



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : Laghcha saadia

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)

FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : AMELIORATION DES PLANTES

Thème

Contribution à l'identification de quelque isolat bactérien issu de tumeurs d'olivier.

Jury de soutenance :

Nom et Prénom

Grade

qualité

Amara yacine

Président

Ameur Djamila

Examinatrice

Zaza masouda

Promotrice

Promotion : 2018



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة عمار ثليجي - الأغواط



كلية العلوم
علوم فلاحية

مذكرة ماستر

تقديم الطالبة : لغشى سعدية
ميدان : علوم الطبيعة والحياة
شعبة : علوم فلاحية
تخصص : تحسين نباتات

موضوع البحث

المساهمة في تحديد بعض العزلات البكتيرية من أورام شجرة الزيتون

أعضاء لجنة المناقشة

الصفة

الاسم واللقب

رئيسا
مناقشة
مقررة

عمارة ياسين
عامر جميلة
زازا مسعودة

Remercement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Mm : ZAZA.M, son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre Eude en acceptant d'examiner notre travail Et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, A mes sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral, A mes frères, pour leur appui et leur encouragement, A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi



Tables des matières

Résumé	
Remerciement	
Dédicace	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Synthèse bibliographique	
Chapitre I: Généralités sur l'olivier	04
I.1.Historique et origine	04
I. 2. Aire de répartition de l'olivier dans le monde	05
3. Caractéristiques botaniques	06
3.1. L'espèce	06
3.2. Classification botanique de l'olivier	06
3.3. Caractéristique morphologiques	07
3.4. Système racinaire	08
3.5. Les organes aériens	08
3.5.1. Le tronc	08
3.5.2. Les charpentières	08
3.5.3. Les rameaux	09
3.5.4. Les feuilles	09
3.5.5. Les inflorescences et fleurs	09
3.5.6. Fruits et noyaux	10
4.Exigences de l'olivier	10
4.1.Exigences édaphiques	10
4.2. Exigences climatiques	11
5.Entretien de l'olivier	11
5.1 Fertilisation	11
5.2. Taille de l'olivier	12
6 La multiplication	12
7. Les types de l'olivier	13
7.1. L'olivier sauvage	13

7.2. L'olivier domestique	13
8. Cycle végétatif annuel de l'olivier	13
9. L'olivier dans le monde et en Algérie	14
9. 1. L'olivier dans le monde (Superficie et production)	14
9. 2. Les principales variétés cultivées de l'olivier dans le monde	15
9. 3. L'olivier en Algérie (Superficie et production)	15
10. Les principales variétés cultivées en Algérie	17
11. Les maladies et ravageurs d'olivier	18
11.1. Insectes ravageurs	18
11.1.1. Le psylle de l'olivier <i>Euphyllura olivina</i> (Costa)	18
11.1.2. La mouche de l'olive	18
11.1.3. La cochenille noire	18
11.2. Les maladies fongiques	19
11.2.1. La verticilliose	19
11.2.2. La tavelure (Œil de paon)	19
11.2.3. Le pourridié	19
11.3. Les maladies bactériennes	20
11.3.1 le Crown gall	20
11.3.2 <i>Xyllela fastidiosa</i>	20
11.3.3 Tuberculose de l'olivier	20
Chapitre II: Généralités sur la tuberculose de l'olivier	22
1. Description de la maladie	22
.2 Répartition géographique de la tuberculose d'olivier dans le monde	22
3. Systématique	23
4. Symptômes	23
5. Agent causal	24
6. Impact économique de la maladie	24
7. Mode d'infection	25
8. Cycle de vie de la bactérie	27
9. Lutte	30
Chapitre III : Matériels et méthodes	
1. Prélèvement des échantillons	32
2. Méthode d'isolement	32

3. Dénombrement des bactéries	33
4. Sélection et purification des isolats	34
5. Identification phénotypique des isolats	34
5.1. La fluorescence	35
5.2 Test de KOH	35
5.3. Coloration de Gram	35
5.4. Hugh et Leifson	36
5.1. Test Levane	37
5.2 Test oxydase	37
5.3 Test Pectinase	38
5.4 Test Arginine	38
5.5. Test tabac	38
Chapitre IV : Résultats et discussion	42
1. Dénombrement des bactéries	42
2. Sélection et Purification	42
3. Identification des isolats bactériens	43
4. La fluorescence	43
5. Test de KOH	45
6. Coloration de gram	45
7. Test Hugh et Leifson	47
8. Test LOPAT	48
8.1 Test levane	48
8.2 Test Oxydase	49
8.3 Test Arginine	49
8.4 Teste Pectinase	50
8.5 Test de réaction d'hypersensibilité sur Tabac	51
9. Test du pouvoir pathogène	52
Discussion	54
conclusion	60
Référence bibliographique	63
Annexes	

List des Figures

Figure n°1 : La répartition d'olivier dans le monde (La distribution de l'olivier dans le monde)	06
Figure n° 2 : Symptômes de la maladie de la tuberculose d'olivier	22
Figure n° 3 : Cycle de maladie de la tuberculose d'olivier causée par <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> . Bertolini, 2003).	29
Figure °n 4 : Schéma représentatif du Protocole expérimentale d'isolement à partir des tumeurs d'olivier.	33
Figure°n 5 : Test hypersensibilité sur les feuilles de tabac	39
Figure n° 6 : Taux des <i>Pseudomonas savastanoi</i> like bacterie par rapport à la flore totale dans des tumeurs d'olivier.	42
Figure n°7 : Aspect d'une culture bactérienne pure d'un des isolats bactériens sélectionnés (isolats E.1.2).	43
Figure°n 8 :résultat de la fluorescence	44
Figure n°9 : Résultat de test KOH (Formation du fil visqueux : réaction positive)	45
Figure n°10 : Résultat du test de la coloration de gram	46
Figure n°11 : Résultat de test Hugh et Leifson	46
Figure n°12 : résultat de test levane	48
Figure°n 13 : Résultats de test oxydase	49
Figure n°14 : Résultat du test Arginine déshydrolase (Originale , 2018)	50
Figure n°15 : résultat de test pectinase	51
Figure°n16 : résultat de hyper sensibilité sur les feuille de Tabac	51

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Les principales variétés d'olivier cultivées dans les pays méditerranéens(C.O.I., 2006). 15

Tableau n° 2 : Les résultats des tests KOH, coloration de Gram, Hugh et Leifson et la fluorescence sur KB. 47

Tableau n°3 : les résultats du test LOPAT 52

Tableau n° 4: Les résultats des tests KOH, coloration de Gram, Hugh et Leifson et la fluorescence sur KB. 53

Liste des abréviations

COI : conseil Oléicole International

C° : degré Celsius

ADH : Argénine déshydrogénase

V : Volume

ml : millilitre

h : heure

mn : minute

pH : potentiel d'hydrogène

UFC : unité formant colonie

N : la moyenne entre de colonies dans les boîtes dans la même dilution

n : Facteur de dilution

KB : milieu de culture King.B

LOPAT : Levan, Oxydase, activité pectonolytique, présence de l'arginine déshydrogénase, et hypersensibilité sur les feuilles de tabac .

KOH : d'hydroxyde de potassium

FAO : Food and Agriculture Organisation

ha : hectare

pv : pathovars

Résumé

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* est l'agent causale de la maladie de la tuberculose d'olivier (*Olea europea* L), une des maladies les plus graves affectant l'olivier. Elle est répandue dans la plupart des pays du monde et principalement dans les pays de la méditerranée.

L'objectif de notre travail était l'isolement de l'éventuel agent causal des tumeurs d'olivier et son identification utilisant des tests biochimiques et physiologiques et l'évaluation du pouvoir pathogène des isolats bactériens sur des plants d'olivier.

Les résultats obtenus, après le dénombrement bactérien, montrent que les *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* like bacteria représente 59.13% dans le premier échantillon et 69.64% dans le deuxième échantillon et 59.68% dans le troisième échantillon par rapport la flore totale. Les colonies suspectes sont identifiées au moyen de différents tests biochimiques, cette identification est confirmée par le test de pathogénicité, parmi les 31 isolats testés, 09 isolats sont des bacilles à gram négatif, aérobies strictes et produisent le pigment fluorescent, les résultats du test LOPAT montre que les tests sont: levane négatif, arginine négatif et pectinase négatif et oxydase négatif. Pour le test de tabac les 09 isolats testés ont donné une réaction d'hypersensibilité. Le test de pathogénicité confirme que les isolats testés sont pathogènes.

Mots clés : *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, tuberculose, tumeur, olivier, isolement, identification.

Abstract

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* is the causative agent of olive knot, one of the most serious diseases affecting the olive tree (*Olea europea* L). It is answered in most countries of the world and mainly in the countries of the Mediterranean.

The objective of our work was the isolation of the possible causative agent of olive knot and its identification using biochemical and physiological tests and the evaluation of pathogenicity of bacterial isolates on olive plants.

The results obtained after the bacterial enumeration show that the *Pseudomonas like bacteria* represents 59.13% in the first sample and 69.64% in the second sample and 59.68% in the third by bringing the total flora.

The suspicious colonies are identified by mean of different biochemical test, this identification is confirmed by pathogenicity test, among 31 isolates tested 09 are gram negative bacilli, strict aerobic and produce a fluorescent pigment, the LOPAT test shows that the tests are negative levane, negative arginine and pectine negative and negative oxidaseFor the tobacco test, the 09 isolates tested gave a hypersensitivity reaction. The pathogenicity test confirms that the isolates tested on olive plants are pathogenic.

Key words: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, olive knot, tumor, olive tree, isolation, identification.

ملخص

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* هو العامل المسبب لمرض السل الزيتون ، وهو أحد

أخطر الأمراض التي تصيب شجرة الزيتون (*Olea europea* L). ينتشر هذا المرض في معظم دول العالم وخاصة في دول البحر الابيض المتوسط

كان الهدف من عملنا هو عزل العامل المسبب المحتمل لأورام الزيتون وتحديد هويته باستخدام الاختبارات البيوكيميائية والفيزيولوجية وتقييم القدرة الإمراضية للعزلات البكتيرية باختبارها على شجيرات الزيتون

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها بعد العد البكتيري أن البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* like bacteria تمثل 59.13% في العينة الأولى و 69.64% في العينة الثانية و 59.68% في الثالثة. يتم التعرف على المستعمرات المشبوهة من خلال اختبار كيميائي حيوي مختلف ، يتم تأكيد هذا التحديد من خلال اختبار القدرة المرضية ، من بين 31 عزلة مدروسة تاكد وجود 09 عزلات بكتيرية عبارة عن عصيات سالبة الجرام ، الهوائية التنفس لها القدرة ، على افراز اصبغة الفلوروسين ويظهر اختبار LOPAT أن كل من الاختبارات levane و Oxidase و Pectinase و Arginine . اعطت نتائج سلبية لهذه العزلات البكتيرية.

بالنسبة لاختبار التبيغ ، أعطت العزلات العشرة التي خضعت للاختبار رد فعل فرط الحساسية. اما اختبار القدرة الإمراضية يؤكد أن العزلات التي تم اختبارها على الزيتون هي مسببة للمرض.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas savastanoi*.pv *savastanoi*، سل الزيتون ، الورم، الزيتون ، عزل ، تحديد هوية;

L'olivier est parmi les espèces les plus anciennes dans le Bassin Méditerranéen, il fait partie de l'identité des peuples méditerranéens, en Algérie nos ancêtres lui ont réservé une place de choix. De ce fait, elle consiste de tout temps; le fond du patrimoine arboricole national. Il est cultivé non seulement pour l'obtention d'huile mais aussi pour la production d'olive de table. L'olivier pousse là où rien ne pousse et offre l'ombre aux animaux et aux cultures, prévient l'érosion des sols, préserve des incendies, assure un revenu à son propriétaire. À côté de l'olivier cultivé, il existe un ancêtre sauvage, l'oléastre, dont l'olivier dérive, mais également des formes sauvages, très proches en apparence de l'oléastre, qui sont en réalité des formes cultivées retournées à l'état sauvage (Breton *et al*, 2006).

L'olivier occupe dans le monde 8,6 millions d'hectares. Le patrimoine mondial est évalué à 900 millions d'arbres avec des densités qui varient entre 17 à 400 arbres/ha. L'oléiculture est concentrée dans la région méditerranéenne, avec 98% des oliviers assurant 90% de la production mondiale d'huile d'olives (C.O.I., 2005).

La production mondiale d'huile d'olive connaît des fluctuations en fonction des conditions climatiques et de la bisannualité de la récolte. Cette production mondiale subit également l'influence de la production d'huile d'olive de l'Italie et de l'Espagne qui représente environ deux tiers de la production totale du globe. En effet sur 1000 tonnes, l'Espagne produit à peu près 1200, ce qui représente 41 % de la production mondiale et l'Italie produit à peu près 540 tonnes, un équivalent de 18 % sur le total produit dans le monde entier. Viennent ensuite les autres producteurs comme la Grèce qui représente 12,1 %, le Portugal qui représente 1,7 % et la France avec 0,2 %. Cela fait de l'Europe le principal continent producteur d'huile d'olive, car il détient environ 75 % de la production mondiale. On retrouve d'autres pays producteurs d'huile d'olive comme la Syrie qui représente 5,2 % de la production mondiale et la Turquie avec ses 5,1 %, la Tunisie avec 4,9 %, le Maroc : 3,3 % et l'Algérie qui produit 1,7 % du volume global d'huile d'olive dans le monde (FAO, 2013).

En Algérie, il reste toujours l'espèce fruitière la plus dominante du verger arboricole algérien, il occupe une superficie de 226 337 ha (33% de la surface arboricole) ce qui présente un nombre de 24.000.000 arbres (Anonyme, 2006). Les superficies occupées par l'olivier sont de l'ordre de 315 000 hectares avec 35 millions d'oliviers et une production

moyenne annuel de 35000 tonnes, Durant les 30 ans qui ont suivi l'indépendance, l'oléiculture fut abandonnée et le paysan livré à lui-même. Malgré une prise de conscience salvatrice, quoique tardive, l'évolution des plantations est insignifiante, en 10 ans on a planté moins de arbres, soit moins de 5000 oliviers par an. Un programme de plantation en intensif est mis en œuvre pour rattraper le retard accusé par l'Algérie dans le domaine de l'oléiculture par rapport aux autre pays de Maghreb, et ce, en dépit de la disponibilité de ressources naturelles considérables lui permettant d'occuper une place de choix sur le marché mondial (Bensemmane, 2009).

Au cours des années 1990, les autorités Algériennes ont constaté une dégradation de l'oléiculture liée à divers facteurs démographiques, économiques, techniques, phytosanitaires, aux incendies, pour améliorer cette situation, l'Algérie avait établir un plan nationale oléicole (PNO) pour l'extension de la superficie des oliviers à 500000ha au nord et au sud du pays (Argenson, 2004) essentiellement avec les deux variétés les plus dominantes Chemllal et Sigoise.

L'olivier est exposé comme d'autres arbres à l'effet de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques , qui ont un impact direct sur la capacité de productivité et le développement des plantes. Parmi les maladies d'origine fongique qui peuvent toucher l'olivier, nous avons surtout, la verticilliose (Benchaabane, 1990; Tahir-Benzina et Sahir-halouane, 2017) et la tavelure (Renaud, 1968; Roubal., 2017), d'autres maladies bactériennes peuvent également avoir un impact économique telles que le Crown gall (Bouzar, 1991; El Arbi *et al.*, 2011.) et la tuberculose d'olivier (Krid, 2009; Benjamaa, 2003, Quessada *et al.*, 2012; et Ouchayeh *et al.*, 2017).

La tuberculose d'olivier est l'une des maladies bactériennes qui présentent ces dernières décennies une menace sérieuse pour l'oléiculture algérienne. Elle se caractérise par des excroissances tumorales, également connues sous le nom de nœuds, produites sur les tiges, les feuilles des plantes. Ces tumeurs sont causées par la bactérie *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, elle est répandue dans tout le bassin méditerranéen (Benjamaa, 2003) .

En Algérie, la maladie a été détectée depuis la période coloniale(Outkhil.2017) . Actuellement, elle se développe partout où l'olivier est cultivé et cause surtout des dégâts dans les régions humides du nord du pays à savoir; Tlemcen, Oran, Alger et Constantine, (Serdouni 2013Boulsen et Bouraoui, 2016). En effet, chaque année des foyers de

tuberculose sont signalés dans des exploitations agricoles implantées dans plusieurs wilayas. Jusqu'à présent, et en absence de statistique officielle, les régions atteintes par l'infection pourraient être beaucoup plus vaste (Argenson et *al.*, 1999).

