

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIC ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة 20 أوت 1955- سكيكدة  
UNIVERSITE 20 AOUT 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

**Identification des bactéries phytopathogènes dans un  
arbre fruitier dans la wilaya de Skikda**

**Présenté Par :**

BERDOUDI Imène

OPIO Daniel

MECHEHOUD Dikra

BOUTOBZA Maissa

**Membre de Jury:**

Dr. BENJAZIA Radia MCA

Présidente

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Dr. Asma Laabid MCA

Promotrice

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Dr. ZADRI Fethia MCB

Examinatrice

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

**Année universitaire 2023/2024**

## **Remerciement**

**Au terme de cette étude, nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout-puissant de nous avoir guidés et sa providence de santé, patience et protection tout au long notre parcours d'études, et le courage pour faire face à toutes les difficultés et obstacles qui ont jalonné notre parcours.**

**Nous souhaitons exprimer nos remerciements particuliers à notre Encadrant, Dr. Labid Asma, qui a été constamment présente à nos côtés tout au long de cette année pour nous orienter et nous apporter une aide précieuse, nous permettant ainsi d'approfondir au maximum notre travail et d'être fiers du résultat obtenu aujourd'hui.**

**Nous adressons également nos sincères remerciements aux ingénieurs de laboratoire de l'université, qui nous ont aidées à travailler en laboratoire avec bienveillance, et à qui nous accordons grand respect.**

**Nous exprimons notre gratitude envers les membres du jury, en particulier le Dr. BENJAZIA Radia (MCA) qui a présidé ce mémoire, et le Dr. ZADRI Fethia (MCB) qui a accepté d'examiner ce travail.**

**Enfin, nous tenons à remercier tous les enseignants qui ont contribué à notre formation universitaire, et qui ont joué un rôle important dans notre parcours.**

## **Dédicaces**

*C'est avec grand plaisir que nous dédions ce mémoire à nos très chers parents source de nos vies, d'amour et d'affection.*

*À nos frères et sœurs qui nous ont soutenu et encouragé durant ces années d'études. Qu'ils trouvent ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.*

*À tous nos familles de loin où de près qui ont partagés avec nous tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail.*

*À tous nos amis qui nous ont toujours encouragés et à qui nous souhaitons plus de succès.*

*A tous ceux que nous aimons.*

*A notre groupe ; **BERDOUDI Imene – BOUTOBZA Maïssa – MECHEHOUD Dikra – OPIO Daniel**, on se souhaite bonne chance et à la réalisation de nos prochains projets.*

## Tableau de matières

Remerciement

Dédicaces

Tableau de matières

Liste des abréviations

La liste des figures

La liste des Tableaux

Résumé

Abstract

ملخص

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Présentation de l'olivier</b> .....	<b>3</b>
1.1 Histoire et Origine de l'Olivier .....	3
1.2 Origine et Symbolisme .....	3
1.3 Origine Géographique et Domestication .....	3
1.4 L'olivier en Algérie .....	3
1.5 La Culture de l'Olivier en Algérie .....	4
1.6 Olivier (Description et généralités) :.....	4
1.7 Classification de l'olivier.....	4
1.8 Description morphologique :.....	5
1.9 Formes de l'olivier .....	7
1.10 Cycle végétatif : .....	7
1.11 L'intérêt d'olivier : .....	8
1.12 Variétés des oliviers en Algérie :.....	8
<b>2 II. La tuberculose de l'olivier</b> .....	<b>10</b>
2.1 Mode de propagation de la maladie : .....	10
2.2 Répartition géographique de la tuberculose de l'olivier dans le monde :.....	10
2.3 La tuberculose de l'Olivier en Algérie .....	11
2.4 Les symptômes de la tuberculose de l'olivier :.....	12
2.5 Agent Causal de la Tuberculose de l'Olivier .....	13
2.6 Historique de la Classification de l'Agent Causal.....	13
2.7 Caractéristiques de la Bactérie.....	14
2.8 Classification de Pseudomonas savastanoi : .....	14
2.9 Pouvoir pathogène : .....	15
2.10 Le cycle de développement de la bactérie au sein de l'olivier .....	15
2.11 Impact de la maladie :.....	16

2.12	La lutte contre la tuberculose de l'olivier : .....	16
2.13	Lutte Chimique contre la Tuberculose de l'Olivier.....	16
2.14	La lutte biologique : .....	18
2.15	Avantages de la Lutte Biologique.....	18
2.16	<i>Bacillus subtilis</i> : Un Agent Biologique Prometteur .....	19
2.17	La lutte culturale.....	19
<b>3</b>	<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>23</b>
3.1	Objectif.....	23
3.2	Échantillonnage : .....	23
3.3	Isolation : .....	23
3.4	Observation macroscopique : .....	24
3.5	Observation microscopique :.....	24
3.6	Test de catalase :.....	25
3.7	Test de coagulase : .....	25
3.8	Test d'oxydase : .....	26
3.9	Test sur gélose Mac Conkey: .....	26
3.10	Activité pectinolytique.....	27
3.11	Test d'Hypersensibilité sur Feuille de Tabac.....	27
3.12	Galerie Api .....	28
3.13	Test de Levane .....	29
3.14	Test de MEVAG (Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides ) :.....	30
3.15	Test de Fluorescence et Identification des Souches de Pseudomonas .....	30
	<b>Résultats et Discussions .....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>Isolation des Souches Bactériennes .....</b>	<b>33</b>
4.1	Purification des Souches Bactériennes .....	33
4.2	Conservation :.....	34
4.3	Observation macroscopique :.....	35
4.4	Observation microscopique .....	36
4.5	Test Levane : .....	39
4.6	Test de MEVAG : .....	39
4.7	Test catalase : .....	39
4.8	Test coagulase : .....	40
4.9	Test d'oxydase : .....	41
4.10	. Test sur gélose Mac Conkey.....	42
4.11	Activité pectinolytique.....	42
4.12	Hypersensibilité de feuille de tabac.....	43

4.13	Test de fluorescence.....	43
4.14	Résumé des Résultats des Tests Biochimiques (LOPAT), Fluorescence et Pathogénicité	44
4.15	Galerie API.....	46
	<b>Discussions.....</b>	<b>46</b>
	<b>Conclusion .....</b>	<b>49</b>
	<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>50</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>54</b>

## Liste des abréviations

AIA : l'acide indole – 3 – acétique  
B.M : Bassin méditerranéen  
EA : échantillon A  
EB: Échantillon B  
FAO: Food and Agricultural Organisation  
GC : les souches pures de King B.  
GN : gélose nutritive  
GPC : les souches pures de GN  
H<sub>2</sub>O : eau  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : l'eau oxygénée  
IND: Indole  
INPV : institut national de la protection des végétaux  
KA: milieu King A  
KB: milieu King B  
O<sub>2</sub>: oxygène  
PSV: *Pseudomonas savastanoi pv. Savastanoi*  
Pv: pathovars  
SCN: staphylocoques à coagulase négative  
UV : Ultras Violet  
VP: Voges-Proskauer

## La liste des figures

Figure 1: Olivier sauvage suffisamment haut et à l'abri pour entrer en production (Haute-Corse).(Christian et Catherine 2023).....	5
Figure 2: Feuille et Fleurs d'olivier (Belguerri, 2016).....	6
Figure 3: Fruits d'olivier (Belguerri, 2016).....	6
Figure 4: Un arbre de l'olivier cultivée(Iran)(COI 2023).....	7
Figure 5: Le cycle annuel de l'olivier (APO, 2016).....	8
Figure 6: Carte géographique des régions les plus touchées par la tuberculose de l'olivier (Benjama, 2003).....	11
Figure 7: Répartition de la tuberculose de l'olivier dans le monde. (Source FAO .Marchier et al,2009). .....	11
Figure 8: Aspect des tumeurs à tuberculose sur rameau d'olivier.(Benjama 2003).....	12
Figure 9: Les galls (tumeurs) sur les feuilles et fruits.( Source INPV, Lekikot, 2017).....	13
Figure 10: Une micrographie à contraste de phase d'une cellule <i>Pseudomonas</i> (Prescott, 2018).....	14
Figure 11: Étalement directe sur le milieu King A et King B(prise personnelle ) .....	23
Figure 12: Étalement indirecte sur le milieu KA et KB (prise personnelle ) .....	24
Figure 13: Conservation dans les tubes à essai inclinés. (Prise personnelle ) .....	24
Figure 14: Méthode de La coloration de gram. (Prise personnelle ) .....	25
Figure 15: Test de catalase (Prise personnelle ) .....	25
Figure 16: Test de coagulase (Prise personnelle ) .....	25
Figure 17: Test d'oxydase. (Prise personnelle ) .....	26
Figure 18: Test sur gélose Mac Conkey (Prise personnelle ) .....	27
Figure 19: Technique du test de MEVAG(prise personnelle ).....	30
Figure 20: Echantillon A (prise personnelle ) .....	33
Figure 21: Echantillon B (prise personnelle ).....	33
Figure 22: Résultat de purification sur GN(GP) (prise personnelle ).....	33
Figure 23: Résultat de purification sur KB(KBP) (prise personnelle ) .....	33
Figure 24: Résultats de conservation sur KB (prise personnelle ).....	34
Figure 25: Résultats de conservation sur GN (prise personnelle ) .....	34
Figure 26: Résultat du test Levane des souches (prise personnelle ) .....	39
Figure 27: Résultat de test MEVAG (prise personnelle ).....	39

Figure 28: Observation (résultat) du test Mac Conkey (prise personnelle ).....	42
Figure 29: Le résultat de test de l'activité péctinolytique ; après 3jours (à gauche), après 5 jours (à droite) (prise personnelle ).....	43
Figure 30: Résultat de test de fluorescence. Résultat positif pour la souche B1 (à gauche). Résultat négatif pour la souche A7 (prise personnelle ).....	43
Figure 31: L'ajout des réactifs après l'incubation à 37°C (prise personnelle ).....	46
Figure 32: Les réactifs de la galerie API 20E et 20NE. Réactif de KOVACS, réactif de VOGUES PROSKAUER 1 & 2 (à gauche). Réactif NIT1 et NIT2 pour API 20NE (à droite) (prise personnelle).....	46

## La liste des Tableaux :

Tableau 1: Les principales variétés nationales (Saad, 2009). .....	9
Tableau 2: Résultat macroscopique des 16 isolats. ....	35
Tableau 3: Résultat microscopique des isolats des Cocci à gram –.....	36
Tableau 4: Observation microscopique des souches Cocci à gram (+). ....	37
Tableau 5: Observation microscopique des bacilles .....	38
Tableau 6: Résultats du test catalase .....	40
Tableau 7: Tableau représentant le résultat de test de coagulase.....	41
Tableau 8: Tableau représentant le résultat du test oxydase .....	41
Tableau 9: Tableau de résultats du test de Mac Conkey. ....	42
Tableau 10: résumé des résultats des tests biochimiques (LOPAT), fluorescence et test de pathogénicité .....	44
Tableau 11: Résumé des Résultats.....	45

## Résumé

L'olivier est l'un des plus anciens arbres fruitiers, principalement cultivé dans les pays méditerranéens, et est apprécié pour ses propriétés alimentaires et thérapeutiques. Cependant, la tuberculose de l'olivier, une maladie bactérienne causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, entraîne la formation de nodules (galles) sur le tronc et les branches de l'arbre, causant des dommages considérables à la culture de l'olivier, notamment en Algérie.

Les objectifs de cette étude sont d'isoler et d'identifier le phytopathogène responsable de la tuberculose de l'olivier, ainsi que d'autres bactéries endophytes, à partir d'échantillons prélevés sur des oliviers infectés de la variété Sigoise, cultivés dans le verger de la commune de Zerdaza, dans la wilaya de Skikda.

Les profils phénotypiques des isolats ont été déterminés en utilisant le test LOPAT et les galeries API 20E. Au total, 16 souches pures ont été isolées parmi lesquelles 11 isolats étaient de forme Cocci, dont 6 souches de Cocci à Gram négative et 5 Cocci à Gram positive. Cinq (5) souches présentant de forme bacillaire composées de la souche B3 un bacille à Gram positive (+) et 4 souches à Gram négative. Parmi les isolats de bacille à Gram –, deux bactéries à Gram négatif (A8 et A11) ont été identifiées comme *Burkholderia cepacia* (anciennement appelé *Pseudomonas cepacia*) et *Pseudomonas fluorescens* respectivement, tandis que la souche (B2) a été identifiée comme *Pseudomonas syringae*. La souche (A4), un bacille à Gram négatif et oxydase positive, a été identifiée par la galerie API 20E comme *Pseudomonas savastanoi*.

L'intégration de la génomique est essentielle pour confirmer et identifier précisément les isolats, tandis que des plants de certification doivent être utilisés pour prévenir tout risque d'infestation future.

**Mots clés :** Olivier, tuberculose de l'olivier, galles, *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, phytopathogène, profils phénotypiques, test LOPAT, *Burkholderia cepacia*

## Abstract

The olive tree is one of the oldest fruit trees, mainly cultivated in Mediterranean countries, and is appreciated for its nutritional and therapeutic properties. However, olive knot, a bacterial disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, causes the formation of nodules (tumours) on the trunk and branches of the tree, causing considerable damage to olive cultivation, particularly in Algeria.

The objective of this study is to isolate and identify the phytopathogen responsible for olive knot, as well as other endophytic bacteria, from samples taken from infected olive trees of the **Sigoise** variety, grown in the orchard in the commune of Zerdaza, in the wilaya of Skikda.

The phenotypic profiles of the isolates were determined using the LOPAT test and API 20E galleries. In total, 16 pure strains were isolated among which 11 isolates were of the Cocci form, including 6 strains of Gram-negative Cocci and 5 Gram-positive Cocci. Five (5) strains presenting a bacilli form composed of strain B3, a Gram-positive (+) bacillus and 4 Gram-negative strains. Among the Gram-bacteria isolates, two Gram-negative bacteria (A8 and A11) were identified as *Burkholderia cepacia* (formerly called *Pseudomonas cepacia*) and *Pseudomonas fluorescens* respectively, while the strain (B2) was identified as *Pseudomonas syringae*. The strain (A4), a Gram-negative and oxidase-positive bacillus, was identified by the API 20E gallery as *Pseudomonas savastanoi*.

Integration of genomics is essential to accurately confirm and identify isolates, while certified plants should be used to prevent any risk of future infestation.

**Keywords:** Olive tree, olive knot, tumours, *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, phytopathogen, phenotypic profiles, LOPAT test, *Burkholderia cepacia*

## ملخص

تعتبر شجرة الزيتون من أقدم الأشجار المثمرة، وتزرع بشكل رئيسي في دول البحر الأبيض المتوسط، وتحظى بتقدير كبير *Pseudomonas savastanoi* ومع ذلك، فإن مرض السل الزيتون، وهو مرض بكتيري يسببه. لخصائصها الغذائية والعلاجية يتسبب السافاستانوي في تكوين عقيدات على جذع الشجرة وأغصانها مما يسبب ضررا كبيرا لزراعة الزيتون خاصة في *pv.* الجزائر.

تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتحديد العامل الممرض المسؤول عن درنة الزيتون، بالإضافة إلى البكتيريا الداخلية الأخرى، من عينات مأخوذة من أشجار زيتون مصابة من صنف سيجواز، مزروعة في بستان بجماعة زردازة، بولاية سكيكدة.

تم عزل 16 عزلة نقية منها 11 عزلة من API 20E ومعارض LOPAT تم تحديد السمات المظهرية للعزلات باستخدام اختبار المكورات من شكل المكورات منها 6 سلالات من المكورات سالبة الجرام و 5 عزلات من المكورات موجبة الجرام. خمس (5) ، وعصية موجبة الجرام (+) و 4 سلالات سلبية الجرام. من بين عزلات بكتيريا B3 سلالات تقدم شكلاً عصياً مكوناً من السلالة التي كانت تسمى سابقاً *Burkholderia cepacia* وهما (A8 و A11) الجرام، تم تحديد نوعين من البكتيريا سالبة الجرام على أنها (B2) على التوالي، بينما تم تحديد السلالة *Pseudomonas fluorescens* و *Pseudomonas cepacia* API ، وهي عصية سالبة الجرام وإيجابية الأكسيداز، بواسطة معرض (A4) تم التعرف على السلالة *Pseudomonas syringae*. *Pseudomonas savastanoi* على أنها 20E.

يعد تكامل علم الجينوم أمراً ضرورياً لتأكيد وتحديد العزلات بدقة، في حين يجب استخدام مصانع إصدار الشهادات لمنع أي خطر للإصابة في المستقبل.

**الكلمات المفتاحية:** شجرة الزيتون، درنة شجرة الزيتون، الكرات، *Pseudomonas savastanoi pv. Savastanoi*، مسببات الأمراض النباتية، الملامح المظهرية، اختبار LOPAT، *Burkholderia cepacia*



## Introduction

La wilaya de Skikda, située dans le nord-est de l'Algérie, est une région connue pour sa diversité agricole, incluant une large variété d'arbres fruitiers qui sont des plantes cultivées principalement pour leurs fruits comestibles. Ils jouent un rôle fondamental dans l'alimentation humaine, l'agriculture et l'économie mondiale. Parmi les arbres fruitiers les plus couramment cultivés, on trouve les pommiers, poiriers, cerisiers, pêchers, pruniers, figuiers, et oliviers. Chaque espèce d'arbre fruitier a ses propres exigences en termes de climat, de sol et de pratiques culturales.

L'olivier (*Olea europaea*) est un arbre fruitier largement cultivé dans les régions de climat méditerranéen pour ses olives, dont l'huile est une composante essentielle de nombreuses cuisines et cultures. Cette culture revêt une importance économique et sociale majeure dans les pays méditerranéens, où la majorité des oliveraies mondiales sont concentrées.

En Algérie, l'olivier joue également un rôle significatif, avec environ 32 millions d'arbres répartis sur plus de 328 000 hectares. Cependant, la productivité de ces vergers est souvent limitée par divers facteurs biotiques et abiotiques, notamment les attaques de pathogènes tels que les bactéries et les champignons.

La tuberculose de l'olivier, causée par la bactérie *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, est l'une des maladies les plus graves affectant l'olivier. Cette maladie se manifeste par la formation de tubercules sur les branches et les tiges de l'arbre, réduisant ainsi la croissance, le rendement et la qualité de l'huile d'olive produite. Bien que cette maladie soit présente depuis des siècles, sa prévalence continue de poser un défi pour les agriculteurs et les autorités agricoles.

Cette étude vise à comprendre les causes des tumeurs observées sur les oliviers de la région de Zerdaza, dans la wilaya de Skikda, en Algérie. Pour ce faire, des échantillons de tumeurs fraîches ont été prélevés et des souches bactériennes isolées. Les tests biochimiques et de phytopathogénicité ont ensuite été réalisés pour identifier et confirmer l'agent pathogène responsable de ces tumeurs.

Le plan de travail de cette étude comprend une revue de la littérature sur l'olivier et la tuberculose de l'olivier, suivie par une description du matériel et des méthodes utilisés dans la partie pratique de l'étude. Les résultats obtenus seront discutés en détail, et des conclusions générales ainsi que des perspectives pour de futures recherches seront fournies.

En conclusion, cette étude contribuera à mieux comprendre la tuberculose de l'olivier en Algérie et à développer des stratégies de prévention et de lutte efficaces contre cette maladie

# **Chapitre I :Synthèse bibliographique**

# 1 Présentation de l'olivier

## 1.1 Histoire et Origine de l'Olivier

L'olivier (*Olea europaea*), est un arbre vénéré et cultivé depuis des millénaires, il est profondément enraciné dans l'histoire des civilisations méditerranéennes

## 1.2 Origine et Symbolisme

### Références Historiques et Religieuses :

L'olivier est cité dans le Saint Coran comme un arbre béni, soulignant son importance spirituelle et symbolique.

Le terme « olive » apparaît dans la langue française en 1080, dérivé du provençal « oliva » et du latin « Olea ». Le terme « huile » dérive du latin « oleum », signifiant « huile d'olive », attesté dès le XIIe siècle.

L'olivier est universellement reconnu comme un symbole de paix, de sagesse, de fertilité, de prospérité et de victoire.

## 1.3 Origine Géographique et Domestication

### ➤ Méditerranée :

La Méditerranée est le foyer originel de l'olivier, où il a commencé à être cultivé il y a environ 7000 ans. Les premières preuves de domestication remontent à la période néolithique en Grèce.

La culture domestique de l'olivier aurait probablement commencé en Crète, comme le confirment les données archéologiques de la période minoenne (3000-1000 avant JC).

### ➤ Expansion par les Civilisations Antiques :

**Phéniciens et Grecs :** Les Phéniciens et les Grecs ont joué un rôle crucial dans la propagation de l'olivier à travers la Méditerranée. Les Grecs l'ont introduit dans leurs colonies, notamment en Sicile, en France, en Espagne et le long de la côte de la mer Noire.

**Rome Antique :** L'huile d'olive a fait l'objet d'un important commerce entre l'Algérie et Rome, soulignant son rôle économique vital.

### Propagation Mondiale

### ➤ Europe et Afrique du Nord :

**Méditerranée Européenne :** L'olivier s'est propagé en Italie, en France, en Espagne, et au Portugal grâce aux commerçants et aux conquêtes.

**Afrique du Nord :** Il a également été introduit en Tunisie, au Maroc, en Algérie et en Égypte.

### ➤ Époque Moderne :

**Amérique et Australie :** Les colons européens ont introduit l'olivier en Amérique, notamment en Californie, ainsi qu'en Australie, où il est maintenant largement cultivé.

## 1.4 L'olivier en Algérie

### Histoire Ancienne :

La culture de l'olivier en Algérie remonte à l'Antiquité. Les paysans algériens ont cultivé l'olivier pendant des siècles, en faisant une base économique essentielle pour la population rurale.

À l'époque romaine, l'huile d'olive algérienne était un produit commercial important, exporté vers Rome.

L'histoire de l'olivier en Algérie est marquée par diverses invasions qui ont influencé sa répartition géographique. À l'indépendance de l'Algérie, cet héritage agricole a perduré.

### **1.5 La Culture de l'Olivier en Algérie**

L'olivier, arbre emblématique des paysages méditerranéens, occupe une place prépondérante en Algérie. Sa culture, profondément ancrée dans l'histoire et les traditions agricoles du pays, joue un rôle vital tant sur le plan économique que socioculturel.

### **1.6 Olivier (Description et généralités) :**

L'olivier est un arbuste pouvant atteindre jusqu'à 15 mètres de hauteur, appartenant à la famille des Oléacées, qui comprend une quarantaine d'espèces et sous-espèces réparties dans le monde entier (Kaniewski et al. 2012). De nos jours, la culture de l'olivier est très développée dans les pays méditerranéens, où près de 95 % de la production mondiale est réalisée, ainsi que dans d'autres pays comme les États-Unis, l'Iran et l'Australie (Hall et al. 2004). Les produits de l'olivier, notamment les fruits et l'huile, occupent une place significative dans l'économie des pays producteurs d'olives, jouant un rôle direct ou indirect dans la sécurité alimentaire, la santé (COI 2023) et comme source de revenus grâce à l'exportation.

### **1.7 Classification de l'olivier**

Selon la classification classique, l'olivier fait partie de la famille des Oléacées, qui regroupe plusieurs espèces. Dans le bassin méditerranéen, on distingue deux variétés botaniques : *Olea europaea* spp. *europaea* pour les formes cultivées, et *Olea europaea* spp. *sylvestris* pour les arbres sauvages et spontanés, communément appelés oléastres (Kaniewski et al. 2012).

- **Règne:** *Plantae*
- **Embranchement :** *Magnoliophyta*
- **Sous-embranchement :** *magnoliophytina*
- **Classe :** *Magnoliopsida*
- **Sous-classe :** *Asteridae*
- **Ordre :** *Scrophulariales*
- **Famille :** *Oleaceae*
- **Genre :** *Olea*
- **Espèce :** *Olea europea*

D'autres sous-espèces peuvent être trouvées sur les cinq (5) continents de l'Afrique, de l'Europe du Sud, de l'Asie, de l'Australie et de l'Océanie. Ce sont *cupsidata* (de l'Afrique du sud jusqu'au sud de

l’Egypte, du sud de l’Arabie Saoudite Jusqu’en Chine) *africana* (Afrique, Arabie et Madagascar), *laperrinei* (Algérie, Argentine, Niger et Soudan) *maroccana* (Maroc) (Marone and Fiorino, 2012).

### 1.8 Description morphologique :

L’olivier est un arbre vigoureux, toujours vert qui peut atteindre 10 à 15 m de hauts et de 1,50 à 2 m de diamètre. A tronc tortueux et écorce grisâtre, des branches tortueuses aux nombreux rameaux arrondis à feuilles oblongues lancéolées. Fleurit entre mai et juillet suivant la variété en grappes terminales ou auxiliaires donnant des fruits pendants, gros, à formes variées L’olivier s’adapte bien à des conditions d’environnement extrêmes telles que la sécheresse, la salinité, et la chaleur. Bien qu’il exige un sol léger et aéré pour un bon développement, l’olivier tolère un large éventail de types de sols différents et résiste à de faibles températures. (Missat, 2012) .La morphologie d’un olivier se caractérise par un système racinaire et un système aérien.



Figure 1: Olivier sauvage suffisamment haut et à l’abri pour entrer en production (Haute-Corse).(Christian et Catherine 2023)

#### Le système racinaire :

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

#### Le système aérien

Le système aérien se compose de :

**Le tronc :** il est cylindrique , avec une surface irrégulière , portant de nombreux renflements . Le bois est jaunâtre et plus foncé vers le centre du tronc . L’aspect gracieux et vallonné de l’olivier peut être assez attrayant . Dans un jardin entièrement vert , son feuillage grisâtre sert de contrepoint intéressant . Le motif attrayant des branches noueuses est également très caractéristique . Les arbres sont tenaces , ils repoussent facilement même lorsqu’ils sont coupés au sol.(Jilani et al, 2016)

**L’écorce :** Est très mince, percevant le moindre choc mécanique et se déchire facilement sous le coup. L’épiderme devient épais, rude, crevassé et se détache en plaques.(Vladimir, 2008).

**Les feuilles :** Les feuilles sont relativement petites, opposées, ovales et lancéolées aux bords entiers de couleur vert foncé et vert argenté au verso. Elles apparaissent sur les branches du printemps à l'automne et vivent une année voir plus. À l'aisselle de chaque feuille, un bourgeon qui peut donner naissance à une inflorescence (bourgeon floral) ou à un bourgeon a bois. La structure anatomique des feuilles de l'olivier lui permet de s'adapter au milieu de haute température (transpiration élevée) pour la minimisation des pertes d'eau (**Belguerri,2016**).

**Les fleurs :** Les fleurs d'olivier sont, très petites, odorantes, d'un blanc tirant vers le vert. En général, la formule florale est de : 4 pétales +4 sépales +2 étamines + 2carpelles (**Missat,2012**).



Figure 2: Feuille et Fleurs d'olivier (**Belguerri, 2016**).

**Le fruit :** L'olive est une drupe , de forme sphérique ou elliptique , composée de l'exocarpe ( peau ), qui contient les stomates, du mésocarpe (flesh), qui est la partie comestible du fruit, et de l'endocarpe (noyau), y compris la graine. Le fruit de l'olivier est noir violacé lorsqu'il est complètement mature, mais quelques cultivars sont verts lorsqu'ils sont murs et certaines olives prennent la couleur du brun cuivré. La taille du fruit de l'olivier est variable, même sur un même arbre, et dépend du cultivar, de la charge fruitière, de la fertilité du sol, de l'eau disponible et des pratiques culturales (**Benedicte , 2015**)



Figure 3: Fruits d'olivier (**Belguerri, 2016**).

**Les rameaux :** Les jeunes pousses ont une écorce, dont la couleur passe du vert gris au gris brun au départ de section quadrangulaire, mais elles s'arrondissant en vieillissant. Elles donnent en suite un bois très dur, compact de couleur jaune fauve marbrée de brune. Les rameaux peuvent être des gourmands vigoureux et verticaux, des rameaux de prolongement terminant par un bouquet de pousses Les rameaux proprement dits sont des posses feuillés de deux ans, à l'extrémité on trouve un bouquet ou des brindilles (**Belguerri ,2016**).

## 1.9 Formes de l'olivier

### L'olivier sauvage :

L'olivier sauvage ou oléastre appelé Zebbouj en arabe c'est un arbre d'une incroyable longévité qui peut dépasser les 1000 ans grâce à sa forte résistance aux conditions indésirables de sécheresse, froid, stress hydrique, sol pauvre ou autres (**Chiappetta et Muzzalupo, 2012**). L'olivier sauvage est localisé tout autour du Bassin méditerranéen (BM) en forêt d'oléastres. Permettant le maintien de la biodiversité, il est aussi considéré comme un moyen de lutte contre l'érosion et les incendies. Présent isolé ou en populations, il régresse du fait de l'anthropisation des milieux (**Catherine et al, 2006**).

