



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 : Birech zineb**

**DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

**FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES**

**OPTION : Protection des végétaux et de l'environnement**

**Thème**

**Contribution à l'identification de L'agent  
pathogène de la tuberculose d'olivier**

**Jury de soutenance :**

<b>Nom et Prénom</b>	<b>Grade</b>	<b>qualité</b>
Mr. Messaoudi O		Président
Mme. Hatteb Touati S		Examineur
Mlle.Zaza M		Encadreur

**Promotion : Juin-2016**



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



جامعة عمار ثليجي - الأغواط

كلية/معهد: العلوم  
قسم: العلوم الفلاحية

## مذكرة ماستر

تقديم الطالب (ة): بيرش زينب

ميدان: العلوم الطبيعية والحياة

شعبة: علوم فلاحية

تخصص: حماية نبات وبيئة

موضوع البحث

## المساهمة في تحديد العامل المسبب للمرض الورم شجرة الزيتون

أعضاء لجنة المناقشة:

الاسم واللقب	الدرجة العلمية	الصفة
مسعودي عمر		رئيسا
تواتي خطاب سهام		ممتحن أول
زازة مسعودة		مقررا

الدفعة: جوان-2016

### **Résumé**

La tuberculose de l'olivier est la principale maladie bactérienne de l'olivier causée par *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*. Cette bactérie peut provoquer des dégâts économiquement importants son effet néfaste sur la croissance, le rendement et la qualité d'huile d'olivier.

L'objectif de ce travail est une contribution à l'identification de l'agent causale des tumeurs d'olivier, dans la région d'Ain El Ibel de la willaya de Djelfa.

Après le dénombrement des bactéries, nous avons remarqué que le taux des "*Pseudomonas savastanoi* like bacteria" au niveau des galles d'olivier varie entre 0 à 25%.

Après l'isolement et la purification des isolats, nous avons sélectionné 12 isolats bactériens. Nous avons fait la détermination du genre bactérien par la coloration de Gram, test KOH, puis au test de Hugh et Leifson et le test de fluorescence sur King B et pour déterminer l'espèce nous avons utilisé les tests biochimiques (LOPAT).

Le test de pathogénicité sur les plantules d'olivier a donné des symptômes similaires à celles d'une attaque par la tuberculose d'olivier.

Des colonies jaunes ont été associées aux colonies de *Pseudomonas savastanoi* dans les tumeurs leur l'identification utilisant les tests biochimiques et l'utilisation de galerie API 20 E montrent qu'elles appartiennent au genre *Pantoea*.

Mots clés : *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*, *Olea europea L*, *Pantoea spp*, test LOPAT, test pathogénicité

## ***Birech Zineb***

### ***Abstract***

Olive knot is the principal bacterial disease of oliver caused by *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*. this bacteria can provoke several economical important damages and harmful effects on the croissance, the yield and the quality of oliver.

The aim of this research is to contribute to the identification of the causally of agent tumors of Oliver, in the la region of'Ain El Ibel . willaya of Djelfa.

After the enumeration of bacterias we notice that the rates of " *Pseudomonas savastanoi* like bacteria" at galls's level of oliver is varied between 0 to 25%.

After isolation and the purification of it, we have selected 12 isolated bactériens. and done the determination of bacterial kind by the coloration of Gram, test KOH, and test of Hugh and Leifson fluorescence test at King B to determine the space we use biochemical tests (LOPAT).

the test of pathogenicity at seedlings of oliver gives some similar symptoms at cells an attack by Ttuberculose of oliver.

Yellow colonies have been associated on colonies de *Pseudomonas savastanoi* on tumors ; the 'identification which is used the biochemical tests show that they some *pantoae sp.*

Key words ; *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*, *Olea europea L*, *Pantoaea spp*, **LOPAT test**, **pathogenicity test**.

الملخص

ورم شجرة الزيتون الناجمة عن امراض *Pseudomonas savastanoi pv. Savastanoi*. هذه البكتيريا و تأثيرا ضارا على النمو والمحصول وجودة الزيتون. يمكن أن تسبب ضررا اقتصاديا كبيرا والهدف من هذا العمل مساهمة في تحديد العوامل المسببة لأورام الزيتون، في منطقة عين الإبل لولاية الجلفة. وبعد تعداد البكتيريا *Pseudomonas savastanoi like bacteria* على مستوى ورم الزيتون لاحظنا أن معدل اورام الزيتون يتراوح بين 0-2.5%.

بعد عزل 12 بكتيريا. استطعنا تحديد نوع البكتيريا بتلوين (غرام). اختبار KOH ثم اختبار Leifson و Hugh واختبار البيوضوي في الوسط الحيوي king B . ولتحديد الأوساط قمنا بأجراء الاختبارات البيو كيميائية LOPAT. أعطى اختبار القدرة الإمرضية في شتلات الزيتون أعراضا مماثلة لشتلات التي تعرضت لورم الزيتون مستعمرات صفراء كانت ترتبط *Pseudomonas savastanoi* في تحديد الأورام باستخدام الاختبارات البيو كيميائية أظهرت انهم *pantoae sp*.

الكلمات الرئيسية: *Pantoea spp, Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*. اختبار LOPAT اختبار القدرة الإمرضية ،

## DEDICACES

Quand il y a le souci de réaliser un dessein  
Tout devient facile pour arriver à nos fins  
Malgré les obstacles qui s'opposent  
En dépit des difficultés qui s'interposent  
Les études sont avant tout  
Notre unique et seul atout  
Je dédie ce mémoire à ...

**A** mes parents que dieu protège :

**E**n témoignage de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissant. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.

**A** mes frères Fouad, Farid, Mokhtaria, Faty et Islam

**A** tous mes Amis (es).

**A** tous les miens.



*Birech Zineb.*

# Remerciement

Louange à Allah , seigneur de l'univers, le tous puissant t miséricordieux, qui m'a inspirée et combler de bienfaits, je lui rends grâce.

Je tiens à exprimer mes remerciements en premier lieu et tout particulièrement à mon encadreur **Mlle Zaza Messaouda**, maître de conférences "A" à l'université Amar TELIDJI (Laghouat), et qui a bien voulu diriger ce travail, ses compétences techniques, son efficacité et surtout sa rigueur ont fortement contribué à la réalisation de ce mémoire. De son savoir et de sa grande expérience qui, alliés à ses qualités humaines, resteront pour moi un modèle.

Mes vifs remerciements sont adressés également aux membres de jury : **M. Massaoudi O. (Président)**, **Mme Touati S. (Examinatrice)**, **Mlle Zaza Messaouda. (Rapporteur)** de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Tous mes remerciements à tous mes enseignants du Département d'agronomie d'Université Amar THELDJI de Laghouat pour leurs collaborations et leur accueil chaleureux.

Une pensée amicale à mes collègues en l'occurrence Nafissa, Chahira, Nessrine, Houda, Naouma, Nasima, Aya. Fatiha, Hadjira.

Enfin à tous ce qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*Merci à tous...*

## Liste des Figures

	Page
<b>Figure 01.</b> La verticilliose d'olivier	11
<b>Figure 02.</b> Représentation schématique du système Hrp	18
<b>Figure 03.</b> Galles symptômes d'oliviers typiques causés par <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i>	19
<b>Figure 04.</b> Cycle de la maladie de tuberculose d'olivier causée par <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i>	21
<b>Figure 05.</b> Model representing the interactions between olive cells, <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	26
<b>Figure 06.</b> Schéma du Schaad.	30
<b>Figure 07.</b> Le taux de <i>Pseudomonas like</i> bactéria	39
<b>Figure 08.</b> Résultat de purification des isolats	40
<b>Figure 09.</b> Les caractères morphologiques	41
<b>Figure 10.</b> Resultat de test de coloration de gram	42
<b>Figure 11.</b> Résultat de test KOH	42
<b>Figure 12.</b> Résultat de test levane.	44
<b>Figure 13.</b> Résultat de test pectinas.	45
<b>Figure 14.</b> Resultat de test pathogénicité	47
<b>Figure 15.</b> Résultats obtenus pour la Galerie API 20 E.	48
<b>Figure 16.</b> Les caractères morphologiques.	49
<b>Figure 17.</b> Résultat de test de coloration de Gram.	50
<b>Figure 18.</b> Résulta de test Hugh et Leifson.	51
<b>Figure 19.</b> Résulta de test YDC.	51
<b>Figure 20.</b> Résulta de test oxydase.	52
<b>Figure 21.</b> Résultats du test de Galerie API 20 E	53

## Liste des tableaux

	Page
<b>Tableau 01</b> . L'aspect morphologique des isolats bacteriens issues de tumeurs d'olivier.	41
<b>Tableau 02.</b> Résultats d'identifications des isolats	43
<b>Tableau 03.</b> Résultats de test LOPAT.	46
<b>Tableau 04.</b> Résultats des testes de Galerie API 20 NE	48
<b>Tableau 05.</b> Résultats du test de Galerie API 20 E.	53
<b>Tableau 06.</b> Lecture des résultats d'identification des isolats utilisant logiciel de la galerie API 20 NE	63
<b>Tableau 07.</b> les résultats d'identification de galerie API 20 E	68

## Table des matières

Page	
Résumé.....	I
ملخص .....	II
Abstract.....	III
Liste des tableaux.....	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des abréviations .....	X
Introduction .....	01
<b>Partie I. Revue bibliographique</b>	
<b>CHAPITRE 01: L'olivier</b> .....	
1. Origine de l'olivier.....	3
1. Origine de l'olivier.....	4
2. Classification de l'olivier.....	4
3. Description botanique.....	4
3.1. Le système racinaire.....	4
3.2. Les organes aériens.....	4
4. Cycle de développement de l'olivier.....	5
5. Les exigences de la culture d'olivier.....	7
6. Distribution géographique de l'olivier dans le monde.....	9
7. Répartition de la culture d'olivier en Algérie.....	10
8. Les variétés de l'olivier en Algérie.....	10
9. Les principales maladies d'olivier.....	11
9.1. Les maladies fongiques.....	11
9.1.1. La Verticilliose.....	11
9.1.2. Cercosporiose de l'olivier.....	12
9.3. Quelques espèces ravageuses de l'Olivier .....	13
9.3.1. Otorhynque de l'Olivier ( <i>Otiorynchus cribricolis</i> ).....	14
<b>CHAPITRE 02: La tuberculose d'olivier</b>	
1. Historique de la maladie .....	15

2. Classification de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> .....	16
3. Répartition géographique des agents pathogènes de la tuberculose d'Olivier .....	16
4. Processus d'infection .....	16
5. Symptômes .....	18
6. Epidémiologie et cycle de maladie .....	19
7. Les facteurs qui modulent l'identification de l'agent pathogène de la tubercule d'olivier	21
7.1. Variabilité de l'agent pathogène .....	21
7.2. Influence du climat .....	21
7.3. Influence de la gestion des cultures .....	21
7.4. Impact économique .....	22
8. Méthodes de Lutte .....	22
8.1. Assainissement et précautions culturelles .....	22
8.2. Lutte chimique .....	23
8.3. Utilisation des cultivars de résistants .....	23
9. Autres bactéries associées à <i>Pseudomonas savastanoi</i> dans les tumeurs de la tuberculose d'olivier	24
<b>Partie II. Matériel et méthodes</b>	
1. Matériel végétal .....	26
1.1. Prospection sur terrain .....	26
1.2. Prélèvement des échantillons .....	26
2. Méthode d'isolement .....	27
3. Dénombrement des colonies .....	27
4. Sélection et purification .....	28
5. Conservation des isolats .....	28
6. Identification et caractérisation des isolats .....	28
6.1. Détermination du genre bactérien des isolats .....	28
6.2. Test de Gram .....	30
6.2.1. Coloration de Gram .....	30
6.2.2. Test de KOH .....	30
6.3. Production de pigment fluorescent sur milieu King B .....	31

6.4. Le test de Hugh et Leifson (HL) .....	31
6.5. Test LOPAT .....	31
6.5.1. Test levane sucrose .....	32
6.5.2. Test oxydase .....	32
6.5.3. Test pectinase .....	32
6.5.4. Test arginine dihydrolase .....	33
6.5.5. Le teste d'hypersensibilité sur feuille de tabac .....	33
6.6. Test de pathogénicité .....	34
6.7. Galerie API 20 NE .....	34
II. Identification des colonies jaunes .....	35
1. Coloration de Gram .....	35
2. Test de KOH .....	35
3. Le test de Hugh et Leifson (HL) .....	36
4. Test D'YDS .....	36
5. Teste oxydase .....	36
6. La galerie 20E .....	36
Partie III. Résultats et discussions	
1. Isolement de l'agent causal .....	37
2. Dénombrement bactérien .....	37
3. Identification des isolats bactérien .....	38
4. Caractéristiques morphologiques des <i>Pseudomonas Savastanoi</i> .....	38
4.1. Observation macroscopique .....	38
L'identification des isolats bactérienes .....	40
Les tests biochimiques et physiologiques .....	40
5. Tests de Gram .....	40
5.1. Coloration de Gram .....	40
5. 2. Test de KOH .....	40
6 .Test de Hugh et Leifson .....	41
7. Production de pigments fluorescents .....	42

8. Test LOPAT .....	42
8.1. Test Production de levane sucrase .....	42
8. 2.Test oxydase .....	43
8.3. Test Pectinase .....	43
8.4. Test d'Arginine déshydrolyse .....	44
8. 5. Test d'hypersensibilité sur feuille de tabac .....	44
9. Test pathogenicité : Postula de cokh .....	45
10. Galerie 20 NE .....	46
II. Identification des isolats jaunes .....	47
1. Isolement et dénombrement des bactéries .....	47
2. Test de Gram .....	48
2.1. Coloration de Gram .....	48
2.2. Test de KOH .....	49
3. Test de Hugh et Leifson .....	49
4. Test YDC (Yeast Dextrose Carbonate de Calcium et Agar) .....	50
5. Production d'oxydase .....	50
6. Galerie 20E .....	51
Discussion	53
Conclusion .....	66
Références bibliographiques .....	68
Annexe .....	

## Liste des abréviations

<b>LPGA :</b>	Extrait de Levure, Peptone. Glucose. Agar
<b>AIA :</b>	Acide indole-3-acétique
<b>KB :</b>	King B
<b>KOH :</b>	Hydroxyde de potassium
<b>CFU :</b>	Unité formant une colonie bactérienne
<b>ED :</b>	Eau distillé
<b>G- :</b>	Gram négative
<b>MIN :</b>	minute
<b>mm :</b>	Millimètre
<b>G :</b>	<i>gram</i>
<b>S :</b>	<i>Second</i>
<b>O<sub>2</sub> :</b>	<i>Oxygène</i>
<b>Nit 1 :</b>	Nitrate 1
<b>PH :</b>	Potentiel d'hydrate
<b>T :</b>	Température
<b>TRP :</b>	Tryptophane
<b>API :</b>	Analyse prophylactique Idex

## Introduction :

L'olivier, *Olea europea* L. est l'un des arbres les plus caractéristiques de la région méditerranéenne. Il a une importance nutritionnelle, sociale, économique, phytothérapeutique et écologique (Lousert *et al.*, 1978).

