergique et de proposer une alternative plus respectueuse de la santé de l'olivier.

#### ➤ **Oxychlorure de cuivre + Huile d'Origanum vulgare :**

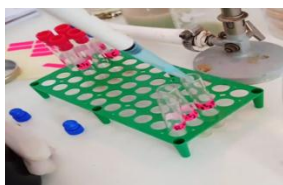
- **Forme pure :** 50  $\mu$ l d'huile d'origan pure ont été mélangés à 0,1 g d'oxychlorure de cuivre, puis le mélange a été introduit dans un puits.
- **Forme diluée :** Le même protocole a été suivi en utilisant l'huile d'origan préalablement diluée.

#### ➤ **Extrait d'ail + Oxychlorure de cuivre + Poudre de feuilles d'olivier :**

Un mélange composé de 0,5 g d'oxychlorure de cuivre, 0,5 g de poudre de feuilles d'olivier et 50  $\mu$ l d'extrait d'ail a été préparé et introduit dans un puits.

#### ➤ **Oxychlorure de cuivre + Huile d'olive :**

0,5 g d'oxychlorure de cuivre ont été mélangés avec 50  $\mu$ l d'huile d'olive, puis le mélange a été déposé dans un puits.



**Figure 35:** Préparation des mélanges d'extraits (prise personnelle)







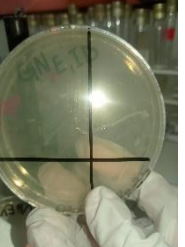



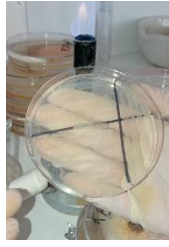

# **Chapitre03**

## **Résultats et discussion**

## 4. Résultats et Discussions :

### 4.1. L'isolement des souches :

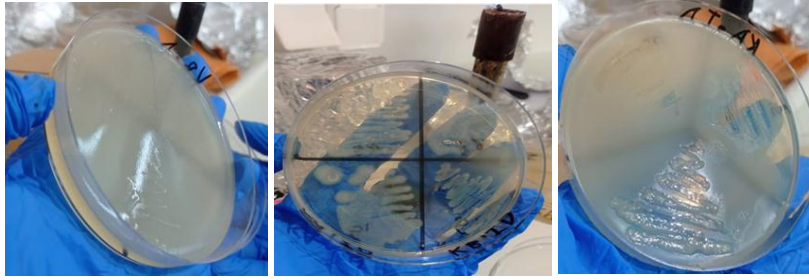
**Tableau 5 :** Résultats obtenus après 24 heures d'incubation selon deux techniques d'isolement (prise personnelle)

Technique échantillons	GN		King B		King A	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
<b>Directe</b>	+	-	+	-	+	+
						
<b>Indirecte</b>	-	-	+	+	+	+
						

+ : culture positive , - : culture négative

### 4.2. Purification des souches :

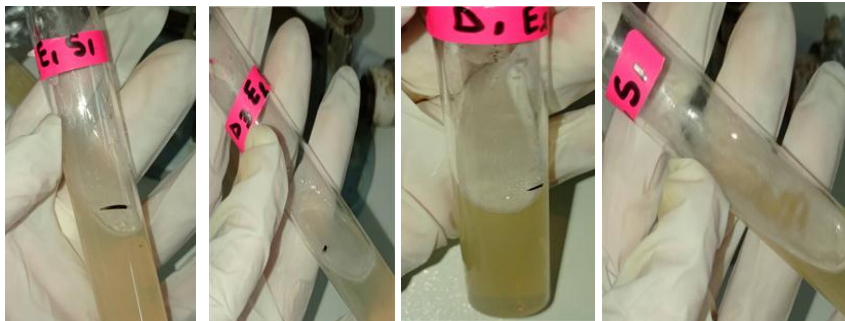
Après repiquage, les souches ont présenté des colonies de couleur blanche à jaunâtre, avec un aspect crémeux ou sec selon les cas. Un envahissement du milieu a été observé pour certaines d'entre elles.



**Figure 36:** Résultats obtenus après repiquage (rise personnelle)

**Conservation des souches :**




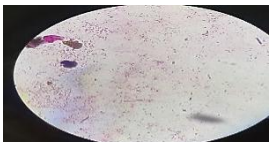
Les souches purifiées ont été conservées à 4 °C dans un réfrigérateur pour préserver leur viabilité.



**Figure 37:** Souches conservées après 24heures d'incubation (prise personnelle)

**4.3. Observation macroscopique et microscopique :**

**Tableau 6 :** Résultats des observations macroscopiques et microscopiques des isolats (prise personnelle)

Isolats	Aspects	Forme	Couleur	Observation macroscopique	forme	Gram	Observation Microscopique
D1E2S3	crémeux	Irrégulière	Jaunâtre		bacilles	+/-	
D2E2S2	crémeux	Irrégulière	Jaunâtre		bacilles	-	

A2E1S1	sèche	Irrégulière	blanc		bacilles	-	
D2E2S1	crémeux	Irrégulière	blanc		bacilles	+	
R1S1	crémeux	Irrégulière	Jaune		bacilles	+	
R1S3	crémeux	Irrégulière	blanc		bacilles	-	
R1S4	Sèche	Irrégulière	blanc		bacilles	-	
A3E1S1	crémeux	Irrégulière	blanc		coccis	+	
D1E2S2	sèche	Irrégulière	jaunâtre		coccis	+	
A4E1S2	crémeux	Irrégulière	blanc		coccis	-	



Selon les observations issues du Tableau 6, la majorité des isolats analysés présentaient des colonies blanches à crémeuses, avec un développement parfois envahissant. Au microscope,

13 d'entre eux se sont révélés être des bacilles à Gram négatif, ce qui correspond aux caractéristiques du genre *Pseudomonas*. Les 8 isolats restants étaient répartis en : 3 bacilles à Gram positif, 2 cocci à Gram positif, 2 bacilles à Gram variable, et 1 cocci à Gram négatif.

D'après (Oulebsir-Mohandkaci *et al.*, 2017), l'isolement de *Pseudomonas savastanoi* sur un milieu sélectif tel que King B conduit généralement à la formation de colonies de couleur blanche ou jaunâtre. L'observation microscopique révèle des bacilles à Gram négatif, caractéristiques typiques de cette espèce. Ces descriptions concordent avec les propriétés morphologiques et cytologiques observées chez nos isolats, suggérant fortement leur appartenance au genre *Pseudomonas*.

#### 4.4. Test catalase et test d'oxydase :

**Tableau 7 :** Réactions catalase et oxydase des bacilles Gram négatif isolés (prise personnelle)

Tubes	Résultats	Catalase	Résultats	oxydase
Les bacilles a gram négatifs		+		+



Les résultats du test catalase sont en accord avec ceux rapportés par (Hassouna *et al.*, 2022) , qui indiquent que tous les isolats testés présentaient une activité catalasique positive.

Par ailleurs, les observations concordent avec les travaux de (Koščak *et al.*, 2023) sur l'identification et la caractérisation de *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* en Croatie, Slovénie et au Portugal. Dans leur étude, les isolats slovènes étaient majoritairement positifs à l'activité oxydasique, ce qui correspond également aux résultats obtenus dans notre cas.