### Olivier cultivé:

L'olivier cultivé appelé Zeitoun en arabe c'est un arbre fruitier qui produit les olives, un fruit consommé sous diverses formes et dont on extrait une des principales huiles alimentaires, l'huile d'olive. C'est une variété cultivée depuis plusieurs millénaires, principalement dans les régions de climat méditerranéen. Il est essentiellement cultivé pour ses fruits, son huile, mais le bois sert aussi à la fabrication de petits ustensiles de cuisine ou à la fabrication de jeux, et de combustible pour le chauffage des foyers surtout sur le continent africain. Son feuillage est utilisé comme fourrage pour le bétail. De plus, l'entretien des cultures est un excellent moyen de prévenir les risques d'incendie et l'érosion (**Catherine et al, 2006**). Dans le but de conserver les caractéristiques de l'olive et de son huile, l'olivier est multiplié par voie végétative : bouturage et greffage. Le greffage est la technique la plus utilisée en raison de son gain de temps sur le délai d'entrée en production, et des propriétés bénéficiées par le porte greffon. Le greffage sur oléastre est pratiqué dans plusieurs pays méditerranéens facilitant l'adaptation afin d'obtenir une réponse rapide des nouveaux cultivars introduits aux conditions locales (**Breton et al, 2006**).



Figure 4: Un arbre de l'olivier cultivée(Iran)(COI 2023)

### 1.10 Cycle végétatif :

Tout le monde connaît la grande longévité de l'olivier, et l'on peut observer des arbres millénaires avec une relative fréquence. Néanmoins, du point de vue agricole, on doit nous centrer dans la période qui va dès sa naissance à la diminution notable de sa production. Ainsi, selon sa productivité on peut diviser la vie de l'olivier en trois étapes :

- Étape juvénile : de 1 à 7ans (sans production).
- Étape de production : de 7 à 150ans.
- Étape sénile : après les 150ans (production basse) (APO, 2016).

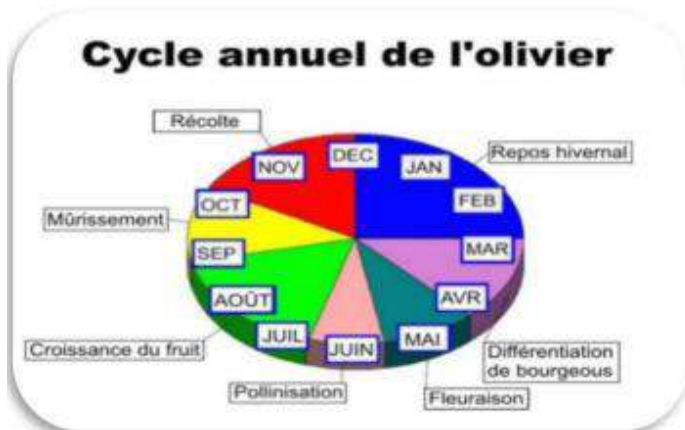


Figure 5: Le cycle annuel de l'olivier (APO, 2016)

### 1.11 L'intérêt d'olivier :

L'olivier est cultivé depuis 3 500 ans, pour ses fruits et pour l'huile qu'on en tire l'utilisation composant essentiel du régime méditerranéen. Riche en acides gras insaturés, en vitamine et en polyphénols (Akrou et al. 2011). Les feuilles sont employées pour désinfecter les blessures cutanées. Les Anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections. Au XIXe siècle, elles servaient pour combattre le paludisme (malaria) (Micol V et al. 2005).

A nos jours, les feuilles d'oliviers se trouvent sur le marché. Les fabricants de ces produits en vantent les vertus pour le système immunitaire et contre les infections virales, bactérienne.

La feuille d'olivier est un des hypotenseurs végétaux les plus captivants. Elles contiennent aussi des Flavonoïdes (antioxydant), ces antioxydants aident à combattre les radicaux libres, et jouent un rôle important dans la protection de la paroi artérielle (Aydogan et al. 2008)

Une autre étude a également montré une baisse de la pression artérielle diastolique et systolique chez les personnes hypertendues (Somova et al. 2003).

### 1.12 Variétés des oliviers en Algérie :

L'oléiculture algérienne est très diversifiée, les variétés cultivées en Algérie étant représentées principalement par des variétés à huile, et un degré moindre, des variétés de table. (Mendil et al, 2007).

Tableau 1: Les principales variétés nationales (Saad, 2009).

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

## **2 II. La tuberculose de l'olivier**

La tuberculose de l'olivier appelé aussi le "chancre de l'olivier" est une maladie bactérienne qui infecte le plus souvent l'olivier (*Olea europea*) touchant le système de la circulation de la sève(Zergoug et al. 2017). Elle est très répandue principalement dans le bassin méditerranéen et dans d'autres pays producteurs d'olive, où les conditions climatiques favorisent souvent la propagation de la maladie (Penyalver et al. 2006)

Elle est causée par une bactérie appelée *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*. Cependant, l'existence de la tuberculose de l'olivier est probablement décrite pour la première fois dans l'antiquité par Théophraste (Koščak et al. 2023) et observée en 1886 par un bactériologiste italien, Luigi Savastanoi, dont le nom de l'agent causal *P. savastanoi*.

Les études ultérieures en Italie et aux états unis ont confirmés les travaux de L. Savastanoi, mais suite aux conflits de l'identité de *P. savastanoi*, ils ont déduit par la suite l'interaction d'un consortia bactérien responsable de la formation de tumeurs chez *Olea europea* et d'autres oléacées, mais *P. savastanoi PV savastanoi (PSV)* est considéré comme le principal pathogène responsable de la formation des nœuds (tumeurs) bactériennes des oliviers(Surico and Marchi 2003).

### **2.1 Mode de propagation de la maladie :**

Dans les régions oléicoles, la tuberculose de l'olivier se propage plus facilement dans les climats chauds des automnes et des printemps pluvieux. L'attaque commence par la pénétration de la bactérie (*PSV*) dans l'arbre par des blessures et/ou des fissures sur la tige, écorces abîmées, et les brindilles causées par des phénomènes météorologiques (grêle), des insectes mineurs, et par les pratiques de récolte et d'élagage (Edyta and Silvana Ilak Peršurić 2009). Elle peut être également transmise par les techniques de multiplication en pépinière à partir d'organes provenant d'arbres contaminés (greffons-boutures)

### **2.2 Répartition géographique de la tuberculose de l'olivier dans le monde :**

La tuberculose d'olivier est une maladie répandue dans tous les pays où l'on cultive l'olivier. Sa répartition géographique peut varier en fonction des agents pathogènes spécifiques impliqués. Cependant, certaines régions du monde sont plus touchées que d'autres par cette maladie. Par exemple, les pays méditerranéens ainsi qu'en États Unis d'Amérique, surtout en Californie ». (Benjama, 2003) (Figure 6).

Ces régions sont parmi les plus touchées par cette maladie en raison de la concentration élevée de cultures d'oliviers.

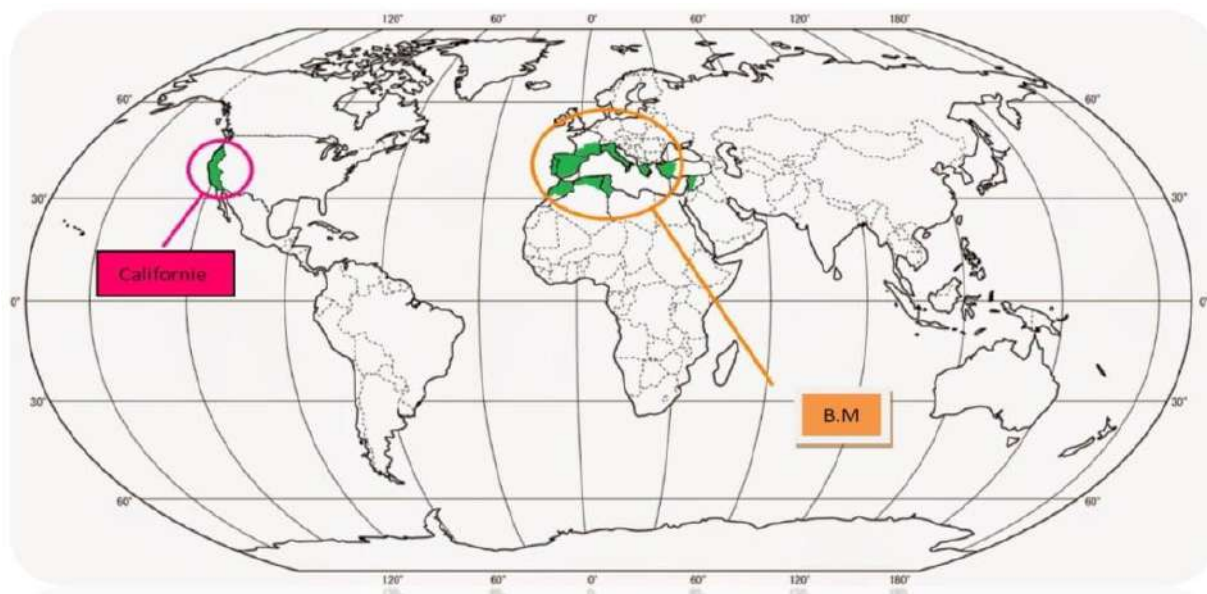


Figure 6: Carte géographique des régions les plus touchées par la tuberculose de l'olivier (Benjama, 2003).

B.M : Bassin méditerranéen.

La présence de la tuberculose de l'olivier, causée par *Psv* a été documentée dans ces pays.(Figure 7).



Figure 7: Répartition de la tuberculose de l'olivier dans le monde. (Source FAO .Marchier et al,2009).

### 2.3 La tuberculose de l'Olivier en Algérie

La tuberculose de l'olivier est une maladie préoccupante pour les cultures oléicoles en Algérie. Causée par la bactérie *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*, cette maladie se manifeste par la formation de tumeurs ou de galles sur les branches, les rameaux et parfois sur le tronc de l'olivier. Les galles peuvent entraîner un affaiblissement de l'arbre, réduisant sa productivité et, dans les cas graves, provoquant la mort de certaines parties de l'arbre.

En Algérie, la tuberculose de l'olivier constitue une menace majeure pour la production oléicole, affectant à la fois les arbres sauvages et cultivés. Les conditions climatiques et les pratiques agricoles locales peuvent contribuer à la propagation de la maladie. Les mesures de contrôle incluent des pratiques culturales rigoureuses, telles que la taille régulière des branches infectées, l'utilisation d'outils désinfectés, et l'application de traitements à base de cuivre pour réduire la propagation bactérienne.

La recherche et la sensibilisation sont essentielles pour gérer cette maladie. Les agriculteurs sont encouragés à suivre des protocoles de prévention et à surveiller attentivement leurs vergers pour détecter les premiers signes d'infection. Des programmes de formation et de soutien technique, en collaboration avec les instituts de recherche agricole, sont cruciaux pour améliorer les méthodes de lutte contre la tuberculose de l'olivier en Algérie.

#### **2.4 Les symptômes de la tuberculose de l'olivier :**

La tuberculose de l'olivier est la principale maladie bactérienne de l'olivier, causée par *Pseudomonas savastanoi pv Savastanoi* (*Psv*). La maladie se manifeste par des excroissances tumorales (tumeurs parenchymateuses) sur différentes parties des plantes (**Edyta and Silvana Ilak Peršurić 2009**) avec un aspect spongieux et de forme irrégulière. Au début de leur apparition, elles sont molles, de couleur verte et de surface lisse. Elles augmentent de volume en fonction du temps, se lignifient, brunissent et durcissent. (**Achbani et Bouaichi, 2017**).

Ces galles apparaissent isolément ou rapprochées sur toute la partie de la plante sur le tronc, branches, rameaux, jeunes pousses, feuilles abîmées rarement sur fruit (Turco et al. 2022)(Figures 9, 10). Les jeunes rameaux (âgés d'un an) perdent leur feuillage et se dessèchent.



Figure 8: Aspect des tumeurs à tuberculose sur rameau d'olivier. (**Benjama 2003**)

Au cours de son développement, la tumeur peut entourer le rameau (tout son périmètre) et en provoquer la mort. En conséquence, les vieilles tumeurs et celles qui se forment sur des branches moins développées sont les plus dangereuses.

Les rameaux vigoureux deviennent faibles et frêles, et se produit en eux une mort partielle. Dans des conditions optimales pour le développement de la maladie on observe que les nervures centrales des feuilles présentent dès le début de la formation des tumeurs. Cela empêche la sève d'arriver au

sommet de la feuille induisant son jaunissement, sa mort et sa chute avant son développement complet.( **Lekikot, 2017**) .

Le développement de ces tumeurs dépend de la production de phytohormones telles que l'acide indole-3-acétique (AIA) et les cytokines+. En plus des phytohormones, qui jouent un rôle crucial dans le développement des tumeurs, d'autres facteurs de virulence sont impliqués dans le développement de la maladie(**Achbani et Bouaichi, 2017**).

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



Figure 9: Les galls (tumeurs) sur les feuilles et fruits.( Source **INPV, Lekikot, 2017**)

## 2.5 Agent Causal de la Tuberculose de l'Olivier

La tuberculose de l'olivier, également connue sous le nom de chancre de l'olivier, est une maladie bactérienne qui affecte principalement les oliviers (*Olea europaea*). L'agent causal de cette maladie a été isolé et décrit à plusieurs reprises depuis la fin du 19ème siècle. Voici une présentation détaillée de l'évolution de la classification de cette bactérie :

## 2.6 Historique de la Classification de l'Agent Causal

### Premières Identifications

- **Luigi Savastano (1887, 1889)** : Savastano a été le premier à isoler et à décrire la bactérie responsable de la tuberculose de l'olivier. Il l'a initialement nommée *Bacillus oleae tuberculosis* en 1887.
- **Smith (1908)** : Plus tard, en 1908, la bactérie a été reclassée par Smith sous le nom de *Bacterium ssavastanoi*

### Révisions du 20<sup>ème</sup> Siècle :

- **Stevens(1913)** : En 1913, Stevens a proposé une nouvelle classification, renommant la bactérie *Pseudomonas savastanoi*
- **Young et al. (1978)** : En 1978, la bactérie a été reclassée en tant que pathovar de *Pseudomonas syringae*, connue sous le nom de *Pseudomonas syringae pv savastanoi*.

- **Gardan et al. (1992)** : La classification la plus récente, établie par Gardan et ses collègues en 1992, a confirmé le nom de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, qui est actuellement utilisé pour désigner l'agent causal de la tuberculose de l'olivier.

## 2.7 Caractéristiques de la Bactérie

### ➤ Morphologie et Structure :

**Forme** : *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* est une bactérie gram-négative, en forme de bâtonnet.

**Motilité** : Elle est motile grâce à la présence de flagelles polaires.

### ➤ Pathogénicité

**Mécanisme d'Infection** : La bactérie infecte principalement les tissus vasculaires de l'olivier, provoquant la formation de tumeurs ou galles sur les branches, les troncs et parfois les feuilles et les fruits.

**Symptômes** : Les galles apparaissent d'abord comme des excroissances vertes et molles, qui deviennent brunes et dures avec le temps.