L'oléiculture prend une place considérable dans l'économie de l'Algérie. D'ailleurs, une prise de conscience s'est opérée récemment à ce sujet pour améliorer la conduite du verger oléicole, réfléchir à son extension sur des terres où l'intensification de la production est possible. En effet, l'État algérien a mis en place un Plan National Oléicole (PNO) en 2000. Ce plan avait comme objectifs, l'extension de la superficie des oliveraies à 500000 ha, à l'horizon 2010 (Argenson, 2008).

L'olivier comme d'autres arbres fruitiers est souvent attaqué par des micro-organismes (bactéries, champignons, et virus, ainsi que certains ravageurs (insectes). Parmi les maladies qui peuvent toucher l'olivier certaines sont des maladies de quarantaine; tels que la tuberculose d'olivier.

La tuberculose de l'olivier est la principale maladie bactérienne de l'olivier. Causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Gardan *et al.*, 1992), elle est répandue dans tout le bassin méditerranéen. La bactérie s'installe sur les blessures et provoque des tumeurs aériennes sur différentes parties du végétal. C'est un parasite épiphyllé qui vit à la surface et à l'intérieur des tumeurs; sa dissémination est favorisée par le gaulage des fruits. La maladie agit, entre autres, 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).

Les symptômes d'arbres infectés comprennent excroissances (galles, tumeurs ou tuberculose) sur les tiges et les branches de la plante hôte, se produisant parfois sur les feuilles et les fruits. A l'heure actuelle, les seuls déterminants connus chez *Pseudomonas savastanoi* pour être impliqués dans le développement des galles sont les phytohormones: l'acide indole et les cytokinines ( Smidt et Kosuge 1978 ; Comai et Kosuge 1980 ; Surico *et al.* , 1985 ; . Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008), et la biosynthèse du système de sécrétion de type III, le (SSTT), (Sisto *et al.*, 2004 ). Récemment, une analyse génomique globale du plasmide de *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* ont permis l'identification de plusieurs

facteurs de virulence putatifs chez ce pathogène d'olivier, comprenant plusieurs effecteurs de protéine TTSS et une variété de gènes - virulence - (Pérez-Martínez *et al.*, 2008 ).

Les symptômes s'observent principalement sur rameaux, brindilles mais également sur charpentes. Sur les parties infectées, on note la présence de petites tumeurs parenchymateuses avec un aspect spongieux et de forme irrégulière. Au début de leur apparition, elles sont molles, de couleur verte et à surface lisse.

Des galles similaires à celles d'une attaque par la tuberculose d'olivier ont été observées sur des rameaux d'olivier dans une oliverie dans la région d'Ain El Ibel à la wilaya de Djelfa. Au cours de ce travail de mémoire nous nous sommes proposés de faire l'identification de l'agent pathogène de ces symptômes chez l'olivier en évidence son éventuel pouvoir pathogène. En effet, notre plan de travail a porté sur quatre vols :

- ✓ Prospection sur terrain
- ✓ Isolement et caractérisation de l'agent causal à partir des galles d'olivier, par les tests physiologiques et biochimiques.
- ✓ Identification des isolats par les plaques API 20NE .
- ✓ Test de détermination du pouvoir pathogène.

## Chapitre I: Généralités sur l'olivier

### 1. Origine d'olivier

L'origine de la culture d'olivier se perd dans la nuit des temps, son extension coïncide et se confond avec celle des civilisations qui se sont succédées dans le Bassin méditerranéen. Selon Loussert et Brousse (1978), cet arbre a une origine très ancienne; son apparition et sa culture remonteraient à la préhistoire. Parmi les vestiges les plus anciens, des fossiles de feuilles d'olivier ont été trouvés dans les gisements Phéocéniques de Montardino en Italie, dans les strates du Paléolithique supérieure, dans l'excarvotière capsienne de Relilai (région de Tebessa) en Afrique du Nord. Des fragments d'oléastes et des noyaux ont également été trouvés dans des sites du Néolithique et de l'âge de Bronze, en Espagne (Blazquez, 1977).

La voie de l'expansion des oliviers au cours du temps ne peut être déterminés avec certitude. Cependant, plusieurs hypothèses sont admises mais la plus fréquemment retenue est celle de De Candolle (1883), qui situe le berceau de l'olivier cultivé sous une forme primaire en Syrie et en Asie Mineure (Iran), il y a six millénaires. De là, de nombreuses civilisations méditerranéennes se relayèrent à travers l'histoire pour propager la culture de cet arbre de l'Est en Ouest, dans tout le Bassin circum méditerranéen (Zohary et Spigel, 1975; Bensard *et al.*, 2001). Au VI<sup>ème</sup>, sa culture s'est étendue à tout le Bassin méditerranéen par les grecs d'abord, puis par les romains qui l'ont utilisé comme arme pacifique dans leurs conquêtes pour l'établissement des villes en fixant les habitants des steppes (Baradez, 1949; Blàzquez, 1997).

En Afrique du Nord, la culture de l'olivier existait déjà avant l'arrivée des romains, car les berbères savaient greffer les oléastes (Camps-fabrer, 1953). Cependant, les romains ont permis l'extension des champs aux régions plus arides, considérées jusqu' alors comme peu propices à cette culture. C'est le cas de la région de Sufetula, l'actuelle Sbeïbla en Tunisie (Barbery et Delhoune, 1982). De plus, une foule de mosaïques trouvées en Tunisie et en Algérie témoigne de l'importance de l'olivier dans la civilisation romaine (Camps-Fabrer, 1953). La colonisation française a contribué à l'extension de l'oléiculture en Afrique du Nord, telles que l'oliveraies de Sfax en Tunisie, de Sig en Algérie (Mendil et Sbari, 2006) et des oliveraies entre Meknès et Fez, au Maroc (Loussert et Brousse, 1978).

C'est à partir du XVI<sup>ème</sup> siècle que s'ouvre une nouvelle ère continue qui va conduire l'olivier à son extension maximale, sous l'influence de la demande croissante d'une société occidentale de plus en plus industrialisée (Fiorino et Nizzi, 1992). Avec la découverte du nouveau monde, les émigrants de la péninsule ibérique (Espagne) ont introduit l'olivier dans leurs anciennes colonies

des Amériques comme l'Argentine, le Mexique, le Pérou ensuite le Chili et la Californie. Et ce n'est qu'au XIII<sup>ème</sup> siècle, lors de l'apogée de la démographie et de la colonisation européennes que l'oléiculture a vu un essor rapide en s'implantant dans des régions éloignées de son lieu d'origine comme d'Afrique du Sud, l'Australie, le Japon ou la Chine (Lousert et Brousse, 1978).

## **2. Classification de l'olivier**

Selon la classification de Pagnol (1975), l'olivier présente la classification suivante:

Domaine: Planta

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement: Spermaphyte

Classe : Dicotylédones

Ordre : Gentianales

Famille: Oleacées

Genre: *Oléa*

Espèce: *Oléa europaea*

## **3. Description botanique**

### **3.1. Le système racinaire**

L'olivier possède un système racinaire fasciculé très puissant, généralement situé sous le tronc dans une profondeur de 50 à 70 cm (Argenson *et al.*, 1999). Des rejets, assureront la pérennité de l'arbre, se développent à proximité du collet où les racines offrent une surface raboteuse et bosselée appelée souchets ou ovules (Argenson *et al.*, 1999).

### **3.2. Les organes aériens**

La partie aérienne d'un plant d'olivier comprend : le tronc, les charpentières, la frondaison et les rameaux fructifères (Lousert et Brousse, 1978).

#### **3.2.1. Le tronc**

D'après Pagnol (1975), le tronc d'un olivier est tout d'abord lisse, gris verdâtre jusqu'à la dixième année environ. Avec le vieillissement, il se déforme en devenant noueux, crevassé, fendu, élargi à la base et d'une couleur gris foncé presque noire. Selon la zone de culture et le mode de conduite adopté, certains oliviers atteignent 8 à 10 m de hauteur, alors que d'autres ne dépassent guère 03 à 05 m (Ruby, 1918).

### 3.2.2. Les charpentières

Ce sont de grosses ramifications destinées à former la charpente de l'arbre. Il s'agit des charpentières mères ou branches mères qui prennent naissance sur le tronc et des sous-charpentières ou sous branches mères qui se développent sur les charpentières (Loussert et Brousse, 1978). Ces sous-charpentières portent des rameaux feuillés et des rameaux fructifères qui formeront le port de l'arbre.

### 3.2.3. La frondaison

Elle est constituée principalement par l'ensemble du feuillage (Loussert et Brousse, 1978). La feuille de l'olivier est simple, entière, à pétiole court et à limbe lancéolé qui se termine par un mucron (Ruby, 1918; Argenson *et al.*, 1999). Les feuilles sont opposées et persistantes, leur durée de vie est de l'ordre de 03 ans. Elles possèdent des formes et des dimensions très variables suivant les variétés. Elles peuvent être ovales, ovales oblongues, lancéolées et parfois presque linéaires. Les dimensions peuvent varier de 03 à 08 cm de long et de 01 à 1,25 cm de large (Loussert et Brousse, 1978).

### 3.2.4. Les rameaux fructifères

Ce sont les rameaux qui porteront les fleurs puis les fruits (Loussert et Brousse, 1978). L'inflorescence est une panicule (Chol *et al.*, 2005), constituée de grappes longues et flexueuses dressées à l'aisselle des feuilles de l'année précédente. Elle peut comporter de 10 à 40 fleurs selon la variété (Loussert et Brousse, 1978). Petites et d'un blanc jaune verdâtre, Les fleurs sont régulières, hermaphrodites avec une formule florale très simple: 4 sépales, 4 pétales, 2 étamines, 2 carpelles (Argenson *et al.*, 1999).

Le fruit est une drupe à mésocarpe charnu, riche en lipide, de diamètre compris entre 1 et 03 cm (Argenson *et al.*, 1999). L'endocarpe ou noyau est dur, généralement fusiforme portant une série sillons longitudinaux. Il renferme une graine à albumen: l'amandon (Loussert et Brousse, 1978). La couleur de l'épiderme et les formes du mésocarpe et de l'endocarpe sont des caractères variétaux (Chol *et al.*, 2005). A maturation, l'épicarpe passe de la couleur vert tendre (olive verte), à la couleur violette ou rouge (olive tournante) et enfin à la couleur noirâtre (olive noire) (Loussert et Brousse, 1978).

## 4. Cycle de développement de l'olivier

Après le repos hivernal de Novembre à février, la végétation démarre à partir de Mars - Avril, les pousses terminales s'allongent, les bourgeons axillaires se développent après s'être différenciés en boutons floraux ou en yeux à bois, les bourgeons végétatifs débourent vers la fin

du mois de Mars un peu après les bourgeons floraux, la floraison se déroule entre Mai et Juin, l'endocarpe (noyau) se scerifie en Juillet-Août. La pousse de printemps la plus importante dans la croissance annuelle, dure jusqu'à mi-Juillet environ, une deuxième pousse peut avoir lieu entre Septembre et mi-octobre, si les conditions le permettent (Loussert et Brousse, 1978).

Chez les arbres qui ne portent pas de fruits (années moins) une croissance continue mais irrégulière peut être observée pendant toute la période de Mars à Octobre. L'ampleur à la croissance des rameaux est très affectée par la quantité de fruits portés par l'arbre.

Les feuilles de troisième année jaunissent puis chutent à un âge compris entre 28 et 30 mois en moyenne. L'arbre rentre enfin en repos hivernal.

La floraison s'effectue sur la pousse de l'année précédente et sur la pousse de deuxième année qui n'a pas fleuri l'année première.

La production interviendra donc sur du bois en deuxième année de croissance.

L'induction florale est déjà intervenue 90 à 100 jours avant le début de la floraison et Vrai semblablement 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 déterminant 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).

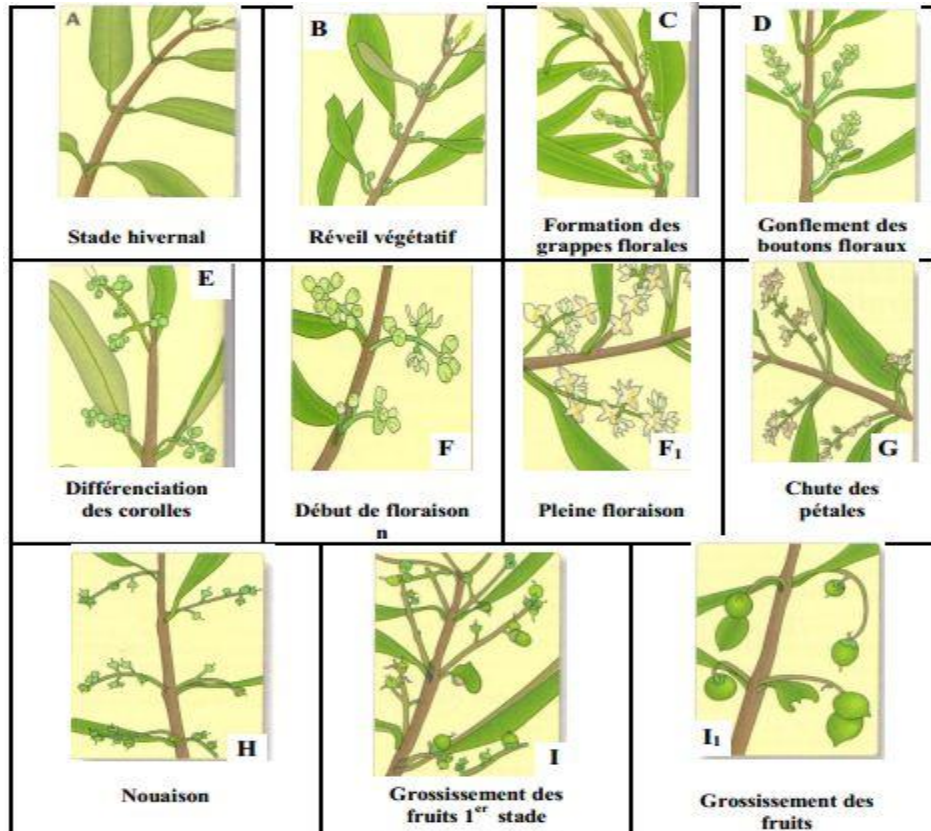


Figure 1 : Le cycle de vie de l'olivier (Argenson *et al* ; 1999)

## 5. Les exigences de la culture d'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'eau accumulée dans le sol durant la période humide (Denis, 1998).

### 5.1. Le sol

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.

En général, on recommande :

- 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).

## **5.2. La lumière**

L'olivier étant exigeant en lumière, l'insolation est à considérer dans le choix de l'orientation des arbres et la densité de plantation. En effet, l'aspect le plus important pour une bonne productivité est l'exposition importante à la lumière du soleil de toute la cime de l'arbre (Sikaoui, 2006).

## **5.3. La pluviométrie**

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 (Loussert et Brousse, 1978).

Des oliviers cultivés sous de telles conditions climatiques ne peuvent s'adapter à l'irrégularité de ce régime hydrique qu'en puisant en profondeur du sol le peu d'humidité qu'il peut contenir (terrain favorable à la pénétration des racines) et en exploitant un grand volume de terre (faible densité de plantation).

En oléiculture pluviale, la pluviométrie se situe entre 450- 800 mm/an. En cas d'excès, on choisit des terrains drainants. En cas de déficit, on opte pour des terrains profonds et on procède à la réduction de densité.