#### 4.5. Test de coagulase :

**Tableau 8 :** Résultats du test de coagulase pour les cocci à Gram positif (CGP)

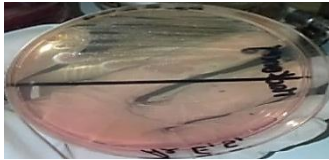


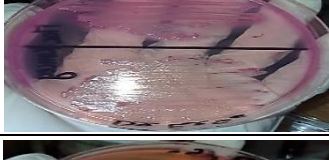
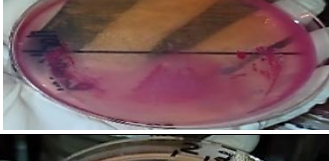

	En lame	En tube
<b>A3E1S1</b>	+	+
<b>Résultats</b>		


D1E2S2	+	+
Résultats		

Les résultats positives de deux méthodes de test de coagulase qui fait pour les cocci a gram positif montrent que ce sont des *Staphylococcus aureus* (Pradhan, 2013)

#### 4.6. Test de Mac conkey :

**Tableau 9** : Résultats du test sur gélose Mac Conkey (prise personnelle)

Isolats	Lactose	Résultats
D2E2S4	-	
A2E1S1	+	
D2E2S2	-	
D1E2S1	+	
D2E2S5	-	
A4E1S1	+	
A3E1S2	+	
D2E2S6	+	
R1S2	-	
R1S3	+	
A1E1S1	-	
D4E2S1	+	

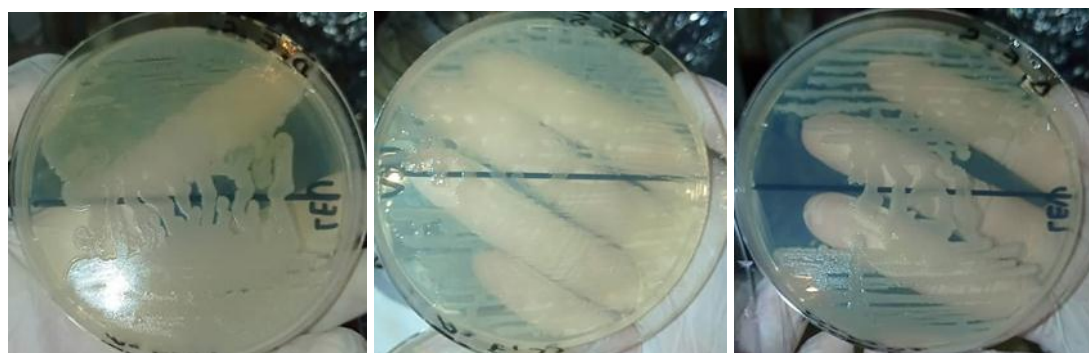
R1S4	-	
------	---	--

+ : acidification du milieu due à la fermentation du lactose ; - : absence d'acidification du milieu

Les résultats obtenus sur gélose Mac Conkey sont en accord avec ceux rapportés par (Fatmi & Sammar, 2019), qui ont étudié des bactéries endophytes isolées d'oliviers infectés. Dans leur étude, la présence de colonies rouges entourées d'un halo opaque, ainsi qu'un virage de couleur du milieu vers le rouge, traduisent une acidification due à la fermentation du lactose, confirmant la précipitation des sels biliaires. À l'inverse, des colonies incolores ou jaunâtres indiquent l'absence de fermentation. Ces observations corroborent nos résultats, suggérant que les isolats présentent des profils métaboliques similaires.

#### 4.7. Test levane :

Les 13 isolats testés ont montré une croissance bactérienne, mais aucune fermentation du lactose ou du saccharose n'a été observée, comme en témoignent les colonies incolores.



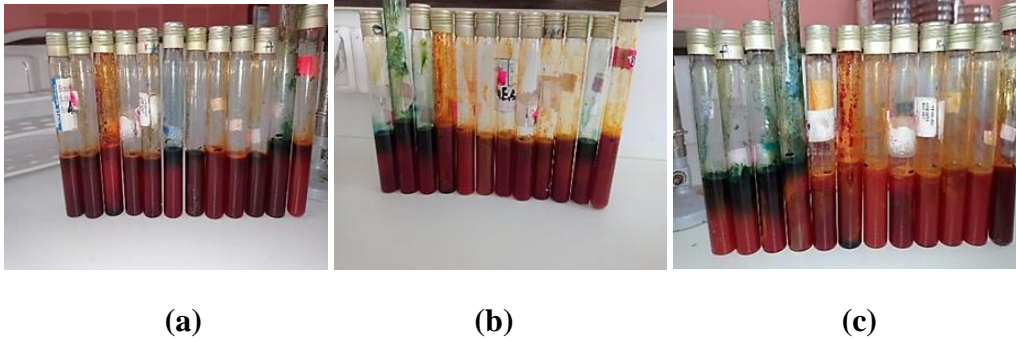
**Figure 38:** Résultats Du test sur gélose levane (prise personnelle)

Selon (Sisto *et al.*, 2004), les isolats turcs de *Pseudomonas savastanoi* présentent également des résultats négatifs au test de Levane, ce qui concorde avec les observations de notre étude.

#### 4.8. Test MEVAG :

Après incubation, les 13 isolats se répartissent en trois groupes selon la couleur des tubes :

- **Tubes rouges (aucun changement) :** A2E1S1
- **Tubes bleu/vert :** A3E1S2, D4E2S1, R1S4, D2E2S5, A1E1S1 indiquant une absence d'acidification du lactose
- **Tubes jaune/orange :** D1E2S1, A4E1S1, R1S2, R1S3, D2E2S6, D2E2S2, D2E2S4 indiquant une acidification du lactose en milieu aérobie



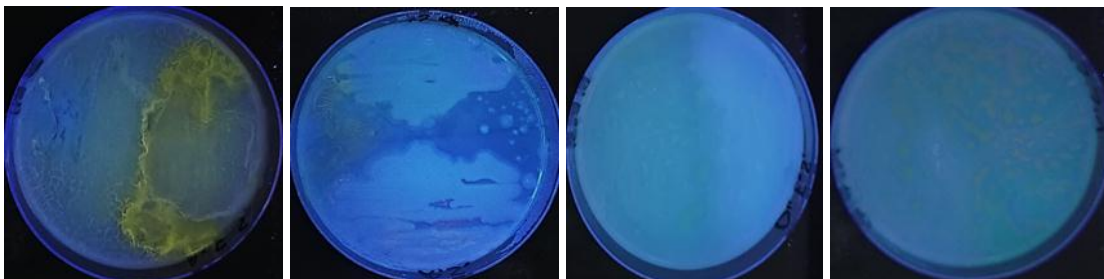
**Figure 39:** : Résultats du test MEVAG après 24h, 48h et 72h d'incubation (prise personnelle)

Le milieu MEVAG contient un indicateur (bleu de bromothymol) qui vire au jaune en cas de production d'acide. Selon (Abdelatif, 2016), ce test permet de différencier les bactéries selon leur métabolisme aérobie ou anaérobie.

Nos résultats montrent que certains isolats n'acidifient pas le lactose (virage au bleu/vert), ce qui suggère un métabolisme strictement aérobie, typique des *Pseudomonas savastanoi*. D'autres isolats, en revanche, présentent une acidification (jaune), traduisant une activité métabolique aérobie plus marquée .