## 2.8 Classification de *Pseudomonas savastanoi* :

Le nom *Pseudomonas savastanoi* a été attribué pour la première fois par Stevens en 1913, mais la bactérie a été incluse dans la liste des pathovars de l'espèce *Pseudomonas savastanoi* (**Bergey, 2003; Serdoune, 2013**). Le genre *Pseudomonas* est classé dans la famille des pseudomonadaceae (**Young, 1996**).

- Règne : *Bactérie*
- Division : *Proteobacteria*
- Classe : *Gamma-proteobacteria*
- Ordre : *Pseudomonadales*
- Genre : *Pseudomonas*
- Espèce : *Pseudomonas savastanoi*



Figure 10: Une micrographie à contraste de phase d'une cellule *Pseudomonas* (**Prescott, 2018**)

Cette espèce a été divisée en 5 pathovars

- *Pseudomonas savastanoi* PV Fraxini

- *Pseudomonas savastanoi* PV Phaseolicola
- *Pseudomonas savastanoi* PV Nerii
- *Pseudomonas savastanoi* PV Glucinea
- *Pseudomonas savastanoi* PV savastanoi (**Boulssen et Bouraoui, 2016**).

## 2.9 Pouvoir pathogène :

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

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

La stimulation des phytohormones est due à un plasmide qu'on l'appelle Ti (tumeurs, induisant) qui est transféré dans les tissu végétaux et qui s'intègre dans le génome de la cellule hôte. Pour un nouvel ADN formé, il déclenche une production autonome de phytohormones : l'acide indole-acétique (AIA) qui joue un rôle dans l'élargissement des cellules et la cytokinine qui favorise la division cellulaire (**Serdoun Bekri, 2013**).

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

L'interaction des bactéries du xylème de la plante à travers les blessures qui se produisent dans l'arbre. La bactérie adhère sur la surface des rameaux ou les troncs de l'arbre grâce aux exo-polysaccharide.

## 2.10 Le cycle de développement de la bactérie au sein de l'olivier

Le développement et la multiplication de *Pseudomonas savastanoi* nécessitent une plante hôte, en l'occurrence l'olivier. La bactérie prolifère au sein du végétal, au niveau des chancres mais sa survie reste limitée dans le sol. Elle (*Psv*) est toutefois capable de se maintenir à la surface de l'écorce et des feuilles, notamment durant les périodes plus humides.

Les contaminations ont lieu de l'automne à la fin de printemps, par l'action des pluies mais également par l'intermédiaire des outils de taille et de récolte mécanique. Les périodes humides suivies de chaleurs sont très favorables aux contaminations. *Pseudomonas savastanoi* s'introduit dans le végétal au travers des tissus non cicatrisés: les plaies causées par la grêle, le gel, les opérations de taille et de récolte, ainsi que les points d'abscission des feuilles, des fleurs et des fruits sont autant de portes

d'entrée pour la bactérie. Ainsi, les épisodes de grêle et de gel précèdent bien souvent l'apparition ou une recrudescence de la maladie dans le verger.

Le développement de *Pseudomonas savastanoi* au sein du végétal s'accompagne de la sécrétion d'auxine bactérienne, entraînant une multiplication anarchique des cellules du bois. Cela conduit à la formation d'un chancre. Cette excroissance présente à sa surface un exsudat riche en bactéries et constitue une nouvelle source de contamination. Sous l'action des pluies et du vent, les bactéries sont ensuite disséminées au sein de l'arbre et du verger. En cas de vent violent, la bactérie peut être dispersée au sein d'aérosols sur plusieurs centaines de mètres autour du foyer initial.

L'infection reste généralement localisée au niveau du point d'entrée de la bactérie. Dans des cas plus sévères, la bactérie est véhiculée par la sève et l'infection se propage aux parties voisines. Les branches se recouvrent alors d'un chapelet de galles (Centre Technique de l'Olivier (**S. Le Verge**), **2019**)

### **2.11 Impact de la maladie :**

Il se traduit sous divers aspects :

Perte des feuilles des brindilles du fait de l'étranglement mettant hors circuit l'alimentation des feuilles en aval.

Dessèchement de bois par suite d'une photosynthèse défailante.

Réduction du même de la taille des arbres.

Rédaction du rendement d'olive et sur la qualité de son huile grâce à des caractéristique organoleptiques inférieures, telles qu'une odeur désagréable et un goût amer rance (**Senhaji, 1999 ; Lavermicocca et al. 2002**).

### **2.12 La lutte contre la tuberculose de l'olivier :**

Comme pour la plupart des maladies bactériennes, les méthodes prophylactiques restent l'essentiel de l'arsenal mis à disposition pour lutter contre l'agent pathogène. Les risques d'infestation des arbres d'olivier par la tuberculose peuvent être potentiellement réduits en veillant à :

### **2.13 Lutte Chimique contre la Tuberculose de l'Olivier**

La lutte chimique contre la tuberculose de l'olivier, causée par *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* (*Psv*), reste une méthode courante malgré les préoccupations environnementales et la résistance des pathogènes. Voici un aperçu des principaux aspects de cette approche.

#### **➤ Utilisation de Composés de Cuivre**

Les composés de cuivre, comme l'hydroxyde de cuivre, l'oxychlorure de cuivre et le sulfate de cuivre, sont largement utilisés pour lutter contre les maladies bactériennes des plantes.

#### **➤ Application**

Les traitements à base de cuivre sont généralement appliqués sous forme de pulvérisation foliaire.

Les applications sont souvent faites après la taille pour protéger les plaies et en période de risque élevé d'infection (par exemple, après des pluies ou des blessures mécaniques).

#### **Efficacité :**

- Les composés de cuivre agissent en inhibant les enzymes bactériennes, ce qui empêche la croissance et la multiplication des bactéries pathogènes.
- Ils sont efficaces pour réduire la propagation de PSV et limiter la formation de tumeurs.

#### **Risques et Inconvénients**

##### **• Risques Environnementaux :**

Les composés de cuivre peuvent s'accumuler dans le sol et l'eau, entraînant une toxicité pour les micro-organismes bénéfiques, les plantes et les animaux aquatiques.

L'utilisation excessive de cuivre peut entraîner une pollution des sols et des eaux, affectant la biodiversité locale.

##### **• Résistance des Pathogènes :**

Une exposition prolongée aux composés de cuivre peut entraîner le développement de souches bactériennes résistantes, réduisant l'efficacité des traitements.

##### **• Impacts sur la Santé Humaine :**

Une exposition répétée aux composés de cuivre peut poser des risques pour la santé des travailleurs agricoles.

#### **Autres Produits Chimiques Utilisés**

##### **• Antibiotiques :**

Dans certains cas, des antibiotiques comme la streptomycine peuvent être utilisés, bien que leur usage soit strictement réglementé en raison des risques de résistance et des impacts environnementaux.

##### **• Produits Chimiques Synthétiques :**

D'autres produits chimiques, tels que les composés à base de quinoléine, peuvent être utilisés, mais ils sont souvent moins courants en raison de leur coût et de leurs effets potentiels sur l'environnement.

#### **Pratiques Complémentaires**

##### **• Élagage et Gestion des Débris :**

Élaguer les branches infectées et éliminer les débris végétaux peut réduire la charge bactérienne et limiter la propagation de la maladie.

##### **• Désinfection des Outils :**

La désinfection régulière des outils de taille avec des produits désinfectants appropriés (par exemple, alcool isopropylique ou solutions d'hypochlorite) est essentielle pour prévenir la transmission de la maladie.

##### **• Rotation des Cultures :**

La rotation des cultures et la plantation de variétés résistantes peuvent aider à réduire l'incidence de la maladie.

La lutte chimique contre la tuberculose de l'olivier repose principalement sur l'utilisation de composés de cuivre, qui sont efficaces mais présentent des risques environnementaux et de résistance des pathogènes. L'intégration de pratiques complémentaires, telles que l'élagage et la désinfection des outils, est cruciale pour une gestion efficace et durable de la maladie. La recherche continue sur des alternatives plus sûres et durables, y compris les agents biologiques, est essentielle pour réduire la dépendance aux traitements chimiques.

#### **2.14 La lutte biologique :**

**Bactéries Antagonistes :** Des bactéries antagonistes ont été isolées et étudiées pour leur efficacité contre *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* (Psv) :

*Pseudomonas syringae* :

**Produisant des Bactériocines :**

Une souche appelée ciccaronei produit des bactériocines efficaces contre Psv (Lavermicocca et al., 2002).

*Pseudomonas putida* :

**Produit un Antibiotique contenant du Salicylate :**

Isolé de la rhizosphère des plantes, ce *Pseudomonas putida* produit un antibiotique efficace contre Psv (Rokni Zadeh et al., 2008).

*Pseudomonas fluorescens* :

Plusieurs souches isolées de la rhizosphère et des nœuds d'oliviers infectés montrent une activité antagoniste contre Psv (Krid et al., 2010).

*Bacillus subtilis* :

Déjà mentionné précédemment pour sa capacité à produire des substances antimicrobiennes comme zwittermicine-A et kanosamine, réduisant la taille des nœuds sur les oliviers infectés (Krid et al., 2010).

#### **2.15 Avantages de la Lutte Biologique**

**Réduction des Risques Environnementaux :** Les agents biologiques sont généralement plus respectueux de l'environnement que les composés chimiques.

**Diminution de la Résistance des Pathogènes :** L'utilisation de multiples agents biologiques peut réduire le risque de développement de résistance chez les pathogènes.

**Compatibilité avec les Pratiques Agricoles Durables (Durabilité) :** La lutte biologique s'inscrit dans une approche plus durable et intégrée de la gestion des maladies des plantes. La gestion de la tuberculose de l'olivier évolue vers des méthodes plus durables et respectueuses de l'environnement, telles que la lutte biologique. L'utilisation de bactéries antagonistes comme *Pseudomonas syringae*,

*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Bacillus subtilis* montre un grand potentiel pour remplacer ou compléter les applications traditionnelles de composés de cuivre, offrant une alternative prometteuse pour le contrôle efficace de cette maladie. La lutte biologique constitue une approche prometteuse pour gérer la tuberculose de l'olivier, causée par *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*.

L'utilisation de *Bacillus subtilis* est particulièrement efficace dans ce contexte.

## 2.16 *Bacillus subtilis* : Un Agent Biologique Prometteur

### ➤ Propriétés Antimicrobiennes :

*Bacillus subtilis* est une bactérie connue pour produire plusieurs substances antimicrobiennes, notamment : **Zwittermicine-A**, **Kanosamine**, et diverses lipoprotéines antimicrobiennes

### ➤ Mode d'Action :

Ces substances antimicrobiennes inhibent la croissance de *Pseudomonas savastanoi* et réduisent l'infection de l'olivier.

Il a été démontré qu'une protéine spécifique produite par *Bacillus subtilis* peut réduire la taille des nœuds (tumeurs) causés par *Pseudomonas savastanoi* sur les oliviers (Krid et al., 2010)

Les chercheurs ont montré que l'application de *Bacillus subtilis* sur les oliviers infectés peut considérablement réduire la formation et la taille des tumeurs.

Cette étude met en lumière le potentiel de *Bacillus subtilis* comme agent de biocontrôle dans la lutte contre la tuberculose de l'olivier.

### ❖ Avantages de la Lutte Biologique en utilisant *B. subtilis*

**Efficacité** : Les substances produites par *Bacillus subtilis* sont très efficaces pour inhiber *Pseudomonas savastanoi*.

**Sécurité Environnementale** : Contrairement aux pesticides chimiques, les agents biologiques comme *Bacillus subtilis* sont généralement sans danger pour l'environnement et les organismes non cibles.

**Durabilité** : L'utilisation d'agents de biocontrôle contribue à une agriculture durable en réduisant la dépendance aux produits chimiques.

L'application de *Bacillus subtilis* offre une méthode efficace et écologique pour lutter contre la tuberculose de l'olivier. En produisant des substances antimicrobiennes puissantes, *Bacillus subtilis* peut inhiber la croissance de *Pseudomonas savastanoi* et réduire la formation de tumeurs sur les oliviers. Cette approche de lutte biologique représente une alternative prometteuse aux traitements chimiques traditionnels.

## 2.17 La lutte culturale

### Lutte Culturelle contre la Tuberculose de l'Olivier

La lutte culturale implique l'application de pratiques agricoles visant à prévenir et à réduire l'incidence des maladies sans recourir aux produits chimiques. Ces méthodes sont essentielles pour gérer la tuberculose de l'olivier de manière durable et respectueuse de l'environnement.

## **Pratiques de Lutte Culturale**

### **1. Sélection de Variétés Résistantes :**

- Planter des variétés d'oliviers qui montrent une résistance naturelle à *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* peut réduire l'incidence de la maladie.
- Les programmes de sélection végétale continuent de développer et d'identifier des variétés plus résistantes.

### **2. Taille et Élagage :**

- Pratiquer une taille régulière pour enlever les branches et les tiges infectées.
- Éliminer les tissus malades pour réduire la charge bactérienne et prévenir la propagation.
- Éviter les tailles pendant les périodes humides pour réduire le risque d'infection par les blessures.

### **3. Désinfection des Outils :**

- Nettoyer et désinfecter les outils de taille entre chaque utilisation avec des désinfectants appropriés (alcool isopropylique, solution d'hypochlorite de sodium) pour éviter la transmission de la bactérie d'un arbre à l'autre.

### **4. Gestion des Débris Végétaux :**

- Ramasser et éliminer les débris végétaux et les feuilles tombées qui peuvent abriter la bactérie.
- Brûler ou compostage approprié des débris infectés pour éviter la propagation de la maladie.

### **5. Contrôle des Blessures :**

- Éviter les blessures mécaniques aux arbres causées par les équipements agricoles, le vent ou les animaux.
- Utiliser des pratiques culturales qui minimisent les blessures, car les plaies sont des portes d'entrée pour l'infection bactérienne.

### **6. Amélioration des Conditions de Croissance :**

- Maintenir une bonne nutrition et un bon état sanitaire des arbres pour augmenter leur résistance aux infections.
- Assurer une irrigation appropriée pour éviter le stress hydrique, qui peut rendre les arbres plus susceptibles aux maladies.

### **7. Rotation et Espacement :**

- Éviter de replanter des oliviers dans des zones précédemment infectées.
- Planter les oliviers à des espacements appropriés pour permettre une bonne circulation de l'air et réduire l'humidité, ce qui peut limiter la propagation des pathogènes.

### **8. Surveillance et Détection Précoce :**

- Effectuer une surveillance régulière des oliveraies pour détecter les premiers signes de la maladie.
- En cas de détection, appliquer rapidement des mesures de contrôle pour limiter la propagation.

#### **Avantages de la Lutte Culturelle**

- **Durabilité** : Les méthodes culturelles sont durables et respectueuses de l'environnement, réduisant la dépendance aux produits chimiques.
- **Réduction des Risques** : Diminue les risques environnementaux et de développement de résistance des pathogènes.
- **Efficacité à Long Terme** : Les pratiques culturelles renforcent la santé globale des arbres, les rendant plus résistants aux maladies.