## **5.4. La température**

L'olivier craint le froid. Les températures négatives peuvent être dangereuses, particulièrement si elles se produisent au moment de sa floraison. La sensibilité de l'olivier aux basses températures est fonction de plusieurs facteurs tels que : l'état végétatif de l'arbre, la durée des basses températures, la résistance de la variété, l'état sanitaire de l'arbre, etc. (Loussert et Brousse, 1978).

## **5.5. Choix de densité**

Le choix de la densité doit découler des facteurs suivants (Sikaoui, 2006):

- Des conditions climatiques et possibilités d'irrigations
- De la nature du sol, profondeur et pente.
- De la variété: vigueur et développement des arbres à l'âge adulte.
- De l'orientation de la production (olive, huile).
- Des possibilités de la mécanisation.
- De la technicité au niveau de l'exploitation.

- De la présence de cultures intercalaires.

### 5.6. La fertilisation

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). Il a un effet sur la coloration et la qualité gustative des fruits (effet favorable sur l'accumulation des acides organiques). Toutes ces fonctions confèrent au potassium un effet majeur sur le rendement en quantité et en qualité.

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.

La demande en potassium augmente au cours de la saison, surtout pendant les phases de croissance rapide du fruit. Pour cela, la fertilisation doit être concentrée pendant cette période. La dose doit être calculée selon les exportations et principalement le rendement du verger.

### 6. Distribution géographique de l'olivier dans le monde

Dans les pays du bassin méditerranéen, l'olivier trouve une place de choix. Il s'acclimate à presque toutes les étages bioclimatiques, de l'humide, sub-humide, au semi-aride et même l'aride, zone caractérisée par de faibles précipitations et une forte évapotranspiration où ces deux facteurs climatiques occasionnent de longues périodes de déficit hydrique. Le comportement morphologique et physiologique de l'olivier montre une grande capacité d'adaptation à des milieux totalement différents, ceci est dû aux particularités morphologiques de ses feuilles, ainsi qu'à son système racinaire, et à son potentiel de régénération morphogénétique (Lavee, 1997).

La rusticité, longtemps prêtée à l'olivier, a souvent contraint l'arbre dans des conditions de végétation très difficiles, peu propices à la pleine expression de son génotype et au bon déroulement de son cycle végétatif, ce qui engendre le phénomène d'alternance de production. Mais, l'olivier placé dans des conditions agronomiques favorables se trouve en mesure d'exprimer pleinement toutes les phases de son cycle et de produire régulièrement (Argenson *et al.*, 1999).

En effet, l'olivier connaît une distribution géographique assez large due à son adaptation à toutes les conditions édaphiques et aux reliefs du sol. Cependant, la rusticité de l'olivier lui confère une certaine marginalité, car l'espèce *Olea europaea* peut bien exprimer son potentiel

génétique par de hauts rendements dans des conditions très favorables. Ainsi, l'olivier exploité sous un système intensif (fertilisation et irrigation) trouve sa productivité améliorée (Uzzan, 1992; Lopez-Villalta, 1997).

## **7. Répartition de la culture d'olivier en Algérie**

En Algérie, la culture de l'olivier remonte à la plus haute antiquité. Nos paysans s'y consacraient avec art durant plusieurs siècles (Alloum, 1974). L'olivier et ses produits constituaient alors l'une des bases essentielles des activités économiques de nos populations rurales. L'huile d'olive faisait l'objet d'un commerce intense entre l'Algérie et Rome, durant l'époque romaine. 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 (Mendil et Sebai, 2006).

## **8. Les variétés de l'olivier en Algérie**

Nous citons ci-dessous quelques-unes des variétés population les plus connues (Loussert et Brousse, 1978; Ahmim, 2006; Mendil et Sebai, 2006; Oulebsir, 2008; Sahli, 2009):

**Chemlal** : cultivée plus en Kabylie. Elle représente 40% du verger oléicole national. Les fruits relativement petits destinés à la production d'huile. Elle est autostérile par absence de pollen. Son rendement en huile est de l'ordre de 14 à 16%. Il existe plusieurs types de Chemlal : Chemlal de Tizi-Ouzou; Chemlal précoce de Tazmalt; Chemlal de l'Oued-aissi; Chemlal blanche d'Ali-cherif; Petite chemlal pendante.

**Azaradj**: synonyme : **Adjeraz** ; Cette variété représente 10% des oliviers cultivés en Algérie. Elle se trouve localisée en Kabylie souvent en mélange avec la variété « Chemlal » dont elle est le pollinisateur. Variété à double fin, ses fruits sont assez gros (3 à 5 g) et son rendement en huile varie entre 24 à 28 %.

Il existe également plusieurs types locaux de cette variété : Azeradj de Seddouk, Azeradj de Béni-Bou-Melek, Grosse Azeradj d'Ali-Cherif.

**Limli**: Cette variété est localisée dans la vallée de l'Oued Soummam. Elle représente 8 % du verger oléicole algérien. Ses fruits sont petits (1 g) et sa teneur en huile est de 15%.

**Sigoise**: synonyme : olive de Tlemcen, olive de Tell. Elle est surtout cultivée dans l'Ouest du pays, en Oranie, et plus particulièrement dans la plaine du Sig. Elle représente 20 % des oliviers cultivés en Algérie. Le fruit est moyen, d'un poids de 3 à 3,5 g. Rendement en huile de 18 à 20 %. Cette variété est utilisée principalement pour la production d'olives de table en vert ou en noir comme elle est appréciée pour la production d'huile.

**Rougette de la Mitidja:** elle est fréquente dans la plaine de la Mitidja et sur le piémont de l'Atlas, à faible altitude, c'est une variété à huile.

**Rougette et Blanquette de Guelma:** ce sont deux variétés à huile et se trouvent en mélange dans les régions de l'Est du pays.

**Bouchouk:** Variété cultivée surtout dans la basse vallée de l'Oued Soummam, en petite Kabylie. Mais on la trouve également en grande Kabylie en mélange avec « Chemlal », et dans l'Est de pays (Constantinois). Les fruits sont assez gros (2,6 g) et donnent un rendement moyen en huile de 16 à 20 %, la variété est toutefois orientée vers la conserve.

## 9. Les principales maladies d'olivier

Il existe plusieurs maladies attaquent l'oliveiers tels que les maladie fongiques, bactérienne et les ravageurs.

### 9.1. Les maladies fongiques

#### 9.1.1. La Verticilliose

La verticilliose est une maladie fongique, se trouve dans le sol et pénètre dans l'arbre par ses racines puis progresse à l'intérieur de celui-ci véhiculé par la sève. (Resende, 1996). Il provoque des lésions dans le système vasculaire de l'olivier ce qui entraîne le dessèchement d'une partie de ses rameaux ou même de sa totalité puis flétrissements et des chloroses suivis de nécroses et de défoliation (Fradin, 2006).

##### 9.1.1.1. Agent causal: *Verticillium dahliae*

La maladie est causée par le champignon *Verticillium dahliae*, l'infection de l'arbre commence a priori au niveau du système racinaire et à la base du tronc. Le développement du champignon est favorisé par la présence de blessures. L'agent pathogène se conserve dans le sol sous forme de microsclérotés (petites sclérotés à peine visible) et de chlamydospores (spores à paroi épaisse). Ces formes de conservation constituent également un excellent moyen de dissémination de la maladie fongique, notamment par le déplacement et le transport du sol (Isaac, 1967).

##### 9.1.1.2. Symptômes de maladie

Les symptômes sont très fréquents et graves les années humides ou dans les zones où le sol est excessivement humide en été. L'intensité de la maladie varie de saison en saison; les plantes atteintes une année peuvent sembler saines l'année suivante et pendant ensuite plusieurs années (Levin, 2003).

Les premiers symptômes sur feuilles apparaissent fin juillet ou début août sous forme d'un jaunissement des feuilles inférieures qui s'étend progressivement aux feuilles placées plus haut sur la tige, la plante n'est atteinte en entier qu'occasionnellement. Les feuilles inférieures se

dessèchent, se flétrissent et peuvent chuter, alors que des zones nécrotiques cunéiformes peuvent se développer sur les feuilles supérieures (Levin, 2003).

Les tiges sont souvent renflées (grosse tige) et peuvent paraître extérieurement marron et liégeuses.



**Fig 01.** La verticilliose d'olivier (Levin, 2003).

### **9.1.2. Cercosporiose de l'olivier**

En 1944, la maladie a été décrite pour la première fois en Amérique. En 1968 une épidémie s'est déclarée sur l'olivier par la maladie du Cercosporiose dont le pathogène est attribué à *Mycocentrospora cladosporioides* en Grèce (Freeman *et al*, 1998 ).

La cercosporiose peut causer de graves dégâts, principalement des régions d'Europe à été chaud, cette maladie provoque un abaissement du rendement.

#### **9.1.2.1. L'agent pathogène**

L'agent causal de la maladie appartenant à la classe des Deutéromycètes, l'ordre des hyphales, la famille des Dématiacées, le genre des *Mycocentrospora* et l'espèce *Mycocentrospora cladosporioides* (Kiffer et Morelet,1997).

#### **9.1.2.2. Symptôme**

Le premier symptôme pour identifier cette maladie, c'est la présence de zones chlorotiques sur la face supérieure de la feuille qui deviennent nécrotiques par la suite. La face inférieure se couvre par des sclérotés de couleur vert olive à noir foncée et elle peut être confondue avec la fumagine en général. Cette attaque provoque une chute aigue des feuilles surtout observée sur les feuilles âgées des branches inférieures de l'arbre.

Sur Les fruits les symptômes sont en fonction de l'étape de maturité. Les oliviers verts présentent des tâches molles de couleur marron de 04 à 10 mm de diamètre et les olives mures prennent une couleur gris clair entourée d'un anneau marron clair différent de la couleur du fruit. Sous les conditions climatiques humidités l'épiderme se déchire et le champignon se développe en donnant un mycélium hyalin, des conidiophores et des conidies (Bottalico *et al.*, 1995).

## **9.2. Quelques espèces ravageuses de l'Olivier**

### **9.2.1. Cochenille noire de l'Olivier (*Saissetia oleae*)**

Selon Loussert et Brouss (1978) *Saissetia oleae* est un insecte de la famille des Sternorhynches. Comme le puceron ou le psylle, elle n'est pas spécifique de l'Olivier car elle vit également sur d'autres plantes, en particulier sur le Laurier rose. A l'âge adulte, elle mesure environ 05 mm de long et 04 mm de large. Elle ressemble à une demi-sphère noir collé sur l'intérieur des feuilles mais surtout sur les jeunes tiges d'un an ou deux. On peut voir sur son dos un motif qui ressemble à la lettre "H". A ce stade adulte, l'insecte ne se déplace plus car ses pattes sont atrophiées. Il se nourrit en suçant la sève au moyen d'un rostre qui perfore les tissus végétaux. Le mal est très différent de la femelle. C'est un insecte ailé minuscule, avec une seule paire d'aile. La femelle est capable de se reproduire par parthénogenèse, sans avoir besoin de s'accoupler avec un mâle. La femelle pond une fois par an de mai à août, directement sous sa carapace, jusqu'à 1000 œufs. Les larves éclosent rapidement. De couleur orange, elles mesurent environ 0,4 mm. Etant pourvues de pattes développées, elles se déplacent pour aller se fixer sur la face inférieure des feuilles. Ce stade est appelé stade "L1". Au stade "L2" la larve a grandi, ses pattes sont moins visibles et surtout elle a pris une couleur jaunâtre. Le dernier stade avant l'âge adulte est le stade "L3". La couleur est devenue grise et la larve mesure environ 1 mm. Les adultes meurent après la ponte. Les larves au stade "L2" et "L3" survivront jusqu'à l'année suivante si les températures ne sont pas descendues au-dessous de moins 06 degrés (Loussert et Brouss, 1978).

### **9.2.2. Symptômes des dégâts**

D'après Ammar (1986) les dégâts sont d'un côté directs, dus à la succion de la sève par les larves et les adultes entraînant l'affaiblissement de l'arbre en cas de densité de population élevées. Et de l'autre côté indirects, suite à la sécrétion du miellat par l'insecte et au développement d'un complexe de champignon appelé « fumagine » qui, en

Couvrant les feuilles d'une couche noirâtre entrave la photosynthèse et entraîne leurs chute. Le seuil d'intervention est de 03 à 05 larves par feuille et de 10 femelles par mètre linéaire de rameau.

### 9.3. Otiorhynque de l'Olivier (*Otiorhynchus cribricollis*)

Les adultes ont le corps massif, long de 7 à 8 mm, brun tirant sur le rougeâtre. Les élytres portent entre 2 stries longitudinales, une rangée de soies courtes et arquées. Le rostre est court. Les œufs sont lisse, ovoïde, de couleur crème (0,8 x 0,6 mm). Par contre les larves de couleur gris jaunâtre clair, arquée, elle atteint une longueur de 8 à 9 mm à son complet développement. La nymphe est jaunâtre clair, elle est enfermée dans une coque terreuse. Ce même auteur signale que la biologie montre qu'elle est inféodée à l'Olivier, mais très polyphages, l'adulte attaque couramment les Rosacées fruitières, les Agrumes, le Cotonnier et l'Artichaut. Les larves vivent aux dépens de racines de Luzerne et d'Armoise. Les adultes, dont l'apparition a lieu fin mai, ont une activité nocturne (*Artemisia*). Ils consomment les feuilles en y pratiquant des échancrures marginales caractéristiques. Le jour, ils se tiennent cachés dans le sol ou sous divers abris. Après l'accouplement la ponte commence, en Septembre, elle se poursuit pendant 3 mois environ. Les adultes disparaissent peu après. Les œufs sont pondus isolément et éclot au bout d'une quinzaine de jours. La larve vit dans le sol et passe par 10 stades avant de se nymphoser. La nymphose dure 1 mois environ, entre avril et mai. Le cycle de vie est composé d'une seule génération par an et l'hivernation se fait à l'état de larves qui poursuivent leur développement dans le sol. Les dégâts des larves sont insignifiants par rapport à ceux des adultes. Sur Olivier, les feuilles sont découpées d'encoches à leur périphérie. Lors de pullulations exceptionnelles, l'attaque peut se traduire par une défoliation totale.

#### 9.3.1. Symptômes et dégâts

Selon Pala *et al.*, (1997) les seuls dégâts sont ceux occasionnés par les adultes à la frondaison et notamment aux jeunes pousses des plantations jeunes. Sur arbres adultes, les dégâts passent généralement inaperçus.

## Chapitre 02: La tuberculose d'olivier

### 1. Historique de la maladie

La tuberculose de l'olivier est une maladie bactérienne signalée pour la première fois en 1908 par Smith l'a appelé *Bacterium savastanoi*, la bactérie qui provoque des tuberculoses sur plusieurs plantes appartenant à la famille des Oléacées. Cette espèce a ensuite été transférée par Stevens (1913) au genre *Pseudomonas* et nommée *Pseudomonas savastanoi*.