#### 4.9. Test de fluorescence :

La production de pigments fluorescents a été observée chez quatre isolats : **R1S4**, **R1S3**, **D2E2S6** et **D1E2S1**.



**Figure 40:** Résultats du test de fluorescence (prise personnelle)

Les travaux de (Lamichhane & Varvaro, 2013) ont montré que la majorité des souches phytopathogènes de *Pseudomonas spp.* produisent des pigments fluorescents facilement détectables sous lumière UV, notamment sur gélose King B. Cette propriété a été confirmée dans notre étude pour les isolats R1S4, R1S3, D2E2S6 et D1E2S1.

À l'inverse, (Pirc *et al.*, 2015) ont rapporté une fluorescence faible ou absente chez certaines souches, ce qui concorde avec les autres isolats analysés dans le cadre de cette étude, chez lesquels aucune fluorescence marquée n'a été observée.

#### **4.10. Test mobilité :**

La diffusion observée autour de la ligne d'inoculation dans les deux milieux semi-solides indique que les isolats testés sont mobiles.



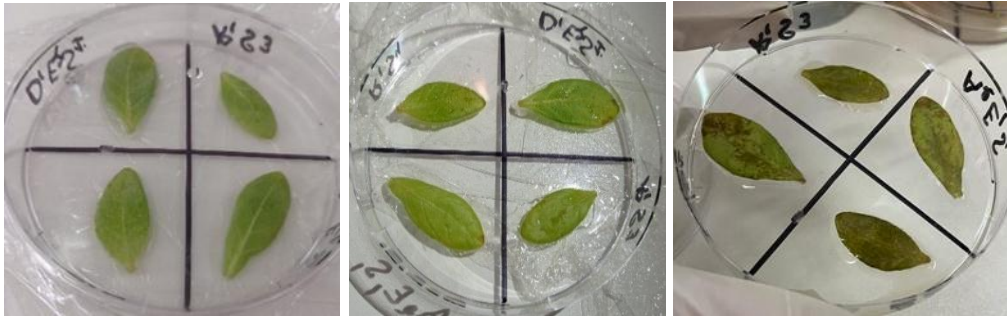
**Figure 41:** Résultats du test de mobilité (prise personnelle)

(Vuletin Selak *et al.*, 2022) ont rapporté que la souche *Pseudomonas* ST1, isolée à partir de nodules d'olivier, présente une mobilité confirmée par microscopie et par la présence de gènes codant pour des structures de motilité telles que les flagelles et les pili. Nos résultats concordent avec ces observations, suggérant également une capacité de déplacement chez les isolats étudiés.

#### 4.11. Test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac et test de pectinase :

##### ○ Test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac :

On observe que les feuilles présentent des signes de flétrissement et de dépérissement à partir de le 3<sup>ème</sup> jour d'incubation, ce qui se traduit par l'apparition de nécroses sur celles-ci.



(a)

(b)

(c)

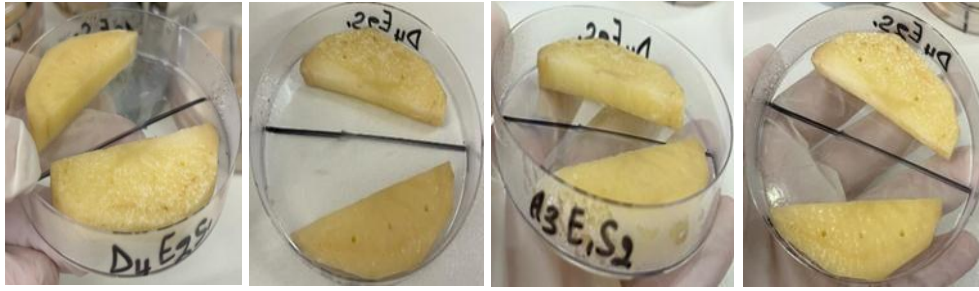
**Figure 42:** Les résultats de test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac (a) Après 24heures (b) Après 48heures (c) Après 72heures (prise personnelle )

La réponse hypersensible (HR) est un mécanisme de défense rapide et localisé des plantes, déclenché par la reconnaissance d'un agent pathogène non compatible. L'apparition de nécroses sur les feuilles de tabac dès le troisième jour d'incubation dans notre test indique que les isolats bactériens testés sont capables d'induire cette réponse, ce qui suggère leur pouvoir pathogène potentiel.

Ces résultats sont en cohérence avec ceux rapportés par (Buonauro *et al.*, 2015), qui soulignent que *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* peut provoquer une réaction d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac, un test couramment utilisé pour détecter la pathogénicité des bactéries phytopathogènes. La présence de nécroses dans nos essais renforce donc l'hypothèse que certains de nos isolats appartiennent à des souches pathogènes du genre *Pseudomonas*

##### ○ Test de pectinase :

Aucun halo clair n'a été observé autour des zones d'inoculation sur les tranches de pommes de terre, ce qui indique l'absence d'activité pectinolytique chez les souches testées.



**Figure 43:** Résultats du test de pectinase sur tranches de pommes de terres (prise personnelle)

Selon (Krid *et al.*, 2011), *Pseudomonas savastanoi* se distingue par une absence ou une très faible production de pectinases, enzymes impliquées dans la dégradation des parois cellulaires végétales. Ce manque d'activité enzymatique limite probablement sa capacité à envahir les tissus internes des plantes.

#### 4.12. Api 20 E et Api 20NE :

Treize souches à Gram négatif (BGN), dont D1E2S1, R1S3, R1S4, A2E1S1, etc., ont présenté des profils biochimiques similaires selon le système API 20E. Parmi elles, deux souches (R1S4 et A2E1S1) ont été sélectionnées pour une identification plus approfondie via l'API 20NE.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 10 :** Les résultats d'Api 20E et 20NE (prise personnelle)

Souche	Api 20 E			Api 20 NE		
	Probabilité	Indice de typicité	Le taxon le plus probable	Probabilité	Indice de typicité	Le taxon le plus probable
<b>R1S4</b>	0.344	-0.46	<i>Serratia marcescens</i>	5144572.00	0.60	<i>Pseudomonas savastanoi</i>
<b>R1S3</b>	—	—	—	5144572.00	0.60	<i>Moraxella spp</i>
<b>A2E1S1</b>	—	—	—	5144572.00	-0.28	<i>Chryseobactérium Indologene</i>

— / : non testé ou résultat non concluant



**Figure 44:** Les résultats d'Api 20NE (prise personnelle)

Selon (Keating *et al.*, 2013) 11,6 % des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* analysés ont été faussement identifiés comme *Moraxella spp.* par l'API 20NE, malgré une identification jugée « très bonne » par le système. Cependant, des analyses moléculaires ont confirmé qu'il s'agissait bien de *P. aeruginosa*.

De la même manière, dans notre étude, certaines souches ont été mal identifiées (par exemple, R1S4 comme *Serratia marcescens*), ou identifiées avec une fiabilité faible (*Chryseobacterium indologenes*). Ces incohérences illustrent les limites du système API pour l'identification précise de certaines bactéries phytopathogènes, notamment celles appartenant au genre *Pseudomonas*.