La lutte culturelle contre la tuberculose de l'olivier est une composante essentielle de la gestion intégrée des maladies. En mettant en œuvre des pratiques agricoles judicieuses et durables, il est possible de réduire l'incidence de la maladie et de maintenir des oliveraies saines. Les producteurs doivent combiner ces méthodes avec d'autres approches, telles que la lutte biologique et, si nécessaire, des interventions chimiques raisonnées, pour une gestion efficace et globale de la tuberculose de l'olivier.

# **Chapitre 2**

## **Matériels et Méthodes**

### 3 Matériels et Méthodes

#### 3.1 Objectif

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie (Hall de technologie) de l'université de Skikda, avec pour objectif l'identification et la caractérisation de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, l'agent causal de la tuberculose de l'olivier.

**Lieu et période du stage.** Dans le cadre de la préparation de ce mémoire, nous effectuées un stage pratique au niveau de laboratoire pédagogique de microbiologie de Hall technologique.

**Matériel du laboratoire :** Les différents verreries et appareillages utilisés dans notre travail sont mentionnés dans l'annexe A.

**Produits utilisés :** Les produits et les milieux de culture utilisés dans notre travail sont mentionnés dans l'annexe A.

#### 3.2 Échantillonnage :

L'échantillonnage a été effectué en février 2024 lors d'une sortie organisée vers le verger de M. Berdoudi Ahmed, situé à Ould Messaoud, commune de Zerdaza, dans la wilaya de Skikda, en Algérie. Deux échantillons ont été prélevés à partir de deux oliviers infectés, comprenant de jeunes rameaux et brindilles présentant des signes de la maladie sur une certaine distance, désignés comme Échantillon A et Échantillon B. Les branches contenant des tumeurs ont été coupées aseptiquement, transportées et conservées au laboratoire de microbiologie de l'université de Skikda, où l'agent pathogène présumé a été analysé.

#### 3.3 Isolation :

Les surfaces des échantillons ont été désinfectées à l'aide d'éthanol à 90 %. L'ensemencement sur les milieux King A et King B a été réalisé selon deux techniques.

##### **Première technique (méthode directe) :**

Les tumeurs ont été coupées et désinfectées à l'aide d'un papier filtre stérile imbibé d'éthanol à 90 %, puis découpées en deux. À l'aide d'une pince stérile, la moitié de la tumeur (galle) a été étalée directement sur les milieux KA et KB préalablement coulés dans des boîtes de Pétri (figure 11). Les boîtes ont ensuite été incubées à 30 °C pendant 3 jours.



Figure 11: Étalement directe sur le milieu King A et King B (prise personnelle )

##### **Deuxième technique (méthode indirecte) :**

Le tissu interne des tumeurs a été découpé et écrasé, puis placé dans des tubes Eppendorf stériles contenant 1 ml d'eau distillée stérile pour obtenir un macérât. Après 20 minutes à température ambiante, une goutte de la suspension a été prélevée à l'aide de l'anse de platine stérile (écouvillons), puis ensemencée sur les milieux KA et KB par étalement en stries (figure 12). Les boîtes ont ensuite été incubées à 30 °C pendant 3 jours.



Figure 12: Étalement indirecte sur le milieu KA et KB (prise personnelle )

Après 3 jours, des colonies poussées sur le milieu KA et KB de l'échantillon B ont été identifiées en fonction de leurs caractéristiques macroscopiques telles que la taille, la couleur, la consistance. Plusieurs souches (16 souches) présentant des caractéristiques distinctes ont été identifiées et désignées par des chiffres alphabétiques (A1-A11 et B1-B5).

Le repiquage de chaque souche (16 repiquages) sur le milieu KB et gélose nutritive (GN) a été réalisé en utilisant la technique d'étalement en stries ou la technique de cadrans afin d'obtenir des souches pures.

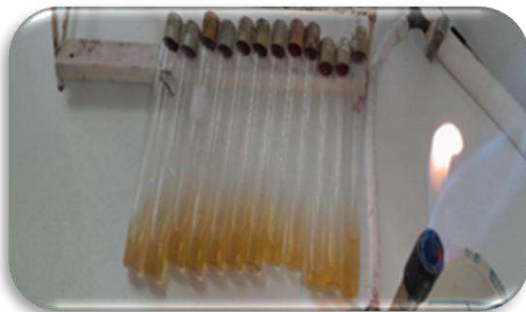


Figure 13: Conservation dans les tubes à essai inclinés. (Prise personnelle )

### **3.4 Observation macroscopique :**

C'est le premier examen réalisé après l'isolement. C'est l'étude de l'aspect des colonies qui exige l'observation à l'œil nu. Il y a beaucoup de critères séparant les colonies : de forme, de taille, de couleur, etc. La technique est faite dans une zone d'asepsie :

### **3.5 Observation microscopique :**

#### **Coloration de gram**

C'est une coloration différentielle qui nous permet de connaître la forme, mode de regroupement, la pureté et la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées (Boussena 2019). La procédure

(annexe B) a été effectuée sur tous les isolats (souches) jeunes afin de reconnaître leurs caractéristiques microscopiques. L'observation a été réalisée au microscope à l'objectif X100.

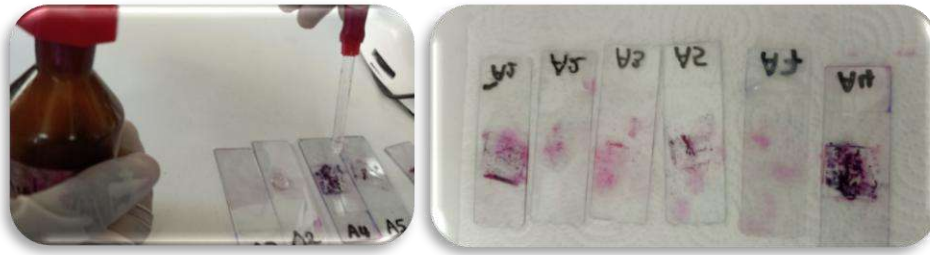


Figure 14: Méthode de La coloration de gram. (Prise personnelle )

### Tests biochimiques :

#### 3.6 Test de catalase :

Le test catalase s'effectue sur les bactéries Gram positives, il sert à déterminer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à transformer l'eau oxygénée en eau et en oxygène par contact de la culture avec une solution d'eau oxygénée.



Figure 15: Test de catalase (Prise personnelle )

La technique (**Annexe**)

#### 3.7 Test de coagulase :

Le test de coagulase est un test utilisé pour différencier les souches de *Staphylococcus aureus* des autres staphylocoques, car *S. aureus* est souvent coagulase positif tandis que les autres staphylocoques sont coagulase négatifs. La technique (**Annexe**)

Si la souche bactérienne est coagulase positif (comme *S. aureus*), le plasma coagulera et formera un caillot visible sur la lame. En revanche, si la souche est coagulase négatif, aucun caillot ne se formera. (**Sue, 2016**).



Figure 16: Test de coagulase (Prise personnelle )

### 3.8 Test d'oxydase :

Appelé aussi phénylène-diamine oxydase est une enzyme intervenant dans divers couples d'oxydo-réduction . Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram ( - ). Le test oxydase est utilisée pour déterminer la présence d'une enzyme appelée cytochrome C oxydase dans certaines bactéries. Cette enzyme est impliquée dans la chaîne respiratoire des bactéries et est essentielle pour la production d'énergie.

Le Protocol comprend ;

Placer un disque d'oxydase sur une lame propre et stérile,

Prélèvement d'une colonie bactérienne fraîche à l'aide d'une boucle bactériologique (anse) et déposée sur un disque d'oxydase mouillé ( Figure 17 ).

L'apparition d'une couleur violette au bout de 30 secondes, l'indophénol suite à l'oxydation du réactif phenylenediamine signifie le résultat positif. L'absence de couleur violette, signifie l'absence d'oxydation et donc le résultat négatif.(Camille, 2014).



Figure 17: Test d'oxydase. (Prise personnelle )

### 3.9 Test sur gélose Mac Conkey:

La gélose Mac Conkey est un milieu de culture utilisé en microbiologie pour la différenciation des bactéries Gram-négatives et mettre en évidence la fermentation du lactose. Ce milieu contient des **cristaux de pourpre de bromocrésol** qui réagissent à l'acidité produite par certaines bactéries, permettant ainsi de distinguer les bactéries fermentaires des bactéries non-fermentaire du lactose.

Pour effectuer un test sur gélose Mac Conkey, une colonie bactérienne jeune est ensemencée sur la gélose Mac Conkey (figure 18) et puis incubée à la température de 37°C pendant 18 à 24 heures.

L'apparition de colonies rouges entourées d'un halo opaque avec virage du milieu vers le rouge du fait de son acidification, signifie qu'il y a eu une précipitation des sels biliaires et que la bactérie fermente le lactose (Lactose +). Dans le cas où il y a apparition des colonies jaunes ou incolores cela signifie que la bactérie ne fermente pas le lactose (Lactose -) (Benjamin,2022).

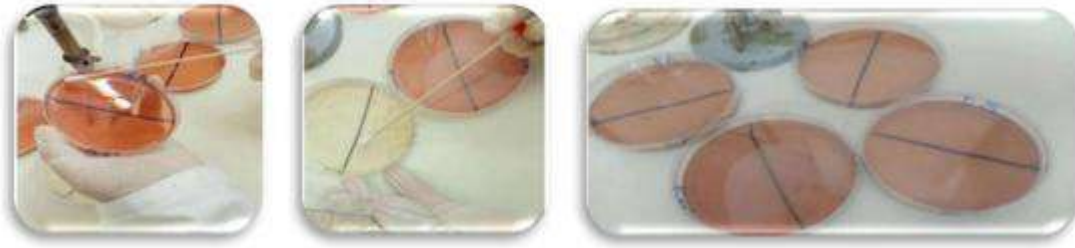


Figure 18: Test sur gélose Mac Conkey (Prise personnelle )

### 3.10 Activité pectinolytique

Ce test a pour but d'identifier une bactérie capable de dégrader la pectine, un polysaccharide composant de la lamelle moyenne de la paroi cellulaire végétale (Kumar Patidar et al. 2018).

Les tranches de pomme de terre stérilisées (à l'éthanol 70%) et rincées à l'eau distillée ont été déposées dans boîte de pétries contenant du papier filtre préalablement mouillé. Les colonies isolées (chaque souche) ont été prélevées et inoculées au centre de chaque quadrant d'une tranche. L'incubation à 28°C pendant Cinq (5) jours. Une tâche foncée (nécrose) sur ou autour du point d'inoculation signifie un test positif pour l'activité pectinolytique de la bactérie

### 3.11 Test d'Hypersensibilité sur Feuille de Tabac

#### ➤ Objectif

L'objectif de ce test est de vérifier le pouvoir pathogène des souches bactériennes sur la plante de tabac.

#### ➤ Méthode

Jeunes plants de tabac (*Nicotiana tabacum*), âgés de quelques mois, provenant d'une pépinière (Tamalous).

Cultures bactériennes fraîchement cultivées.

Tampon phosphate ou eau distillée stérile pour préparer les suspensions bactériennes.

Seringues stériles pour infiltrer les suspensions bactériennes dans les feuilles.

Bac à glaçons ou chambre d'humidité pour maintenir les feuilles dans des conditions d'humidité élevée après infiltration.

#### ➤ Préparation de la Culture Bactérienne :

Cultiver les bactéries à tester sur un milieu approprié (par exemple, gélose nutritive) à 28°C pendant 24 à 48 heures.

Préparer une suspension bactérienne dans un tampon phosphate stérile ou de l'eau distillée stérile pour obtenir une concentration d'environ  $10^8$  UFC/ml (Unité Formant Colonie par millilitre).

#### ➤ Préparation des Feuilles de Tabac :

Sélectionner des feuilles de tabac saines et matures.

Laver les feuilles à l'eau stérile pour éliminer toute contamination de surface.

#### ➤ Inoculation des Feuilles :

Remplir une seringue stérile avec la suspension bactérienne préparée.

Injecter 1 ml de la suspension entre l'épiderme et les tissus parenchymateux des jeunes feuilles de tabac.

Marquer les zones infiltrées pour une identification facile.

#### **Témoins Négatifs :**

Injecter la même quantité d'eau distillée stérile dans des feuilles similaires pour servir de témoins négatifs.

#### **Incubation :**

Laisser les plants de tabac dans des conditions normales de laboratoire (température ambiante, humidité) pendant une période de 10 jours.

Observer régulièrement les signes de changement à la surface des feuilles.

#### **Observation des Résultats :**

Examiner les zones infiltrées pour des signes de nécrose.

Noter les résultats positifs et négatifs en fonction des observations.

#### **Interprétation des Résultats**

##### ➤ **Réaction Hypersensible (HR) Positive :**

Présence de nécrose sur ou autour du point d'inoculation.

Indique que la bactérie testée est capable d'induire une réaction de défense hypersensible, suggérant un pouvoir pathogène.

##### ➤ **Réaction Hypersensible (HR) Négative :**

Absence de réaction ou de nécrose au point d'inoculation.

Indique que la bactérie testée n'est pas perçue comme une menace par la plante, suggérant une absence de pathogénicité ou une incapacité à induire une HR.

Le test d'hypersensibilité sur feuille de tabac est une méthode efficace pour évaluer le pouvoir pathogène des bactéries sur les plantes. La présence de nécrose au site d'inoculation est un indicateur clair de la capacité pathogène des souches bactériennes testées, tandis que l'absence de réaction indique une absence de pathogénicité.

### **3.12 Galerie Api**

Les galeries d'identification API (Analytical profile Index) sont des tests biochimiques pour l'identification des bactéries et des levures (Biomérieux 2018). Elles sont composées d'une série de cupules (tubes miniaturisées et standardisées) permettent la réalisation des tests biochimiques facile et rapides.

Il existe plusieurs types de galeries, mais le choix de la galerie à ensemercer dépend des résultats de l'étude des caractères morphologiques, cultureux et biochimiques qui ont été étudiés précédemment

(oxydase, catalase...), et qui sont indispensables pour l'interprétation de la galerie Api (Boussena 2019).

Dans notre étude, nous avons utilisé la galerie API 20E (un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux). Elle comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification. La procédure d'ensemencement et la lecture de la galerie API sont présentées dans l'annexe

### **3.13 Test de Levane**

Le test de Levane est conçu pour détecter la production de levane par les bactéries. La levane est un polysaccharide fructosylé, produit par certaines bactéries via la fermentation des sucres, principalement le saccharose. Ce test permet d'identifier les bactéries capables de synthétiser ce polysaccharide, souvent associé à la virulence de certaines bactéries phytopathogènes

#### **➤ Méthodes**

**Milieu de culture spécifique** : milieu agar-saccharose (milieu levane solide).

#### **Préparation du Milieu de Culture :**

Préparer un milieu agar-saccharose en dissolvant du saccharose dans un milieu agar approprié.