Young *et al.*, (1978) ont proposé une nouvelle nomenclature et la classification des bactéries pathogènes des plantes et ont introduit le concept de pathovar, et toutes les *Pseudomonas* fluorescentes oxidase négative à l'exception de *Pseudomonas viridiflava*; ont été considérées comme membres d'une seule espèce *Pseudomonas syringae*, qui avait un certain nombre de pathovars. Ainsi, *Pseudomonas savastanoi* est devenu *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Le pathovar est une subdivision infrasubspécifique qui n'est pas couverts par le Code international de la nomenclature de bactéries (Lapage *et al.*, 1975). Ainsi, le nom de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* ne figurait pas sur les listes approuvées de noms bactériens (Skerman 1989).

En 1982, Janse a proposé l'épithète *savastanoi* pour désigner une nouvelle sous-espèce de *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. Les trois pathovars suivants ont été reconnus dans cette sous-espèce: *Pseudomonas syringae* subsp. pv *savastanoi. Oleae*, qui provoque des galles parenchymateuses sur les membres de divers genres des *Oleaceae*; *Pseudomonas syringae* subsp. pv *savastanoi. nerii*, qui provoque des galles parenchymateuses ou excroissances verruqueuses sur *Nurium oleander* L. et des membres de divers genres d'*Oleaceae*; et *Pseudoonas syringae* subsp. *savastanoi. pv. Fraxini*, qui provoque des excroissances verruqueuses sur *Fraxinus excelsior* et *Olea europea*. Bien que Janse n'a pas spécifiquement décrit le taxon, sa proposition en fait crée *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* (Lapage 1975 in Gardan *et al.* 1992 ).

Plusieurs auteurs ont décrit les caractéristiques physiologiques, nutritionnelles et biochimiques de *P. syringae* subsp. *savastanoi* souches isolées à partir de différents hôtes et ont comparés ces organismes avec des pathovars de *P. syringae* subsp. *Syringae* (Janse *et al.*, 1981).

Dans une étude de taxonomie numérique, 34 souches de *P. syringae* subsp. *savastanoi* constituait un phénomène qui a été étroitement liée à *P. syringae* pv. *glycinea* et *P. syringae*

pv.*phaseolicola* (Sannds *et al.*,1970). Auparavant, les données d'hybridation ADN-ADN ont montré que *P. syringae* est une espèce hétérogène (Pecnold *et al.*, 1973).

## 2. Classification de *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*:

Le statut taxonomique de l'agent causale a été pas male de fois discuté par les auteurs qui ont travaillé sur cette maladie:

Domaine: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Classe: *Gammaproteobacteria*

Ordre: *Pseudomonadales*

Famille: *Pseudomonadaceae*

Genre: *Pseudomonas*

Espèce: *Pseudomonas savastanoi* pathovar *savastanoi* ( Gardan *et al.*, 1992 ).

D'après Janse (1982), il existe les pathovars suivants:

*P. s. pv. fraxini*

*P. s. pv. nerii*

*P. s. pv. oleae*

*P. s. pv. phaseolicola*

*P. s. pv. Savastanoi*

## 3. Répartition géographique de la tuberculose d'olivier

La tuberculose d'olivier a été signalée dans beaucoup de pays à travers le monde à savoir: Algérie, Argentine, Australie, Brésil, Chypre, Colombie, France, Iran , Libye, Mexique, Maroc, New-Zélande, IraK, Palestine, le Pérou, la Pologne, l'Afrique du sud, l'Espagne, Switserland, Tanzanie, Tunisie, Turquie, Royaume-Uni, États-Unis, ex-URSS, ancien Yugoslavia (Janse 1982).

## 4. Processus d'infection

*Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*, provoque la formation de la croissance hyperplasique sur les oliviers, produisant galles sphériques sur le tronc et les branches, et moins fréquemment sur les feuilles et les fruits (Sisto et Iacobellis, 1999; Smith, 1920), infections Psv dans les plaies fraîches d'oliviers qui commencent par la formation d'une petite cavité provoquée par l'effondrement des cellules végétales adjacentes et sont plus fréquentes sur les troncs et les branches, et rares sur les feuilles et les fruits. Par la suite, une prolifération de tissus suivant la périphérie de la cavité obtenue dans le développement de galles (Smith, 1920; Surico, 1977)

Le développement de la tumeur est dépendante de la production bactérienne de phytohormones acide indole et cytokinines (Comai & Kosuge, 1980; Iacobellis et al, 1994; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008; Smidt et Kosuge, 1978; Surico *et al.*, 1985). Outre, les résultats récents ont révélé que les souches Psv contiennent deux copies de tous les gènes impliqués dans la synthèse de l'acide indole (Matas *et al.*, 2009; Pérez-Martínez *et al.*, 2008). Il a été rapporté que des galles d'olive sont également tributaires de la HRP / gènes hrc (Sisto *et al.*, 2004), qui code la biosynthèse d'un type fonctionnel III Système de Sécrétion (TTSS). Récemment, des progrès remarquables ont été accomplis dans la recherche sur plusieurs aspects de l'interaction hôte-pathogène de la galle d'olivier (Pérez-Martínez *et al.*, 2008; Matas, 2010; Pérez-Martínez *et al.*, 2010). Plusieurs facteurs de virulence putatifs VVP ont été identifiés, y compris les effecteurs de protéine TTSS et une variété de gènes codant pour connu *P. syringae* déterminants de la virulence (Pérez-Martínez *et al.*, 2008). Les analyses des effecteurs TTSS protéiques de Psv ont récemment mis en évidence le rôle de TTSS dans la pathogénicité et la gamme d'hôtes (Matas, 2010; Pérez-Martínez *et al.*, 2010).

Les protéines du TTSS sont codées par un ensemble de gènes, les gènes hrp ("hypersensitive response and pathogenicity") et hrc ("hrp conserved"), qui sont organisés en groupements de gènes (généralement 20-40 kb) dans le génome de la plupart des bactéries pathogènes (Salmond, 1994). Les protéines Hrc sont les protéines qui forment le corps basal du T3SS et sont très conservées.

Le corps basal se prolonge par un pilus extracellulaire creux reliant la bactérie et la cellule hôte, appelé pilus Hrp. Il est composé d'une protéine, la piline, comme HrpA chez *P. syringae* (Guttman *et al.*, 2006), et il peut atteindre plusieurs  $\mu\text{m}$  de long chez les bactéries phytopathogènes leur permettant de traverser la paroi végétale et d'atteindre la membrane plasmique. Le pilus Hrp est terminé par un translocon formant un pore dans la membrane plasmique végétale permettant le passage des effecteurs de type III du pilus vers le cytosol de la cellule eucaryote (figure 02).

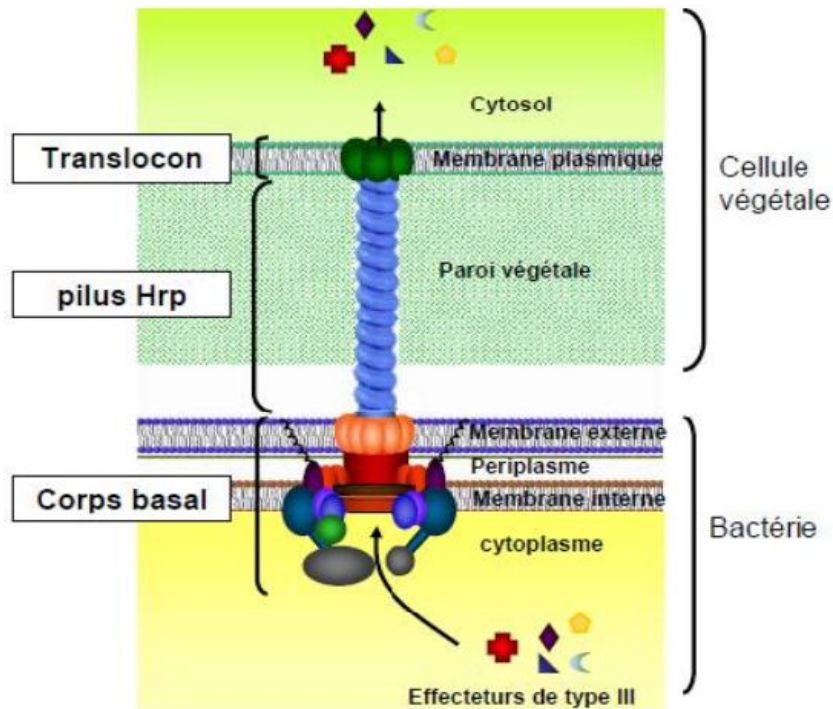


Fig 02. Représentation schématique du système Hrp (Boulanger, 2009).

## 5. Symptômes

Elle se manifeste par des tumeurs parenchymateuses à forme irrégulière de couleur verte au début de surface lisses. La tuberculose d'olivier manifeste comme galls bruts ou gonflements d'environ 0.5 à 02 cm de diamètre sur rameaux, branches troncs principal, racines, feuilles abimées, tiges fruits et jeunes pousses. Après quelques mois, les galls acquièrent un aspect spongieux et irrégulier, devenant durs et bruns sur les petites pousses. Ces galls apparaissent isolément ou rapprochées sur toute les parties de la plante. Les galls peuvent endommager la structure de la tige et déformer l'échafaud de l'arbre si l'infection est sévère durant le premier stade du développement des arbres (Phillipe *et al.*, 2007).



**Fig 03.** Symptômes typiques de la tuberculose d'olivier causés par *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*, sur les rameaux (en haut à gauche), la feuille (en haut à droite), les branches (en bas à gauche) et les fruits (en bas à droite) (Pérez-Martínez *et al.*, 2008).

## 6. Epidémiologie et cycle de maladie

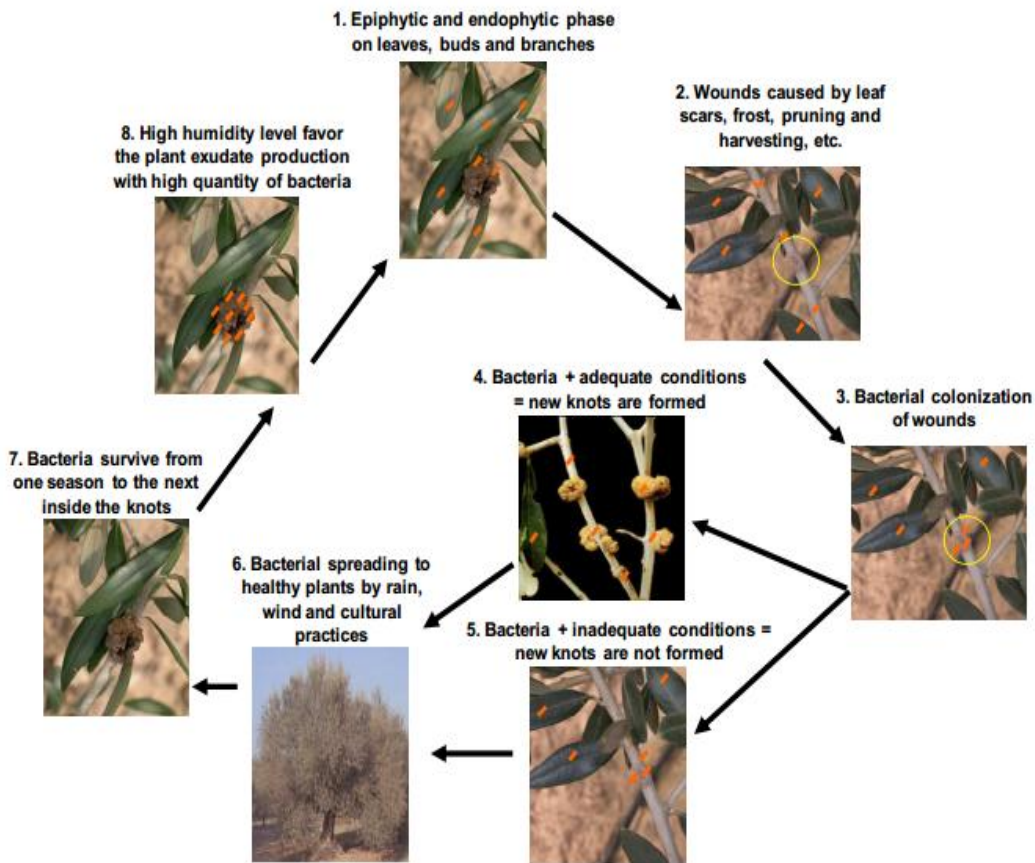
La maladie causée par les populations *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* a un cycle de type épiphytes-pathogène. Les bactéries ont une phase épiphyte dans laquelle ils se multiplient à la surface de l'olivier (tiges et feuilles) sans symptômes en développement (Ercolani, 1978, 1991; Varvaro et Ferrulli, 1983). Fait intéressant, des populations *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* ont été récupérés à partir de pousses asymptomatiques des arbres témoins non inoculés avant l'apparition des symptômes, ce qui suggère que ces bactéries ont été les épiphytiques source potentielle d'inoculum pour l'infection des plantes saines (Quesada *et al.*, 2010a).

La gamme de température dans laquelle *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* peut déclencher l'infection se situe entre 5 et 37 ° C ce qui permet aux bactéries de causer des infections tout au long de l'année. Cependant, l'optimum de température pour le développement de la maladie se situe entre 22 et 25 ° C et les périodes subséquentes avec une forte probabilité d'infection sont l'automne et le printemps (Protta, 1995).

*Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*, peut infecter les oliviers à tout moment de l'année et la formation des galles se fait quand les conditions sont favorables. Ainsi, lorsque les bactéries infectent un olivier à l'automne, les galles vont commencer à se développer plusieurs mois plus tard, mais si l'infection se produit au cours du printemps, le temps nécessaire pour la formation de galles peut se faire seulement en deux semaines (Wilson, 1935). Des essais de terrain effectués en Californie ont montré que les inoculations *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* d'oliviers réalisées en avril ont causé des niveaux plus élevés de maladies de galles d'olive que les inoculations Psv effectuées en décembre (Teviotdale et Krueger, 2004).

La diffusion des bactéries *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* de plantes infectées (ou inoculées) aux plantes non-infectées (ou non inoculés) a été suggéré (Quesada et al., 2010a). Les bactéries peuvent se propager sur de longues distances en raison de l'introduction et la plantation de matériel infecté, ou sur de courtes distances transportées par les éclaboussures de pluie, aérosols chablis, insectes et pratiques culturelles (Wilson, 1935). Actuellement, la diffusion bactérienne est facilitée par les pratiques culturelles, de nouvelles plantations avec la densité élevée des arbres, une taille sévère fréquente et avec peu de distance entre les plantes. Plaies causées par la récolte et la taille, ainsi que par la grêle, le gel et les feuilles cicatrices, créer des niches où l'infection se produit (Wilson, 1935; Janse, 1982) et olivier infection par *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* est directement liée au degré de blessure des arbres (Smith et al., 1991).

Dans un essai, pour évaluer la diffusion naturelle des bactéries sur les jeunes plants, les galles ne sont pas observés dans les arbres inoculés et non inoculés jusqu'à 3 et 10 mois respectivement après inoculation. (Quesada et al., 2010). Le *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* d'olivier interaction compatible facilite l'invasion, l'infection et la multiplication, l'hypertrophie et l'hyperplasie de déclenchement de la formation de galles. Les bactéries peuvent survivre à l'intérieur des galles d'une saison à l'autre et lorsque l'humidité est suffisamment élevée, des exsudats contenant de grandes quantités de bactéries sont émises dans lesquelles elles peuvent survivre comme épiphytes (Wilson, 1935). Cependant, les bactéries ne peuvent survivre dans le sol pendant quelques jours (Wilson et Ogawa, 1979). Le cycle de la maladie est résumé à la figure 04.