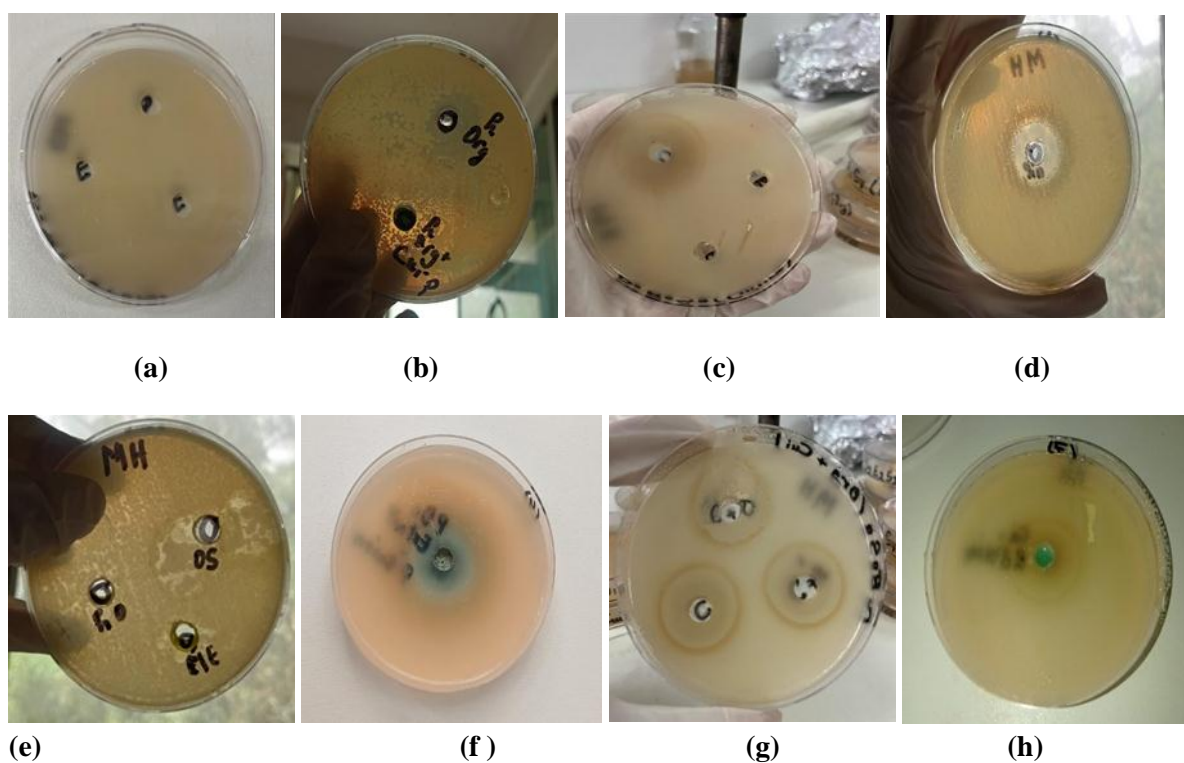
#### 4.13.      **Activité anti microbienne :**

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée à l'aide de la méthode de diffusion en puits. Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 11 :** Résultats de l'activité Anti-microbienne (prise personnelle)

Conditions testés	Diamètres de zones d'inhibition ( mm)	Résultats
Huile d'origan diluée	0	Résistante
Huile d'origan pure	10.5	Sensible
Oxychlorure de cuivre	9	Sensible
Extrait d'ail	9	Sensible

Extrait de feuilles d'olivier	8	Résistante
Cuivre + huile de origan pure	20	Extrêmement sensible
Ail +cuivre +feuilles d'olive	29	Extrêmement sensible
Cuivre + huile de origan diluée	15	Très sensible
Cuivre + huile d'olive	11	Sensible



**Figure 45:** Illustration des tests d'activité antimicrobienne selon les différents extraits et combinaisons utilisés :

(a) l'huile de l'origan diluée avec des puits témoins ( éthanol , eau distillée) (b) l'huile d'origan pure avec un puits combiné avec l'oxychlorure de cuivre (c) l'oxychlorure de cuivre (d) extrait d'ail (e) extrait de feuilles d'olive (f) extrait d'ail, feuilles d'olive et oxychlorure de cuivre (g) oxychlorure de cuivre et l'huile de l'origan diluée (h) oxychlorure de cuivre et l'huile d'olive (prise personnelle)

Les résultats montrent que la plupart des extraits utilisés seuls présentent une activité antibactérienne modérée à faible. En revanche, certaines combinaisons d'extraits révèlent une activité synergique marquée. Notamment :

- Le mélange ail + feuilles d'olivier + cuivre génère la plus grande zone d'inhibition (29 mm), indiquant une forte efficacité.
- L'association cuivre + huile d'origan pure montre également une action remarquable (20 mm).
- D'autres combinaisons, comme cuivre + huile d'origan diluée (15 mm), renforcent également l'effet par rapport aux extraits isolés.

Ces observations suggèrent que l'utilisation combinée d'extraits naturels et de cuivre permet d'améliorer considérablement l'efficacité antimicrobienne, offrant une alternative potentielle aux produits phytosanitaires classiques.

Les résultats de cette étude confirment en partie les données de la littérature :

Selon (Hassinoui & Belhorma, 2019), l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* présente une forte activité antibactérienne contre *Pseudomonas savastanoi*, ce qui rejoint nos observations avec la forme pure.

D'après (Tarakanov & Dzhililov, 2022), les HE d'origan et de thym sont globalement plus efficaces que d'autres extraits naturels, renforçant l'intérêt pour leur usage en biocontrôle.

Concernant l'extrait d'ail, (Al-Obaidy, 2023) indique une activité pouvant atteindre 20 mm contre *Pseudomonas aeruginosa*, alors que nos résultats révèlent une efficacité modérée (9 mm), probablement liée à la concentration ou à la souche cible.

Pour le cuivre, l'étude de (Nguyen *et al.*, 2018) montre une sensibilité variable chez *P. savastanoi* en Californie. De même, (Quesada *et al.*, 2010) n'ont détecté aucune résistance parmi plus de 550 isolats en Espagne, ce qui conforte l'intérêt de ce composé.

Enfin, bien que (Ali *et al.*, 2019) aient rapporté une activité antibactérienne marquée de l'extrait alcoolique de feuilles d'olivier (OLE), notamment via l'inhibition de biofilms, nos résultats montrent une activité modérée (8 mm), possiblement en lien avec la méthode d'extraction ou la concentration appliquée.

# **Conclusion et perspectives**

La tuberculose de l'olivier constitue une problématique phytosanitaire majeure affectant la production oléicole dans plusieurs régions d'Algérie. L'étude menée dans la région d'Aïn Kechra (wilaya de Skikda) a permis l'isolement de 21 souches bactériennes à partir de galles, dont une a été confirmée comme *Pseudomonas savastanoi*. L'identification a été appuyée par des tests biochimiques et des galeries API, révélant également la présence d'autres espèces telles que *Serratia marcescens*, *Moraxella spp.* et *Chryseobacterium indologenes*. L'évaluation de la sensibilité aux extraits naturels et chimiques a montré une inhibition marquée de la souche pathogène par certains traitements, notamment l'ail, l'huile essentielle concentrée d'*Origanum vulgare*, ainsi que l'oxychlorure de cuivre. L'association de plusieurs extraits a renforcé l'effet antimicrobien, ce qui ouvre des perspectives intéressantes pour une lutte alternative, plus respectueuse de l'environnement.