Stériliser le milieu par autoclave.

Verser le milieu stérile dans des boîtes de Pétri et laisser solidifier.

#### **Inoculation des Cultures Bactériennes :**

Utiliser une anse stérile pour prélever une petite quantité de culture bactérienne.

Réaliser de nombreuses stries sur la surface du milieu agar-saccharose dans les boîtes de Pétri.

Incuber les boîtes de Pétri à 30°C pendant 3 à 5 jours.

#### **Observation des Résultats :**

Examiner les colonies bactériennes sur les boîtes de Pétri.

Observer la formation de colonies blanches, convexes, avec un aspect crémeux, qui indiquent la production de levane.

#### **Interprétation des Résultats**

##### **➤ Résultat Positif :**

Présence de colonies blanches, convexes et crémeuses.

Indique que la bactérie possède une enzyme lévane-sucrase, capable de transformer le fructose en poly-fructose (lévane).

##### **➤ Résultat Négatif :**

Absence de colonies avec les caractéristiques mentionnées.

Indique que la bactérie ne possède pas la lévane-sucrase et ne produit pas de lévane.

Le test de Levane est une méthode efficace pour déterminer la capacité des bactéries à utiliser le saccharose et à produire de la lévane. La production de lévane, identifiée par la présence de colonies blanches, convexes et crémeuses, indique l'activité de l'enzyme lévane-sucrase.

### 3.14 Test de MEVAG (Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides) :

Le test MEVAG vise à distinguer les bactéries fermentaires des bactéries oxydatives ou indifférentes en utilisant le glucose comme substrat permet de caractériser des bactéries fermentaires (entérobactéries) de celles oxydatives ou indifférentes.

Ce test permet de caractériser les capacités métaboliques des bactéries en conditions aérobies et anaérobies.

Chaque isolat bactérien a été ensemencé dans deux tubes contenant le milieu MEVAG

Après l'ensemencement par piqure centrale, un des deux tubes est recouvert d'huile de vaseline en condition d'anaérobiose. Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 3 à 5 jours. Le métabolisme fermentaire favorisé par l'anaérobiose génère de nombreux produits. Acides que l'on pourra détecter par le changement de virage de pH qui est de rouge de phénol à jaune. Le métabolisme oxydatif ne génère que de faibles quantités d'acides et uniquement dans de bonnes conditions d'oxygénation et le changement de virage à jaune n'est que superficiel dans le tube (acidification uniquement en aérobiose) et correspondant qu'au courant d'acidification. (Haque, M. A. (2022))

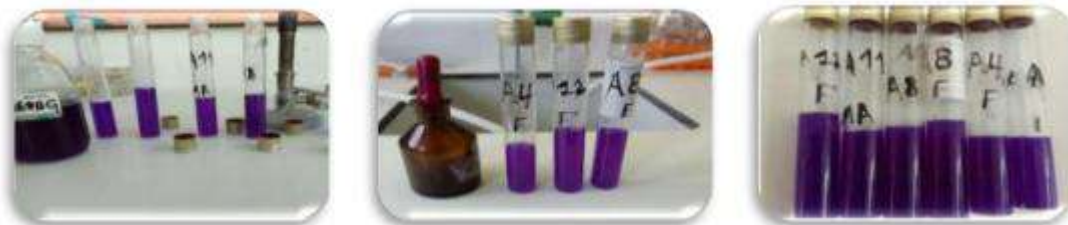


Figure 19: Technique du test de MEVAG (prise personnelle)

### 3.15 Test de Fluorescence et Identification des Souches de Pseudomonas

Le test de fluorescence est un moyen important pour identifier les bactéries du genre **Pseudomonas**, en particulier les espèces fluorescentes qui produisent des pigments comme la pyoverdine. Ces bactéries sont souvent phytopathogènes et peuvent être distinguées par leur capacité à produire une fluorescence bleu-verte sous lumière UV.

#### Procédure du Test de Fluorescence

- **Préparation du Milieu** : Utilisation du milieu King B, un milieu spécifique pour la détection de la fluorescence.
- **Inoculation des Souches** : Les souches bactériennes sont cultivées sur le milieu King B.
- **Incubation** : Les plaques sont incubées à une température appropriée (généralement 28-30°C) pendant 24 à 48 heures.

- **Observation sous Lumière UV** : Les plaques sont examinées sous une lampe UV à 360 nm pour détecter la fluorescence bleu-verte.

### **Interprétation des Résultats**

#### **Fluorescence Positive**

Les souches montrent une fluorescence bleu-verte sous lumière UV, indiquant la production de pyoverdine.

**Interprétation** : Ces souches appartiennent probablement au genre **Pseudomonas** et sont souvent phytopathogènes.

## **Chapitre 3**

# **Résultats et Discussions**

#### 4 Isolation des Souches Bactériennes

Après une incubation de 5 jours à 30°C, l'échantillon A a produit des colonies isolées de différentes formes, tailles et couleurs, En revanche, l'échantillon B a été envahi par des moisissures, indiquant une contamination. En conséquence, cet échantillon a été exclu des analyses ultérieures.

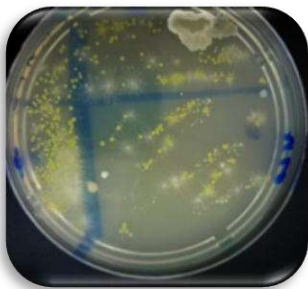


Figure 20: Echantillon A (prise personnelle )

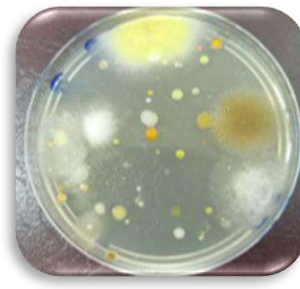


Figure 21: Echantillon B (prise personnelle )

La présence de moisissures dans l'échantillon B indique une contamination fongique. Cela peut être dû à une manipulation non stérile, à un équipement contaminé, ou à des conditions de stockage inadéquates. La contamination rend l'échantillon B inapproprié pour l'analyse bactériologique car la croissance des moisissures peut inhiber ou masquer la présence de bactéries.

##### 4.1 Purification des Souches Bactériennes

Après une incubation de 24 heures à 30°C, les souches bactériennes ont été purifiées à partir des isolats de gélose nutritive (GN) et de King B (KB).

Après une incubation de 24 h dans l'étuve à 30 °C, on a obtenu 13 souches pures pour les isolats de Gélose nutritive , ils sont codés par GP et 16 souches pures pour les isolats de King B, sont codés par KBP.

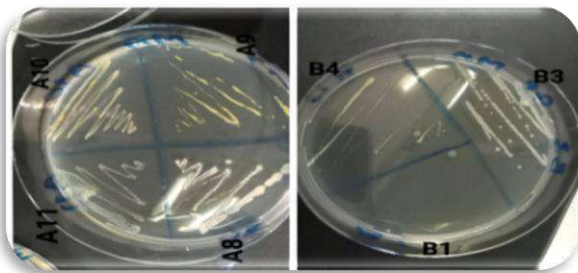


Figure 22: Résultat de purification sur GN(GP) (prise personnelle )



Figure 23: Résultat de purification sur KB(KBP) (prise personnelle )

## 4.2 Conservation :

Les tubes conservés au réfrigérateur à (- 4°) sont donnent les résultats suivants :



Figure 24: Résultats de conservation sur KB  
(prise personnelle )



Figure 25: Résultats de conservation sur GN  
(prise personnelle )

### 4.3 Observation macroscopique :

Tableau 2: Résultat macroscopique des 16 isolats.

Souche	Couleur	Aspect	Elévation	Forme
A1	J	Crémeux	Convexe	Circulaire
A2	J	Crémeux	Convexe	Circulaire
A3	J	Crémeux	Convexe	Circulaire
A4	J	Crémeux	Convexe	Ovale
A5	B	Crémeux	Convexe	Circulaire
A6	JC	Crémeux	Plate	Circulaire
A7	J	Crémeux	Bombée	Circulaire
A8	J	Crémeux	Bombée	Irrégulier
A9	J	Crémeux	Bombée	Circulaire
A10	B	Crémeux	Convexe	Circulaire
A11	J	Crémeux	Bombée	Irrégulier
B1	JC	Crémeux	Convexe	Circulaire
B2	JC	Crémeux	Plate	Circulaire
B3	BC	Crémeux	Plate	Irrégulier
B4	BC	Crémeux	Plate	Circulaire
B5	JC	Crémeux	Convexe	Circulaire

(B : Blanche, B.C : Blanc crème, J : Jaune, J.C : Jaune clair)

#### 4.4 Observation microscopique

Tableau 3: Résultat microscopique des isolats des Cocci à gram –

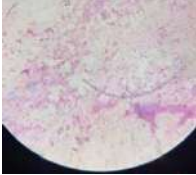
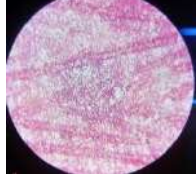
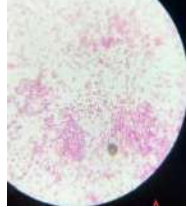
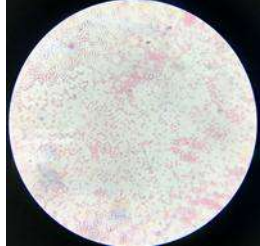
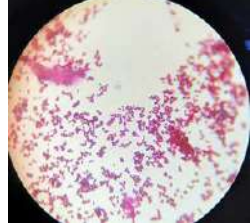
Souche	Gram	Aspect des cellules	Observation microscopique
A3	-	Cocci	
A6	-	Cocci	
A7	-	Cocci	
B1	-	Cocci	
B4	-	Cocci	

Tableau 4: Observation microscopique des souches Cocci à gram (+).


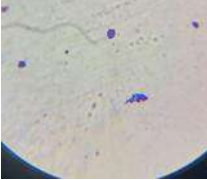
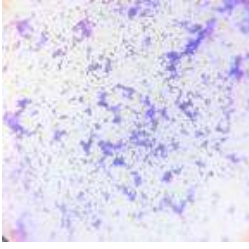
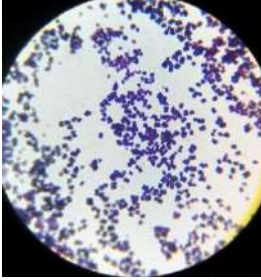
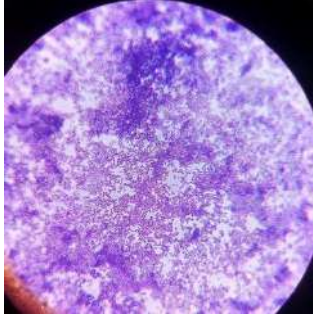
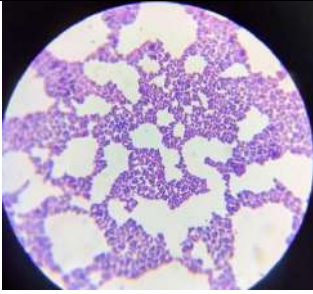
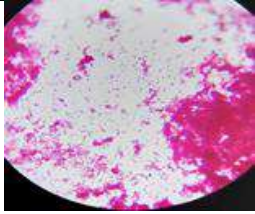
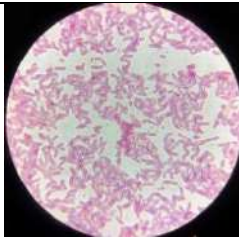

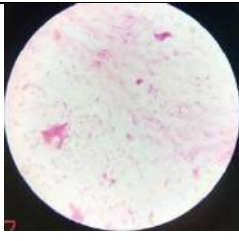

Souche	Gram	Aspect des cellules	Observation microscopique
A1	+	Cocci	 Microscopic image showing several purple-stained cocci (spherical bacteria) scattered across a light background.
A2	+	Cocci	 Microscopic image showing a few purple-stained cocci, some appearing in small groups.
A5	+	Cocci	 Microscopic image showing a dense field of purple-stained cocci, appearing as a thick layer of small spheres.
A9	+	Cocci	 Microscopic image showing a very dense field of purple-stained cocci, covering most of the field of view.
A10	+	Cocci	 Microscopic image showing a dense field of purple-stained cocci, with some larger, more irregular clusters visible.
B5	+	Cocci	 Microscopic image showing a dense field of purple-stained cocci, with some larger, more irregular clusters visible.

Tableau 5: Observation microscopique des bacilles

Souche	Gram	Aspect des cellules	Observation microscopique
A4	-	Bacilles	
A8	-	Bacilles	
A11	-	Bacilles	
B2	-	Bacilles	
B3	+	Bacilles	

Parmi les 16 souches, 11 isolats (68,75%) étaient de forme Cocci, dont cinq (5) souches sont Gram – (Tableau 3) et six (6) souches, Gram + (Tableau 4). Cinq (5) souches (31,25%) présentaient de forme bacillaire, composées de quatre (4) souches à Gram – et la souche B3 contenant des coccobacilles à Gram + (Tableau 5).

#### 4.5 Test Levane :

Au bout de 3 jours une poussée de colonies blanchâtres et convexes avec un aspect crémeuse des souches A1, A4, A6, A8, A10, A11, B1, B3, indique la polymérisation du fructose en poly-fructose par ces souches et donc, elles sont positives pour (possèdent) l'enzyme levane-sucrase.



Figure 26: Résultat du test Levane des souches (prise personnelle )

#### 4.6 Test de MEVAG :

Absence de Changement de Couleur dans les Deux Cas (Oxydatif et Fermentatif) Cette observation indique qu'aucune acidification du milieu n'a eu lieu, ce qui signifie que les souches testées n'ont pas métabolisé les glucides par des voies oxydatives ou fermentatives pour produire de l'acide

Les résultats négatifs au test de MEVAG peuvent aider à exclure certaines espèces de micro-organismes qui sont connues pour acidifier les glucides. Cela peut affiner l'identification des souches testées.


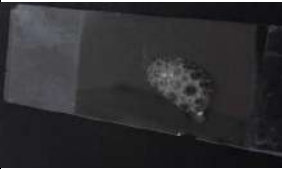






Figure 27: Résultat de test MEVAG (prise personnelle )

#### 4.7 Test catalase :

Les souches A1, A2, A5, A9, A10, B5 (Cocci à Gram positif ) sont de catalase positive donc sont des staphylocoques (Tableau 6). Pour confirmer l'espèce de ces staphylococcus, on fait recours au test de coagulase.

Tableau 6: Résultats du test catalase

Les souches (Cocci+)	Catalase	Résultats	Les Souches (Cocci+)	Catalase	Résultats
A1	+		A9	+	
A2	+		A10	+	
A5	+		B5	+	

Cocci + : Cocci à gram positif ; + : résultat (catalase) positif

#### 4.8 Test coagulase :

##### Résultats Observés

: Cocci Gram positif.