**Fig 04.** Cycle de la maladie de la tuberculose d'olivier causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ( Bertolini, 2003).

## 7. les facteurs qui modules l'identification de l'agent pathogène de la tuberculose d'olivier:

### 7.1. Variabilité de l'agent pathogène

Il existe une grande variation dans la réponse des plantes à différents isolats de l'agent pathogène. Certaines bactéries peuvent ne produire presque aucune réaction chez les plantes inoculées, tandis que d'autres produisent rapidement des Galles sur les sites de l'inoculation. Jusqu'à présent, il n'y a aucune preuve que les différents niveaux d'agressivité sont trouvés dans les cultures provenant de différentes régions. Des variations considérables dans la sévérité de la maladie peuvent se produire entre les localités (Osman *et al.*, 1980).

### 7.2. Influence du climat

Des températures élevées et fortes précipitations augmentent l'effet des agents pathogènes. En général, les galles d'Olivier semblent être plus sévères au printemps et en automne (Krueger *et al.*, 1999; Surico 1977). Cela peut être dû à l'influence du climat, mais il peut aussi être lié à l'état physiologique des arbres. (Young, 2004).

### 7.3. Influence de la gestion des cultures

La pratique horticole moderne sert à encourager le développement rapide de la plante afin de mettre des arbres en production précoce et d'offrir des rendements élevés. Les régimes élevés d'engrais d'azote sont particulièrement susceptibles de favoriser le développement de la maladie

bactérienne (Baratta et Di Marco, 1981 ; Young, 1987). Sur la base d'observations en Sicile, (ceci peut être corrigé et recommandé pour l'hémisphère Sud), l'application d'engrais se référera en juillet-août à 1400 – 1500 kg/ha. Blocs d'olive doivent être irrigués, une fois avant décembre et encore ~ 30 jours avant la récolte, pour un total de 1000 – 1200 m<sup>3</sup>/ha. Effectuer des applications légères de nitrates d'action rapide à 200 – 250 g N/plante pendant l'irrigation avant la récolte (Baratta et Di Marco, 1981).

#### **7.4. Impact économique**

Il n'y a pas de données quantitatives sur l'impact de la maladie sur le rendement des cultures ou de la qualité des cultures (Iacobellis 2001), mais des recherches ont signalé en Italie et en Espagne que la maladie "réduit la productivité" (Teviotdale, 1994). L'observation directe du développement de la maladie sur plusieurs saisons sera nécessaire pour déterminer l'impact de l'agent pathogène.

Des pertes peuvent être causées directement par des infections localisées qui inhibent la floraison et affectent le goût et le développement du fruit et indirectement en affaiblissant les branches immatures principal dirigeant entraînant des dommages ultérieurs à la structure de l'arbre. En raison des différents climats, sols et conditions topographiques où les olives sont cultivées, l'étendue des dégâts en New-Zélande est susceptible d'être très variable, d'une saison à l'autre et d'une région à l'autre.

### **8. Méthodes de lutte**

#### **8.1. Assainissement et précautions culturelles**

Dans les pays et les régions où la galle ne se produit pas, de nouvelles plantations d'oliviers devraient être établies à l'aide de pépinière indemne de sources exemptes de micro-organismes pathogènes. Par mesure de précaution, jusqu'à ce que la spécificité de l'hôte d'oliviers et de lauriers roses est entièrement comprise, l'enlèvement des buissons de lauriers roses à proximité (moins de 500 m) considérée comme une mesure pour éliminer les sources possibles de pathogènes qui constituent une menace pour la nouvelle plantation.

La pépinière est une pratique recommandée Il s'agit de maintenir les pulvérisations de cuivre sur les plantes de pépinières. Oxychlorure de bouillie bordelaise (1 kg de sulfate de cuivre, 2 kg de limon, et 100 litres d'eau), cuivre (200 à 300 g/hl; a.i. 50 %), ou hydroxyde de cuivre (200 à 300 g/hl; a.i. 40 %) peut être appliquée. De prudence initiale jusqu'à l'application, ne pas de blesser les feuilles dans des conditions locales.

Une réduction des infections causées par la pratique de la récolte par les battements des rameaux d'Olivier avec des bâtons (Panagopoulos, 1993) peut être effectuée à l'aide de bâtonnets enveloppés avec chiffon trempé dans une solution de cuivre (par ex. Kocide) à intervalles fréquents, surtout lors du déplacement entre les arbres.

Les pratiques de contrôle les plus importantes sont ceux qui sont concernés avec l'élagage. Comme nous l'avons déjà dit, l'agent pathogène ne peut être éradiqué des arbres ou des vergers,

mais réfléchir élagage peut minimiser ses effets les plus graves. Attention au développement des arbres dans les premières années vous propose la meilleure approche pour gérer les dégâts de la maladie. L'élagage annuel doit être effectué en août afin d'éviter la période de sensibilité de printemps au plus tard.

L'objectif pour l'élagage des arbres jeunes est de laisser les branches non malades pour former l'échafaud de l'arbre adulte. L'évaluation individuelle devrait constituer un guide pour l'élimination des branches affaiblis spécifiques. Pour les arbres jeunes infecté, il n'est pas nécessaire d'enlever sauf si elles sont infectées tellement au sérieux qu'ils présentent peu d'espoir de former un arbre sain. L'élagage avant que la pluie attendue devrait être évitée

La forme des couronnes de très vieux arbres endommagés par la grêle et par la suite gravement infectées par la galle bactérienne peut être transformée du l'ancien cône tronqué inversé conique à la base, pour ériger des cônes tronqués coniques de la base. Des effets positifs sur la santé des arbres, la croissance et la productivité ont été rapportés (Ruffaldi, 1972).

## **8.2. Lutte chimique**

On a signalé plusieurs des essais de l'efficacité de pulvérisation par des composés de cuivre (par exemple l'hydroxyde de cuivre). Ce ne sont pas toujours réussies, et l'avantage économique est très douteux (Sisto et Iacobellis, 1999). Pour être efficace, les pulvérisations doivent être appliquées pour maintenir la couverture bactéricide continue sur une partie importante de l'année, tout en évitant les dommages causés par les niveaux phytotoxiques de pulvérisation de cuivre. C'est difficile et pas forcément rentable.

## **8.3. Utilisation des cultivars de résistants**

Sisto et Iacobellis (1999) notent l'importance d'identifier les cultivars résistants d'Oliver afin d'améliorer la quantité et la qualité du fruit et en huile. Aucuns cultivars d'oliviers ne sont connus et qui sont complètement résistant aux galles d'oliviers. Il y a eu peu d'études quantitatives de la résistance à l'étranger. Au Maroc, proche Gordale est considéré comme résistant, Picholine Marocaine présentait certains symptômes, tandis que Meslala était censé être sensible (Benjama *et al.*, 1987).

## 9. Autres bactéries associées à *Pseudomonas savastanoi* dans les tumeurs de la tuberculose d'olivier

### 9.1. Historique

La bactérie phytopathogène *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* est un résident commun de la phyllosphère d'olivier (Ercolani, 1971). Cette bactérie a la capacité de passer d'un mode de vie épiphyte au sens large à un mode de vie parasitaire chaque fois que les plaies de nature diverse permettent à la bactérie d'envahir le tissu de l'hôte (Ciccarone, 1950). Le résultat macroscopique est la formation des tumeurs. Dans le processus de différenciation des galles, un rôle fondamental est joué par un certain nombre de virulence des facteurs produits par la bactérie, y compris indole3-acétique (IAA) (Comai et Kosuge, 1982), divers cytokinines (Surico *et al.*, 1975, 1985), et les gènes *hrp* (Sisto *et al.*, 2004). Au cours d'une enquête sur les oliveraies dans le centre de l'Italie (Toscane, Ligurie et Ombrie) en 2002 et 2003, en surveillant la propagation d'une population *Ps. savastanoi* levain positif (Marchi *et al.*, 2005), des colonies jaunes ont été isolées à la fois à partir des feuilles et des échantillons de galles sur le milieu (NSA) (Varvaro et Surico, 1978).

Cette bactérie était parfois présente dans les tumeurs à des concentrations qui ont rendu difficile l'isolement de *Pseudomonas savastanoi*. Une bactérie similaire a également été trouvée avec *Pseudomonas savastanoi* dans les galles d'olivier et de *Nerium oleander* par Savastano (1886) et Peglion (1905). Ces deux chercheurs ont apparemment confondu le véritable agent causal avec ces colonies jaunes. L'erreur a été signalé par Petri (1907), qui, sur la base de la description, donnée par Savastano a pu identifier ces isolats (colonies jaunes) comme étant: *Ascobacterium luteum* [Bactérie (*Erwinia*) *herbicola*, maintenant *Pantoea agglomerans* (Gavini *et al.*, 1989)]. Petri a signalé qu'une description correcte de l'agent causale de la galle d'olivier (*Ps. savastanoi*) avait été faite par Smith et Rorer aux Etats-Unis en 1904. *Pantoea agglomerans* a souvent été rapportée comme étant une bactérie présentes dans les galles d'olivier et de laurier rose (Surico et Lavermicocca, 1989; Azad et Cooksey, 1995; Fernandes et Marcelo, 2002). La bactérie est considérée comme un épiphyte et est très commune sur les parties aériennes des plantes (Starr et Chatterjee, 1972), y compris les lésions de la maladie (Gibbins, 1978).

Trois pathovars de *P. agglomerans* ont été décrites; pv. *gypsophilae* (Brown, 1932), pv. *betae* (Burr *et al.*, 1991) et pv. *milletiae* (Opgenorth *et al.* 1994), toutes ces pathovars provoquent des maladies caractérisées par des galles similaires aux galles causés par *Ps. savastanoi*. galles

soupçonnés d'être causées par des souches de *P. agglomerans* (*E. herbicola*) ont également été rapportés sur *Pseudotsuga menziesii* (DeYoung *et al.*, 1998) et *Vaccinium macrocarpa* (Vasanthakumar et McManus, 2004)

Des études récentes ont montré que les tumeurs (galles) causés sur olivieru par cette bactérie contiennent une communauté bactérienne multispécifique et que les espèces bactériennes collaborent avec l'agent pathogène dans l'augmentation de la gravité de la maladie (Hosni *et al.* , 2011 ; Passos da Silva *et al.*, 2014 ). Le séquençage récent du génome des Psv isolées en France ( Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010; Bardaji *et al.*, 2011) ou en Italie (Moretti *et al.*, de 2014c). Ainsi que le séquençage du génome de trois espèces non-pathogènes) espèces bactériennes fréquemment associées à l'agent causale de la tuberculose d'olivier, à savoir *Pantoea agglomerans* (Moretti *et al.*, 2014d ), *Erwinia toletana* (Passos da Silva *et al.*, 2013 ), et *Erwinia oleae* (Moretti *et al.*, 2014b ), ont mis en lumière les interactions interspécifiques possibles rendant ce créneau un modèle pour étudier la mise en place d'une communauté multispécifique dans une pathologie végétale.

Une approche metagénomique indépendante de la culture, réalisée dans des échantillons des galles provenant de différentes régions italiennes et basées sur l'amplification et le séquençage de l'ARNr 16S régions hypervariables, a révélé que la classe Gammaproteobacteria était la plus représentée, qui représente jusqu'à 90% du population bactérienne totale, avec des commandes *Pseudomonas* les plus fréquemment trouvés (principalement Psv qui a été estimé à représenter environ 50% de la charge bactérienne totale dans le galle) et *Enterobacteriales* (Passos da Silva *et al.*, 2014 ). Dans l'ordre des *Enterobacteriales*, les bactéries les plus abondantes appartiennent aux genres de *Pantoea* ( Passos da Silva *et al.*, 2014 ).

## II. Matériel et méthodes

### 1. Matériel végétal

L'objectif de notre travail est une contribution à l'identification de l'agent pathogène de la tuberculose d'olivier dans la région d'Ain El Ibel qui se situe à 45 Km de la willaya de Djelfa. Nous avons réalisé dans une première étape des prospections sur terrain à fin de déterminer le taux d'infection par la maladie et dans une deuxième étape isolement et identification de l'agent pathogène et en dernier vérification de son éventuel pouvoir pathogène.

#### 1.1. Prospection sur terrain

Les prospections ont porté sur deux oliveraies en 2016, au niveau de la première oliverie aucun symptôme n'a été observé par contre dans la deuxième oliveraie qui se situe à 10 Km de la première des symptômes semblables à celles de la tuberculose d'olivier ont été observés. Les arbres d'olivier de cette oliverie sont âgés de huit ans et c'est la première culture dans son précédent cultural. Cette oliveraie fait partie d'une exploitation agricole plantée également d'arbres d'abricotier et de quelques cultures maraichères. Concernant les traitements phytosanitaires aucun produit n'a été utilisé dans cette oliverie. Pour calculer le le taux d'infection nous avons utilisé la formule suivante :

$$\text{Taux d'infection \%} = \frac{\text{Nombre d'arbres infectés}}{\text{Nombre totale des arbres prospectés}} \times 100$$

#### 1.2. Prélèvement des échantillons

Le matériel végétal utilisé dans la présente étude provient de la deuxième oliveraie, Un échantillonnage subjectif a été réalisé en 2016. De jeunes rameaux portant des tumeurs caractéristiques à la tuberculose d'olivier ont été prélevés à partir des arbres d'olivier de la variété Chemlal. Ces échantillons ont été placés dans des sacs en plastique stériles et transportés

directement au laboratoire et conservés au réfrigérateur à une température de 4°C jusqu'à leur ultérieure utilisation.

## 2. Méthode d'isolement

L'isolement de l'agent pathogène a été effectué par la méthode suspension dilution. Des tumeurs ayant un poids de un gramme ont subi une désinfection à l'hypochlorite de sodium à une concentration de (1%), puis trois rinçages successifs avec l'eau distillée stérile. Chaque tumeur est découpée puis écrasée dans un mortier contenant 9 ml d'eau distillé stérile à fin de préparer la suspension mère.

Après l'agitation au vortex, nous avons préparé une série de dilutions de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-5}$ . Par la suite, nous avons étalé 0,1ml de chaque dilution sur les deux milieux: - King B et LPGA en boites de pétri avec 3 répétitions pour chaque dilution, l'incubation a été effectuée pendant 5 jours à une température de 27 °C dans l'étuve.

## 3. Dénombrement des colonies

Après 72 h d'incubation, à l'aide de l'appareil compteur de colonies, nous avons effectué le comptage des colonies sur les deux milieux (King B et LPGA).

Le dénombrement consiste à compter les colonies ayant les caractéristiques de *Pseudomonas savastanoi* sur les boites du milieu King B et sur les boites du milieu LPGA toutes les colonies sont comptées. Le comptage se fait macroscopiquement et seules les boites ayant 30 à 300 colonies sont retenues (Klement *et al.*, 1990).

Pour le calcul de la CFU; nous avons utilisé la formule suivante (Klement *et al.*, 1990)

$$\text{Taux des bactéries} = N \times 10^x \times 10 \text{ (ufc/ml)}$$

N: La moyenne du nombre des colonies bactériennes comptées par boite de la même dilution.

X: Facteur de dilution.