Dans la continuité de ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Il serait tout d'abord pertinent de confirmer l'identification des souches par des approches moléculaires, telles que la PCR ou le séquençage, afin d'assurer une caractérisation précise de l'agent pathogène. Des essais *in vivo* sur des plants d'oliviers en conditions réelles permettraient également de valider l'efficacité des extraits identifiés comme actifs. Il conviendrait aussi d'évaluer l'impact de la maladie sur la qualité de l'huile extraite, tant au niveau physico-chimique qu'organoleptique. Par ailleurs, une comparaison de l'efficacité des extraits sur des souches issues de différentes régions pourrait mettre en évidence d'éventuelles variations de sensibilité. Enfin, il serait judicieux d'évaluer l'innocuité environnementale des traitements proposés et d'envisager leur intégration dans une stratégie globale de lutte, combinant agents naturels, prophylaxie culturale et recours à des plants certifiés.

## Références bibliographiques :

**Al-Obaidy, G. A. A. (2023).** In vitro pathogenicity of *Pseudomonas savastanoi* isolated from olive trees in Iraq on fruits of various plant species and their molecular characterisation. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 19(1), 108–112.

**Abdelatif, C. (2016).** *Contribution à la caractérisation de l'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier dans la région de la wilaya de Djelfa* [Mémoire de master, Spécialité : Protection des végétaux et de l'environnement]. Université Amar Telidji, Laghouat. 69 p

**Acharya, T. (2016).** *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press.

**Alasmari, K., Zeid, I., & Al-Atar, A. (2020).** *Potential health benefits and components of olive oil: An overview*.

**Ali, A. O., Awla, H. K., & Rashid, T. S. (2024).** Investigating the in vivo biocontrol and growth-promoting efficacy of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas fluorescens* against olive knot disease. *Microbial Pathogenesis*, 191, 106645.

**Ali, M. A., Sweedan, E. G., & Muayyed, A. (2019).** *Antimicrobial and antibiofilm activities of alcoholic extract of olive leaves (Olea europaea) against pathogenic bacteria*.

**Analytice. (2024).** *Analytice – Analyses, essais et expertises en laboratoires*.

**Aryal, S. (2022).** *Motility test – Principle, procedure, uses and interpretation*. Microbiology Info

**Barguigua, A., Zahir, I., Youss, S., Fikri, N., & Youss, B. (2020).** *Prospection des maladies microbiennes de l'olivier dans la région Tadla-Azilal*. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 8(3).

**Belaidi, A., Beghami, Y., María, F., Pardo, V., & Souilah, N. (2022).** Ethnobotanic study of medicinal plants in the Guerbes-Sanhadja wetland complex (North East of Algeria). *International Journal of Sciences and Natural Resources*, 1(1).

**Bender, C., Straßmann, S., & Heidrich, P. (2021).** Cellular antioxidant effects and bioavailability of food supplements rich in hydroxytyrosol. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(11), Article 4763.

**Benjama, A. (1999).** *Isolement et identification de l'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier au Maroc* [Mémoire de master, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Meknès].

**Benjama, A. (2003).** Méthode d'évaluation rapide du degré d'attaque de l'olivier par la tuberculose causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, en verger au Maroc. *Fruits*, 58(4), 213–219.

**Benlahrache, R., & Boudjema, S. (2022).** *Évaluation de l'activité antimicrobienne de deux extraits de la plante Centaurea dimorpha* [Mémoire de master, Spécialité : Biochimie]. Université Mentouri Constantine 1. 44 p.

**Bermúdez, B., Pacheco, Y. M., López, S., Abia, R., & Muriana, F. J. G. (2004).** Digestion and absorption of olive oil. *Grasas y Aceites*, 55(1), 1–10.

**Besnard, G., Terral, J. F., & Cornille, A. (2018).** On the origins and domestication of the olive: A review and perspectives. *Annals of Botany*, 121(3), 385–403.

**Bergon Nature & Jardin. (n.d.).** *Les stades phénologiques de l'olivier*. Retrieved June 13, 2025, from

**bioMérieux. (2003).** *API 20 NE: Identification system for non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods* [Notice technique]. bioMérieux sa.

**bioMérieux. (2002).** *API 20 E: Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods* [Notice technique, Réf. 07584D-GB-2002/10]. bioMérieux sa.

**Bio-Rad. (2023).** *Disques OXYDASE 355-3834* [Fiche technique]. Bio-Rad Laboratories.

**Bouaichi, A., Benkirane, R., El-Kinany, S., Habbadi, K., Lougraimzi, H., Sadik, S., Benbouazza, A., & Achbani, E. H. (2019).** Potential effect of antagonistic bacteria in the management of olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(4), 1035–1040.

**Boutkhill, S. (2017).** *Isolement, identification et caractérisation physiologique et pathogénique de quelques pathogènes de l'olivier (Olea europaea L.)* [Thèse de doctorat, Spécialité : Sciences biologiques Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès] Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès.. 78 p.

**Bonkowski, J., et al. (2021).** *Pseudomonas savastanoi*. BugwoodWiki.

**Bouaichi, A., Benkirane, R., Ameer, A., Sadik, S., Benbouazza, A., & Achbani, E. H. (2015).** Characterization of *Pantoea agglomerans* strains isolated from olive knot disease in Morocco. *Biolife*, 3(2), 533–539.

Bonkowski, J., et al. (2021). *Pseudomonas savastanoi*. BugwoodWiki.

**Buonaurio, R., Moretti, C., Da Silva, D. P., Cortese, C., Ramos, C., & Venturi, V. (2015).** The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Frontiers in Plant Science*, 6, Article 434.

**Caballo-Ponce, E., Murillo, J., Martínez-Gil, M., Moreno-Pérez, A., Pintado, A., & Ramos, C. (2017).** Knots untie: Molecular determinants involved in knot formation induced by *Pseudomonas savastanoi* in woody hosts. *Frontiers in Plant Science*, 8, Article 1089.

**Centre Technique de l'Olivier. (2019).** *La bactériose de l'olivier : Symptômes et services de diagnostic* [Fiche technique].

**Chavan, D. D., Khatoon, H., & Kalia, V. (2022).** *Oxidase test: A biochemical method in bacterial identification*. AgriCose Magazine.

**Coagulase test. (2025).** *Microbiologie Clinique*.

**D'Auria, A., Buonincontri, M. P., Allevato, E., Saracino, A., Jung, R., Pacciarelli, M., & Di Pasquale, G. (2017).** Evidence of a short-lived episode of olive (*Olea europaea* L.) cultivation during the Early Bronze Age in western Mediterranean (southern Italy). *The Holocene*, 27(4), 605–612.

**DB-City. (2025).** *Daira Aïn Kechra, Algérie, Skikda – DB-City : Toutes les infos sur les pays, régions, villes et villages*

**Découpage administratif de l'Algérie & Monographie : Monographie de la wilaya de Skikda. (2012).** *Blog : Découpage administratif d'Algérie*.

**Dupin, J., Raimondeau, P., Hong-Wa, C., Manzi, S., Gaudeul, M., & Besnard, G. (2020).** Resolving the phylogeny of the olive family (Oleaceae): Confronting information from organellar and nuclear genomes. *Genes*, 11(12), Article 1508.

**Ercolani, G. L. (1978).** *Pseudomonas savastanoi and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field*. *Journal of General Microbiology*, 109(2), 245–257.