##### Souches Coagulase Positives

**A1, A2, A5, A10** : Ces souches montrent la formation d'un caillot dans le plasma, confirmant qu'elles sont *Staphylococcus aureus*.

##### Souches Coagulase Négatives

**A9, B5** : Ces souches ne montrent pas de formation de caillot, confirmant qu'elles sont des staphylocoques à coagulase négative.





Tableau 7: Tableau représentant le résultat de test de coagulase

Les souches	Coagulase	Résultats	Les Souches	Coagulase	Résultats
A1	+		A9	-	
A2	+		A10	+	
A5	+		B5	-	

Cocci + : Cocci à gram positif , + : positif , - : négatif

#### 4.9 Test d'oxydase :

Tableau 8: Tableau représentant le résultat du test oxydase

Les souches (Bacilles -)	A4	A8	A11	B2
<b>Oxydase</b>	+	+	+	+
<b>Résultats</b>				

Bacilles - : bacilles à Gram négatif , + : positif , - : négatif

#### Résultats Observés

Bacilles Gram négatif.

#### Souches Oxydase Positives

**A4, A8, A11, B2** : L'apparition d'une tache rose-violette après 30 secondes indique une activité oxydase positive, ce qui suggère que ces souches appartiennent au genre *Pseudomonas*.

**Souches Oxydase Négatives** : L'absence de tache rose-violette indique une activité oxydase négative, ce qui suggère que cette souche appartient au genre **Enterobacteriaceae**.

**Caractéristiques** : Bacilles Gram négatif.

#### 4.10. Test sur gélose Mac Conkey



Figure 28: Observation (résultat) du test Mac Conkey (prise personnelle )

Tableau 9: Tableau de résultats du test de Mac Conkey.

Les souches (bactéries -)	Lactose	Couleur des colonies
A3	+	Rouges
A4	-	Incolores
A6	-	Jaunes
A7	-	Incolores
A8	-	Incolores
A11	-	Incolores
B1	+	Rouges
B4	-	Incolores

Bactéries - : des bactéries à Gram négatif. , + : positif , - : négatif

Résultats Observés

- **Colonies Rouges (Fermentent le Lactose)**

**Souches A3, B1** : Ces souches produisent de l'acide à partir du lactose, ce qui provoque un changement de couleur des colonies en rouge.

- **Colonies Jaunes/Incolores (Ne Fermentent pas le Lactose)**

**Souches A4, A6, A7, A8, A11, B4** : Ces souches ne produisent pas d'acide à partir du lactose, donc les colonies restent jaunes ou incolores. Bacilles à Gram négatif qui ne fermentent pas le lactose.

#### 4.11 Activité pectinolytique

➤ **Présence de Pectinase**

**Taches Foncées/Nécrose** : Indique que les bactéries produisent de la pectinase, ce qui entraîne la dégradation de la pectine dans la pomme de terre, causant des taches foncées ou de la nécrose.

**Souches Positives** : A4, A8, A11 et B2

Ces souches montrent la présence de pectinase, indiquée par la nécrose autour du point d'inoculation.

➤ **Absence de Pectinase**

**Absence de Taches Foncées/Nécrose** : Indique que les bactéries ne produisent pas de pectinase et ne causent donc pas de dégradation notable de la pectine dans la pomme de terre.

**Souches Négatives** : Toutes les autres souches testées (comme indiqué dans le Tableau 10).

Les bactéries produisant de la pectinase sont souvent des pathogènes végétaux capables de causer des pourritures et des maladies des plantes. La présence de pectinase est une caractéristique de pathogènes comme

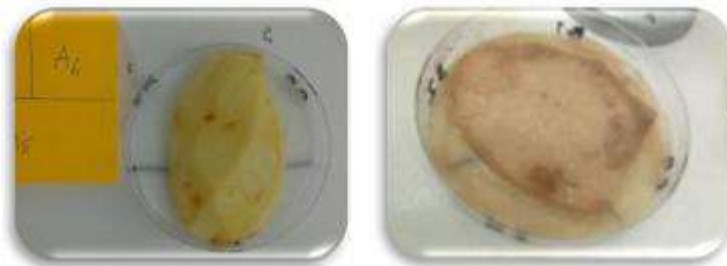


Figure 29: Le résultat de test de l'activité pectinolytique ; après 3 jours (à gauche), après 5 jours (à droite) (prise personnelle )

#### 4.12 Hypersensibilité de feuille de tabac

Pour déterminer le pouvoir phytopathogène de ces souches, le test d'hypersensibilité au tabac a abouti à des résultats dans le Tableau 10.

#### 4.13 Test de fluorescence



Figure 30: Résultat de test de fluorescence. Résultat positif pour la souche B1 (à gauche). Résultat négatif pour la souche A7 (prise personnelle )

#### Interprétation des Résultats

➤ **Fluorescence Positive**

**Observation** : Les souches montrent une fluorescence bleu-verte sous lumière UV, indiquant la production de pyoverdine. ( un pigment fluorescent bleu-vert)

Ces souches appartiennent au genre *Pseudomonas* et sont souvent phytopathogènes.

➤ **Résultats Observés**

**Souches Fluorescentes** : A4, A8, A11, B2, A2, A3, A6, B1, B4

Ces souches sont capables de synthétiser des pigments fluorescents dans des conditions de culture carencée en fer, ce qui est une caractéristique des *Pseudomonas fluorescents*.

#### 4.14 Résumé des Résultats des Tests Biochimiques (LOPAT), Fluorescence et Pathogénicité

Pour fournir un résumé complet, il est utile de compiler les résultats dans un Tableau, intégrant les tests biochimiques (LOPAT), la fluorescence et le test de pathogénicité.

Ces résultats permettent de caractériser et identifier les souches bactériennes, en déterminant leurs propriétés biochimiques et leur potentiel pathogène. En particulier :

**Identification des Pathogènes** : Les résultats des tests d'oxydase, de levane, et de pectinase sont utiles pour identifier les pathogènes et leur capacité à causer des maladies.

**Gestion des Maladies** : La connaissance des souches positives pour la pectinase et la catalase peut aider à élaborer des stratégies de gestion des infections dans les cultures.

Tableau 10: Résumé des résultats des tests biochimiques (LOPAT), fluorescence et test de pathogénicité

Tests	A4	A8	A11	B2
<b>Coloration de Gram</b>	-	-	-	-
<b>Levane</b>	+	+	+	-
<b>Oxydase</b>	+	+	+	+
<b>Pectinase</b>	+	+	+	+
<b>ADH</b>	-	-	-	-
<b>Hypersensibilité du tabac</b>	+	+	+	+
<b>Catalase</b>	-	+	+	+
<b>MEVAG</b>	-	-	-	NA

- : résultat négatif ; + : résultat positif ; NA : pas de résultat

Tableau 11: Résumé des Résultats

<b>Souche</b>	<b>Gram</b>	<b>Coagulase</b>	<b>Fermentation du Lactose</b>	<b>Pectinase</b>	<b>Fluorescence</b>	<b>Pathogénicité</b>
A1	+	+	Rouge (Fermente)	-	-	-
A2	+	+	-	-	+	-
A3	-	-	Rouge (Fermente)	+	+	+
A4	-	-	Jaune/Incolore (Non Fermente)	-	+	-
A5	+	+	-	-	-	-
A6	-	-	Jaune/Incolore (Non Fermente)	-	+	-
A7	-	-	Jaune/Incolore (Non Fermente)	-	-	-
A8	-	+	Jaune/Incolore (Non Fermente)	-	-	-
A9	+	-	-	+	-	+
A10	+	+	-	-	-	-
A11	-	-	Jaune/Incolore (Non Fermente)	-	+	-
B1	-	+	Rouge (Fermente)	-	+	-
B2	+	-	-	+	-	+
B3	-	-	-	+	-	+
B4	-	-	Jaune/Incolore (Non Fermente)	-	+	-
B5	+	-	-	-	-	-

#### 4.15 Galerie API

Après incubation (24h) à 37°C, la révélation des réactions (virage de couleur) et toutes autres tests nécessitant l'ajout de réactif ont été réalisés (figure 31). L'ajout de 1 goutte de réactif TDA, réactif de KOVACS (IND), et VP1 et VP2 pour la galerie API 20E (figure 32).



Figure 31: L'ajout des réactifs après l'incubation à 37°C (prise personnelle )



Figure 32: Les réactifs de la galerie API 20E. Réactif de KOVACS, réactif de VOGUES PROSKAUER 1 & 2 (prise personnelle)

La détermination de profil ainsi que l'identification ont été réalisés à partir de la base de données (IA\_galerie.swf, 2009) contenant du catalogue analytique pour l'identification microbienne (figure 35)

#### Identification des souches bactériennes

A4: *Pseudomonas savastanoi*

A11: *Pseudomonas fluorescens*

B2: *Pseudomonas syringae*

A8: *Burkholderia cepacia* (anciennement appelé *Pseudomonas cepacia* )

#### Discussions

La présence des colonies crémeuses au jaune d'œuf, un caractère typique de *Pseudomonas savastanoi* *pv. savastanoi* (*Psv*) observé, supporte les études précédentes par (Surico and Marchi 2003). Certaines souches sont fluorescentes et d'autres non-fluorescentes deviennent plus fréquentes comme un mécanisme d'adaptation aux conditions environnementales.

Le résultat du test LOPAT des souches A4 (Tableau 10) présente un caractère typique de *Psv* sauf pour la polymérisation du fructose (Levane). (Hassouna et al. 2022) dans la Kabylie (Bouira, Tizi-

Ouzou, Bejaïa) ont trouvé des souches de *Psv* levane négative, mais sont catalase positive et induisent l'hypersensibilité au tabac. Le *Psv* se différencie des autres *Pseudomonas* comme levane négative, cependant, **(Marchi et al. 2005)** ont documenté la propagation de souches levane positive de *Psv* à partir des nœuds d'olive à Florence, en Italie.

L'activité pectinolytique est indispensable dans la colonisation de l'olivier. L'agent pathogène colonise d'abord les tissus autour du point d'infection et se propage par les enzymes pectinolytique et hémicellulolytiques, perturbant l'intégrité des cellules hôtes et produisant des cavités qui sont ensuite remplies par la bactérie. Alternativement, il peut envahir directement les vaisseaux du xylème **(Buonaurio et al. 2015)**.

Les souches A4 et B2 n'induisent pas de nécrose sur les feuilles de tabac, alors que d'après le test de fluorescence, elles sont phytopathogènes.

L'inoculation de la plante de carotte, citron, pois et pomme avec le *Psv* **(A Al-obaidy 2023)** a révélé que la bactérie a la capacité d'infecter la plante de carotte mais n'a aucun effet sur le citron, les pois et les pommes. Le *Psv* isolé et maintenu dans les mêmes conditions environnementales de chaleur et d'humidité n'a montré de symptômes qu'au 9e jour de l'inoculation. Les premiers signes d'infection du plant de carotte sont apparus au 13e jour **(A Al-obaidy 2023)**

En Algérie, des plants d'oliviers certifiés (*O. europaea*) âgés d'un an de l'INPV d'Alger ont été inoculés artificiellement avec la suspension bactérienne contenant le *Psv*. La formation des nœuds/galles a été observée après une période de 4-5 semaines **(Hassouna et al. 2022)**. Il en a montré des mêmes résultats pour des types sauvages **(Surico, Iacobellis, and Sisto 1985)**

Une étude sur la galerie API a révélé la présence de plusieurs souches/espèces (*Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*) dans les galles. Ceci implique que l'association entre différentes espèces bactériennes intervient dans la formation des galles sur l'olivier, démontré par la présence de ces espèces.

*B. cepacia*, qui peut dégrader plus de 100 molécules organiques différentes et est très actif dans le recyclage des matières organiques (fixation de N<sub>2</sub>) dans la nature. Décrit à l'origine comme l'agent pathogène des plantes qui cause la pourriture de l'oignon, il est apparu au cours des 20 dernières années comme un agent pathogène nosocomial majeur **(Prescott, 2018)** avec d'autres bactéries à gram négative comme *Stenotrophomonas maltophilia* (isolé du sol, des plantes, de l'eau et du lait cru, et peut également être récupéré de l'environnement hospitalier).

L'interaction inter-espèces est rendue possible par le Quorum Sensing (QS), qui est un système de communication et de régulation intercellulaire, médiée par N-Acyl homolactoserine et joue aussi un rôle majeur dans la virulence de *Psv* **(Buonaurio et al. 2015b)**.

Des espèces non pathogènes comme *Erwinia toletana*, *Erwinia oleae*, *Pantoea agglomerans* souvent isolées des galles, coopèrent avec Psv dans la modulation de la maladie en établissant des interactions commensales, antagonistiques, mais aussi en interagissant avec le système de défense de la plante. La colonisation des plantes est souvent liée à la capacité de la bactérie à former une population microbienne adhérente; **Biofilm**.

Un rapport sur les études de système de QS du Psv et *E. toletana* a démontré que ces deux espèces forment une communauté sTableau dans les galles de l'olivier, partageant des signaux et coopérant, ce qui entraîne une maladie plus agressive (**Caballo-Ponce et al. 2018**)

Toutes les variétés d'olivier peuvent être touchées, mais à des niveaux très variables (**Hassouna et al. 2022**), et la circulation active des végétaux et des matières végétales, ainsi que l'origine de l'olivier (**Benjama 2003b**) influencent grandement le taux de susceptibilité

Une étude menée par (**Hassouna et al. 2022**) dans les wilayas de Bouira, Tizi-Ouzou et Béjaïa a démontré une présence de la tuberculose d'olivier dans la région d'étude. Une autre étude (**Chliyah et al. 2017**) rapporte l'Algérie parmi les pays les plus touchés par la tuberculose dans le bassin méditerranéen.

## Conclusion

L'étude préliminaire menée pour rechercher la tuberculose de l'olivier, une maladie grave en oléiculture, est cruciale pour la préservation des oliveraies algériennes. Voici un résumé des principales conclusions :

Un total de 16 isolats a été isolés à partir des tumeurs d'olivier, parmi lesquels 11 souches ont été de forme Cocci, dont 6 étaient des Cocci à Gram négative et 5 souches, Cocci à Gram positive. Cinq (5) souches présentant de forme bacillaire composées de la souche B3 un bacille à Gram positive (+) et 4 souches à Gram négative. Parmi les isolats de bacille à Gram –, deux bactéries à Gram négatif (A8 et A11) ont été identifiées comme *Bukholderia cepacia* (anciennement appelé *Pseudomonas cepacia*) et *Pseudomonas fluorescens* respectivement, tandis que la souche (B2) a été identifiée comme *Pseudomonas syringae*. La souche (A4), un bacille à Gram négatif et oxydase positive, a été identifiée par la galerie API 20E comme *Pseudomonas savastanoi*.