#### **4. Sélection et purification**

Le choix des colonies est basé sur les critères morphologiques reconnus chez les *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*. Il s'agit de la fluorescence sur King B, de l'aspect et du contour des colonies, de petite taille, rondes brillantes et lisse (Schaad *et al.*, 2001).

Les colonies sélectionnées ont été repiquées en stries sur le milieu King B, dans le but d'avoir des colonies individualisées. Le repiquage successif est répété jusqu'à l'obtention de colonies pures.

#### **5. Conservation des isolats**

Les colonies pures sont ensemencées dans des tubes de gélose king B inclinés et sont ensuite incubés à 27°C et conservés puis placés au réfrigérateur à +4°C.

#### **6. Identification et caractérisation des isolats**

##### **6.1. Détermination du genre bactérien des isolats**

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.

L'identification préliminaire de nos isolats est basée sur les caractéristiques morphologiques et physicochimiques. Dans une première étape nous avons adopté le schéma proposé par Schaad *et al.* (2001) et ce, pour la détermination du genre bactérien au quel sont affiliés nos isolats (Figure 6). Pour cela, nous avons procédé d'abord à la coloration de Gram, test KOH, puis au test de croissance en anaérobiose et en fin test de fluorescence sur king B.

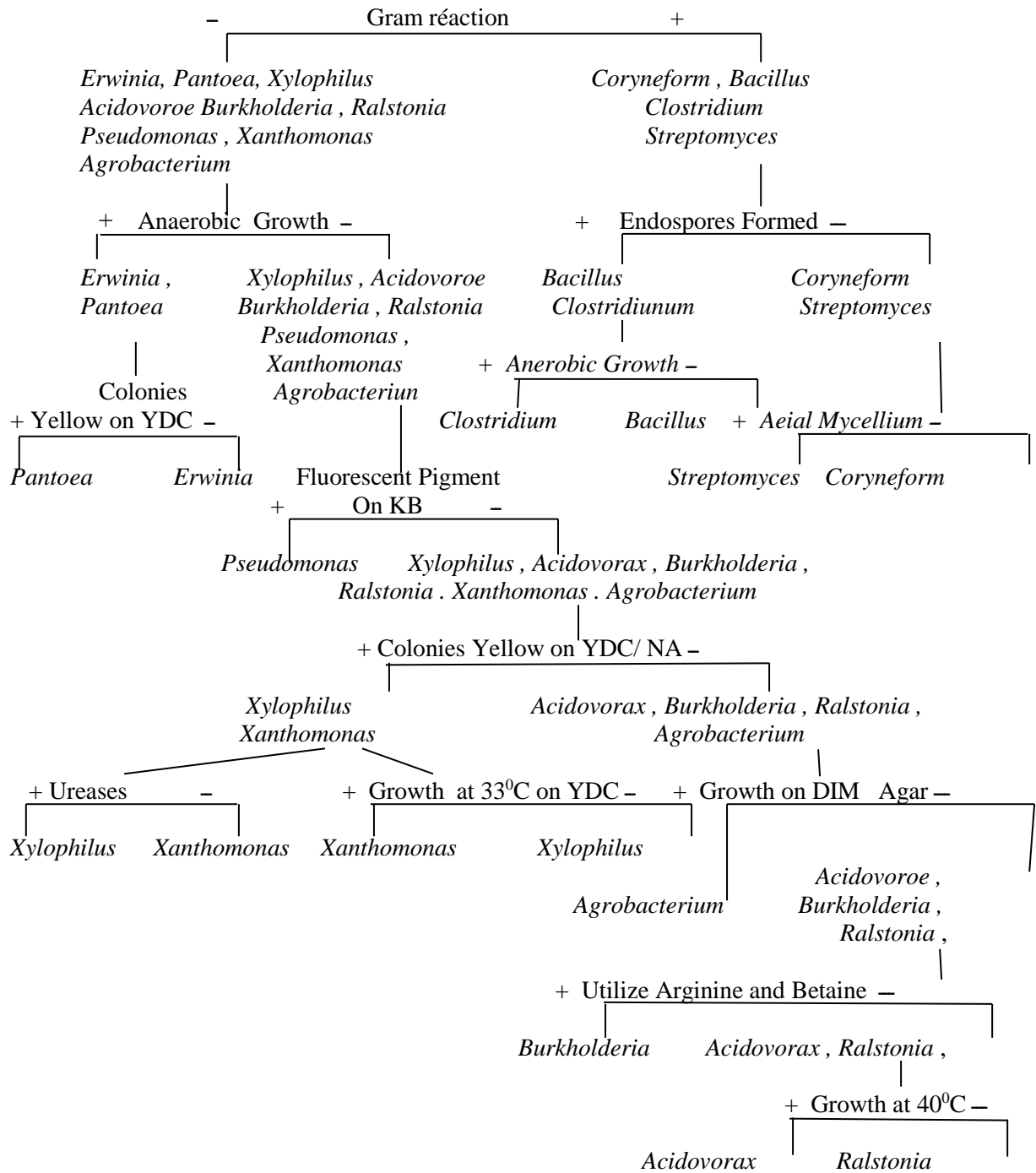


Fig 06. Schéma de détermination des différents genres bactériennes proposé par Schaad (2001).

## **6.2. Test de Gram**

### **6.2.1. Coloration de Gram**

C'est une double coloration qui met en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Elle classe les microorganismes en deux groupes, soit des Gram+, soit des Gram – possédant une structure plus complexe grâce à leur richesse en lipide (20%) et une concentration beaucoup plus inférieure en peptidoglycane que les Gram+ (Singleton, 1990)

Elle se base sur la fixation d'un premier colorant, le Violet de Gentiane, par le Lugol suivie d'une décoloration par l'alcool. Certaines bactéries résistent à cette décoloration, indiquant le groupe des Gram+. Par contre, d'autres bactéries nécessitent une deuxième coloration par la Fushine, c'est le groupe qui renferme les bactéries à Gram- (Singleton, 1990).

Pour la préparation du frottis, nous avons prélevé et étalé une couche mince de la culture bactérienne pure sur une lame contenant une goutte d'eau distillée stérile

ensuite, nous avons ajouté le Violet de Gentiane que nous l'avons laissé agir une minute, puis nous avons rincé à l'eau distillée stérile. Après nous avons versé sur la lame quelques gouttes de Lugol, et laissé agir une minute, après un rinçage nous avons incliné la lame et – jusqu'à l'apparition un fil clair. Pour arrêter l'opération, un lavage abondant à l'eau distillée stérile est effectué, une recoloration par la Fushine est réalisée pendant 30 secondes, à la fin nous avons rincé par l'eau distillée stérile. La lame est ensuite séchée à l'air libre.

L'observation sous microscope optique au grossissement ( $G \times 40$ ), permet la distinction des bactéries à Gram+ ayant la couleur violette par rapport à celles de Gram- présentant la couleur rose.

### **6.2.3 Test de KOH**

Le test de KOH est un test de confirmation de la coloration de Gram, Le test KOH est un test rapide qui a été réalisé pour déterminer le type de Gram des bactéries, Gram positif ou Gram négatif.

Pour effectuer ce test, deux gouttes d'hydroxyde de potassium (KOH) à 3 % ont été mises en contact avec la crème bactérienne de chaque isolat, sur une lame en effectuant un mouvement circulaire par une anse de platine.

Après 30 seconde, si la solution KOH présence un fil visqueuse, c'est une réaction positive, et la bactérie est un gram négatifs. Si la solution ne présence pas un fil c'est une réaction négatifs et la bactérie est à gram positifs.

#### **6.4. Production de pigment fluorescent sur milieu King B:**

Ce test permet la mise en évidence de la pyoverdine des *Pseudomonas* du groupe fluorescent (Lelliott et al, 1966). La méthode consiste à ensemencer les souches à tester à l'aide d'une anse à inoculer stérile dans une boîte de Pétri contenant le milieu King B. les boîtes sont incubées à 27°C pendant 72h (Maury, 1987). Après incubation, la boîte est passée sous une lampe de wood émettant une lumière ultraviolette (UV). La production du pigment fluorescent bleu ou vert se fait en comparaison avec une boîte non ensemencée (Guiraud, 1998).

#### **6.5. Le test de Hugh et Leifson (HL)**

Le milieu de Hugh et Leifson permet de déterminer la voie métabolique, oxydative ou fermentative empruntée par la bactérie étudiée (Schaad *et al.*, 2001).

Le milieu de Hugh et Leifson contient un indicateur de pH, le bleu de bromothymol, qui prend une couleur jaune en milieu acide.

Nous avons ensemencé l'isolat à testé par pique centrale à l'aide du fil de l'anse de platine dans un tube d'essai contenant un milieu à faible teneur en peptone et à forte concentration en glucose, puis nous avons ajouté environ 2 ml d'huile de paraffine stérile pour créer les conditions anaérobiques. Les tubes sont ensuite mises en incubation à une température de 27°C, pendant 24 à 48 h. Suit à l'incubation, pour les bactéries inactives ou inertes le milieu ne change pas la couleur vert, ce qui correspond à une réaction négative et dans le cas d'une réaction positive une couleur jaune est obtenue.

#### **6.6. Test LOPAT**

Les tests biochimiques appelés LOPAT (production de levane, présence d'oxydase, dégradation de pectine, présence de l'arginine déshydrolyase et hypersensibilité sur feuilles de tabac ont été réalisés selon les techniques décrites par (Lelliott *et al.*, 1966). Les tests de LOPAT permettent de déterminer les caractères métaboliques des *Pseudomonas savastanoi* et permettent de distinguer au sein du groupe, les espèces non pathogènes et espèces phytopathogènes (Semal, 1990).

### 6.6.1. Test levane sucrose

Le test levane permet de vérifier la capacité de la bactérie à polymériser le fructose en polyfructose, tout en sachant qu'elle peut décomposer le saccharose en fructose (Larpen et Gourgaud, 1997).

Chaque boîte de Pétri contenant le milieu levane est divisée en deux secteurs pour tester deux isolats bactériens au même temps. Avec l'anse de platine, nous avons ensemencé une colonie jeune de l'isolat par des stries, nous avons laissé les boîtes en incubation à 27 °C pendant 24 à 78 h.

La réaction positif se manifeste par le développement d'une culture abondante, dont les colonies ont un aspect bombé (mucoïdes), blanchâtres, convexes et brillantes indique la présence de levane sucrase, et par strie partiellement saillante et luisante, présence d'une zone opaque et luisante en marge de la strie (Lelliot et sead. 1987 : Hildebrand, 1988). La réaction négative se manifeste par stries prostrées et non luisantes.

### 6.6.2. Test oxydase

Le principe de ce test est mettre en évidence la présence du cytochrome oxydase qui rentre dans la composition d'une chaîne respiratoire (Marchal et Bourdon., 1982).

Sur une boîte de pétri, nous avons placé un disque d'oxydase et à l'aide d'une pipette pasteur stérile, puis nous avons prélevé une colonie bactérienne à identifier et la écrasé sur ce disque.

La présence du cytochrome oxydase s'exprime par l'apparition d'une coloration violette durant 3 secondes à température 25 à 30 °C, cela indique une réponse positive. Une réaction tardive ou une absence de coloration indique une réaction négative. (Schaad *et al.*, 2001).

### 6.6.3. Test pectinase

Le test pectinase permet d'identifier l'activité pectinolytique d'une bactérie c'est-à-dire sa capacité à dégrader la pectine par isolat bactérien.

Après la désinfection des tubercules de pomme de terre par l'éthanol pure (95%) puis l'eau de javel 1%, suivie par trois rinçages successifs à l'eau distillée stérile, nous avons coupé en tranche de 7 mm de hauteur, chaque tranche est déposée dans un boîte de pétri stérile contenant un papier buvard stérile imbibé d'eau distillée stérile.

A l'aide d'un scalpel, nous avons réalisé un petit creux au centre de la tranche. La suspension bactérienne a été préparé à une concentration  $10^8$  cell /ml , et ajouté dans la crue puis en mettons en incubation à une température de 27 °C. L'observation a été faite après 10 à 15 jours.

La réaction positive s'exprime par présence de couleur marron sur la surface des tranches accompagnée d'une odeur, qui s'explique par la dégradation de la pectine. Pour la réaction négative aucun changement n'est observé sur la tranche de pomme de terre (Schaad *et al.*, 2001).

#### **6.6.4. Test arginine dihydrolase**

Ce test détermine si la bactérie est susceptible de dégrader l'arginine par l'enzyme arginine dihydrolase. (Sebald et Petit, 1997). Le principe se base sur l'acidification du milieu (couleur jaune), due à la fermentation du glucose par les bactéries, et virage de la coloration vers le jaune ou rose. Ceci indique l'utilisation de l'arginine.

Nous avons ensemencé les isolats que nous voulons étudier par piqure centrale, à l'aide un fil de l'anse de platine, la crème bactérienne jeune âgée de 48h dans un tube d'essai contenant le milieu arginine puis nous avons ajouté environ 1 cm d'huile de vaseline stérile (condition d'anaérobie). Nous les avons ensuite mises en incubation à la température de 27 °C pendant 5 jours. Dans le cas d'une réaction positive, le milieu devient rose et dans le cas contraire, il se maintient jaune.

#### **6.6.5. Le teste d'hypersensibilité sur feuille de tabac**

Le test d'hypersensibilité (HR) sur feuille de tabac met en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie suite au dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac (Klement, 1963).

Nous avons préparé la suspension bactérienne à partir d'une souche jeune âgée de 48h. A l'aide d'une seringue stérile de 1 ml, nous avons inoculé l'espace intracellulaire le long de la nervure centrale de la feuille de tabac. Les plantules de tabac inoculées ont été mises au laboratoire, à la température ambiante pendant 2 jours.

Dans le cas d'une réponse positive la zone foliaire inoculée par la bactérie devient légèrement translucide et un aspect humide ensuite, elle prend une coloration brune claire à beige. La réponse négative s'exprime par l'absence de changement dans la zone inoculée

### 6.7. Test de pathogénicité

Le test du pouvoir pathogène a été effectué sur de jeunes plantules d'olivier de la variété Chemlal; âgées d'une année. L'inoculation a été réalisée au niveau des tiges principales en introduisant 10 µl d'une suspension bactérienne ajusté à une concentration de ( $10^8$  UFC/ml) issue d'une culture âgée de quarante-huit heures au niveau d'une blessure réalisée à l'aide d'un scalpel stérile. L'incision est, ensuite, couverte par du papier aluminium stérile enlevé après une semaine. Les plantules d'oliviers sont, ensuite, placées dans la salle de culture à une température variant entre 25 et 30 °C. Et une plantule inoculé à l'eau distillée stérile a servi comme témoin (sans aucune infection). La lecture des résultats a été effectuée deux mois après la date d'inoculation.

### 6.8. Galerie API 20 NE

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram- non entrobactéries et non fastidieux (ex : *pseudomonas*, *Acintobacter*, *Flavobacterium*, *Morexella*, *Vibrio*,....etc). Combinant 8 tests conventionnels et 12 test d'assimilation. et une base de données.

La galerie API 20 NE comporte 20 micros cupules contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau et lecture. Et l'identification par un logiciel d'identification.

#### 6.8.1 Préparation de la galerie:

Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation sont réunis, ensuite environ 5 ml d'eau distillée stérile sont répartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. La référence de la souche est inscrite sur la languette latérale de la boîte.