**Fabbri, A. (2023).** A short history of the olive. In A. Fabbri (Ed.), *The olive: Botany and production* (pp. 1–32). CABI International.

**Falek, W., Sion, S., Montemurro, C., Mascio, I., Gadaleta, S., Fanelli, V., Savoia, M. A., Piarulli, L., Bechkri, S., Khelifi, D., & Miazzi, M. M. (2022).** Molecular diversity and ecogeographic distribution of Algerian wild olives (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*). *Scientia Agricola*, 79(3), Article e20200308.

**Fatmi, F., & Sammar, M. (2019).** *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* [Mémoire de master, Spécialité : Biologie moléculaire des microorganismes]. Université des Frères Mentouri – Constantine 1. 70 p.

**Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018).** *Crops and livestock products (FAOSTAT QCL)*. FAO.

**Gamez, R., Cardinale, M., Montes, M., Ramirez, S., Schnell, S., & Rodriguez, F. (2019).** Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla). *Microbiological Research*, 220, 12–20.

**Gardan, L., Bollet, C., Abu Ghorrah, M., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (1992).** DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(4), 606–612.

**Gerardin, D., Rouffiange, J., Kellenberger, I., Schaerer, S., & Dupuis, B. (2013).** Sensibilité de la pomme de terre à la pourriture molle provoquée par *Dickeya* spp. *Recherche agronomique suisse*, 4(6), 288–295.

**Google Earth. (n.d.).** [Location coordinates: 36.79224822, 6.47722906]. Retrieved **June 13, 2025**, (Google Earth, n.d.).

**Hadjloune, H., Kihal, O., Kaci, A., & Belhouadjeb, F. A. (2021).** Quel avenir pour la filière huile d'olive fraîchement introduite dans une zone steppique ? Cas de la région de M'Sila. *New Medit*, 20(2), 125–140.

**Hassinoui, M. E. H., & Belhorma, M. E. K. (2019).** Contribution à l'étude de la tuberculose de l'olivier dans la région de l'Ouest algérien (Mémoire de master, Spécialité Microbiologie appliquée). Université Belhadj Bouchaib d'Aïn Témouchent

**Hassouna, M. A., Mebdoua, S., Mahdi, K., Messad, S., & Lamine, S. (2022).** Investigating the spread of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot disease in Algeria. *Bioscience Research*, 19(1), 726–737.

**Hooune, H., El Bekkali, A., Moukhli, A., Oukabli, A., Santoni, S., El Modafar, C., & Khadari, B. (2009).** Origines et processus de domestication chez l'olivier (*Olea europaea* L.) dans le sud-ouest de la Méditerranée : Relations génétiques entre l'olivier au Maroc et dans la Méditerranée. Communication présentée au colloque « Patrimoine oléicole méditerranéen : Biodiversité, potentialités et perspectives de préservation et d'amélioration », Maroc.

**Hôpitaux Apollo. (2025).** Test de coloration de Gram – Objectif, résultats, plage normale et plus.

**Hugh, R., & Leifson, E. (2025).** The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. American Society for Microbiology.

**Jabbarzadeh-Ganjeh, B., Jayedi, A., & Shab-Bidar, S. (2023).** The effects of olive oil consumption on blood lipids: A systematic review and dose–response meta-analysis of

randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition*, 130(4), 728–736. (Jabbarzadeh-Ganjeh et al., 2023)

**Janse, J. D. (1982).** *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. nov., nom. rev., the bacterium causing excrescences on Oleaceae and *Nerium oleander* L. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(2), 166–169.

**Julca, I., Vargas, P., & Gabaldón, T. (2023).** Phylogenomics of the *Olea europaea* complex using 15 whole genomes supports recurrent genetic admixture together with differentiation into seven subspecies. *BMC Biology*, 21(1), Article 83.

**Kabir, M. S., & Tasmim, T. (2019).** Isolation of pectinase-producing bacteria from the rhizosphere of *Andrographis paniculata* Nees and 16S rRNA gene sequence comparison of some potential strains. *Advances in Microbiology*, 9(1), 1–13.

**Keating, D., Crowe, M. J., Kennedy, B., Salmon, A., Britton, D., Gallagher, C. G., McKone, E. F., & Schaffer, K. (2013).** Molecular detection of an atypical, highly resistant, clonal *Pseudomonas aeruginosa* isolate in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(2), 141–146.

**Košćak, L., Lamovšek, J., Đermić, E., Tegli, S., Gruntar, I., & Godena, S. (2023).** Identification and characterisation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* as the causal agent of olive knot disease in Croatian, Slovenian and Portuguese olive (*Olea europaea* L.) orchards. *Plants*, 12(2), Article 307.

**Krid, S., Gharsallaoui, M., Triki, M. A., & Rhouma, A. (n.d.).** Épidémiologie et étiologie de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, agent causal de la tuberculose de l'olivier en Tunisie. *Revue Ezzaitouna*, 12(1).

**Krid, S., Rhouma, A., Mogou, I., Quesada, J. M., Nesme, X., & Gargouri, A. (2010).** *Pseudomonas savastanoi* endophytic bacteria in olive tree knots and antagonistic potential of strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Plant Pathology*, 92(2), 375–381.

**Krid, S., Triki, M. A., Gargouri, A., & Rhouma, A. (2012).** Biocontrol of olive knot disease by *Bacillus subtilis* isolated from olive leaves. *Annals of Microbiology*, 62(1), 149–154.

**Krzymowska, M., Konopka-Postupolska, D., Sobczak, M., Macioszek, V., Ellis, B. E., & Hennig, J. (2007).** Infection of tobacco with different *Pseudomonas syringae* pathovars leads to distinct morphotypes of programmed cell death. *Plant Journal*, 50(2), 253–264.

**Kumar, A., Singh, B., Paul, K., Bakshi, P., Bajaj, P., Kumar, M., Dhiman, S., Jasrotia, S., Kumar, P., & Dutta, R. (2024).** Hydroxytyrosol in cancer research: Recent and historical insights on discoveries and mechanisms of action. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), Article 129.

**La Librairie Musulmane. (2024).** *L'olivier*.

**La météo toute l'année partout dans le monde – Weather Spark. (n.d.).** *Weather Spark*. Retrieved June 13, 2025 .

**Lamichhane, J. R., & Varvaro, L. (2013).** A new medium for the detection of fluorescent pigment production by pseudomonas. *Plant Pathology*, 62(3), 624–632.

**Licciardello, G., Mosca, A., Di Silvestro, S., Puglisi, D., Russo, M. P., Catara, V., & Caruso, P. (2023).** Cultivar susceptibility to olive knot disease and association with endophytic microbiota community. *Agronomy*, 13(2), Article 468.

**Linnaeus, C. (1753).** *Species Plantarum: exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*. Holmiae: Impensis Laurentii Salvii.

**López, J. M., Penyalver, R., & Matas, 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*. InTech.

**Maghreb Emergent. (2013).** *Algérie – 6,8 millions de litres d'huile d'olive produits dans la wilaya*. Vitamedz

**Maldonado-González, M. M., Prieto, P., Ramos, C., & Mercado-Blanco, J. (2013).** From the root to the stem: Interaction between the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7 and the pathogen *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 in olive knots. *Microbial Biotechnology*, 6(3), 275–287.