Dans la présente étude, des symptômes semblables à celles de la tuberculose de l'olivier ont été observées dans des oliveries à la wilaya de Djelfa et Batena, dans l'objectif de savoir les causalités de ces tumeurs, nous nous sommes proposées de faire un échantillonnage subjectif à partir des oliveries infectées et l'identification présomptive de l'éventuel agent causal de ces tumeurs en s'appuyant sur des tests phénotypiques, coloration de Gram et des tests biochimiques

Notre plan de travail est divisé en deux parties: Une première partie bibliographique qui porte sur la culture de l'olivier et la maladie de tuberculose de l'olivier et une deuxième partie pratique qui porte sur trois volets:

- Isolement de l'agent causal de la maladie à partir de tumeurs prélevées des arbres infectés puis,
- Identification des isolats obtenus sur la base des caractères morphologiques et des tests biochimiques ensuite,
- Le pouvoir pathogène des isolats est vérifié par un test de pathogénicité .

1. Historique et Origine

L'olivier est l'une des plus anciennes plantes cultivées et la seule espèce de la famille des oléacées avec des fruits comestibles. La domestication a eu lieu vers 6000–5000 av. J.-C., probablement à partir d'olives sauvages (*Olea. europaea* L. subsp. *sylvestris*). En raison de la présence de bourgeons latents abondants dans le bois, l'olivier est facile à reproduire et cela peut avoir contribué à sa culture dans l'antiquité (Zohary et Spiegel-Roy, 1975 ; Caballero et Del Río, 2008a). Les historiens débattent de l'origine et de la domestication de l'olivier, mais ils proviennent probablement de la région entourée par le sud de l'aire de répartition du Caucase, le haut plateau perse et le littoral syrien. On suppose que son expansion dans tout le bassin méditerranéen a eu lieu dans la péninsule anatolienne, à Chypre, en Crète et en Égypte, d'abord par les Grecs et les Phéniciens, plus tard par les Carthaginois, les Romains et les Arabes. Par conséquent, l'olivier est lié à l'histoire de certaines des plus anciennes civilisations méditerranéennes. Plus tard, lors des grands voyages transocéaniques des XV^{ème} et XVI^{ème} siècles, elle s'est étendue aux Amériques et, plus récemment, elle a été introduite et cultivée en Afrique du Sud, en Chine, au Japon et en Australie (Civantos, 2008).

A partir de la période phénicienne, le commerce d'huile d'olive a permis le développement de l'oléiculture au niveau de tout le bassin méditerranéen. Depuis cette époque, l'histoire de l'olivier se confond avec l'histoire de l'Algérie et les différentes invasions ont eu un impact certain sur la répartition géographique de l'olivier dont nous avons hérité à l'indépendance du pays (Loussert et Brousse, 1978).

L'histoire de l'olivier et en particulier, les origines de sa culture et de sa domestication a toujours été un sujet sensible et controversé. La thèse classique de la domestication de l'olivier situe en Palestine, dans le Chalcolithique de cette aire culturelle, au 4^{ème} millénaire avant notre ère, le passage de l'olivier sauvage à l'olivier cultivé (Zohary et Spiegel- Roy, 1975). La mise en évidence de restes d'oliviers (bois carbonisés et noyaux d'olive) dans une région où l'arbre n'était pas indigène, permettait indirectement de dater les origines de sa mise en culture (Terral Jean-Frédéric *et al.*, 2017).

Angles (2000) rapporte de son côté, presque la même version concernant la domestication de l'olivier. Selon ce dernier, l'olivier domestique, *Olea europea sativa*, est

originaires des hautes terres d'Asie Mineure, de Syrie et des plateaux iraniens et cette plante cultivée s'est peu à peu propagée vers d'autres régions méditerranéennes (Palestine, Egypte, Chypre, Crète) à la faveur des courants commerciaux de l'huile d'olive. Par la suite, les Phéniciens et les Grecs contribuèrent à diffuser l'olivier domestique et ses modes de culture dans l'ensemble du bassin méditerranéen. Les Romains parachevèrent la tâche en développant largement l'oléiculture stimulée par d'intenses échanges commerciaux. L'histoire de la géographie oléicole commence donc très tôt et s'organise en fonction d'une extension spatiale précoce mais limitée au bassin méditerranéen.

2. Aire de répartition de l'olivier dans le monde

La culture de l'olivier est concentrée entre les latitudes 30 ° - 45 ° dans les hémisphères nord et sud des régions climatiques de type méditerranéen. Ainsi, 97% de la zone de culture mondiale (environ 10,5 millions d'ha) se situent dans le bassin méditerranéen, 0,8% dans les Amériques, 1,5% en Asie et 0,01% en Océanie (FAO, 2008).

Dans le monde l'olivier est considéré comme une espèce caractéristique de la région méditerranéenne car l'implantation des oliveraies en Europe méditerranéenne, c'est-à-dire qu'il ne dépasse pas le cap du sud de la France, de la Yougoslavie, ainsi que certaines superficies des territoires de la Grèce, Portugal, et autres pays de la rive Nord de la méditerranée. Dans la rive Sud de la méditerranée en Afrique du Nord, l'olivier n'est pratiquement plus cultivé au-delà du 30^{ème} degré de latitude, limite imposée par les rigueurs du climat présaharien vers le Sud (Loussert et Brousse, 1978).

La découverte du nouveau monde, constitue une ouverture géographique pour l'oléiculture car elle offre de nouveaux espaces mais aussi s'effectue dans le cadre d'une colonisation entreprise par des populations méditerranéennes (espagnole et portugaise). Toutefois, l'expansion spatiale de l'oléiculture sur le continent américain a eu peu d'ampleur et s'est confinée dans quelques régions de climat méditerranéen (Californie, Chili) ou désertique (Argentine, Pérou, Mexique) (Angles, 2000).

Globalement, l'aire de répartition de l'olivier forme une bande étroite et relativement régulière le long des rivages Nord et Est de la méditerranée, qui s'y interrompt au niveau de l'égypte; couvre la région septentrionale de la Tunisie et de - l'Algérie, s'étale enfin, largement au Maroc et dans la péninsule Ibérique en débordant sur une partie de leur façade atlantique, atteignant l'archipel des îles canaries (Rugini *et al.*, 1998; Loumon et Giourage, 2003).



Fig n°1 : La répartition d'olivier dans le monde (COI,2013)

L'olivier connaît une extension progressive à travers le monde. Durant les dernières années, plusieurs pays non méditerranéens ont tendance à développer cette culture dans certaines régions spécifiques de leur territoire. Les pays méditerranéens, restent cependant, prédominants avec plus de 95 % de la production d'olive et avec environ 90 % de sa consommation (COI, 2013).

3. Caractéristiques botaniques

3.1. L'espèce

L'olivier est un arbre vivace très rameux, au tronc noueux, à l'écorce brune crevassée, il peut atteindre 15 à 20 m de haut. Cependant, sous l'action d'animaux - brouteurs ou dans les zones extrêmement ventées ou exposées aux embruns, il conserve une forme buissonnante de défense et se maintient en boules compactes et impénétrables, donnant l'aspect d'un buisson épineux. Dans la plupart des modes de culture, les oliviers sont maintenus entre 3 et 7 mètres de hauteur afin de rendre possible l'entretien et la récolte (Bernie et *al.*, 2006)

3.2. Classification botanique de l'olivier

L'olivier appartient à la famille des Oléacées, du genre *Olea*, le nombre chromosomique de $2n=46$ chromosomes. L'origine génétique de l'olivier est jusqu'à présent mal connue, l'oléastre a toujours été considéré comme l'ancêtre de l'olivier cultivé. L'étude de la diversité moléculaire de cultivars et d'oléastres, révélée que les cultivars s'apparentent aux oléastres

(Breton et al.,2002). La classification botanique de l'arbre de l'olivier selon Guignard (2004), est la suivante :

Embranchement : Spermaphyte.

Sous embranchement : Angiosperme .

Classe : Dicotylédones .

Sous classe : Astéridées .

Ordre : Lamiales .

Famille : Oléa .

Espèce : *Oléa européa* .

3.3. Caractéristique morphologiques

L'olivier se distingue des autres espèces fruitières par sa grande longévité et également par sa grande rusticité qui lui permet de se développer et de fructifier sous des conditions de climat subaride et parfois sur des sols très pauvres(Ricared ., et *al* 2015)

L'olivier est un arbre toujours vert, pouvant atteindre 12 à 15 mètres d'hauteur , avec un tronc normalement élancé, mais la taille le fait s'étaler avec un tronc court et des charpentières en zig-zig. Ce tronc est parfois énorme avec un système racinaire normalement peu profond et une tendance à former sous ce tronc, une souche ligneuse très important Les feuilles sont persistantes (durée de vie : 3 ans), simples, entières, lancéolées ; coriaces ; vert foncé dessus (cuticule importante), argentées dessous (nombreux poils pour limiter la déperdition d'eau) (Ricared ., et *al* 2015)

Lors de la taille, il faut toujours respecter un équilibre entre le système racinaire et la frondaison. Une taille abusive risque d'entraîner la mort du système racinaire correspondant ou la sortie de gourmands, Les fleurs, petites, blanc-verdâtres, en grappes axillaires, sont actinomorphes (régulières avec un axe de symétrie), de type 4 (4 sépales, 4 pétales, 2 étamines, 2 carpelles). de l'ovaire à 2 carpelles biovulés, on obtiendra un fruit de type drupe (ou fruit à noyau, c'est-à-dire à endocarpe ligneux) à une seule graine par avortement.

Pendant des années, les conceptions et les méthodes culturelles des oléiculteurs, ainsi que l'inexistence ou le non application des recherches sur la physiologie de l'olivier, ont conservé un caractère traditionnel à l'oléiculture. Mais, depuis la reconstitution des olivettes, qui a suivi le gel de février 1956, l'oléiculture subit une évolution rapide vers la modernisation et la rentabilisation, car cette « culture traditionnelle méconnaissait les énormes

possibilités de production d'une olivette implantée dans des conditions favorables, correctement cultivée et alimentée » (Leduc, 1990).

3.4. Système racinaire

L'olivier présente un système racinaire puissant, il assure sa vitalité, adapte la plante à la profondeur et aux caractéristiques physiques et chimiques du sol. Selon Civantos (1998), dans les sols à texture franche ; le développement en profondeur peut se situer entre 15 à 150 cm avec une concentration importante située aux environs de 80 cm. A noter que dans les sols sablonneux, les racines se développent jusqu'à 6m de profondeur. Pendant son développement en profondeur, le système racinaire est pivotant s'il est issu de plants de semis et fasciculé s'il est obtenu par bouturage.

3.5. Les organes aériens

3.5.1. Le tronc

C'est le principal support de l'arbre (un soutien à l'arbre); sur jeune arbre, le tronc est lisse de couleur grise verdâtre, puis devient en vieillissant noueux, fendu et élargi à la base. Il prend une teinte grise foncé et donne naissance à des cordes (Loussert et Brousse, 1978). Pour faciliter la récolte, les troncs ne doivent pas être hauts, l'idéal semble être une hauteur de 80 à 120 cm (Civantos, 1998).

3.5.2. Les charpentières

Elles indiquent la forme de l'arbre; elles sont au nombre de 2 à 4, selon le mode de conduite, Il s'agit de grosses ramifications destinées à former la charpente de l'arbre On distingue trois type de branches (Bensemmane, 2009).

- Les charpentières maîtresses ou branches mères qui prennent naissance sur le tronc, au nombre de 2 à 5.
- Les sous-charpentières ou les branches sous mère, qui prennent naissance sur les branches mères.
- Les rameaux qui sont portés par les branches sous mères.

3.5.3. Les rameaux

Ce sont des rameaux d'une année ou de l'année précédente. Ils sont de couleur grise-verdâtre, leur croissance s'est poursuivie tout au long du printemps et de l'automne, mesurant quelques dizaines de centimètre, selon la vigueur de l'arbre et de la variété, ils portent des fleurs puis des fruits (Loussert et Brousse, 1978).

On distingue trois types de rameaux : rameaux à bois, rameaux mixtes, et rameaux à fruits. Le rameau fructifère peut subir un allongement latéral et un allongement terminal. Selon Alkoun (1984), l'allongement terminal donne naissance à trois type de rameaux: les rameaux à entre nœud long, les rameaux à entre nœud court et des rameaux à entre noeud très courts. Par contre l'allongement latéral lui donne deux types de rameaux : Les rameaux anticipés résultants de l'évolution normale du bourgeon au cours de l'année de sa formation (Villemeur, 1997 in Daoudi, 1994) et les rameaux surnuméraires résultants de l'évolution des bourgeons surnuméraires.

3.5.4. Les feuilles

Les feuilles sont persistantes et d'une durée de vie de trois ans, elles confèrent à la famille des Oléacées un caractère botanique du fait de leur disposition opposée sur le rameau. (Loussert et Brousse, 1978) indiquent que la forme et les dimensions des feuilles sont très variables suivant les variétés, elles peuvent être ovales ; oblongues ; lancéolées oblongues et parfois linéaires. Les dimensions de la feuille varient de 3 à 8 cm de long et de 1 à 2,5 cm de large.

3.5.5. Les inflorescences et fleurs

Les fleurs de l'olivier sont groupées en inflorescence, ces dernières sont constituées par des grappes longues et flexueuses pouvant comporter de 4 à 6 ramifications secondaires. Selon Daoudi (1994), le grappe peut contenir un nombre de fleurs qui varient de 10 à 40. De son coté (Oukssili, 1983) précise que ce nombre est un caractère variétale. Dans le même contexte Nait taheen *et al.* (1995) ont affirmé que le nombre de fleurs parfaites par inflorescence est un caractère discriminatoire entre variétés d'olivier

Les fleurs de l'olivier sont hermaphrodites, toute fois les travaux d'Amirouche (1977) montrent que cette caractéristique change, selon les variétés. Parfois sur un même arbre, on trouve trois types de fleur :

- Des fleurs complètes (monoclines) pourvues d'organes (pistils et étamines) normaux, qui produisent fruits et graines.

- Les fleurs stériles (déclines) possédant des étamines avec pollen mais pas de pistils
- Les fleurs pourvues d'étamines normales et de pistils anormales (stigmates non fonctionnels ou ovaire sans ovules ou avec ovules anormaux).

3.5.6. Fruits et noyaux

Le fruit est une drupe charnue, riche en lipide qui lui donne son fort pouvoir énergétique, constitué d'un épicarpe fin et lisse qui recouvre un mésocarpe (la pulpe) est d'un noyau ou endocarpe sclérifié contenant une amande. Selon Fantanazza (1988), la composition du fruit est la suivante:

- Epicarpe: représente 1,5 à 2 % du poids total du fruit ;
- Mésocarpe: représente 65 à 83 % du poids total de fruit ;
- Endocarpe: représente 13 à 30 % du poids total de fruit
- L'huile: représente 15 à 30 % du poids total du fruit ;
- L'eau dans la pulpe représente 15 à 30 % du poids total du fruit. omne de la troisième année que ces dernières chutent (Varille, 1984).

Le fruit et le noyau sont de forme et de dimension variable caractéristique de la variété qui leur donne naissance. La forme du fruit peut être sphérique, ovoïde ou allongée. La longueur du fruit et celle du noyau sont le caractère le plus héréditaire (Fantanazza et Baldini, 1990). A l'approche de la maturité, l'épicarpe change de couleur violette ou rouge à la coloration noirâtre, sauf pour la variété (*Leucocarpa*) qui ne change pas de couleur.

4.Exigences de l'olivier

L'olivier est une espèce typiquement méditerranéenne, très bien adaptée à un climat caractérisé par une période sèche, l'été, pendant laquelle l'olivier va utiliser les réserves d'eaux accumulées dans le sol durant la période humide (Denis, 1998).

4.1.Exigences édaphiques

Tous les terrains sont susceptibles à la plantation de l'olivier à l'exception des sols très argileux. Cependant il est préférable que le sol soit profond et perméable. La texture doit être équilibrée avec un rapport éléments fins/éléments grossiers de l'ordre de 50/50 (Tombesi et Tombesi, 2007). En général, on recommande les pourcentages suivants :

- L'argile : 3-35% avec un maximum de 50%,
- Le limon : 5-35% avec un maximum de 45%,
- Le sable entre 45-75%.

Le **pH** peut aller jusqu'à 8,5 avec des risques de carence en fer (cas de sols trop calcaires) (Sikaoui, 2006).

4.2. Exigences climatiques

Une des caractéristiques du climat méditerranéen est l'irrégularité des précipitations annuelles et la mauvaise répartition des pluies. En général les deux-tiers, voire les trois-quarts de ces précipitations tombent en hiver (de Novembre à Février), c'est à dire en période de repos des arbres. Alors qu'en été (Juin, Juillet, août), les précipitations sont pratiquement nulles, ou du moins sans effet pour les arbres à cause de la grande évaporation (Belguerri , 2016).

Les températures doivent en effet être inférieures à 11-12°C pendant au moins un mois. Enfin, les températures élevées durant la maturation du fruit provoquent une augmentation de l'acide linoléique dans l'huile et une forte réduction de l'acide oléique (Tombesi et Tombesi, 2007).