Les résultats ont permis d'identifier *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* comme l'agent causal de la tuberculose de l'olivier. Cette bactérie est caractérisée comme un bacille Gram négatif, catalase positive et oxydase positive.

Bien que l'agent causal ait été identifié, des études plus approfondies sont nécessaires pour mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie. Ces études permettront également de développer des stratégies de lutte plus efficaces pour protéger les oliveraies algériennes.

La tuberculose de l'olivier représente une menace sérieuse pour la production oléicole en Algérie. La collaboration entre les agriculteurs, les chercheurs et les autorités agricoles est essentielle pour mettre en place des mesures de prévention et de contrôle efficaces de cette maladie et pour protéger les cultures d'oliviers.

En conclusion, cette étude préliminaire constitue une étape importante dans la compréhension et la lutte contre la tuberculose de l'olivier en Algérie. Les résultats obtenus fournissent une base solide pour des recherches futures visant à mieux caractériser la maladie et à élaborer des stratégies de gestion plus efficaces.

## Références Bibliographiques

- A Al-obaidy, Ghaith 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): 108–12. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2023.19.002557>.
- Afidalo, A.** (2019). Association Française Interprofessionnelle de l’Olive, Bulletin de Santé du Végétal Olivier.
- Akrour N et Harani F.**(2011). Contribution à l'amélioration de l'activité antibactérienne d'extrait de feuilles d'olivier par addition de la Nisine, et leur spécialité: Technologie Alimentaire. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou Algérie.
- APO** 2016. Appellation d'origine protégée, huile d'olivier et olive.(ph. D) universidad politécnica de valencia, spain.
- Aydogan C,** Phytotherapy Research 2008. food supplementation with an olive (*Olea europaea* L) Leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive Monozygote twins. *Phytother. Res.* 22.1239.1242.
- Belguerri,H .** (2016). Contribution À L’étude De L’effet De L’irrigation Et La Fertilisation Azotée Et Potassique Sur Les Performances Productives Et Qualitatives De L’olivier Super -Intensif, Thèse doctorat Université De Lleida De 201p .
- Benedicte , D.** ( 2015 ) . Dictionnaire visuel des arbres et arbustes communs : olivier . Paris: Ulmer.319p.
- Benjama, Abdelhadi.** 2003. “Méthode d’évaluation Rapide Du Degré d’attaque de l’olivier Par La Tuberculose Causée Par Pseudomonas Savastanoi Pv. Savastanoi, En Verger Au Maroc.” *Fruits* 58 (4): 213–19. <https://doi.org/10.1051/fruits:2003009>.
- Biomérieux.** 2018. “API ® & ID 32 Identification Databases.” *Www.Biomerieux.Com*, no. 06 (June).
- Boussena, Sabrina.** 2019. “Manuel Des Travaux Pratiques de Bactériologie.”
- Breton, C., Medial, F., Pinatel, C., et Berville, A.** (2006). De l’olivier à L’oléastre : Origine Et domestication de l’*Olea europaea* L dans le Bassin méditerranéen, Cahiers agricultures Vol.15, n°4.
- Breton, Catherine, and André Bervillé.** 2012. “Histoire de l’olivier.” Versaille Cedex. [www.qauae.com](http://www.qauae.com).
- Buonauro, Roberto, Chiaraluce Moretti, Daniel Passos Da Silva, Chiara Cortese, Cayo Ramos, and Vittorio Venturi.** 2015a. “The Olive Knot Disease as a Model to Study the Role of Interspecies Bacterial Communities in Plant Disease.” *Frontiers in Plant Science* 6 (June). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00434>.
- Caballo-Ponce, Eloy, Xianfa Meng, Gordana Uzelac, Nigel Halliday, Miguel Cámara, Danilo Licastro, Daniel Passos da Silva, Cayo Ramos, and Vittorio Venturi.** 2018. “Quorum Sensing in

*Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Savastanoi* and *Erwinia Toletana*: Role in Virulence and Interspecies Interactions in the Olive Knot.” *Applied and Environmental Microbiology* 84 (18). <https://doi.org/10.1128/AEM.00950-18>.

**Catherine B, Christian P , Frédéric M et André B,** (2006).L’histoire de l’oléastre et de la domestication de l’olivier.L’Albera .Presses Universitaires de Perpignan, Institut Franco – catalan. p . 267-285.

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

**Chliyh, Mohamed, Amina Ouazzani Touhami, Karima Selmaoui, Rachid Benkirane, and Allal Douira.** 2017. “Inventory and World Geographical Distribution of the Olive Tree (*Olea Europaea* L.) Diseases Caused by Viruses, Bacteria and Phytoplasma.” *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology* 2 (3): 1410–40. <https://doi.org/10.22161/ijeab/2.3.51>.

**Christian, Pinatel, and Breton Catherine.** 2023. “L ’ Olivier Sauvage En Provence et Le Changement Climatique.” Paris.

**COI. 2023.** Conseil Oléicole Internationale “Journal Officiel Du Conseil Oléicole International N°130.” Madrid. [www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org).

**Edyta, Đermić, and Anita Silvana Ilak Peršurić.** 2009. “the occurrence of olive knot disease caused by *pseudomonas savastanoi* in the northwest region of istrian peninsula.” <https://www.researchgate.net/publication/267403826>.

**Hall, B. H., E. J. Cother, M. Whattam, D. Noble, J. Luck, and D. Cartwright.** 2004. “First Report of Olive Knot Caused by *Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Savastanoi* on Olives (*Olea Europaea*) in Australia.” *Australasian Plant Pathology* 33 (3). <https://doi.org/10.1071/AP04031>.

**Hassouna, Mohamed Amine, Samira Mebdoua, Khadidja Mahdi, Sara Messad, and Salim Lamine.** 2022. “Investigating the Spread of *Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Savastanoi* the Causal Agent of Olive Knot Disease in Algeria.” *Bioscience Research* 1 (202219): 726–37. [www.isisn.org](http://www.isisn.org).

**Jilani H. Cilla A, Barbera R. Hamdi M,** (2016). Improved bioaccessibility and antioxidant capacity of olive (*Olea europaea* L.) polyphenols through biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. *Ind Crops Prod* 84 : 131-138 .

**Kaniewski, David, Elise Van Campo, Jean-Frédéric Terral, Bouchaïb Khadari, and Guillaume Besnard.** 2012. “Primary Domestication and Early Uses of the Emblematic Olive Tree: Palaeobotanical, Historical and Molecular Evidence from the Middle East.” *Biol. Rev* 87: 885–99. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00229.x>.

**Kheira, Benyoub, Kacem Mourad, and Kaid Meriem.** 2019. *Detection of Pseudomonas Syringae pv Savastanoi, causal agent of olive knot in two regions of western Algeria (Ain Témouchent and Sig. Ain Temouchent: Harche.*

- Košćak, Laura, Janja Lamovšek, Edyta Đermić, Stefania Tegli, Igor Gruntar, and Sara Godena.** 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). <https://doi.org/10.3390/plants12020307>.
- Kumar Patidar, Mukesh, · Sadhana Nighojkar, · Anil Kumar, and · Anand Nighojkar.** 2018. "Pectinolytic Enzymes-Solid State Fermentation, Assay Methods and Applications in Fruit Juice Industries: A Review." *3 Biotech* 8:199. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1220-4>.
- M22017, Académie de Lyon** 2014. « Lecture d'une galerie API » Biotechnologie-ST2S
- Marchi, Guido, Carlo Viti, Luciana Giovannetti, and Giuseppe Surico.** 2005. "Spread of Levan-Positive Populations of *Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Savastanoi*, the Causal Agent of Olive Knot, in Central Italy." *European Journal of Plant Pathology* 112 (2): 101–12. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-0804-0>.
- Marone, Elettra, and Piero Fiorino.** 2012. "Oleiculture in Progress." *Advances in Horticultural Science* 26 (3/4): 163–75. <https://doi.org/10.13128/ahs-22672>.
- Micol V., Caturla N., Perez-Fons L., Mas V., Perez V., Estepa A.** the olive leaf extract exhibits-antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *antiviral Research* 2005.
- Missat ,L.** (2012) Perspectives de développement de l'olivier dans les Monts des Ksour . Ingénieur d'état. Univ. Tlemcen.pp14.22.23.25.32 / 102p.
- Penyalver, R., A. García, A. Ferrer, E. Bertolini, J. M. Quesada, C. I. Salcedo, J. Piquer, et al.** 2006. "Factors Affecting *Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Savastanoi* Plant Inoculations and Their Use for Evaluation of Olive Cultivar Susceptibility." *Phytopathology* 96 (3). <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0313>.
- Somova Li et al.** (2003). Antihypertensive, antiatherousclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *olea europaea*, subspecies *africana* leavers *Ethnopharmacol.*
- Surico, G, and G Marchi.** 2003. "Olive Knot Disease."
- Surico, G, N S Iacobellis, and A Sisto.** 1985. "Studies on the Role of Indole-3-Acetic Acid and Cytokinins in the Formation of Knots on Olive and Oleander Plants by *Pseudomonas Syringae* Pv. *Savastanoi*." *Physiological Plant Pathology*. Vol. 26.
- Turco, Silvia, Mounira Inas Drais, Luca Rossini, Elena Chaboteaux, Yaseen Jundi Rahi, Giorgio Mariano Balestra, Nicola Sante Iacobellis, and Angelo Mazzaglia.** 2022. "Complete Genome Assembly of the Levan-Positive Strain PVFi1 of *Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Savastanoi* Isolated from Olive Knots in Central Italy." *Environmental Microbiology Reports* 14 (2): 274–85. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13048>.

**Vladimir, A.** (2008 ). L'olivier et la vertu thérapeutique de ses feuilles . Docteur en pharmacie Univ.Nantes.pp28.50.58 / 94p.

**Zergoug, Mme, Amina Doctorante, Mostaganem.** 2017. “Mémoire de Fin d'études Devant Le Jury Président Mme CHOUGRANI Fadela Prof U. Mostaganem Encadreur Mr CHERIGUENE Abderrahim Prof U. Mostaganem Co Encadreur Mr ZABOURI Younes MAA U. Mostaganem.”

# ANNEXES

## Annexe A : Compositions des milieux de cultures

### Milieux de culture (g/l) :

#### King B :

- Mélange de peptone 20.0g/l
- Phosphate dipotassique 1.5g/l
- Sulfate de magnésium 1.5g/l
- Agar bactériologique 14.0g/l
- PH final :  $7.0 \pm 0.2$  à 25 °C

#### King A :

- Peptone. 20,0g/l
- Sulfate de potassium 10,0 g/l
- Chlorure de magnésium 1,4g/l
- Aga 15,0 g/l
- PH final à 25°C :  $7,2 \pm 0,2$  à 25°C

#### Gélose nutritive :

- Extrait de viande 3g/l
- Peptone 5 g/l
- Chlorure de sodium 5 g/l
- Agar 15 g/l
- Eau distillée 1L
- PH final =  $7,2 \pm 0,2$  à 25°C

#### Mac Conkey :

- Peptone. 20 g/l
- Lactose 10g/l
- Sels biliaires 5g/l
- Chlorure de sodium 5g/l
- Rouge neutre 0.075g/l
- Agar 12g/l
- PH final :  $7.4 \pm 0.2$  à 25 °C.

#### Levane :

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

#### MEVAG

- Macération de viande 50g/l
- KCl 5g/l
- Rouge de phénol 10g/l
- Agar. 3g/l
- (+ GLUCOSE), PH Final =7-7,2

### **Appareillage :**

Bec bunsen, Agitateur, Bain marie, Pipette pasteur, Réfrigérateur, Erlenmeyer, Entonnoir en verre, Balance, Autoclave, Anse de platine, Microscope

### **Verrerie**

Béchers, Lame et lamelle, Boite pétri, Flacon, Tube à essai ;

## **Annexe B : Protocoles et techniques**

### **1. Technique de la coloration de gram (Boussena 2019)**

- Préparer un frottis bactérien sur une lame stérile et fixer à la chaleur du bec Bunsen.
- Recouvrir au violet de Gentiane (cristal violet) pendant 1min. Eliminer l'excès par l'eau courante.
- Ajouter du Lugol (mordant) et appliquer pendant 1min, jeter l'excès par l'eau courante.
- Traiter à l'alcool 95° pendant quelques secondes (10-15 secondes), puis rinçage à l'eau.
- Recolorer à la Fuschine (safranine) pendant 60 à 75 secondes, rinçage à l'eau puis séchage.

Les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les Gram négatif se colorent en rose.

### **2. Préparation d'une suspension bactérienne utilisée dans le test d'hypersensibilité de feuille de tabac**

Une colonie isolée d'une jeune culture bactérienne sur milieu King B ou milieu nutritif, incubée pendant 24 à 48 heures à 28 °C (30 °C), a été mélangée à 5 ml d'eau distillée stérile et agitée pour homogénéiser la suspension.

### **3. Protocol de test de coagulase**

Le test de coagulase est réalisé à la suite de :

1. Préparation de la lame : Une goutte de plasma de lapin ou de plasma humain est déposée sur une lame de verre propre et stérile. Le plasma est ensuite mélangé délicatement pour former un film mince et uniforme sur la surface de la lame.
2. Inoculation de l'échantillon : Une petite quantité de la culture bactérienne prélevée à l'aide d'une boucle bactériologique et déposée sur la lame. La culture bactérienne est étalée et répartie uniformément sur la surface du plasma (Figure 17).

La lame est incubée à une température de 37°C pendant une période de 4 heures. Après l'incubation, on observe visuellement la formation d'un caillot dans le plasma. Si la souche bactérienne est coagulase positif (comme *S. aureus*), le plasma coagulera et formera un caillot visible sur la lame. En revanche, si la souche est coagulase négatif, aucun caillot ne se formera. (Sue ,2016).

#### **4. La technique de test de catalase**

La technique consiste à :

1. Préparation de l'échantillon bactérien : Une petite quantité de la culture bactérienne à tester est prélevée à l'aide d'une boucle bactériologique et déposée sur une lame propre et sèche.
2. Ajoute de peroxyde d'hydrogène : Une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3 % est déposée sur l'échantillon bactérien étalé sur la lame (Figure 16), Le peroxyde d'hydrogène sert de substrat pour l'enzyme catalase.

L'observation se fait immédiatement, Si l'échantillon contient de la catalase, une réaction enzymatique se produira, entraînant la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Cette réaction libère des bulles d'oxygène, ce qui est visible sous forme de formation de bulles ou d'effervescence. (Khatoun et al ,2022).

























#### **Annexe c : La galerie API**

##### **Préparation de suspension bactérienne pour l'API 20<sup>E</sup>.**

- Dans un tube à essai stérile mettre 5ml d'eau physiologie.
- A l'aide d'une anse de platine prélève la souche précisée.
- Mélanger les deux compositions pendant 2min pour obtenir la suspension.

Tableau 12 de la lecture de la galerie API20E

Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée API20E

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