### 6.8.2. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune (18-24 heures), une à quatre colonies d'aspect morphologique identique sont prélevées par touches successives puis mises en suspension dans une ampoule API contenant du NaCl 0,85 %. Une densité suffisante (0,5 de McFarland) est exigée.

### 6.8.3. Inoculation de la galerie

Les tubes des tests NO<sub>3</sub> à PNG sont remplis en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, qui empêcheraient le contact entre les bactéries à identifier et le réactif ou substrat à tester, la pointe de la pipette est posée sur le côté de la cupule tout en inclinant légèrement la boîte d'inoculation vers l'avant. Les tubes et cupules des tests | GLU | à | PAC | sont remplis en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe. Enfin, les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) sont remplies d'huile de paraffine en formant un ménisque convexe. A la fin la boîte d'incubation est fermée et incubée à 30° C pendant 24 heures.

## II. Identification des colonies jaunes

Pour déterminer le genre nous avons fait la détermination du genre bactérien par la coloration de Gram, test KOH, puis au test de Hugh et Leifson et le test d'oxidase.

### 1. Coloration de Gram

C'est une méthode de la classification des bactéries selon leur structure. Les résultats de ce test de coloration de gram varie selon plusieurs facteurs: structure et la perméabilité de paroi bactérienne, la différence de composition chimique (Schaad *et al.*, 2001).

Ce test a été réalisé de la même manière avec laquelle nous avons fait la coloration de gram dans la partie précédente.

### 2. Test de KOH

Le test KOH est un test plus rapide qui a été effectué, pour la confirmation de test de coloration de Gram, deux gouttes d'une solution (KOH) à 3 % sont mise en contact avec une crème bactérienne de chaque isolat que nous étudier sur une lame codée et en effectuant un mouvement circulaire. La solution KOH devient visqueuse c'est-à-dire la bactérie étudiée à gram négative. La réaction considérée positive en cas d'absence de la viscosité après 30s (Schaad *et al.*, 2001).

### 3. Le test de Hugh et Leifson (HL)

Le milieu de Hugh et leifson, contenant un indicateur de pH, permet de déterminer la voie métabolique empruntée par les différentes espèces bactériennes (la voie oxydative ou fermentaire) (Guiraud, 1998). Ce test a également été réalisé de la même manière avec la laquelle nous avons fait le test Hugh et Leifson dans la partie précédente.

### 4. Test YDC:

Le test d'YDC est utilisé pour la production de pigment jaune (Shaad *et al.*, 2001). Ce test consiste à ensemercer les isolats bactériens jeunes âgés de 24 à 48h par la méthode de stries sur des boîtes contenant le milieu YDC.

Après 24 h et 48h d'incubation, le développement de colonies jaunes sur le milieu YDC indique une réaction positive. Si les colonies qui se développent n'ont pas de couleur jaune la réaction est dite négative.

### 5. Teste oxydase

Le principe de ce test est mettre en évidence le cytochrome oxydase qui rentre dans la composition de l'une des chaînes respiratoires (Marchal et Bourdon., 1982). Nous avons réalisé ce test avec la méthode décrite par Schaad *et al.* (2001).

### 6. La galerie 20E

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

## I. Résultats

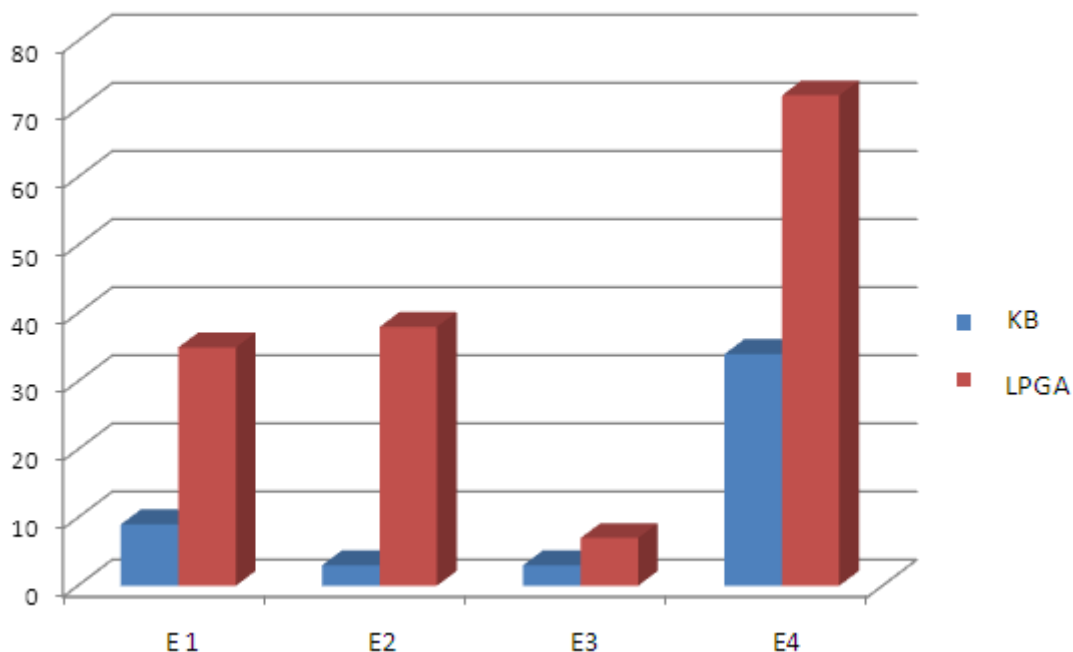
L'objectif de notre travail est une contribution à l'identification de l'agent pathogène de la tuberculose d'olivier. Les prospections ont été menées dans deux oliveries situées dans la région d'Ain El Ibel de la willaya de Djelfa. D'après ces prospections, dans la première oliverie aucun symptôme n'a été observés alors qu'au niveau de la deuxième un taux d'infection de 100% a été enregistré nous avons effectuées.

### 1. Isolement de l'agent causal

L'isolement de l'agent pathogène a été réalisé sur deux milieux de culture : milieu sélectif King B et milieu général LPGA, Après 3 jours d'incubation des colonies bactériennes, se sont développées sur ces deux milieux (LPGA et King B) de la dilution  $10^{-1}$  à la dilution  $10^5$ .

### 2. Dénombrement bactérien

Après l'isolement et l'incubation des boîtes de Pétri, nous avons fait le dénombrement des colonies bactériennes. Les résultats obtenus par ce dénombrement, montre une faible présence des "*Pseudomonas like bactéria*" par rapport à la flore totale. allant de 4% à 25%.

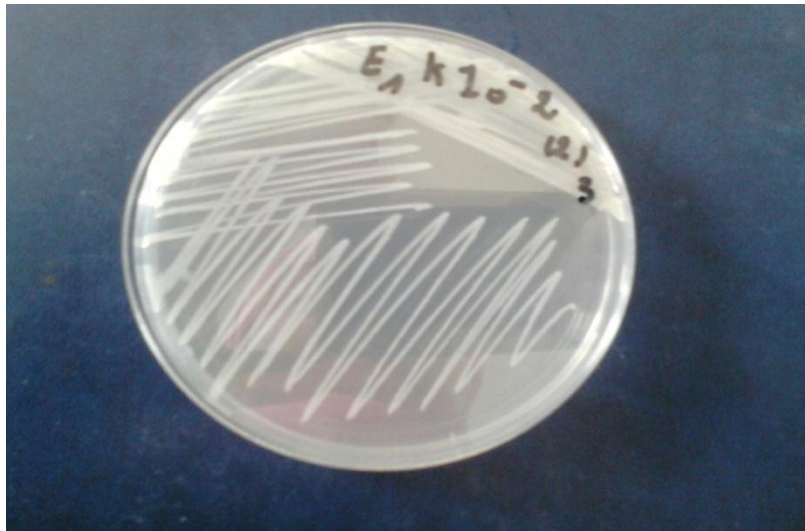


**Fig 07.** Le taux de *Pseudomonas like bactéria* par rapport la flore totale

## 2. Identification des isolats bactériens

Après 48 h, d'incubation nous avons remarqué l'apparition de différentes colonies bactériennes sur les deux milieux (King B et LPGA), la sélection des colonies est faite à l'œil nu.

Pour l'étape de la purification, douze isolats bactériens uniquement ont été retenus à partir des deux milieux de culture utilisés. Ces isolats sont choisis en se basant essentiellement sur la fluorescence des colonies et les caractères morphologiques (petite taille, circulaire, régulière, lisse et brillante). Pour obtenir des isolats purs nous avons répété la purification plusieurs fois jusqu'à l'apparition de colonies homogènes et isolées.

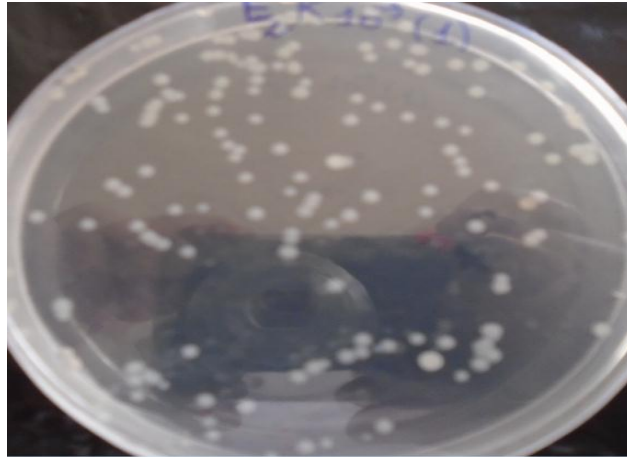


**Fig 08.** Résultat de purification des isolats

## 4. Caractéristiques morphologiques des *Pseudomonas Savastanoi*

### 4.1. Observation macroscopique

Les caractères morphologiques des colonies bactériennes de *Pseudomonas savastanoi* par l'œil basé sur la fluorescence sur le milieu King B, la taille des colonies, circulaire, régulière, lisse et brillante.



**Fig 09.** Les caractères morphologiques

**Tableau 01 .** L'aspect morphologique des isolats bacteriens issues de tumeurs d'olivier.

Les isolats	La forme	Le contour	L'aspect	Le couleur	Diamètre (mm)
<b>E 1.4</b>	Circulaire	Régulière	demibombé	Beige	4mm
<b>E 1.5</b>	Circulaire	Régulière	demibombé	Beige	3mm
<b>E1.7</b>	Circulaire	Régulière	demibombé	Beige	4mm
<b>E1.6</b>	Circulaire	Régulière	demibombé	Beige	3mm
<b>E1.3</b>	Circulaire	Régulière	demibombé	Beige	2mm
<b>E 1.8</b>	Circulaire	Régulière	demibombé	Beige	2mm
<b>E 1.1</b>	Circulaire	Régulière	demibombé	Beige	2mm
<b>E 1.2</b>	Circulaire	régulière	demi bombé	Beige	3mm
<b>E2.2</b>	Circulaire	régulière	demibombé	Beige	1.5mm
<b>E3.1</b>	Circulaire	régulière	demibombé	Beige	1mm
<b>E3.3</b>	Circulaire	régulière	demibombé	Beige	2mm
<b>E3</b>	Circulaire	régulière	demibombé	Beige	2mm

## **L'identification des isolats bactérienes**

### **Les tests biochimiques et physiologiques**

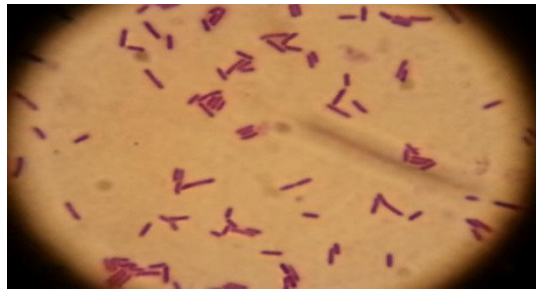
#### **5. Tests de Gram**

##### **5.1. Coloration de Gram**

La coloration de Gram permet une classification des bactéries selon leur structure. Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration: la différence de composition chimique de bactérie et la différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool.

Le test permet de différencier entre les Gram positif et les Gram négatif selon l'apparition de couleur rose.

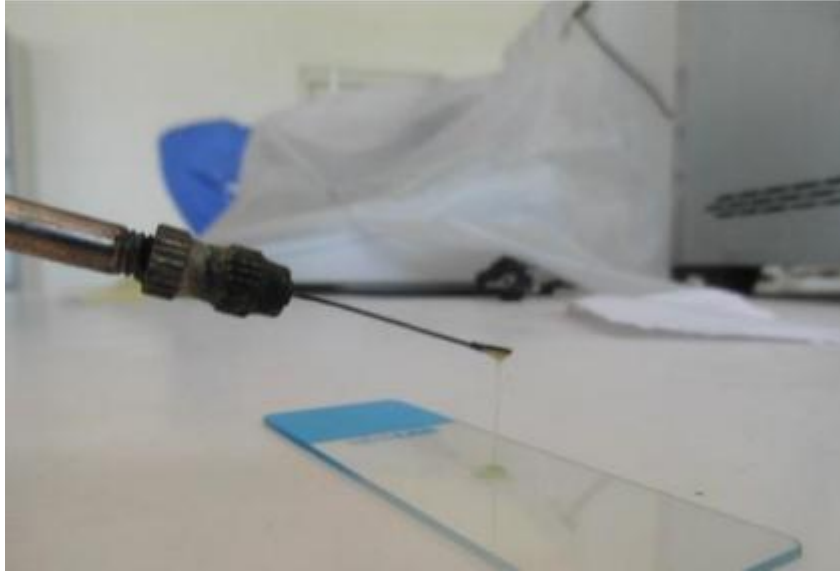
Les résultats de la coloration de Gram ont montré que les 12 isolats testés sont généralement des bacilles à Gram négatif, de couleur rose sous microscope optique(Gx40).



**Fig 10** : résultat de test de coloration de Gram

##### **5.2. Test de KOH**

Le test de KOH est un test de confirmation de la coloration de Gram, Après quelques minutes, la solution devient visqueuse (réaction +) c'est-à-dire la présence des bactéries Gram négatif pour tous les 12 isolats étudiés. Donc le résultat obtenu par la coloration de Gram a été confirmé par le test KOH.



**Fig 11.** Résulta de test KOH.

### **6. Test de Hugh et Leifson**

Le milieu de Hugh et Leifson permet de déterminer la voie métabolique, oxydative ou fermentative par la bactérie étudiée, Le milieu contient un indicateur de pH, le bleu de bromothymol, qui prend une couleur jaune en milieu acide.

Après 48 à 72h d'ensemencement bactérienne et l'incubation, nous avons remarqué un changement de couleur dans le tube à essai vers le couleur jaune ( sans huile) c'est –à- dire les bactéries étudiées sont des bactéries aérobies strictes fermentatives dans les 8 isolats. Mais les 4 isolats restent vers ( avec huile).alors ces isolats sont des bactéries aérobies strictes non fermentatives.