5. Entretien de l'olivier

5.1 Fertilisation

Les normes de fertilisation pour l'olivier ne sont pas encore clairement définies à travers le monde (Bouhafa, 2016); le potassium est un élément essentiel pour les arbres. Il doit être apporté à des doses voisines voire supérieures à celle de l'azote. Il joue un rôle important dans différentes fonctions cellulaires (synthèse des sucres et des protéines, turgescence des tissus, augmentation de la résistance à la déshydratation et transfert des substances minérales et organiques dans les différents organes de l'arbre,...) (Ben Mimoun, 2002). Le sol est aussi susceptible de fixer une partie du potassium apporté à l'arbre ou d'en perdre par lessivage, d'où la nécessité de corriger la dose d'apport calculée sur la base des exportations (Allalout et al ., 2013).

5.2. Taille de l'olivier

Selon l'âge de l'olivier, on pratique trois types de taille: taille de formation, taille de fructification et taille de rajeunissement (Rouques *et al.*, 2015):

➤ La taille de formation forme la silhouette de l'arbre avec trois ou quatre branches charpentières, et un tronc d'un mètre de hauteur. Après cinq tailles, la charpente étoffée d'une trentaine de rameaux est terminée. L'arbre peut porter ses premières olives.

➤ La taille de fructification permet une bonne production d'olives tout en favorisant une croissance régulière. Elle consiste à éclaircir l'arbre en enlevant les rameaux gourmands*, et les rameaux de l'année précédente qui ont porté des fruits et sont devenus stériles. Les rayons du soleil baigneront ainsi le plus possible toutes les parties de l'arbre. « Lorsque l'olivier est bien taillé, une grive doit passer à travers en volant » dit-on en pays grassois .

➤ La taille de rajeunissement s'applique à des arbres non taillés depuis des années, ou touchés par des maladies ou des gels.

6 La multiplication

L'olivier est multiplié par voie végétative : la multiplication par semis afin d'obtenir des francs et la multiplication par greffage (écusson) dans notre but améliorer notre variété, et la deuxième méthode est le bouturage pour obtenir des plants identique ou plant mère.

Dans la première multiplication (greffage), on récolte les graines de l'olivier et puis en les semis pour produire des francs qui assure la vigueur de l'arbre, sa durée de vie, sa précocité, sa production et son adaptation au terrain. La deuxième opération est consacrée à mettre en évidence deux entités végétale en contact qui sont: le greffon (la partie aérienne où la variété choisi à produire) et le porte greffe. Dans la deuxième méthode de multiplication (bouturage) on produit des plants identiques ou plant mère à partir des jeunes rameaux (Breton *et al.*, 2006).

7. Les types de l'olivier

7.1. L'olivier sauvage

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

7.2. L'olivier domestique

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

8. Cycle végétatif annuel de l'olivier

Au cours de son cycle annuel de développement, l'olivier passe par des phases première en Janvier, février: induction, initiation et différenciation florale; et deuxième courant mars: croissance et développement des inflorescences à raisselle des feuilles que portent les rameaux de année précédente; en suit Avril: pleine floraison; et la Fin Avril-début mai: fécondation et nouaison des fruits; Juin: c'est le début de développement et grossissement des fruits; et après Septembre: véraison; et Octobre: maturation du fruit et son enrichissement en huile et Mi-Novembre en janvier: récolte des fruits. La période la plus intense du cycle annuel se déroule de mars à juin. Au cours de cette phase, les besoins en eau et en nutriments de l'arbre sont les plus intenses. La durée de vie de r olivier s'étale sur plusieurs dizaines d'années à des siècles. Les rendements sont variables en fonction de l'âge des arbres, des densités de plantation et des soins culturaux

L'induction florale est déjà intervenue 90 à 100 jours avant le début de la floraison et vraisemblablement antérieurement à une période où aucune évolution n'est visible, ce caractère traduit une exigence pour oléiculture, celle de ne tailler l'Olivier qu'après le bon déroulement de cette induction florale. Une taille d'automne va automatiquement conduire

l'olivier à privilégier une pousse à bois au déterminent d'une croissance florale. La régularité d'une pousse annuelle est par conséquent une condition « sine qua non » pour obtenir une fructification annuelle (Argenson et *al.*, 1999).

9. L'olivier dans le monde et en Algérie

9. 1. L'olivier dans le monde (Superficie et production)

La culture de l'olivier occupe en 2005 dans le monde 7,5 millions d'hectares pour une production de 14,9 millions de tonnes d'olives avec un rendement de 20 quintaux/ha. Sur la période 2000-2006, la production mondiale moyenne annuelle s'élève à 2.778.800 tonnes d'huile d'olive, et à 1 638 300 tonnes d'olives de table, La production mondiale d'huile d'olives est passée de 1 453 000 tonnes en 1990 à 2 820 000 tonnes en 2006, alors que dans le même temps la production d'olives de table passait de 950 000 tonnes à 1 832 500 tonnes (FAO,2007).

La production mondiale se situe pour l'huile d'olive à 1 400 000 tonnes et pour les olives de table entre 600 et 700 000 tonnes. La production mondiale d'huile d'olive ne représente cependant qu'environ 3% de la production d'huile végétale comestible du monde, et est largement dépassée par celle de l'huile de soja (32% de la production mondiale avec 32 Mt/an), de l'huile de palme (28% avec 27,2 Mt/an), de l'huile de graine de colza (13,5% avec 13,6 Mt/an), de tournesol (8,9% avec 9 Mt/an), d'arachide (4,8% avec 4,8 Mt/an), et de coton (4,2% avec 4,2 Mt/an). De même, dans le commerce international, les huiles d'olive ne représentent pas plus que 2% du volume d'huiles végétales comestibles vendues (FAO, 2007).

L'oléiculture occupe toutefois une part très importante dans l'économie agricole de certains pays méditerranéens et la tendance de la consommation mondiale est à la hausse. Les quatre premiers pays producteurs (Espagne, Italie, Grèce et Turquie) assurent 80% de la production mondiale d'olives et les dix premiers, tous situés dans la zone méditerranéenne, 95%. La production d'olives de table connaît elle un quadruplement en passant de 346 730 quintaux en 2000 à plus d'1,4 million de quintaux en 2012, alors que celle de l'huile d'olive atteint les 728 000 hl en 2011 contre 333 200 hl

9. 2. Les principales variétés cultivées de l'olivier dans le monde

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

On reconnaît des milliers de cultivars d'olivier différenciés par leur port et par la phénologie et la morphologie des feuilles et des fruits. Ce n'est que récemment que la diffusion de certains d'entre eux s'est faite sur des aires très étendues. Ils sont groupés avec des noms évocateurs : Koroneiki, Picholine, Ascolana, Arbequina, Picual, Frantoio, Moraiolo, Picholine marocaine et Chemlali pour exemples à diffusion mondiale (Besnard *et al.*, 2000). Parmi ces variétés beaucoup d'entre elles sont cultivées dans la méditerranée (Tableau n°1).

Tableau n°1 : Les principales variétés d'olivier cultivées dans les pays méditerranéens

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

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

(C.O.I., 2006).

9. 3. L'olivier en Algérie (Superficie et production)

L'oléiculture est pratiquée en Algérie par près de 129 089 exploitations agricoles, dont seulement 13 256 irriguées (pour l'olive de table). Plus de 70% des exploitations sont de petites tailles avec une production destinée à l'autoconsommation. Les grandes exploitations de plus de 200 ha ne représentent qu'une faible proportion de 5,4%. Les unités de

transformation (huileries) sont au nombre de 1 828 unités, dont 80% traditionnelles. Cela nuit considérablement à la qualité de l'huile d'olive produite. Les unités de conditionnement sont peu répandues, l'huile d'olive étant vendue en vrac (Bensemmane, 2009).

Dans notre pays l'oliveraie algérienne se répartit sur trois zones oléicoles importantes: la zone de la région Ouest, répartis entre cinq wilayas: Tlemcen, Ain Témouchent, Mascara, Sidi Belabes et Relizane. . La zone de la région centrale du pays, de loin la plus importante, répartis entre les wilayas d'ain Defla, Blida, Boumerdés, Tizi- Ouzou, Bouira et Bejaia: cette zone représente 57,5 du verger oléicole national. La région du centre, Kabylie (Bouira, Bejaia et Tizi-ouzou) détient à elle seule près, la superficie oléicole nationale, il s'agit surtout des vergers extensifs situés sur des sols à forte déclivité, ce qui constitue une contrainte à tout recours à l'intensification. La zone de la région «Est» est représentant 26,1 du patrimoine national, et répartis entre les wilayas de Jijel - Skikda - Mila et Guelma. Même avec ces superficies assez importantes et malgré l'importance du patrimoine oléicole, qui constitue 40% du verger arboricole national (Bensemmane, 2009).

L'extension de l'oléiculture sur tout le territoire national selon le mode de production intensive se traduit par un triplement des plantations d'oliviers en Algérie durant les dix dernières années. "En termes d'équivalents plants, entre 2000 et 2012, le chiffre passait de 16,8 millions de plants en 2000 à 48 millions de plants à fin 2012", Plus de 240 200 ha ont été plantés durant la période 2000-2012, avec un taux de 37% d'arbres plantés entre 2009 et 2012. Le potentiel existant entre 1970 et 2 000 s'établissait à plus de 16 millions de plants. En termes de superficie, la filière oléicole occupe actuellement 389 000 ha. Elle se présente, de ce fait, comme la filière arboricole la plus importante en couvrant 38,7% des superficies (Bensemmane, 2009)

En Algérie, Il est possible d'identifier deux types de système de production: moderne et traditionnel, avec une forte prédominance de ce dernier. La profondeur historique est un élément de distinction entre le système moderne plus récent et traditionnel assez ancien. La logique spatiale de ces deux systèmes permet également de caractériser deux types de géographies et de zones productrices. La plupart des oliveraies (80%) sont situées dans des zones de montagne, sur des terrains accidentés et marginaux, peu fertiles et caractérisés par une pluviométrie moyenne comprise entre 400 et 900 mm/an. Le reste des oliveraies (20%) sont localisées dans les plaines occidentales du pays (Mascara-Sig-Relizane), où la pluviométrie moyenne annuelle est de 300-400 mm (Hadjou *al* 2013).

10. Les principales variétés cultivées en Algérie

Azzeradj : Arbre rustique et résistant à la sécheresse ; fruit de poids élevé et de forme allongée utilisée pour la production d'huile et olive de table, elle est localisée surtout dans la région de la Petit kabylie (Oued Soummam), elle occupe 10% de la surface oléicole nationale (Saad, 2009)

Chemlal : 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% de la surface oléicole nationale. , elle occupe 40% des verges oéicole national, « présente surtout en kabylie » s'étend des monts Zekkar à l'ouest aux Bibans à l'est (Saad, 2009).

Limli : Variété précoce, peu tolérante au froid, résistante à la sécheresse, le fruit et de poids moyen et de forme sphérique, utilisée pour la production d'huile et olive de table, rendement de 16% à 20%. Originaire de sidi-aiche (Bejaia), elle occupe 8% du verger oléicole national, localisée sur les versants montagneux de la base vallée de Soummam jusqu'au littoral (Saad, 2009)

Sigoise : ou olive de Tlemcen ou olive de tell : Variété rustique, le fruit et de poids moyen et de forme ovoïde, produit une olive à deux fins est très recherchée pour la conserverie et donne un bon rendement en huile de 18% à 22% de la surface oléicole nationale . Elle est dominante depuis Oued Rhiou jusqu'à Tlemcen (Saad, 2009).

Rougette de Mitidja : Variété rustique : le fruit est moyen et allongé, utilisé pour la production d'huile, rendement de 18 à 20% de la surface oliéicole nationale . Plaine Mitidja (Saad, 2009).

Grosse de Hamma, Oueld Ethour : Variété précoce, rustique, résistante au froid et à la sécheresse, fruit de poids très élevé et de forme allongée, double aptitude : huile et olive de table, le rendement de 16 à 20 % de la surface oléicole nationale il y'as une coupure a Hamma (Constantine) (Saad, 2009).

Blanquette de Guelma : Sa rigueur est moyenne, résistante au froid et moyennement à la sécheresse; le fruit est de poids moyen et de forme ovoïde, destiné à la production d'huile, le rendement est de 18 à 22 % de la surface oléicole nationale, elle est originaire de Guelma, assez répondeue dans le Nord-est Constantinois, Skikda et Guelma. (Saad, 2009).

11. Les maladies et ravageurs d'olivier

L'olivier est un arbre résistant : la meilleure preuve en est son exceptionnelle longévité. *Olea europea* est cependant sujet à quelques maladies et l'attaque de plusieurs ravageurs,

11.1. Insectes ravageurs

11.1.1. Le psylle de l'olivier *Euphyllura olivina* (Costa) (hémiptères, Psyllidae)

L'insecte nuisible à l'état larvaire car, d'une part, il ponctionne une partie de la sève qui alimente le végétal sur lequel il se trouve, altérant ainsi son développement normal, et, d'autre part, il excrète un miellat qui favorise un champignon saprophyte (fumagine) altérant la photosynthèse. Les organes attaqués par la psyllose de l'olivier montrent ensuite un flétrissement, suivi d'un brunissement partiel qui tend à s'étendre et à s'intensifier, conduisant au dessèchement et à la chute des organes concernés. La mise en place d'une lutte intégrée s'avère donc nécessaire et même indispensable pour maintenir la psylle au-dessous de son seuil de nuisibilité sans pour autant affecter l'équilibre écologique de la biocénose de l'olivier (Zouiten, 2011).

11.1.2. La mouche de l'olive

Bactrocera oleae est le ravageur principal de l'olivier. Cet insecte peut causer des dégâts très importants, jusqu'à 100% d'olives abîmées et inutilisables. La période la plus critique se situe en septembre – octobre, mais la mouche est présente dès le mois de juin dans les vergers en zones précoces et réalise 4 à 5 générations jusqu'à fin octobre, et parfois mi-novembre. Il n'existe pas de solution unique de lutte contre ce ravageur. Les techniques s'orientent vers une alternance des produits, l'utilisation de produits préventifs ou la conjugaison de plusieurs méthodes. Les pièges sont utilisés exclusivement pour le contrôle et le suivi de l'insecte. L'action des insectes auxiliaires sur la mouche de l'olive est très limitée. (Ricard, 2007).

11.1.3. La cochenille noire

La cochenille noire *Saissetia oleae* est un des principaux ravageurs de l'olivier. Elle ne provoque pas de dégâts directs comme la mouche ou la teigne, mais elle peut

engendrer un affaiblissement très important des arbres atteints en favorisant le développement de fumagine. Certains automnes sont très propices à l'installation des nouvelles larves et les arbres se couvrent de miellat, substance poisseuse sécrétée par ces insectes, donnant un aspect brillant aux feuilles, la consommation des organes floraux rend toute la fécondation impossible pour les fruits les dégâts se manifestent par deux chutes successives. alors la teigne provoque 30-40% des pertes d'olive (Argenson et *al.*, 1999).

11.2. Les maladies fongiques

L'olivier souffre de l'attaque de beaucoup de champignons qui occasionnent dégâts non tolérables. Les principales maladies fongiques qui peuvent induire des pertes considérables sont :

11.2.1. La verticilliose

Des Champignons filamenteux sont la cause de cette maladie vasculaire *Verticillium dahliae*. Il pénètre dans l'arbre par les racines et bouche les vaisseaux conducteurs. On observe alors un dépérissement de l'arbre : les feuilles deviennent ternes, puis s'enroulent vers leur face inférieure puis deviennent brunes, sa dissémination se fait grâce à sa conservation sous forme de microsclérotés (Daayf, 1993) . Il n'existe actuellement aucun traitement curatif.

11.2.2. La tavelure (Œil de paon)

L'oeil de paon est dû au champignon *Cycloconium oleaginum* qui est réparti dans la zone méditerranéenne et dans les zones de culture de l'olivier. Il est responsable de graves pertes de rendement dans nombreuses régions oléicoles partout dans le monde. En Algérie selon les travaux de Guéchi *et al.* (1998) . La prévention vis à vis l'attaque de *Cycloconium* consiste en l'application de la bouillie bordelaise.

11.2.3. Le pourridié

Le pourridié est une maladie mortelle pour l'olivier et très contagieuses, causée par un champignon *Armillaria mellea* dont le mycélium s'installe entre le bois et l'écorce. Le traitement est difficile et peu efficace. Les symptômes apparaissent plusieurs années après la contamination. Cette maladie est souvent fatale pour l'olivier et très contagieuse pour ces voisins (Mokrani et Medjahed, 2007).

11.3. Les maladies bactériennes

Parmi les maladies bactériennes les plus redoutables chez l'olivier nous pouvons citer:

11.3.1 le Crown gall

Maladie provoquée par une bactérie pathogène nommée *Agrobacterium tumefaciens*, caractérisée par la formation de tumeurs au niveau du collet ou des racines. Souvent présente de manière native dans certains sols, elle nécessite une blessure récente non cicatrisée du végétal pour permettre l'infection. Aucun produit chimique actuel ne s'est encore avéré efficace contre ce pathogène (El arbi *et al.*, 2011).