**Medical Laboratory Scientist. (n.d.).** *Motility test: Types, principle, method, control & interpretation*. Retrieved June 13, 2025

**Microbiologie Clinique. (2025).** *Gélose EMB*

**Nguyen, K. A., Adaskaveg, J. E., Stanghellini, M. E., & Roper, C. M. (2017).** *Epidemiology and management of olive knot caused by Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in California olive production [Technical report]. University of California, Riverside.

**Nguyen, K. A., Förster, H., & Adaskaveg, J. E. (2018).** Efficacy of copper and new bactericides for managing olive knot in California. *Plant Disease*, 102(5), 892–898.

**Nora, B., Lynda, R., & HENCHIRI, C. (2016).** Analysis of bioactive minor compounds in three olive oils from varieties of olive tree eastern Algerian (Bouricha, Limli and Blanquette). *Journal of Natural Remedies*, 16(4), 154–164.

**Oulebsir-Mohandkaci, H., Selami, S., Belaid, M., & Tihar-Benzina, F. (2017).** *Détection de Pseudomonas savastanoi, agent causal de la tuberculose de l'olivier dans*

trois régions centre d'Algérie. Évaluation de l'effet antagoniste de quelques substances végétales bioactives. In *The 1st International Congress on Biotechnologies for Sustainable Development – CIBSDD* (Boumerdes, Algeria) (Oulebsir-Mohandkaci et al., 2017)

**Panagopoulos, C. G. (1993).** Olive knot disease in Greece. *EPPO Bulletin*, 23(3), 417–422

**Pirc, M., Ravnikar, M., & Dreo, T. (2015).** First report of *Pseudomonas savastanoi* causing bacterial leaf spot of *Mandevilla sanderi* in Slovenia. *Plant Disease*, 99(3), 415.

**Pradhan, P. (2013).** *Coagulase test: Principle, procedure and interpretation – Microbiology and Infectious Diseases.*

**Puressence Aroma. (2019).** *Procédés d'extraction d'une huile essentielle.* Retrieved June 19, 2025

**Quesada, J. M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C. I., Carbonell, E. A., & López, M. M. (2010).** Comparison of chemical treatments for reducing epiphytic *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and for improving subsequent control of olive knot disease. *Crop Protection*, 29(12), 1413–1420.

**Rabiha, K., et al. (2023).** *Catalogue des variétés d'oliviers d'Algérie* [Catalogue technique]. Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV).

**Ramos, R., Penyalver, R., García, A., García, G., Ferrer, A., Bertolini, E., Marí, M., López, M. M., & López, L. (2000).** Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2673–2677.

**Ramos, C., Matas, I. M., Bardaji, L., Aragón, I. M., & Murillo, J. (2012).** *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: Some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13(9), 998–1009.

Sadighara, P. (2021). Determination of iron, zinc, manganese and copper trace elements in traditional and commercial black table olives. *Novel Techniques in Nutrition & Food Science*, 6(1).

Samoa. (2005). *Import health standard for olive trees (Olea europaea L.) from New Zealand.*

**Sanz-Cortés, F., Martínez-Calvo, J., Badenes, M. L., Bleiholder, H., Hack, H., Llácer, G., & Meier, U. (2002).** Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea*). *Annals of Applied Biology*, 140(2), 151–157.

**Surico, G., Evidente, A., Iacobellis, N. S., Randazzo, G., & Savastano, S. P. (1985).** A cytokinin from the culture filtrate of *Pseudomonas savastanoi*. *Physiological Plant Pathology*, 24(7), 309–318.

**Shoda, M. (2000).** Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6), 515–521.

**Sisto, A., Cipriani, M. G., & Morea, M. (2004).** Knot formation caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive plants is *hrp*-dependent. *Phytopathology*, 94(5), 484–491.

**Sidhoum, M. (2020).** *État de la biodiversité de l'olivier au niveau de l'ouest algérien et contribution à sa caractérisation génétique* [Thèse de doctorat, Spécialité : Amélioration de la production végétale et biodiversité]. Université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen. 78 p.

**Smith, E. F. (1908.).** *Recent studies of the olive-tubercle organism.* (Smith, 1908.)

**Souhila boubrit, N. boussad. (2007).** *Memoire Online - Détermination "in vitro " du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée.* - Souhila Boubrit et Nafaa Boussad.

**Stevens, F. L. (1913).** Recent studies of the olive-tubercle organism. *Science*, 40(1022), 876–878.

**Tarakanov, R. I., & Dzhililov, F. S. U. (2022).** Using of essential oils and plant extracts against *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean. *Plants*, 11(21), 2898.

**Temsah, M., Hanna, L., & Saad, A. T. (2007).** Anatomical observations of *Pseudomonas savastanoi* on *Rhamnus alaternus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70(1–3), 1–5.

**Titouh, K., Mazari, A., & Meziane, M. Z. A. (2020).** Contribution to improvement of the traditional extraction of olive oil by pressure from whole and stoned olives by addition of a co-adjutant (talc). *OCL – Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 27, 17.

**Unicat. (2025).** *MAC CONKEY gélose 3 + cristal violet, déshydratée, 500 g [BD-212306]*. (Unicat, 2025)

**University of California Agriculture and Natural Resources. (n.d.).** *Pest Notes* (Publication No. 74156). Retrieved June 15, 2025.

**University of California Agriculture and Natural Resources. (2011).** *Pest Notes: Publication 74156.*

**Vuletin Selak, G., Raboteg Božiković, M., Abrouk, D., Bolčić, M., Žanić, K., Perica, S., Normand, P., & Pujic, P. (2022).** *Pseudomonas* ST1 and *Pantoea Paga* strains cohabit in olive knots. *Microorganisms*, 10(8), 1529.

**Wilson, E. E. (1935).** The olive knot disease: Its inception, development, and control. *Hilgardia*, 9(4), 231–264.

**WOAH. (2024).** Chapitre 2.1.1 – Méthodes de laboratoire utilisées pour les tests de sensibilité des bactéries aux antimicrobiens. Dans *Manuel des tests diagnostiques et des vaccins pour les animaux terrestres* (Section 2.1).

**Xu, F., Kofod, L. V., & Olsen, H. S. (2014).** *Pectinase treatment of potato products* (European Patent No. EP 1 591 019 B2). European Patent Office.

**Zeghba, N. (2014).** *Les ressources génétiques de l'olivier dans la wilaya de Skikda : Production et contraintes* (Mémoire de magistère, Spécialité : Arboriculture fruitière en zone subhumide ). Université 20 Août 1955, Skikda , 100p

**Zucchini, M., Maoloni, A., Lodolini, E. M., Ferrocino, I., Aquilanti, L., & Neri, D. (2023).** Knot formation and spread along the shoot stem in 13 olive cultivars inoculated with an indigenous pathobiome of seven species of *Pseudomonas* including *Pseudomonas savastanoi*. *PLoS ONE*, 18(8), e0289875.