11.3.2 *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa est une bactérie nuisible sur 200 espèces végétales environ, appartenant à 50 familles botaniques. Cette bactérie se propage par le biais d'insectes piqueurs-suceurs polyphages, qui se nourrissent de sève brute en piquant le xylème des végétaux, et qui peuvent donc potentiellement véhiculer la bactérie vers une nouvelle plante hôte. Le seul moyen de lutte est l'arrachage des végétaux contaminés (El arbi *et al.*, 2011)

11.3.3 Tuberculose de l'olivier

Pseudomonas savastanoi est une bactérie, c'est un bâtonnet Gram négatif, mobile, endophyte, phytopathogène causant des excroissances, nommées: galles, nœuds ou des tumeurs, principalement sur les parties aériennes des plantes, leur incidence sur les feuilles et les fruits étant rares (Benjama, 2003 ; Young, 2004). *P. savastanoi* infecte le système de circulation de la sève et dont il est très difficile de se débarrasser. Pour limiter la maladie, il faut éliminer, autant que faire se peut, ces branches malades et surtout bien désinfecter les outils de coupe avant de passer à un autre olivier (Attaran *et al.*, 2014)

1. Description de la maladie

Pseudomonas savastanoi pv savastanoi est l'agent causale de la tuberculose de l'olivier, observé pour la première fois par Savastanoi en 1870 puis au début du vingtième siècle par Smith et Rorer (Guido M., 2005). Il est considéré un de la plupart des maladies graves affectant des oliviers (*Olea europaea* L.) dans la plupart des régions oléicoles dans le monde entier et principalement dans des pays méditerranéens, où cette récolte a grandi pendant des siècles. La maladie peut mener aux graves dommages dans des oliveries, causant des pertes sérieuses en termes de production. C'est probablement la première maladie clairement décrite dans l'antiquité par Théophraste (Iacobellis, 2001), et son étiologie bactérienne a été connue par le travail de Savastano. Actuellement, il y a beaucoup de faits inconnus de l'épidémiologie de cette maladie et de son contrôle chimique. La maladie agit sur la croissance des repousses et elle affecte les organes reproducteurs. L'intensité des dégâts provoqués est fortement liée au nombre de tumeurs par arbre (Benjama. 2003).



Fig n° 2: Symptômes de la maladie de la tuberculose d'olivier(DSA la wilaya d'Oran .2017)

2. Répartition géographique de la tuberculose d'olivier dans le monde

La tuberculose sur olivier est une maladie bactérienne très importante, elle avait été décrite pour la première fois par les Grecs au 4ème siècle B.C. (Iacobellis, 2001).

La maladie a été signalée en Afrique depuis le début du 19^{ème} siècle, En Algérie la maladie est traditionnellement connue. Elle était localisée dans la région de l'Est vers les années 1960. Actuellement on la rencontre partout où l'on cultive de l'olivier (Benjema, 1998).

3. Systématique

L'évolution des processus de classification, d'identification et de nomenclature de *Pseudomonas syringae* est décrite en se référant à l'origine d'une espèce pathogène de lilas, dans la révision des noms bactériens en 1980, *P. syringae* en est venu à représenter plus de 40 populations pathogènes spécifiques de l'hôte, en tant que pathovars. Les études d'hybridation ADN-ADN et les récentes analyses de séquences multi-locus (MLSA) indiquent un « *Pseudomonas*. complexe *syringae* » qui englobe désormais jusqu'à dix espèces de *Pseudomonas* et 60 pathovars de *P. syringae*. Une réévaluation du complexe à l'aide d'approches polyphasiques pourrait permettre la révision de ces espèces et la distribution des pathovars chez un certain nombre d'espèces ou de "génomospécies". Les classifications et nomenclatures alternatives de ces taxons sont discutées, le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonadaceae* (Young, 1996); le statut taxonomique de cette espèce est comme suit:

Règne : Bacteria

Division : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Genre : *Pseudomonas*

Espèce : *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

4. Symptômes

Les symptômes de la tuberculose d'olivier sont des tumeurs qui se développent en réaction aux facteurs produites par la bactérie (Rodriguez-Moreno *et al.*, 2008; Matas *et al.*, 2009).

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

L'attaque commence timidement sur brindille de rameaux et n'épargne pas les charpentes, elle se manifeste par formation de tumeurs parenchymateuse à forme irrégulière de couleur vert au début et surface lisse. Le diamètre de ces tumeurs augmente au fur et mesure de l'évolution de l'attaque et les fissures deviennent irrégulière (Senhaja, 1999) . Il se traduit sous divers aspects; perte de feuilles des brindilles du fait de l'étranglement mettant hors circuit l'alimentation des feuilles en aval, dessèchement de bois par suite d'une photosynthèse défaillante et réduction même de la taille des arbres, réduction du rendement d'olive et sur la qualité de son huile grâce à des caractéristiques organoleptiques inférieures, telles que une odeur désagréable et un goût amer rance (Senhaja, 1999; Lavermicocca *et al.*, 2002).

5. Agent causal

Ces bactéries seraient incorporées à la tumeur suite à l'infection causée par l'agent causale, selon Garcia de los Rio (1989). En effet, une relation symbiotique peut exister entre *Psv* et *Pantoea* (ou peut être d'autre bactéries) parce qu'ils sont trouvés ensemble non seulement dans des tumeurs, mais aussi comme des bactéries épiphytes dans Plantes infectées (Ercolani, 1978, 1991; Quesada *et al.*, 2007).

Les tumeurs, pourraient avoir un effet synergique avec *Psv* dans le développement des symptômes typiques de la maladie de la tuberculose d'olivier (Fernandes et Marcelo, 2002). Des résultats semblables ont été rapportés dans des oliviers co-inoculés avec les souches de *Psv* et *P. agglomerans*, qui ont produit des tumeurs plus grandes que des tumeurs des inoculations avec *Psv* se tendent seul et cet effet pourrait être dû à la production d'auxine par *P. agglomerans* (Marchi *et al.*, 2006).

6. Impact économique de la maladie

Les conséquences économiques de cette maladie sont considérables sur la culture de l'olivier affectant aussi bien la qualité que le rendement en huile (Krid *et al.*, 2011). Les pertes peuvent être provoquées directement par les infections localisées qui empêchent la floraison

et affectent le développement de fruit, et indirectement en affaiblissant les branches principales non mûres, en provoquant des dommages postérieurs à la charpente d'arbre. La croissance végétative annuelle des rameaux diminue au fur et à mesure que le nombre de tumeurs augmente, en raison des climats différents, du sol et des conditions topographiques dans lesquels les oliviers sont cultivés; l'ampleur des dommages est susceptible d'être fortement variable d'une saison à l'autre et d'une région à l'autre. L'observation du développement de la maladie pendant plusieurs saisons sera nécessaire pour déterminer l'impact l'agent pathogène (Young, 2004)

La recherche étendue a montré que la maladie peut réduire la productivité (Teviotdale, 1994). Des travaux effectués aux USA montrent que l'incidence de la maladie est en corrélation directe avec la baisse de rendement. Ces chercheurs montrent que le rendement des arbres ayant 0.1 à 0.3 tumeur par 0.3 m de bois fruitier (infection légère) voient leur rendement baisser de 21.3 kg. Et celui des arbres ayant 0.51 à 1 tumeur (infection modérée) de 94.6 kg (Schroth et al., 1973).

7. Mode d'infection

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* cause la formation de croissance hyperplasique dans des oliviers, produisant des tumeurs sphériques sur le tronc les branches, moins fréquemment sur feuilles et fruits (Sisto et Iacobellis, 1999; Smith, 1920). Les infections de *Pseudomonas savastanoi* dans les blessures fraîches d'olivier commencent par une petite cavité causée par l'écroulement de cellules végétales adjacentes et sont plus fréquentes sur des troncs (coffres) et des branches et rares sur des feuilles (congés) et des fruits. Par la suite, une prolifération de tissus touche la périphérie de la cavité aboutissant au développement de la tumeur (Smith, 1920; Surico, 1977).

Le développement de tumeur est dépendant de la production bactérienne de phytohormones: l'acide indoleacétique et cytokinines. En plus, des résultats récents ont révélé que les souches de *Pseudomonas savastanoi* contiennent deux copies de tous les gènes impliqués dans synthèse de l'acide indolacétique (Matas et al., 2009; Pérez-Martinez et al., 2008). Il a été rapporté que des tumeurs d'olivier dépendent aussi des gènes *hrp/hrc*, qui codent pour la biosynthèse fonctionnelle d'un Système de Sécrétion de Type III (TTSS) (Sisto et al., 2004). Récemment, le progrès remarquable a été fait dans la recherche dans plusieurs aspects de l'interaction hôte-pathogène dans le cas de la tuberculose d'olivier (Pérez-Martinez et al., 2008; Matas, 2010; Pérez-Martinez et al., 2010).

Plusieurs facteurs de virulence putatifs chez *Psv* ont été identifiés, y compris des effecteurs de protéine TTSS et une variété de codage de gènes connu *P. syringae* des déterminants de virulence (Pérez-Martinez et *al.*, 2008). Les analyses des effecteurs de protéines TTSS de *Psv* ont récemment éclairé le rôle de TTSS dans pathogénicité et (Matas, 2010; Pérez-Martinez et *al.*, 2010).

L'infection par *Psv* et la formation de tumeurs dans les jeunes brindilles de laurier rose (*Nerium oleander*) exige l'activité du cambium vasculaire (Wilson, 1965). L'invasion de l'hôte par la bactérie commence par la colonisation du site d'infection, suivi par la désintégration des cellules végétales adjacentes qui aboutit à la formation d'une grande cavité autour la zone colonisée par les bactéries., cette bactérie induit la dégradation de paroi cellulaire enzymes "*in vitro*" comme: la cellulase, la cellobiase, la xylanase et la peptinase (Magie, 1963). Durant la deuxième phase, des cellules intactes entour le pathogène subissent l'effet des hormones cela *Psv* produit et l'augmentation de la taille (l'hypertrophie) suivie par une division cellulaire anormale (hyperplasie). Finalement, il y a une différenciation des certaines cellules de la zone hyperplasique, Les éléments de xylème et phloème.

La première réaction de tissu de la fente inoculée d'une jeune tige est de renouveler ou rapidement augmenter l'activité du cambium, bien que ceci dépend de si l'inoculation a lieu en hiver, l'été ou le printemps (Surico, 1977). L'activité accrue du cambium promeut la formation de deux nouvelles masses tissulaires des deux côtés de la blessure, qui grandit jusqu'à leur jonction et forme une tumeur. La différenciation de phloème et des éléments de xylème, qui sont organisés ou pas dans des paquets vasculaires, arrive dans le nouveau tissu de parenchyme. La microscopie montre la présence des paquets vasculaires de nouvelle formation dans des nœuds olives, connectés avec la tige le cylindre vasculaire (Rodríguez-Moreno et *al.*, 2009).

La formation d'ensembles bactériens, des microcolonies et biofilms à plusieurs couches a été observée dans des sections de tumeurs (Rodríguez-Moreno et *al.*, 2009). Par ailleurs, dans de vieilles tumeur, les cellules végétales s'effondrent et des cavités se forment contenant le grand nombre de bactéries.

Les tumeurs peuvent représenter un environnement favorable pour les bactéries pour se multiplier et aussi les protéger contre des conditions environnementales extrêmes, comme d'habitude sèchent et les étés chauds des zones oléicoles (Comai & Kosuge, 1980). L'agent causal de maladie de la tuberculose d'olivier n'est pas le seul organisme vivant dans des

tumeurs, parce qu'il y a aussi des bactéries saprophytes blanches ou jaunes caractérisées comme *Pantoea agglomerans* (Garcia de los Rios, 1989), d'autres espèces d'*enterobacteria* et même d'autres (Ouzari et *al.*, 2008).

Les conditions climatiques semblent avoir un effet sur la dissémination et la virulence de la maladie. Les zones à pluviométrie importante sont généralement plus affectées par la tuberculose que les zones à faible pluviométrie. Les variétés d'oliviers semblent présenter des sensibilités différentes à la maladie. Il n'existe pas de moyens de lutte curatifs pour faire disparaître ou atténuer les effets de la maladie et limiter la propagation de cette bactérie dans le verger oléicoles (Loussert et *al.*, 1978).

8. Cycle de vie de la bactérie

La maladie causée par des populations de *Psv* a un cycle de type épiphyte-pathogène. Les bactéries ont une phase épiphyte durant laquelle; ils se multiplient à la surface de tiges d'olivier et des feuilles –sans développer des symptômes (Ercolani, 1978, 1991; Varvaro et Ferrulli, 1983). De façon intéressante, des populations de *Psv* ont été récupérées d'arbres non-inoculés sans symptômes avant l'apparition de symptômes, suggérant que ces bactéries épiphytes soient la source potentielle d'inoculum pour l'infection (de plantes) saines (Quesada et *al.*, 2010a).

Les variations de température dans lesquelles *Psv* peut provoquer l'infection sont entre 5 et 37 ° C et ceci permettrait aux bactéries de causer des infections tout au long de l'année. Cependant, les conditions optimales pour le développement de maladie sont environ 22-25 ° C et les périodes ultérieures avec la haute probabilité d'infection sont l'automne et le printemps (Protta, 1995). *Psv* peut infecter des oliviers à n'importe quel moment de l'année quand les conditions sont favorables. Ainsi, quand les bactéries infectent un olivier en automne, les tumeurs commenceront à se développer plusieurs mois plus tard, mais si l'infection arrive pendant le printemps, le temps nécessaire pour la formation de tumeur peut être seulement deux semaines (Wilson, 1935). Les essais sur le terrain exécutés en Californie ont montré que les inoculations d'oliviers par *Psv* effectués en avril ont causé plus la maladie que en décembre (Teviotdale et Krueger, 2004).

Les bactéries pourraient s'étendre sur de longues distances en raison de l'introduction de matériel infecté, ou sur des distances courtes transporté par les éclaboussures de pluie, aérosols fouettés par le vent, insectes et les pratiques culturelles (Horne et *al.*, 1912; Wilson,

1935). La dissémination bactérienne est facilitée par le gel et des cicatrices de feuille, créant des niches où l'infection peut avoir lieu (Wilson, 1935; Janse, 1982) et l'infection d'olivier par *Psv* est directement liée au nombre de blessures par arbres (Smith et al., 1991).

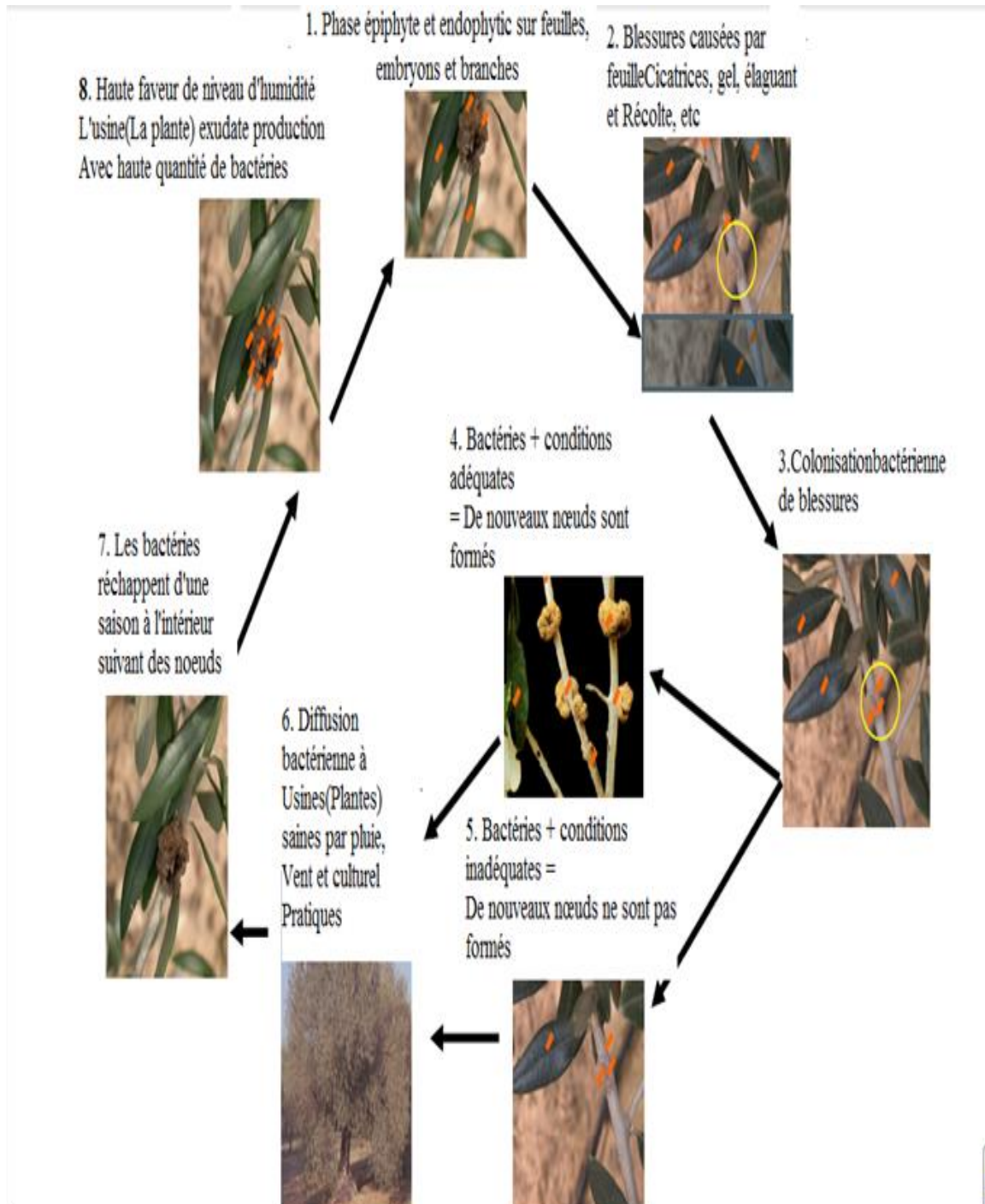


Fig n° 3 : Cycle de maladie de la tuberculose d'olivier causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* - (Bertolini, 2003).

9. Méthodes de lutte

Plusieurs méthodes de lutte ont été envisagées dans le cadre de la lutte contre la maladie de la tuberculose d'olivier ; une des maladies de quarantaine qui peut toucher l'olivier et qui peut induire des dégâts très graves.

9.1 Lutte Biologique

La lutte biologique est une autre alternative à la lutte contre la maladie des tumeurs d'olivier, mais elle est rarement testée contre le Psv. À ce jour, des agents de lutte biologique ont été évalués à l'aide d'isolats de *P. fluorescens* et Psv mutants produisant des bactériocines, mais sans résultats satisfaisants (Krueger et al., 1999; Varvaro et Martella, 1993)

9.2 Lutte chimique

La lutte chimique contre les maladies bactériennes des plantes n'est efficace que si elles sont utilisées dans des stratégies préventives avant le début de l'infection ou très tôt dans le processus d'infection bactérienne (Montesinos et López, 1996). Plus précisément, la lutte chimique contre la maladie la tuberculose d'olivier a donné des résultats incohérents dans les expériences sur le terrain et peut également avoir une faible efficacité et même une phytotoxicité pour certains tissus. Cette variabilité est due à plusieurs facteurs, tels que la quantité d'inoculum, le moment du traitement, les conditions climatiques, la sensibilité du cultivar, la méthode d'application du traitement ou l'état physiologique de la plante hôte (Smith et al., 1993)

L'objectif de la présente étude est une contribution à l'identification de l'agent causale de tumeurs semblables à celles de la tuberculose d'olivier. Ces tumeurs ont été observées dans des oliveries dans la région de Batna et la région de Djelfa. Pour cela, nous avons fait dans une première étape des prospections sur terrain à fin de déterminer le taux d'infection par la maladie et dans une deuxième étape, nous avons fait un échantillonnage pour faire l'isolement puis l'identification de l'éventuel agent causale de ces tumeurs et en dernier, nous avons vérifié le pouvoir pathogène des isolats

1. Prélèvement des échantillons

Un échantillonnage subjectif a été mené en 2018 dans deux oliveraies, une à la willaya de Djelfa et une à la willaya de Batna. De jeunes rameaux portant des tumeurs semblables à celles de la tuberculose d'olivier ont été prélevées à partir de la première parcelle qui se trouve à Ain el bel de la willaya de Djelfa, la variété plantée dans cette parcelle est la variété Segoise de superficie 20h, l'âge de plantation est 9 ans, la deuxième parcelle se trouve dans la région Ngaous de la wilaya de Batna, variété plantée est Chemlal de superficie 12h et les arbres étaient âgés de 8 ans. Les échantillons prélevés ont été ensuite placés dans des sacs plastiques stériles et conservés à 4°C.

2. Méthode d'isolement

L'isolement a été effectué selon la méthode suspensions dilutions. Des galls fraîches pesant un gramme ont été désinfectés superficiellement dans l'hypochlorite de sodium à une concentration de (1%) pendant 10 min et après on fait un rinçage trois fois (15 min, 10 min, et 5 min) successivement dans de l'eau distillée stérile. La tumeur désinfectée a ensuite été découpée par un scalpel stérile, les fragments obtenus ont été écrasés dans un mortier 9 ml d'eau distillée stérile et resté 30min pour libérée du contenu de tumeur.

Ensuite, A l'aide d'une micropipette et à partir de la suspension mère, nous avons préparé une série de dilution de 10^{-1} jusqu'à la dilution 10^{-6} .

A l'aide d'une micropipette, un volume de 100µl de chaque dilution est étalé dans des boîtes de pétrie contenant des milieux KB et LPGA à raison de 3 répétition par milieu. Les biotes ensemencés sont incubées à l'étuve à 28 °C pendant 3a 5 jours.

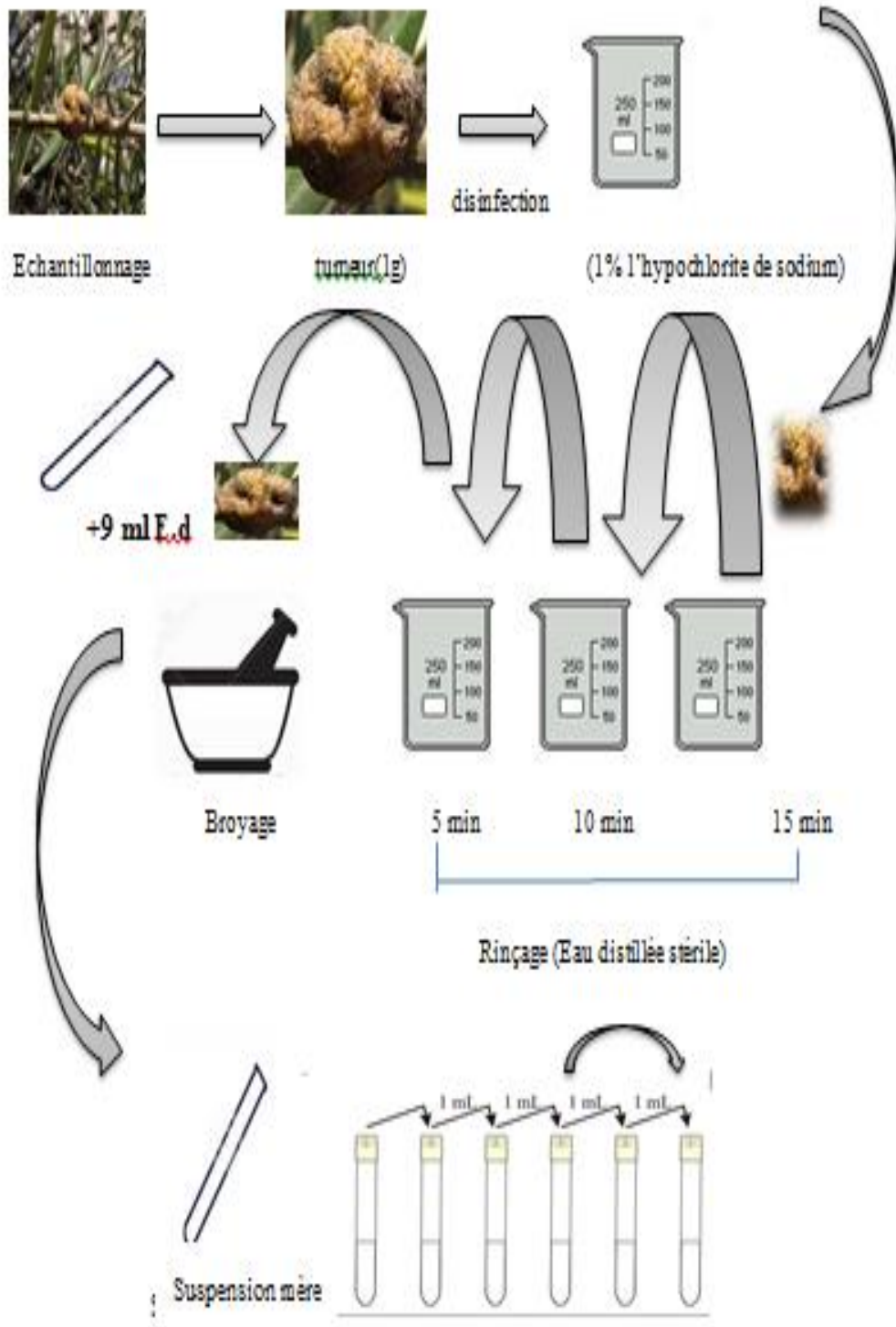


Fig °n 4 : Schéma représentatif du Protocole expérimentale d'isolement à partir des tumeurs d'olivier(Originale .2018)

3. Dénombrement des bactéries

Après trois jours d'incubation, nous avons calculé le nombre des bactéries qui se sont développées sur les deux milieux de culture utilisés King B et LPGA à l'aide de l'appareil compteur de colonies. Le taux des bactéries par échantillon est déduit en multipliant le nombre de bactéries par son facteur de dilution (Klement et al., 1990). Pour cela, nous avons utilisé la formule suivante

$$\text{UFC} = N \times 10^n (\text{cellule.ml}^{-1})$$

N= la moyenne entre le nombre de colonies dans les biotes de la même dilution

n= Facteur de dilution.

UFC= Unité formant colonie.

4. Sélection et purification des isolats

Après une incubation de 3 jours, à partir de boîtes d'isolement, nous avons sélectionné 31 isolats bactériens, nous avons sélectionné les isolats ayant les caractéristiques des *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* :

Les bactéries sélectionnées sont purifiées par la méthode des stries, l'opération de purification est renouvelée, en prenant chaque fois une colonie bien isolée sur le milieu (King B)

5. Identification phénotypique des isolats :

Avant toute expérimentation réalisée, les bactéries ont été cultivées sur milieu de culture (King B), pendant 24 à 48 heures, en utilisant la technique des stries par épuisement dans des conditions de travail en asepsie. Cette technique permet d'obtenir des colonies pures et séparées.

L'identification présomptive est basée sur les caractères macroscopiques, morphologiques, biochimiques.

5.1 La fluorescence

Le milieu *King.B* mise en évidence de la pyoverdine des *Pseudomonas* du groupe fluorescent. La pyoverdine jaunit le milieu. Principales espèces des *Pseudomonas* groupe fluorescent qui comprenait un agent fixant le fer, La plupart des espèces bactériennes appartenant au genre *Pseudomonas* sont bien connues pour leur capacité à produire des sidérophores fluorescents à la lumière UV à 365 nm. Récemment, il y a eu un intérêt accru pour les *Pseudomonas*. en raison de leur capacité à provoquer des maladies sur un grand nombre d'hôtes et en raison de l'utilisation possible de sidérophores en tant que biopesticides (Wilson, 1997).

La culture bactérienne en boîte de pétrie contenant le milieu *King.B* a été observée sous une lumière ultraviolette ayant une longueur d'onde de 360 nm à fin de vérifier la présence ou l'absence de la fluorescence.

5.2 Test de KOH

Le but de cette méthode est de déterminer rapidement si une bactérie est gram positive ou négative avant de passer aux étapes de coloration habituelles.

Une colonie isolée a été, à l'aide d'une anse de platine, dans une goutte d'une solution de KOH à une concentration de (3%). Quelques secondes plus tard, le mélange est tiré vers le haut; si un filament se forme entre la pipette et la lame, la colonie isolée est alors constituée de bactéries Gram négatifs, si rien n'est entraîné par l'anse, les bactéries sont dites Gram positifs.

5.3. Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne car les bactéries qui seront dites « Gram négatives » ont une paroi pauvre en peptidoglycane permet le passage de l'alcool (molécule lipophile) et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries dites « Gram positif » la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car, elle est composée d'une "couche" de peptidoglycane plus épaisse. Elles resteront alors violettes (Schaad et al ., 2001).

L'avantage de cette coloration est de classer les bactéries en deux grands groupes, des bactéries dites Gram positif et des bactéries dites Gram négatif. Cette coloration permet aussi d'observer la morphologie des bactéries et leurs modes d'association.

Pour la réalisation de ce test, nous avons réalisé un frottis à partir d'une culture bactérienne jeune âgée de 24 h puis nous l'avons fixé à la flamme sans dépasser 50 - 60°C ce qui les sèche puis on doit laisser refroidir la lame.

Pour la coloration, nous avons immergé les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1 mn ensuite, nous les avons rincées abondamment à l'eau en transvasant les lames sous le robinet, et après une fixation du premier colorant a été faite utilisant du Lugol (pendant 1 mn) l'excès du colorant est lavé à nouveau à l'eau.

Une décoloration a été faite jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant (l'éthanol) et lavée à l'eau ensuite une contre coloration avec la solution de la safranine diluée ou de la fuchsine diluée a été faite pendant 20 à 30 secondes. Ensuite, les lames sont lavées à l'eau puis séchées à l'air.

L'observation se fait sous microscope photonique à l'objectif (G:X10, X40, X100), en immersion avec de l'huile à immersion.

5.4. Hugh et Leifson

Le test d'oxydation-fermentation (OF) a été développé par Hugh et Leifson en (1953). Ils ont développé des milieux OF pour différencier les bactéries oxydatives (qui produisent de l'acide des hydrates de carbone en condition aérobie seulement) et les bactéries fermentatives (qui produisent de l'acide dans des conditions aérobies et anaérobies).

Le test de fermentation oxydative détermine si certains bâtonnets gram-négatifs métabolisent le glucose par fermentation ou respiration aérobie (oxydative). Au cours du processus de fermentation anaérobie, le pyruvate est converti en une variété d'acides mixtes en fonction du type de fermentation. La forte concentration d'acide produite

pendant la fermentation transformera l'indicateur bleu du Bromthymol dans les milieux OF du vert au jaune en présence ou en l'absence d'oxygène (Baron et *al.*,1990).

Deux tubes du milieu Hugh et Leifson sont ensemencés par piqûre centrale les deux tubes de Hugh et Leifson, l'un sera recouvert d'une couche d'environ 1-1.5cm d'épaisseur huile de vaseline stérile, les tubes sont mises à l'incubation pendant 48h à 27°C, deux lectures sont effectuées pour ce test une après 24 h et l'autre après 48h .

6. Tests biochimiques LOPAT

Les tests biochimiques LOPAT: L, production de levane, O, production d'oxydase, P, activité pectinolytique, A, production d'arginine dihydrolase et T, hypersensibilité au tabac constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, il n'en demeure pas moins qu'ils sont particulièrement utiles pour détermination de certaines espèces et sous espèces de bactéries phytopathogènes. Grâce à ces tests, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées.

5.1. Test Levane

Le test Levane (Schaad, 1988), permet de vérifier la polymérisation du fructose en poly fructose par la bactérie. Ce test consiste à faire un ensemencement par des stries sérés sur le milieu Levane ensuite, l'incubation des boîtes ensemencées a été effectuée à étuve pendant 5 jours à une température de 28 °C.

La production de Levane sucrase se traduit par la présence de colonies blanchâtres et convexes luisante et indique une réaction positive.

5.2 Test oxydase

Ce test est basé sur la production par la bactérie testée de l'enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C (Schaad, 1988).

Ce test est réalisé par l'utilisation des disques spéciaux puis, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile une quantité de crème bactérienne est étalée à la surface du disque. La lecture se fait par l'observation d'une réaction suite à l'apparition d'une tache violette au bout de 2 min, ce qui explique que la bactérie est oxydase positive et elle possède le cytochrome oxydase, l'absence de la coloration est due à l'absence de l'enzyme recherchée, la bactérie est dépourvue donc de cette enzyme respiratoire.

5.3 Test Pectinase

Le test pectines permet de vérifier l'activité pectinolytique d'une bactérie c'est-à-dire sa capacité à dégrader la pectine. (Rathore *et al.*, 2000). Pour la réalisation de ce test, des tubercules de pomme de terre sont désinfectés pendant 10 min dans un bécher contenant 1/3 d'hypochlorisodium de sodium et 2/3 eau distillée, puis rincées à l'eau distillée stérile et séchées. A partir de ces tubercules, des tranches ont été inoculées au centre de ces rondelles par une suspension bactérienne ajustée à (D.O: 0.500) puis mises dans des boîtes de pétrie contenant du papier filtre mouillé à l'eau distillée stérile. Les boîtes sont ensuite incubées à 28 °c pendant 7 à 14 jours.

L'odeur indésirable et l'apparition de nécrose signifie la présence de l'enzyme pectinase et cela indique une réaction positive.