## **Annexes :**

**Annexe A :** composition des milieux de cultures , matériels et produits utilisés :

### **Milieux de cultures (g/l)**

#### **Gélose nutritive :**

- Extrait de viande **3,0g**
- Peptone **5,0g**
- Chlorure de sodium **5,0g**
- Agar **15,0g**
- L'eau distillée **1L**
- PH final = **7,2 ± 0,2 à 25°C**

#### **King B :**

- Mélange de peptone **20,0g**
- Phosphate dipotassique **1,5g**
- Sulfate de magnésium **1,5g**
- Agar bactériologique **14,0g**
- L'eau distillée **1L**
- Glycérol **10ml**
- PH final : **7,0±0,2 à 25°C**

#### **King A :**

- Peptone **20,0g**
- Sulfate de potassium **10,0 g**
- Chlorure de magnésium **1,4g**
- Agar **15,0 g**
- L'eau distillée **1L**
- Glycérol **10ml**
- PH final : **7,2 ± 0,2 à 25°C**

#### **Mac Conkey :**

- Peptone **20,0 g**
- Lactose **10,0g**
- Sels biliaires **5,0g**
- Chlorure de sodium **5,0g**
- Rouge neutre **0.075g**
- Agar **12,0g**
- L'eau distillée **1L**

- PH final :  $7.4 \pm 0.2$  à  $25^{\circ}\text{C}$

**MEVAG :**

- Extrait de viande **50,0g**
- Kcl **5,0g**
- Bleu de bromothymol **10,0g**
- Agar **12,0 à 13,0g**
- Glucose **3,0g**
- L'eau distillée **1L**
- PH final :  $7,0 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$

**Levane :**

- Extrait de levure **2,0 g**
- Peptone **5,0g**
- Na Cl **5,0g**
- Saccharose ou sucre de table **50,0 g**
- Agar **20,0 g**
- Eau distillée **1L**
- PH final :  $7,0 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$

**Semi solide :**

- Peptone **5,0g**
- NaCl **2,5g**
- Agar **1,5 à 2,0g**
- Eau distillée **500ml**
- PH final :  $7,0 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$

**Mueller hinton (MH) :**

- Extrait de bœuf **2,0g**
- Hydrolysate acide de caséine **17,5g**
- Amidon **1,5g**
- Agar **17,0g**
- Eau distillée **1L**
- PH final :  $7,3 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$

**Les milieux de cultures sont stérilisés dans l'Autoclave à  $120^{\circ}\text{C}$  pendant 2 heures**

**Matériels et produits utilisés :**

- **Matériels :**

Appareillage : autoclave, bain marie, balance, incubateur à 37°C et 30°C , lampe UV, bec bunsen , réfrigérateur, agitateur, microscope.

Verreries : bécher, pipette pasteur, tube à essai , tubes à vis , éprouvette graduée , lames, flacons, boites de pétri en verre .

Autres : micro pipette , anse de platine, collecteur de déchets, seringues 5ml, papier filtre, écouvillons , pince , couteau, scotch, étiquettes autocollantes ,ciseaux , embouts bleu et jaune, boites de pétri , mortier et le pilon , pipette en plastique, papier aliminum .



Autoclave



Bain-marie



Balance



Incubateur à 37°C



Ultraviolette



Incubateur à 30°C



Bec bunsen



Agitateur



Anse de platine



Microscope



Collecteur de déchets



Seringues



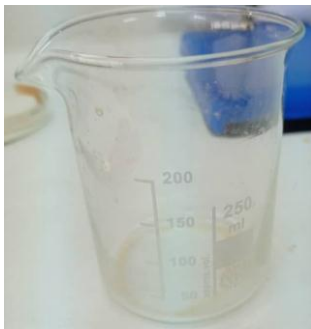
micro pipette



Eprouvette graduée



Papier filtre



Bécher



pipette pasteur



Embouts bleu



lames



Pipette en plastique

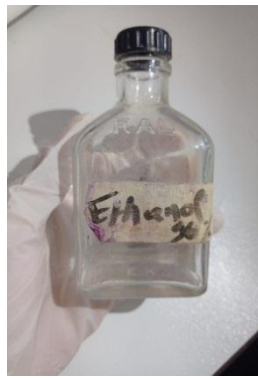
- **Produits** : Eau oxygénée, disque d'oxydase, Nit1 et Nit 2 , kovacs, éthanol , oxychlorure de cuivre, huile d'origan, TDA , huile de paraffine ,violet de gentiane, fushine, lugol, alcool, chlorure de sodium, Glycérol, VP 1 et VP2 ,



Eau oxygénée



Glycérol



Ethanol



violet gentiane



Disques d'oxydase



Nit 1



Nit 2



KOVACS



TDA



VP1



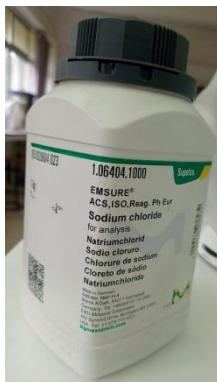
VP2



Fushine



Lugol



Chlorure de sodium



Oxychlorure de cuivre



Huile d'origan pure



Les bandelettes d'Api 20NE



La poudre des feuilles d'olivier

## **Annexe B : Techniques et protocoles**

### **1- La coloration de Gram :**

constitue une étape fondamentale dans l'analyse microbiologique , permettant l'identification des agents pathogènes. Cette méthode facilite la visualisation des bactéries tout en fournissant des informations sur leurs morphologies et leur taille . (Bioutils, 2020) ,elle consiste à appliquer une série de colorants à l'échantillon bactérien pour distinguer les bactéries Gram positives et Gram négative)(hopitaux Apollo, 2025)

- **Violet cristallisé:**On applique quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis fixé, puis on le laisse agir pendant une minute avant de le rincer. Ce colorant adhère au peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne.
- **Iode :**Par la suite, des gouttes de Lugol (un composé iodé) sont appliquées sur le frottis. Il est laissé en contact pendant une minute avant d'être rincé. Le Lugol agit comme un mordant, facilitant la fixation du violet dans les bactéries.
- **Décoloration :** puis, l'alcool est ajouté et laissé agir pendant 30 secondes avant un nouveau rinçage. Cette phase permet de retirer le colorant des bactéries Gram-négatives, qui possèdent des parois cellulaires plus minces ainsi qu'une membrane externe. En revanche, les bactéries Gram-positives conservent le colorant violet.

**Contre-coloration :**Au cours de la l'étape finale, on dépose de rose de fuchsine pendant une minute après avoir effectué un nouveau rinçage . Par la suite, la lame doit être laissée à sécher à l'air libre près de bec Bunsen.

### **2- Protocole d'utilisation les disques d'oxydase :**

À l'aide d'une pince, un disque d'oxydase a été placé sur une lame propre et stérile, puis humidifié avec une goutte d'eau physiologique stérile.une colonie bien distincte et représentative de la culture fraîche à analyser a été sélectionnée et prélevée à l'aide d'une pipette pasteur (l'utilisation d'oèses en métal a été évitée (sauf celles en platine), pour les 13 BGN (A3E1S2 , D2E2S6, D4E2S1, A1E1S1, R1S3, R1S2, D1E2S1, D2E2S2, D2E2S4, A2E1S1, R1S4 , D2E2S5, A4E1S1) .

afin de prévenir des résultats faussement positifs. la colonie a ensuite été frottée délicatement sur le disque et l'apparition d'une coloration violette a été observée dans un délai de 30 secondes .

**Réaction positive** : coloration bleu foncée à violette apparaissant dans un délai de 30 secondes.

**Réaction négative** : absence de coloration ou coloration au-delà de 30 secondes (Bio-Rad, 2023)