5.4 Test Arginine

Le test Arginine déshydrolase (Schaad, 1988), permet la mise se en évidence de la transformation de l'arginine par l'enzyme arginine déshydrolase. Pour la réalisation de ce test, une jeune colonie bactérienne âgée de 48 heures a été ensemencée suivant la technique de piqure centrale dans deux tubes contenant le milieu arginine, les deux tubes ont été recouverts d'une couche de vaseline stérile afin de créer une anaérobiose relative. Ensuite les tubes ont été incubés à l'étuve 28°C pendant 48 heures.

La réaction positive se traduit par l'apparition de couleur jaune, si le milieu reste rose c'est une réaction négative.

5.5. Test tabac

Le test d'hypersensibilité du tabac sert à mettre en évidence d'une bactérie par le dessèchement de la zone d'inoculation sur les feuilles de tabac (Schaad ., *et al* 2001).

Ce test consiste à préparer une suspension bactérienne ayant une concentration de 10^8 cfu /ml dans un tube à essai contenant de l'eau distillée stérile, à l'aide d'une seringue, nous avons injecté un volume de 50 µl de la suspension bactérienne entre deux nervures secondaires à la surface inférieure des feuilles de tabac, à raison de deux répétitions par isolats. Les plantes sont par la suite mises dans la salle à une température de 27 °C.

La lecture des résultats est fait après 24 heures, une réaction négative est enregistrée si aucun changement dans la couleur et l'aspect du tissu n'est enregistré et dans le cas d'une réaction positive, la zone foliaire inoculée par la bactérie devient légèrement translucide avec un aspect humide, ensuite le tissu se dessèche et prend une couleur brune à beige.



Fig°n 5: Test hypersensibilité sur les feuilles de tabac(origine.2018)

6. Test de pathogénicité

Le test du pouvoir pathogène est un test confirmatif qui se réalise à la fin des tests d'identification pour confirmer les symptômes initiales sur des plantules d'olivier âgée d'un ans de la variété Chemllal.

L'inoculation a été réalisée au niveau des tiges en introduisant un volume de 50 μ l d'une suspension bactérienne ajustée à 10^8 cfu /ml, au niveau de quatre blessures réalisées à l'aide d'un scalpel stérile, L'inoculation à l'eau distillée stérile a été utilisée comme un témoin négatif, ensuite chaque site inoculé est recouvert avec du coton stérile puis avec du papier aluminium stérile. Les plants sont ensuite placés à une température entre 27 et 30°C et arrosées périodiquement selon les besoins.

Après deux mois, nous avons lu les résultats en fonction de la formation ou pas de tumeur aux niveaux des sites inoculés.

Dans la présente étude, nous avons réalisé dans une première étape des prospections sur terrain à la recherche d'une attaque possible par la tuberculose dans la région de Djelfa et Batna. Les prospections faites au niveau de cette région ont montré l'existence de symptômes typiques de cette maladie dans une oliveries dans les oliveries qu'on a visité et le taux d'infection par la maladie était de 10% dans l'oliverie de Ngaous (Batna) et de 5% dans l'oliverie de Ain El Bel (Djelfa).

Dans l'objectif d'étudier l'étiologie de ces tumeurs, nous avons fait l'isolement et l'identification de l'agent causale de ces tumeurs et ce, par la réalisation des tests biochimiques et physiologiques.

Pour l'isolement de l'éventuel agent pathogène , deux milieux de culture ont été utilisés King B et LPGA. Nous avons fait le dénombrement des bactéries *Pseudomonas savastanoi* like bacteria viables sur le milieu kingB et de la flore totale pour évaluer le taux des *Pseudomonas savastanoi* like bacteria par rapport à la flore totale dans les tumeurs.

1. Dénombrement des bactéries

Après un temps d'incubation (48 h) à 28°C, nous avons observé la formation des colonies bactériennes semblables à celles des *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* sur des deux milieux de culture testés LPGA et KB. Dans les boîtes du milieu LPGA, d' autres bactéries se sont développées.

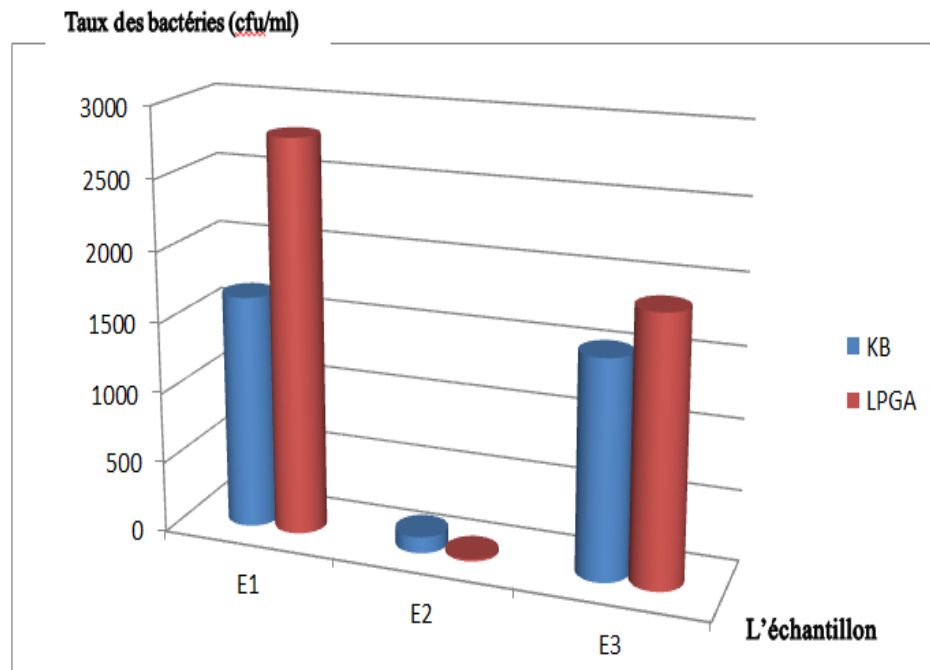


Fig n° 6 : Taux des *Pseudomonas savastanoi like bacterie* par rapport à la flore totale dans des tumeurs d'olivier.

Nous nous sommes intéressés au taux de *Pseudomonas savastanoi* par rapport à la flore totale. Pour le première échantillon le taux des bactéries *Pseudomonas like bacteria* dans le milieu KB (1.656×10^3 cellule $.ml^{-1}$) soit 59.13% par rapport à la flore bactérienne totale.

Pour le deuxième échantillon, le taux de *Pseudomonas like bacteria* dans le milieu de KB est de (1.15×10^2 $.ml^{-1}$) soit 69.64% par rapport à la flore totale.

Quant au—troisième échantillon, le taux de *Pseudomonas* dans le milieu de KB (1.547×10^3 cellule $.ml^{-1}$) soit 59.68% par rapport à la flore bactérienne totale.

2. Sélection et Purification

La purification des bactéries isolées a été réalisée sur le milieu de culture King.B et, nous a permis de sélectionner 31 isolats bactériens qui expriment les caractéristiques morphologiques des *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*.

Les colonies obtenues après purification des différentes isolats bactériens sélectionnés sur le milieu KB présentent les mêmes caractéristiques macroscopiques, elles apparaissent

homogènes, elles sont circulaires de 1 à 1.5 mm de diamètre, de couleur beige, lisses et brillantes.

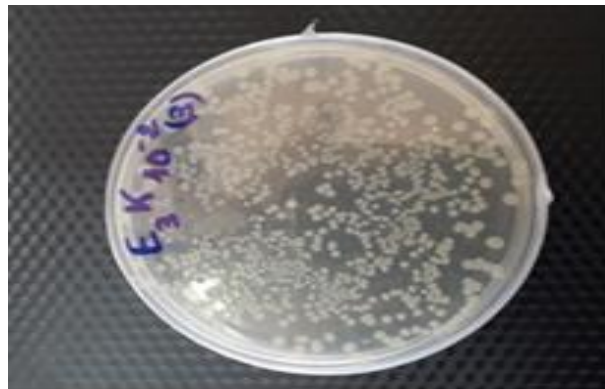


Fig n°7: Aspect d'une culture bactérienne pure d'un des isolats bactériens sélectionnés (isolats E.1.2).

3. Identification des isolats bactériens

Pour déterminer le genre de nos isolats a été fait par des tests biochimiques et physiologiques (Coloration de gram, KOH et Hugh et Leifson et la fluorescence) et ce , selon le protocole de Schaad et *al.*(2001).

Les 31 isolats ont été obtenus à partir de tumeurs prélevées d'oliviers ont été analysés par les tests biochimiques et par le test de pathogénie.

4. La fluorescence

Le test de fluorescence utilisé principalement pour la détection des *Pseudomonas* fluorescentes, Les colonies présentant une fluorescence jaune verte à l'oeil nu et détectable sous ultraviolets à 360 nm, sont considérées comme positives. La gélose King B favorise la production de pyoverdine et inhibe par ailleurs la production de pyocyanine, le phosphate dipotassique augmente la concentration en phosphore apporté par la peptone et stimule ainsi la production de fluorescéine, et le sulfate de magnésium apporte les actions nécessaires à la production de pyoverdine et inhibant la production de pyocyanine (Halabi,2014).

Dans les résultats globaux, nous obtenons la présence de fluorescence sur 28isolats et l'absence sur 3 isolats .

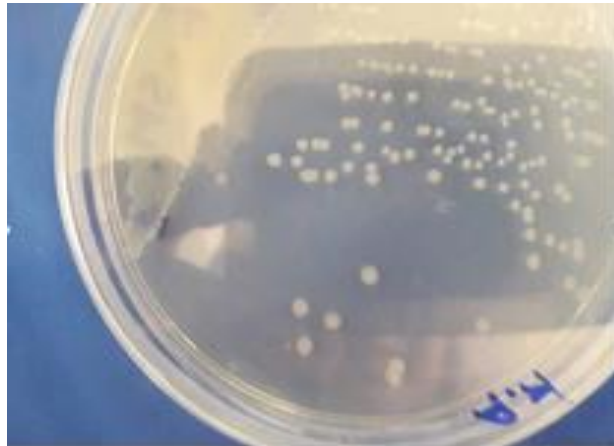


Fig °n 8 :résultat de la fluorescence(Originale .2018)

5. Test de KOH

Le test KOH est un essai rapide se basé sur les différences dans la composition de la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. La paroi des cellules à bactéries Gram-négatives est lysée par des solutions alcalines diluées de (3% KOH), ce qui n'a aucun effet sur les parois cellulaires des bactéries Gram-positives en raison de la présence d'un peptidoglycane épais. Lorsque des bactéries à Gram négatif sont lysées (5 à 60 secondes), l'ADN cellulaire est libéré, ce qui fait que le mélange devient visqueux ou filandreux (Schaad et *al.*, 2001),

D'après les résultats du test KOH, sur 31 isolats testés, 16 isolats uniquement sont formé des fils visqueux, cela indique qu'ils sont des gram négatifs .

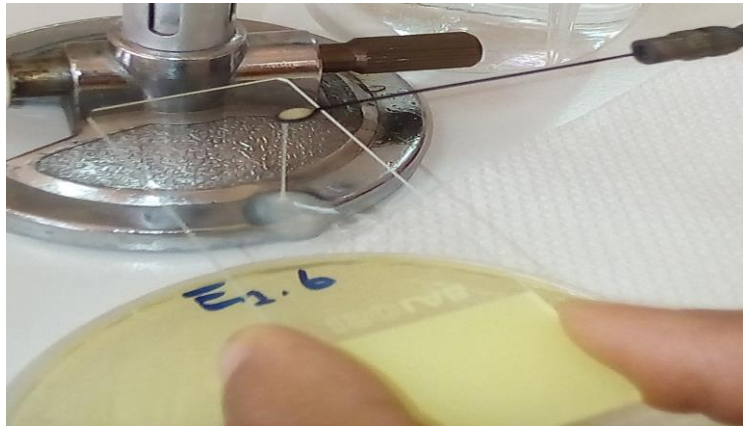


Fig n°9: Résultat de test KOH (Formation du fil visqueux : réaction positive)

6. Coloration de gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer entre les bactéries à gram négatif et les bactéries à gram positif. Le colorant utilisé est le violet de gentiane qui colore le cytoplasme des bactéries des bactéries le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries. Celles-ci sont ensuite décolorées à l'alcool-acétone. En raison de leur paroi de structure plus épaisse (et de composition chimique particulière), les bactéries Gram+ gardent la coloration violette. Les bactéries Gram-, avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette. Afin qu'on puisse visualiser les bactéries Gram-, on recolore avec de la fuchsine (rose). Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+ (schaad.2001).

D'après l'observation microscopique, 16 isolats apparaissent sous forme des bacilles en couleur rose, ce qui indique qu'il sont des gram négatif et 13 isolats apparaissent sous forme coccobacilles violet et 2 sous forme de petite bacilles de couleur violet ce la veut dire que se sont des Gram positifs.

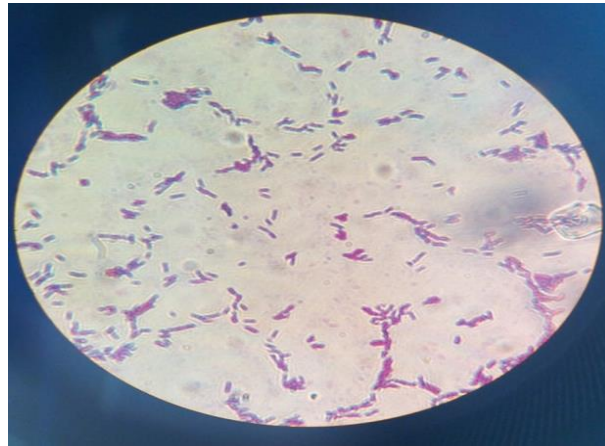


Fig n°10 : Résultat du test de la coloration de gram (Originale, 2018)

7. Test Hugh et Leifson

Le virage de l'indicateur de pH au jaune dans les tubes ferme qui contient l'huile de vaseline Pour 17 isolats veut dire qu'il y a eu production d'acides lors que pas de l'utilisation du glucose par les bactéries en en absence d'O₂. Le virage au jaune de l'indicateur dans les deux tubes pour les 11 isolats il y a utilisation du glucose par les bactéries en présence et absence d'O₂ , Les bactéries sont oxydatives. pour un seule isolat le milieu reste tel qu'il était avant ensemencement, il n'y a pas de croissance de la culture bactéries sont inertes vis-à-vis du glucose (Schaad et *al.*, 2001)

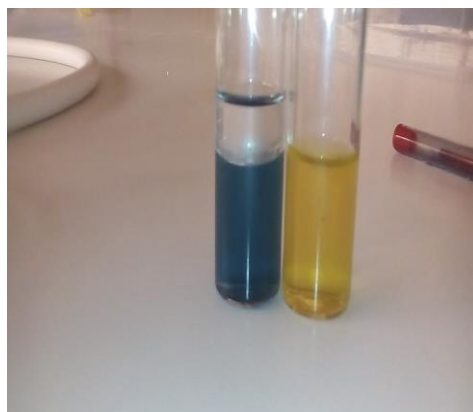


Fig n°11: Résultat de test Hugh et Leifson (Originale, 2018)

Tableau n° 2 : Les résultats des tests KOH, coloration de Gram, Hugh et Leifson et la fluorescence sur KB.

Isolats	Les Tests						
	Fluorescence Sur KB	Test KOH	Coloration de Gram	Test Hugh et Leifson			
				Après 24 h		Après 48h	
				Avec l'huile	Sans huile	Avec huile	Sans huile
<i>E_{1.2}</i>	F	-	-	-	+	-	+
<i>E_{1.3}</i>	F	-	-	-	+	-	+
<i>E_{1.4}</i>	F	-	-	-	+	-	+
<i>E_{1.5}</i>	F	-	+	-	-	-	-
<i>E_{1.6}</i>	F	-	-	-	+	+	+
<i>E_{1.7}</i>	F	-	-	-	-	+	-
<i>E_{1.8}</i>	F	-	-	+	-	+	-
<i>E_{1.9}</i>	F	-	-	-	+	-	+
<i>E_{1.10}</i>	F	-	-	-	+	-	+
<i>E_{1.11}</i>	B	-	-	-	+	-	+
<i>E_{2.1}</i>	F	-	-	-	+	-	+
<i>E_{2.2}</i>	F	+	-	-	+	-	+
<i>E_{2.3}</i>	F	+	-	-	+	-	+
<i>E_{2.4}</i>	F	+	+	-	+	-	+
<i>E_{2.5}</i>	B	+	+	+	+	+	+
<i>E_{2.6}</i>	F	-	-	-	-	-	+
<i>E_{2.8}</i>	F	+	+	+	+	+	+
<i>E_{2.10}</i>	F	+	+	+	+	+	+
<i>E_{2.11}</i>	F	+	+	+	+	+	+
<i>E_{2.12}</i>	B	+	+	+	-	+	-
<i>E_{2.13}</i>	F	+	+	-	+	-	+
<i>E_{2.14}</i>	F	+	+	-	-	-	-
<i>E_{3.1}</i>	F	-	+	-	+	-	+
<i>E_{3.2}</i>	F	+	+	+	+	+	+
<i>E_{3.3}</i>	F	-	+	-	+	-	+
<i>E_{3.4}</i>	F	-	-	-	+	-	+
<i>E_{3.5}</i>	F	-	-	-	+	-	+
<i>E_{3.6}</i>	F	+	+	+	+	+	+
<i>E_{3.8}</i>	F	+	+	+	+	+	+
<i>E_{3.9}</i>	F	+	-	+	+	+	+
<i>E_{3.10}</i>	F	+	+	+	+	+	+

(-) réaction négatif, (+) réaction positif

8. Test LOPAT

Un profil LOPAT atypique (où LOPAT est une série de tests déterminatifs: L, production de lévane, O, production d'oxydase, P, activité pectinolitique; A, production d'arginine dihydrolase et T, hypersensibilité au tabac) est largement appliqué pour différencier les isolats. Bien que présentant un intérêt pratique, la caractérisation phénotypique bactérienne seule ne permet souvent pas de révéler des relations génétiques au sein d'une espèce ou entre espèces, peuvent être considérées comme des pathogènes (Schaad *et al.*, 2001).

8.1 Test levane

Les bactéries qui ont l'enzyme levane sucrose, peuvent décomposer le saccharose et former levane (le poly-fructose), un matériel (une matière) capsulaire. Le saccharose peptone l'agar-agar ou un moyen nutritif avec le saccharose de 5 % est un substrat approprié. La viscosité de levane aboutit aux colonies en forme de dôme distinctives (Schaad *et al* 2001).

Pour le test Levane 5 isolats sont des (levane positive) et 26 isolats sont des (levane négatif)

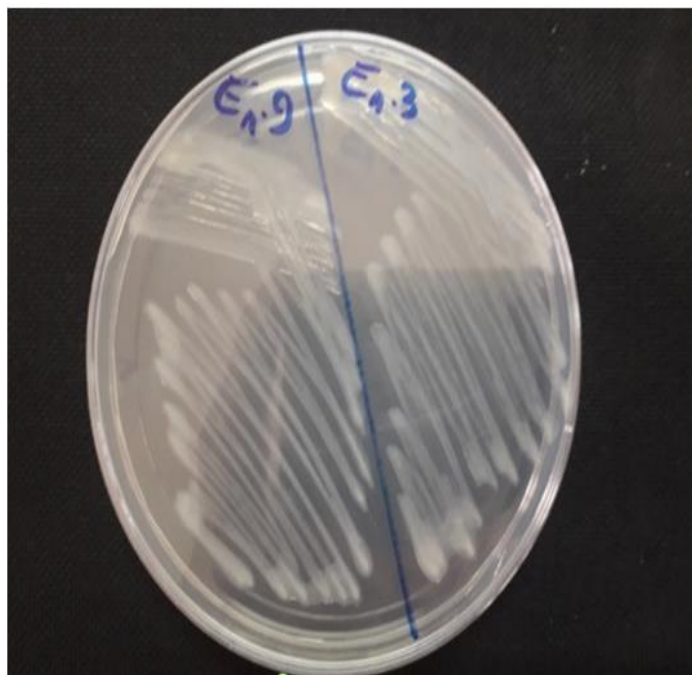


Fig n°12 : Résultat de test levane (Originale, 2018)

8.2 Test Oxydase

Le test Oxydase est un test fondamental pour orienter l'identification des bacilles Gram-. Le chlorhydrate ou le N-diméthyl paraphénylène diamine est utilisé comme réactif, généralement imprégné sur des disques (disques oxydases).

Ce test a été effectué sur des disques commerciale, On dit qu'une bactérie est oxydase, si un fragment de culture est capable d'oxyder la forme réduite de dérivés N-méthylés du paraphénylènediamine en semi-quinone (rose violacé) (Schaad et al., 2001).

Nous avons observé développement de la couleur violet foncé (indophénols) dans les 10 secondes. La présence d'oxydase serait liée à celle dans la chaîne respiratoire du complexe enzymatique cytochrome-oxydase pour 2 isolats (oxydase positive), et l'absence de réaction pour les 29 isolats testés (oxydase négatif).



Fig°n 13 : Résultats de test oxydase (Originale, 2018)

8.3 Test Arginine

Les résultats préliminaires sont déterminés. Les isolats doit d'abord utiliser le glucose présent pour amener le p H à déposer. Ceci est indiqué par un changement du violet au jaune . Une fois le milieu acidifié, l'enzyme arginine dihydrolase est activée. La culture est incubée 24 heures supplémentaires à 35-37 ° C pour permettre au microbe d'utiliser maintenant l' arginine . Les résultats finaux sont ensuite obtenus en observant le tube à 48 heures. Changer en violet à partir du jaune indique un test positif pour l'arginine dihydrolase . Le fait de ne pas virer au jaune à 24 heures ou de revenir en violet à 48 heures indique un résultat négatif (Schaad et al., 2001) .

Après une incubation de 48h, nous avons observé que le milieu des tubes inoculés par 25 isolats a demeuré rose. Ce résultat exprime que le test Arginine est négatif, et pour le 6 isolats le milieu virage de la couleur du rose au jaune (test Arginine positif).



Fig n°14 : Résultat du test Arginine déshydrolase (Originale , 2018)

8.4 Teste Pectinase

Après 14 jour d'incubation, nous n'avons remarqué aucune odeur reniflé sur les tranches de la pomme de terre testées, pour 21 isolats testés (résultat négatif) et pour les 10 isolats restants, un changement par l'apparition de pourriture d'une forte odeur a été enregistré cela indique que les bactérie sont capable de dégrader la pectine (résultat positif).

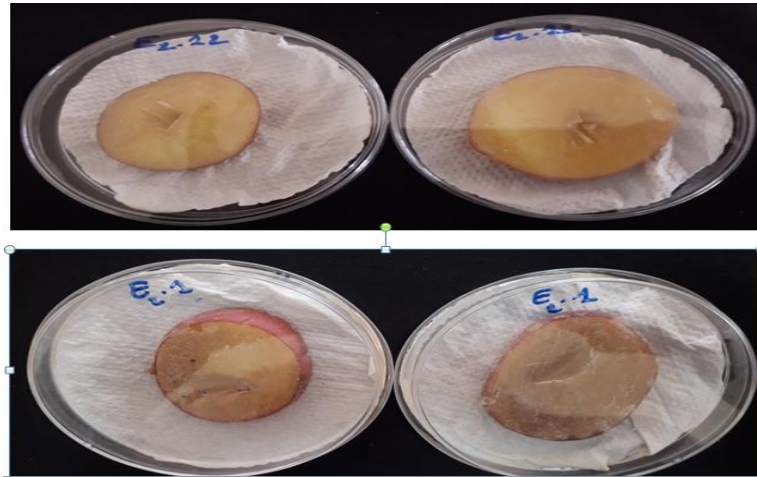


Figure n°15 : résultat de test pectinase(Originale, 2018)

8.5 Test de réaction d'hypersensibilité sur Tabac

A cause de manque des plants de tabac, nous avons testé uniquement 9 isolats bactériens. Après 24 h d'inoculation tous les isolats teste on donnée une réaction de hypersensibilité



Fig°n16 : Résultat Du test de réaction d' hyper sensibilité sur feuille de Tabac

(Originale, 2018)

Tableau n°3 : les résultats du test LOPAT

	Levane	Oxydase	Arginine	Péctinase	Tabac
<i>E</i> ₁ 2	-	-	-	-	Nt
<i>E</i> ₁ 3	-	-	-	-	-
<i>E</i> ₁ 4	-	-	-	+	-
<i>E</i> ₁ 5	+	-	-	+	-
<i>E</i> ₁ 6	-	-	-	-	-
<i>E</i> ₁ 7	-	-	-	-	-
<i>E</i> ₁ 8	-	-	-	-	-
<i>E</i> ₁ 9	-	-	-	-	-
<i>E</i> ₁ 10	-	-	-	-	-
<i>E</i> ₁ 11	+	-	-	+	Nt
E2.1	-	-	-	-	Nt
E2.2	-	-	-	+	Nt
E2.3	-	--	-	-	Nt
E2.4	-	-	-	+	Nt
E2.5	-	-	-	+	Nt
E2.6	-	+	+	+	Nt
E2.8	-	-	-	-	Nt
E2.10	+	-	-	-	Nt
E2.11	-	-	-	-	Nt
E2.12	-	-	-	-	Nt
E2.13	-	-	-	-	Nt
E2.14	-	-	-	-	Nt
E3.1	-	-	-	-	Nt
E.2	-	-	-	-	Nt
E3.3	-	-	-	+	Nt
E3.4	-	-	+	-	Nt
E3.5	-	-	-	+	Nt
E3.6	-	-	+	-	Nt
E3.7	-	-	+	-	Nt
E3.8	+	+	+	+	Nt
E3.9	+	-	+	-	Nt

(+) réaction positif , (-) réaction négatif , Nt : non testé

9. Test du pouvoir pathogène

D'après les résultats obtenus, des tumeurs se sont développées après trois mois de l'inoculation des plantules d'olivier par les isolats, ce qui confirme bien que nos isolats testés étaient bien des isolats de *Pseudomonas savastanoi* à cause de formation de tumeurs au niveau de blessures.



Photo n°17: Résultats de test de pathogénicité (Originale, 2018)

Tableau °4: Les résultats du test de pathogénicité.

Isolats	Répétition			
	1	2	3	4
E3.1	+	+	-	-
E1.4	+	+	+	+
E1.6	+	+	+	+
E1.3	+	+	+	+
E1.2	+	+	+	+
E3.3	-	-	-	-
E3.5	-	-	-	-
E1.7	+	+	+	+
E3.2	-	-	-	-
E2.2	-	-	-	-
E1.9	+	+	+	+
E1.8	+	+	+	+
E1.10	+	+	+	+
E2.10	-	-	-	-

(-) résultat négatif

(+) résultat positive (formation des tumeurs)

L'olivier est sujet à différents types d'attaques des maladies bactériennes qui peuvent causer de sérieuses pertes économiques, c'est l'exemple de la tuberculose d'olivier causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (psv).

Cette maladie s'est beaucoup répandue dans divers pays du bassin méditerranéen et Europe du sud, Afrique du nord, moyen orient et Amérique (la Californie). Notre travail a été basé sur l'identification de la bactérie causale de ces tumeurs.

Parmi les 31 isolats analysés par les tests LOPAT ont été utilisés pour identifier les isolats bactériens, observée sur le milieu KingB.

Le milieu King B décrit par King en (1954) est un milieu utilisé principalement dans l'identification et la différenciation de *Pseudomonas savastanoi* qui produit ce pigment fluorescent contrairement à certaines espèces de *Pseudomonas*. Il s'agit d'un milieu semi sélectif, elle permet la production de fluorescéine, pigment jaune vert fluorescent sous lumière ultra-violette.

Après trois jours de dénombrement les résultats obtenus à partir des échantillons des tumeurs sur les deux milieux King B et LPGA montrent que le taux de bactérie des *pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* like bacteria est faible par rapport à la flore totale.

Dans le premier échantillon, le taux de bactérie des *Pseudomonas savastanoi like bacteria* dans KingB (1.656×10^3 cellule.ml⁻¹) soit 59.13% par rapport à la flore bactérienne totale—dans le deuxième échantillon le taux de bactérie des *Pseudomonas savastanoi like bacteria* dans King B (1.15×10^2 cellule.ml⁻¹) soit 69.64% par rapport à la flore bactérienne totale. Dans le troisième échantillon, le taux de bactérie des *Pseudomonas savastanoi like bacteria* dans King B (1.547×10^3 cellule.ml⁻¹) soit 59.68% par rapport à la flore bactérienne totale.

Dans la présente étude le taux des *Pseudomonas savastanoi like bacteria* dans King B était compris entre (1.15×10^2 cellule.ml⁻¹) et (1.656×10^3 cellule.ml⁻¹), ceci peut être lié à plusieurs facteurs par exemple la sensibilité variétale. Par ailleurs, les résultats d'isolement réalisés par Serdoune,(2013) montrent que le taux des *Pseudomonas savastanoi like bacteria* dans King B est compris entre (1.2×10^6 cellule.ml⁻¹) et (3.0×10^6 cellule.ml⁻¹), et cela ne concorde pas avec nos résultats qui montrent des taux faibles.

D'après la coloration de Gram, 16 isolats apparaissent sous forme de bacilles en couleur rose, ce qui indique qu'ils sont des gram négatif et 13 isolats apparaissent sous forme de coccobacilles violets et 2 sous forme de petites bacilles de couleur violet, cela veut dire que ce sont des Gram positifs.

La coloration de Gram permet de classer les isolats bactériens selon la composition et la structure de leur paroi. Les bactéries Gram(-), avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette. De manière à visualiser les bactéries Gram(-), on recolore avec de la fuschine (rose). Les bactéries Gram(+) resteront violettes alors que les Gram- seront maintenant teintées en rose. Bien que le résultat de la coloration de Gram puisse dépendre de l'état physiologique des bactéries (âge de la colonie, conditions de croissance...) elle reste cependant la technique de base de la bactériologie (Schaad *et al.*, 2001).

Tous les résultats Gram-positifs et Gram-négatifs obtenus par la coloration de Gram ont été confirmés par le test KOH. Les bactéries Gram-variables ont produit des résultats équivoques.

Le test KOH est un test secondaire d'identification des cultures Gram (-) et Gram (+) il est beaucoup plus rapide et plus facile à réaliser que la coloration traditionnelle de Gram d'après le test KOH, 16 isolats uniquement ont formé un fil visqueux, cela indique qu'ils sont des gram négatifs et 15 ont été considérées gram positif vu qu'ils n'ont pas formé le fil. La solution KOH à 3% dissout les parois cellulaires de Gram (-) (couche mince de peptidoglycane), mais n'affecte pas les parois cellulaires de Gram (+). Dissolution de la paroi cellulaire Gram (-) lysent la cellule et renverse son contenu, L'ADN est très visqueux et, avec une masse cellulaire suffisamment importante, On peut voir les séquences d'ADN se colle à une boucle ou en glisser lorsqu'elles sont touchées. Les cellules Gram (+) sont non lysées, aucun ADN libre, aucune viscosité ne sera observée. Ce test nécessite une grande quantité de cellules (amas visible).

Le milieu de Hugh et Leifson contient le bleu de bromothymol, qui prend une couleur jaune lorsque le milieu est acide, ce milieu précise le type de dégradation du glucide (glucose) (Schaad *et al.* 2001). Ce milieu a été formulé par Hugh et Leifson. Le milieu contient une forte concentration de glucides et une faible concentration de peptone pour éviter la possibilité d'un organisme aérobique utilisant la peptone et produisant une condition alcaline qui neutraliserait une légère acidité produite par un organisme oxydant. Le phosphate dipotassique favorise la fermentation et agit comme un tampon de contrôle du pH (Hugh and Leifson, 1953).

Les résultats obtenus acidification en aérobiose seulement pour les 17 isolats (le tube avec bouchon d'huile de vaseline vire au jaune), le bouchon d'huile de vaseline ne permettant pas une anaérobiose complète, le test n'est pas valide pour tous les anaérobies. Dans les deux tubes vire au jaune pour les 10 isolats, aérobie et anaérobies strict aerotolerant.

La fluorescence de nos isolats a été vérifiée lors de la purification par étalement sur milieu King B. Les *P. savastanoi* pv. *savastanoi* sont des bactéries fluorescentes (Schaad *et al.*, 2001)

Dans la présente étude une série de test LOPAT (levane, Oxydase, pectinase et Arginine et test Tabac) pour identifier nos isolats.

Nous avons observé l'apparition pour 5 isolats (levane positive). Et 26 isolats levane négatif à *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. De son côté Guido (2005) rapporte que en Toscane, des tumeurs d'olivier dans certaines oliveries hébergent des *Pseudomonas savastanoi* levane positives et levane négatives. Les données suggèrent que, les sous-populations levane positives et levane négatives de cette bactérie phytopathogène peuvent coexister dans le même échantillon et pourtant, *Pseudomonas savastanoi* a toujours été considérée comme une bactérie Levane négative typique, ayant les caractéristiques générales de *P. syringae*.

Pour le test Oxydase, 29 isolats sont des oxydases négatifs. L'absence de coloration rose/violette indique l'absence d'oxydation du réactif (oxydase -) d'après ce test, 2 isolats sont des oxydases positifs et cela s'exprime par l'apparition d'une coloration (tache) rose /violette après trente secondes. Le résultat positif signifie que la bactérie possède l'activité oxydase, capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN diamine) en un dérivé rose violacé d'oxydation du type : NN-diméthyl Incolore (Schaad *et al.*, 2001).

Les résultats obtenus d'après le test pectinase montrent que parmi les 31 isolats testés, 21 isolats donnent un résultat négatif et le reste des isolats donne un résultat positif; ce test permet de déterminer la présence ou absence de l'enzyme pectinase, celles-ci décomposent la pectine, un substrat de polysaccharide présent dans les parois cellulaires des plantes (pomme de terre). C'est utile parce que la pectine est la matrice de gel qui aide à cimenter les cellules végétales et dans laquelle d'autres composants de la paroi cellulaire, tels que les fibres de cellulose, sont incorporés. La bactérie capable de libérer des enzymes pectinolytiques libère ainsi une odeur. Les résultats obtenus d'après ce test concordent avec les critères des *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* qui sont incapables de dégrader la pectine comme le

font certaines espèces d'*Erwinia*-responsables des pourritures molles (Benjamaa , 1991; Schaad *et al.*, 2001).

A cause de manque de plante de tabac nous n'avons testé que 09 isolats, tous les isolats testés ont donné une réaction d'hypersensibilité après 24 h, conséquence d'une relation incompatible entre l'agent pathogène et l'hôte. Dans un test de réaction d'hypersensibilité sur tabac, Si certaines espèces de plantes sont inoculées avec des bactéries pathogènes, un mécanisme de défense rapide dans la plante est déclenché et les cellules végétales dans la zone envahie meurent, limitant le pathogène envahissant en empêchant la propagation dans le reste de la plante. Le déclenchement de la Réaction hypersensibilité (HR) chez les plantes par des bactéries phytopathogènes est utilisé comme outil de diagnostic, en particulier pour les *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*.

Test de confirmation d'identification de la pathogénicité sur les plants des olivier 15 isolats, nous observée des tumeur réaction (+) et confirmé postulat de Koch, et 4 négatif réaction.

Dans notre travail, parmi les 31 isolats bactériens sélectionnés sur la base des critères morphologiques des *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* et qui ont subi une identification préliminaire par des biochimiques (coloration de Gram, KOH, fluorescence sur KB) et une série de test LOPAT, 09 isolats uniquement sont des bacilles à gram négatif, aérobies strictes et produisent un pigment fluorescent et sont des levanes négatifs, arginine négatifs et ne dégradent pas la pectine et oxydases négatifs et induisent une réaction d'hypersensibilité sur tabac (pour ce dernier test, 09 isolats uniquement ont été testés). Ces caractéristiques nous permettent de dire que ces 09 isolats appartiennent à la sous espèce *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* et ce. Leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques concordent avec celles des *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* (Schaad *et al.*, 2001).

Pour le reste des isolats non affiliés à la sous espèce *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*, certaines d'entre elles peuvent être des *Psv* et ce, vu qu'ils n'ont pas subi le test de tabac par manque de plantules de tabac. Ce test est indispensable pour déterminer s'il s'agit de cette sous espèce ou une autre. Pour les isolats ayants des caractéristiques différents peuvent être des *Erwinia* ou des *Pantoea*, ces suggestions ont été faites en se basant sur les travaux précédents. Au cours d'une enquête sur les oliveraies du centre de l'Italie (Toscane, Ligurie et Ombrie) en 2002 et 2003, visant à surveiller la propagation d'une population atypique de *Ps. savastanoi* (Marchi *et al.* , 2005), une bactérie à pigmentation jaune a souvent été observée sur de la gélose au saccharose (SNA) (Varvaro et Surico, 1978) après isolement à partir

d'échantillons de feuilles et de tumeurs . Cette bactérie est parfois présente à des concentrations rendant difficile l'isolement de *Ps. Savastanoi*. Une bactérie similaire a également été trouvée avec *Ps. savastanoi* dans les tumeurs d'olivier et de laurier rose par Savastano (1886) et Peglion (1905), ces deux chercheurs l'ont apparemment confondu avec le véritable agent causal. Petri (1907) a relevé l'erreur et , sur la base de la description donnée par Savastano, a identifié la bactérie jaune comme étant *Ascobacterium luteum* [*Bacterium (Erwinia) herbicola* , maintenant *Pantoea agglomerans* (Gavini et al ., 1989)]. Petri a souligné que la description correcte de l'organisme causal du la tumeur d'olivier (*Ps. Savastanoi*) avait été faite par Smith & Rorer aux États-Unis en 1904.

L'olivier joue un rôle très important, parce que non seulement il utilise un terrain qui ne convient pas à d'autres cultures, mais il aide également à protéger le sol contre l'érosion. Les principaux produits de l'olivier sont l'huile d'olive et les olives de table. Le grignon d'olives est également important pour un usage industriel. Quelques produits dérivés qui peuvent posséder une importance économique sont les feuilles, le bois, le cœur, etc (Chliyah *et al.*, 2017).

Tout comme les autres arbres l'olivier est exposé à plusieurs maladies, y compris les maladies bactériennes. La tuberculose d'olivier est l'une des maladies bactériennes qui peuvent toucher l'olivier. Elle est causée par une bactérie nommée *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* que l'agriculteur ne peut déceler qu'après la plantation d'olivier où des symptômes apparaissent sous forme de tumeurs sur le tronc (Guissous, 2016).

La bactérie *Pseudomonas savastanoi* provoque sur les organes végétatifs de l'olivier, feuilles et rameaux, l'apparition de tumeurs typiques très caractéristiques. Sur les fruits (olives), on n'observe pas ces excroissances fissurées. La dissémination de la bactérie responsable de la maladie s'effectue essentiellement par des vecteurs tels que : les insectes contaminés par l'agent pathogène. Ceux-ci récupèrent la maladie quand ils s'installent sur des blessures fraîches causées éventuellement par des phénomènes naturels au niveau de l'arbre (Rorer, 2012)

Au cours de ce travail, nous avons effectuée des prospections dans des oliveries de la wilaya de Djelfa et celle de Batna, d'après ces prospections deux foyers ont été signalés. Dans la présente étude nous avons estimé le taux d'infection des deux oliveries visitées ; dans celle de Ngaous (Batna) le taux était 10% et 5% dans l'oliverie de Ain El Bel (Djelfa).

L'objectif de notre travail était l'isolement de l'éventuel agent causal des tumeurs d'olivier et son identification par une série de tests biochimiques et physiologiques, grâce à ces tests, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées. L'isolement a été fait sur les deux milieux KB et LPGA.

D'après les résultats de l'isolement et le dénombrement, le taux des *Pseudomonas savastanoi* like bacteria évalué sur le milieu KB était faible par rapport à la flore totale dans deux échantillons parmi les trois analysés.

Après l'isolement, 31 isolats bactériens ont été sélectionnés on se basant les caractéristiques des *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*. Les résultats des tests biochimiques (coloration de Gram, KOH, fluorescence sur KB) et les résultats du test LOPAT montrent que 10 isolats parmi les 31 isolats testés sont des bacilles à gram négatif, aérobie stricte et produisent de pigment fluorescence et sont des levanes négatifs, arginine négatifs et ne dégradent pas la pectine et oxydases négatifs et induisent une réaction d'hypersensibilité sur tabac (pour ce dernier test, 09 isolats uniquement ont été testés).

Pour étudier le pouvoir pathogène des isolats, un test de pathogénicité a été mené sur des plantules d'olivier variété Chemlilal, les résultats de ce test confirme les résultats des tests biochimiques et physiologiques et celles tu test LOPAT et prouve que ces des isolats sont pathogènes sur des plantules d'olivier de la même variété que celle des arbres utilisés pour l'isolement.

Les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, il n'en demeure pas moins qu'ils sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines espèces et sous-espèces de bactéries phytopathogènes. Grâce à ces tests, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées. Les tests biochimiques permettent donc de vérifier si la bactérie a un métabolisme oxydatif ou fermentatif

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

Le facteur qui favorisait le plus la multiplication bactérienne et l'apparition de symptômes était l'eau, et son rôle dans le passage de la phase épiphyte à la phase pathogène pourrait être associé au volume et à l'intensité des pluies, la bactérie devrait être classée comme un organisme de quarantaine présent. La dispersion non symptomatique de la bactérie dans le champ est supérieure à l'apparition de la maladie (Soares et al., 2016)

Comme pour la plupart des maladies bactériennes, les méthodes prophylactiques restent l'essentiel de l'arsenal mis à disposition pour lutter biologiquement contre l'agent pathogène.

Les risques d'infestation des arbres d'olivier par la tuberculose peuvent être potentiellement réduits en veillant par émonder les branches et les rameaux malades, éviter les blessures pendant la récolte, éviter de tailler les olivier pendant la pluie et la rosée, tailler les arbres atteints en dernier lieu et désinfecter les outils de taille (Trottin-Caudal et *al.*, 2006)

Pour la prévention de cette maladie, il faut une vaste campagne de sensibilisation auprès des agriculteurs actifs dans la filière oléicole en leur prodiguant des conseils et des orientations afin d'éviter la propagation de la maladie. Les agriculteurs doivent planter des arbres sains acquis auprès de pépinières dont les produits ont été soumis à un contrôle ou de présenter des échantillons aux services agricoles pour des tests gratuits, en cas de doute (Guissous, 2016).

Nous espérons pour l'avenir continuer à travailler sur des isolats des bactéries *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* en effectuant les tests pour faire une caractérisation plus précise grâce à d'autres tests confirmatives et peut-être en trouvant un moyen d'atténuer et de réduire la propagation de la maladie.

Alkoum S., 1984 – contribution à l'étude des variétés d'olivier (*Olea europea* L.). Etude des caractéristiques végétatives et florifères de Picholine, Sigoise et bouteillon. Mémoire de D.E.A, I.N.A, El-Harrach 70p

Amirouche M., 1977 - contribution à la caractérisation des principales variétés d'olivier cultivées en Kabylie, par l'analyse des données biométriques et morphologiques. Thèse de Magistère. Int. Nat.Agr., El-Harrach. 47p.

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

Benjamaa A.H. 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, vol. 58 (4):213 -219.

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

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

Boussen B. Z. et Bouraoui N.E.H. , 2016. Etude sur la tuberculose de l'olivier ; isolement et identification présomptifs de quelques isolats bactériens à partir des tumeurs. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri de Constantine, Algérie, 79p.

Benchaabane M., 1990. Observation des cas de verticilliose de l'olivier à Cap-Djinet et Sidi Aich . Rapport de mission, ITAV , Algérie, 5p.

Breton, C.(2006). Adaptation et évolution de l'olivier et de l'oléastre dans diverses conditions d'isolement, de culture et d'environnement. Tela Botanica.

Civantos I L., 1998 – L'olivier, l'huile d'olive et l'olive, Ed, Conseil oléicole international, 130 p. 7. MAILLARD R., 1975 – L'olivier, Edit, INVUFLEC, Paris, 147p

COI, 2006. Conseil Oléicole International DÉCISION N° DÉC-22/96-V/08 n° RÉS-1/94-V/06 du 24 novembre 2006

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

Daoudi L., 1994 – Etude des caractères végétatifs et fructifères de quelques variétés d'olives locales et étrangères cultivées à la station expérimentale de Sidi-Aiche (Bejaia), Thèse de Magistère, Inst, Nat,Agr, El-Harrach, 130p

Ercolani, G.L. (1978). *Pseudomonas savastanoi* and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field. *Journal of General Microbiology*, Vol. 109, (December 1978), pp. 245-257, ISSN 0022-1287.

Fantanazza G., et Baldoni L., 1990 – Proposition pour un programme d'amélioration génétique de l'olivier, Revue Olivae n°34, Décembre 1990, PP : 32-39.

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

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

Guido, M., Carlo V., Luciana G & Guisepe S., (2005). Spread of levan positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy, *European journal of plant pathology* (2005). 112: 101-112.

Guignard, J.L ., Dupont, F. (2004) : Botanique : systématique moléculaire. 13ème Eds, Masson. Paris. France. 164-179p

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

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

Istanbouli A ., 1976- étude expérimentale sur la nature des périodes de repos des semences et des bourgeons de l'olivier (*Olea Europaea*)

L.,Gvozdyak, R.I. & Stead De .(1996). Names of plant pathogenic bacteria. *Review of plant pathology*, 75: 721-763.

Loussert R. et Brousse C., 1978 – L'olivier, Techniques culturales et productions méditerranéennes, Edit, C.P, Maisonneuve et Larousse, Paris, 437p.

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

Montesinos E., Moragrega C., Llorente I., Vilardell P. 1995. Susceptibility of selected European pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf and fruit age. *Plant. Dis.*, 79: 471-473.

Nait Taheen R., Boulouha B., et Bechabane; 1995 – étude des caractéristiques de la biologie florale chez les clones sélectionnés de la variété population « picholine marocaine» *Olivae* N°58 pp : 48-53.

Oukssili S., 1983 – Contribution à l'étude de la biologie florale de l'olivier (*Olea europea* L.) de la formation des fleurs à la période de pollinisation effective, Thèse de Doct, Ing, E.N.S.A.M., Montpellier, 143p.

Philippe, 2007. Les procaryotes phytopathogènes . Chapitre 4 phytopathologies. Ed ; Feemen Now York .432 P.

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

Quesada, J.M., Perez-Martinez, I., Ramos, C., Lopez, M.M. & Penyalver, R., (2008). IS53: an insertion element for molecular typing of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Research in Microbiology* 159, 207–15.

Quesada M., Penyalver R. and López M. M., 2012 .Epidemiology and Control of Plant Diseases Caused by Phytopathogenic Bacteria: The Case of Olive Knot Disease Caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Quesada, J.M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C.I., Carbonell, E.A. & López, M.M. (2010a). Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. *Plant Pathology*, Vol. 59, No. 2, (April 2010), pp. 262–269, ISSN 1365-3059.

Roubal C. , 2017. Tavelures du pommier et de l'olivier : réalisation de modèles épidémiologiques par des méthodes exploitant des observations biologiques acquises au verger, l'Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, France, p

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

Renaud p., 1968. Ecologie de la maladie de l'oeil de paon et résistance variétale dans leurs incidences sur la culture de l'olivier dans le pays. *Al Awamia*, 26, pp. 55-74.

Sisto, A., Cipriani, M.G. & Morea, M. (2004). Knot formation caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olives is hrp-dependent. *Phytopathology*, 94(5):484-489.

Varille., 1984 - Sa vie au fil des saisons, Le nouvel olivier n°46. 16.

Varvaro Giuseppe Surico. Phytopath. medit. (1978), L'esigenza di studi volti alla ricerca di culti- vars d'Olivo (*Olea europaea* L.) 17, 174-178.

Villemer S et Dosba J, 1997 – mécanisme de fructification chez *Olea europea*, Arboriculture, Vol III, Edit, 78p

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

Wilson, E.E. & Magie, A.R. (1965). Systemic invasion of the host plant by the tumorinducing bacterium, *Pseudomonas savastanoi*. *Phytopathology*, Vol. 54, pp. 576-579, ISSN 0031-949X.

Young, J.M., Saddler, G.S., Takikawa, Y., De Boer, S.H., Vaqueterin, L., Gardan,

1. Les milieux utilisés pour l'isolement:

1.1 King B

La gélose King B Est un milieu semi sélective, elle permet la production de fluorescéine (ou pyoverdine), pigment jaune vert fluorescent sous lumière ultra-violette, par certains *Pseudomonas* (King, 1954)-

Agar	20g
Peptone	20g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,5g
K ₂ HPO ₄ (anhydre)	1,5g
Glycérol	10ml
Eau distillée	1L

➤ pH =7.20

Après l'autoclavage à environ 120°C pendant 20 min et refroidissement à 50°C ± 5°C , le milieu est coulé en biote de pétrie.

1.2LPGA

Bactopeptone	5g
Extrait de levure	5g
Glucose	10g
Agar bactériologique	15g
Eau distillée	1L

➤ pH =7.20

Après l'autoclavage à environ 120°C pendant 20 min et refroidissement à 50°C ± 5°C , le milieu est coulé en biote de pétrie.

2. Les Milieux utilisés dans les tests d'identification

2.1. Milieu Levane

Extrait de levure	3g
Bactopeptone	5g
Saccharose	50g
Agar Bactériologique	18g
Eau distillée	1L

➤ pH =7.20

Après l'autoclavage à 120°C pendant 20 min et refroidissement à 50°C ± 5°C , le milieu est coulé en biote de pétrie.

4. Milieu Arginine

Extrait de levure	3g
Arginine	5g
Glucose	1g
Pourpre de Bromocrésol	0.16 mg
Na cl	5g
Ethanol	1ml
Eau distillée	1L

➤ pH =7.20

Le milieu est coulé en tube ensuite autoclave à environ 120°C pendant 20 min.

5. Hugh et Leifson

Bactopeptone	2g
Nacl	5g

K ₂ HPO ₄	0.3g
Bleu de prométhymol 1%	3ml
Glucose	10g
Agar	3g
Eau distillée	1L

- pH =7.20
- Le milieu est coulé en tube ensuite autoclavé à environ 120°C pendant 20 min.