**Tableau 02.** Résultats d'identifications des isolats

Les isolats	Fluorescences sur KP	Test KOH	Coloration de Gram	Hugh et Leifson			
				Après 24h		Après 48h	
				Sans huile Oxydation)(	Avec huile (Fermentation)	Sans huile	Avec huile
E 1.4	F	+	-	Jaune	Bleu	jaune	Bleu
E 1.5	F	+	-	Jaune	Bleu	jaune	Bleu
E 1.7	F	+	-	Jaune	Bleu	jaune	Bleu
E1.6	F	+	-	Jaune	Bleu	jaune	Bleu
E 1.3	F	+	-	Jaune	Bleu	jaune	Bleu
E 1.8	F	+	-	jaune	Bleu	jaune	Bleu
E 1.1	F	+	-	jaune	Bleu	jaune	Bleu
E 1.2	F	+	-	jaune	Bleu	jaune	Bleu
E2.2	B	-	-	jaune	Jaune	jaune	Jaune
E3.1	B	-	-	jaune	Jaune	jaune	Jaune
E3.3	B	-	-	jaune	Jaune	jaune	Jaune
E3.4	B	+	-	jaune	Jaune	Jaune	Jaune

## 7. Production de pigments fluorescents

Sur le milieu King B, nous avons observé un pigment jaune – vert fluorescent sous UV (365 nm) diffusible dans le milieu dans tous les isolats étudiés. La bactérie a produit la pyoverdine (résultat positive).

## 8. Test LOPAT

Les tests de LOPAT permettent de déterminer les caractères métaboliques des *Pseudomonas savastanoi* et permettent de distinguer au sein du groupe, les espèces non pathogènes et espèces phytopathogènes (Semal, 1990).

Les tests biochimiques appelés LOPAT ont été réalisés: levan, oxydase, activité pectinolytique, présence de l'arginine déshydrogénase et hypersensibilité sur feuilles de tabac (Lelliott et al, 1966).

### 8.1. Test Production de levane sucrase

Le test levane sert à vérifier la polymérisation du fructose en poly-fructose par la bactérie, les souches qui possèdent une levane sucrase vont scinder le saccharose en glucose et fructose.

Dans ce test nous avons utilisé le milieu levane, après 3 à 5 jours d'incubation à 27°C, nous avons observé l'apparition des stries saillantes et luisantes indique la polymérisation du fructose en poly-fructose (réaction positif) par 4 isolats, Par contre l'apparition des stries non luisantes prostrées (réaction négatif) pour 8 isolats.

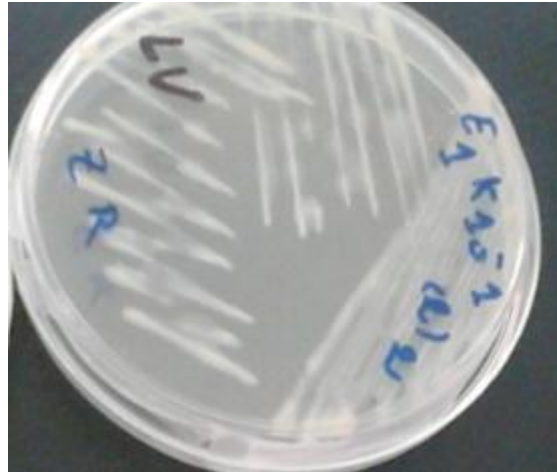


Fig 12. Résultat de test levane.

### 8.2. Test oxydase

Ce test est utilisé pour chercher la production de l'enzyme oxydase (cytochrome oxydase), Les bactéries possédant l'enzyme oxydase peuvent oxyder la N-diméthylparaphénylene diamine, ce qui donne une coloration violacée.

Pour l'ensemble des isolats testés, nous n'avons remarqué aucun changement de la couleur des disques oxydase, qui montre que ces bactéries n'ont pas utilisé cette enzyme

### 8.3. Test Pectinase

Le test pectinase permet d'identifier l'activité pectinolytique d'une bactérie c'est-à-dire sa capacité à dégrader la pectine.

Après 14 jours d'incubation, nous n'avons remarqué aucun changement ou modification et aucune odeur reniflée sur les tranches de la pomme de terre testées, ce qui indique que tous les 12 isolats étudiés ne sont pas capables de dégrader la pectine.



**Fig 13.** Résultat de test pectinas.

#### **8.4. Test d'Arginine déshydrolyse**

Ce test détermine si la bactérie est capable de dégrader l'arginine par l'enzyme arginine dihydrolase ou non.

après 48 jours d'incubation, nous n'avons remarqué aucun changement de couleur, le milieu reste rose, ce la indique que tous les 12 isolats étudiés ne sont pas capables de la transforme l'arginine (un acide aminé) à l'aide de l'enzyme arginine déshydrolyse.

#### **8.5. Test d'hypersensibilité sur feuille de tabac**

Le test d'hypersensibilité sur feuille de tabac sert à mettre en évidence le pouvoir -pathogène (Shaad *et al.*, 2001). Et ce par dépigmentation de la feuille autour au point d'infection.

Après 24 h, six isolats sur huit ont développé une réaction d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac inoculés–et pour le reste des isolats, aucune modification n'a été observée ni de la couleur ni de l'aspect de la zone foliaire inoculée.

**Tableau 03.** Résultats de test LOPAT.

Les isolats	Test Levane	Test Oxydase	Test Pectinace	Test d'arginine deshydrase	Test d'hypersensibilité sur tabac
E 1.4	-	-	-	-	+
E1.5	-	-	-	-	+
E 1.7	-	-	-	-	+
E1.6	-	-	-	-	+
E 1.3	-	-	-	-	+
E 1.8	-	-	-	-	+
E 1.1	-	-	-	-	+
E 1.2	-	-	-	-	-
E2.2	+	ND	-	-	ND
E3.1	+	ND	-	-	ND
E3.3	+	ND	-	-	ND
E3.4	+	ND	-	-	ND

D'après ces résultats, six isolats parmi l'ensemble des isolats testés répondent aux caractères primaires du test LOPAT (Levan négative, Oxydase négative, pouvoir pectolytique négative, Arginine négative et l'hypersensibilité sur feuille de tabac est positive) ce qui nous permet de les affilier à l'espèce *Pseudomonas savastanoi* **Groupe I b** et ce, en se basant sur le schéma de Lelliott *et al.* (1966).

### 9. Test pathogénicité : Postula de cokh

Deux mois après l'inoculation des plantules d'olivier (variété Chemlal), âgées d'une année, nous avons noté présence ou absence de tumeur sur les points blessés. Six isolats sur huit ont pu développés des tumeurs caractéristiques de la tuberculose sur et nous avons enregistré pour certains de ces isolats le développement de 1 jusqu'à 4 tumeurs sur quatre sites blessés. Les premières tumeurs ont commencé à apparaitre au bout de quinze jours. Par ce test avons pu confirmer le pouvoir pathogène de la plupart des isolats obtenus bien que les conditions dans lesquels l'expérimentation a été menée n'ont pas été idéales. Pour le témoin inoculé à l'eau distillée stérile aucun changement n'a été observé.



**Fig 14:** le résultat de test pathogenicité

## 10. Galerie 20 NE

La lecture des plaques de Galerie 20NE effectuée après 24 à 48h pour les 6 isolats qui ont été choisis.

Pour  $\text{NO}_3^-$ :

Nous avons ajoutés une goutte de réactifs NIT 1 et NITE 2 dans la cupule  $\text{NO}_3^-$ . (Après 5 min nous avons fait la lecture. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive.

Après 5 min nous avons obtenu une réaction négative, la réaction négative peut être due à cause de la production d'azote directement. Pour cela nous avons ajoutés 2 mg de zinc (ZN) dans la cupule  $\text{NO}_3^-$ , la cupule changement de couleur vers le rose cela indiquée une réaction négative.

Pour TRP:

Nous avons ajoutée une goutte de réactif JAMES, après 5 min l'observation de la couleur rose cela indique une réaction positive, l'observation de couleur vert pale jaune cela-indique une réaction négative.



**Fig 15.** Résultats obtenus pour la Galerie API 20 NE.

**Tableau 04.** Résultats des testes de Galerie API 20 NE.

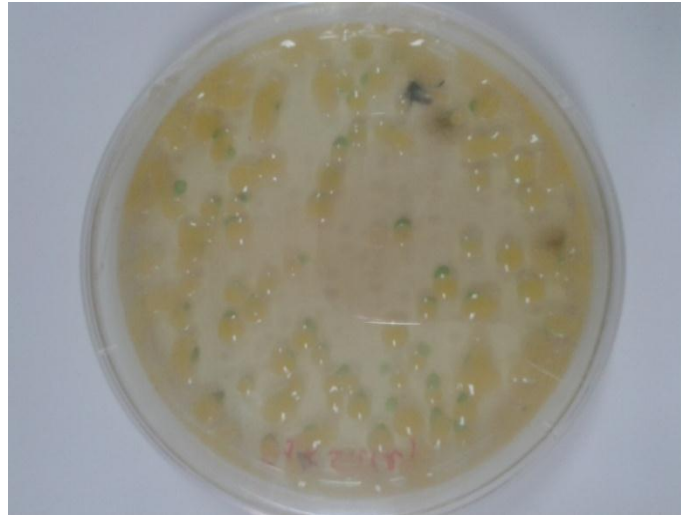
	E <sub>1.1</sub>	E <sub>1.2</sub>	E <sub>1.3</sub>	E <sub>1.4</sub>	E <sub>1.5</sub>	E <sub>1.6</sub>
NO3	-	-	-	-	-	-
TRP	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-
ESC	+	+	+	+	+	+
GEL	-	-	-	-	-	-
PNG	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+
ARA	-	-	-	-	+	-
MNE	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+
NAG	-	-	-	-	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-

## Pour les isolats jaunes

### 1. Isolement et dénombrement des bactéries

L'isolement de l'agent pathogène a été réalisé sur deux milieux de culture : milieu sélectif King B et milieu général LPGA, Après 3 jours d'incubation, nous avons remarqué des colonies bactériennes jaune sur ces deux milieux (LPGA et King B) de tous les délutions.

Après l'isolement et l'incubation des boites de Pétri, nous avons fait le dénombrement des colonies bactériennes. Les résultats obtenus par ce dénombrement, nous avons remarque une faible présence des *Pantoea agglomerans* like bacteria par rapport à la flore totale de 47%. Nous avons sélectionné 22 isolats pure qui montre les caractères morphologique de *Pantoea agglomerans*. Ces colonies sont régulière, d'une contour rond, circulaire a couleur jaune.



**Fig 16.** Les caractères morphologiques.

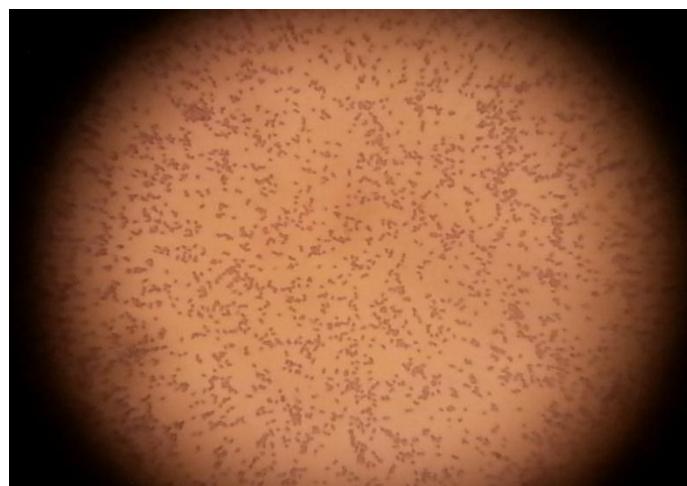
Après l'isolement et la purification des isolat bactériennes sur milieu King B, nous réalise les teste de Gram.

## **2. Test de Gram**

### **2.1. Coloration de Gram**

La coloration de Gram, c'est la coloration de base en bactériologie et elle permet et elle permet une classification des bactéries selon la structure de leur paroi, le test aussi permettre de différencier entre les Gram positif et les Gram négatif selon l'apparition de colore rose.

La coloration de Gram et l'observation microscopique(Gx40), montre que tous les 22 isolats étudiés sont des Gram négatif de couleur rose.



**Fig 17.** Résultat de test de coloration de Gram.

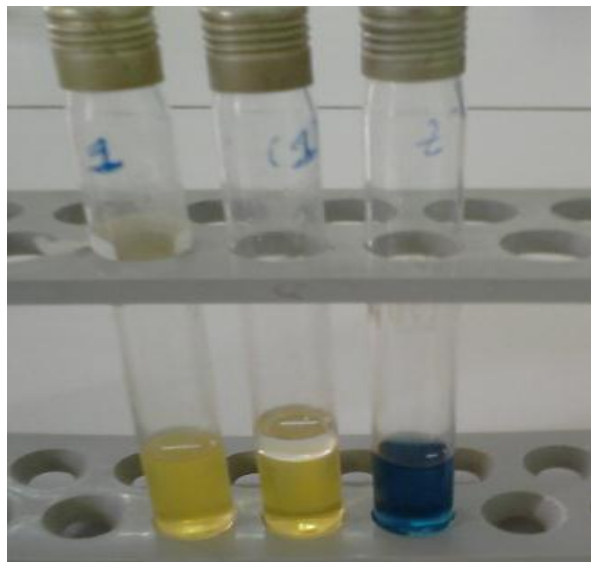
## 2.2. Test de KOH

Le test KOH est un test rapide qui a été réalisé pour déterminer le type de Gram des bactéries, Gram positif ou Gram négatif. Si la solution KOH présente un fil visqueux, c'est une réaction positive, et la bactérie est un gram négatif. Si la solution ne présente pas un fil c'est une réaction négative et la bactérie est à gram positif. Après quelques minutes la solution devient visqueuse (réaction +) c'est-à-dire la présence des bactéries Gram négatif pour tous les 22 isolats étudiés.

## 3. Test de Hugh et Leifson

Le test de Hugh et Leifson c'est un test qui précise du métabolisme énergétique il découle que un glucide peut être catabolisé par voie respiratoire ou par voie fermentative. Ce milieu contient un indicateur de pH, le bleu de bromothymol, qui prend une couleur jaune en milieu acide.

Après 48 h d'incubation, nous avons remarqué un virage de couleur dans les tubes à essai vers le jaune pour tous les 22 isolats étudiés, les bactéries ont utilisé le glucose en présence et en absence d'oxygène, les bactéries étudiées sont fermentatives. (Oxydation par respiration aérobie ou fermentation aérobie, les isolats sont aérobies anaérobies).



**Fig 18.** Résultats de test Hugh et Leifson.

#### 4. Test YDC (Yeast Dextrose Carbonate de Calcium et Agar)

Ce teste utilise pour la plupart des isolats de tissus végétaux afin de tester la pigmentation après l'incubation pendant 48h à 27°C.

Après 48 h d'incubation nous avons observé l'apparition d'une pigmentation jaune sur le milieu YDC pour les tous 22 isolats étudiés, qui montre les isolats bactérienne d'YDC positif.



**Fig 19.** Résulta de test YDC.

#### 4. Production d'oxydase

Ce test est utilisé pour chercher la production de l'enzyme oxydase (cytochrome oxydase), Les bactéries possédant l'enzyme oxydase peuvent oxyder la N-diméthylparaphénylene diamine, ce qui donne des colorations violacés.

Les résultats obtenus pour ce test, nous avons remarqué aucune changement d'une couleur sur le disque pour 22 isolats testées, qui montre que ces bactéries sont pas utilise l'enzyme d'oxydase.



**Fig 20.** Résulta de test oxydase.

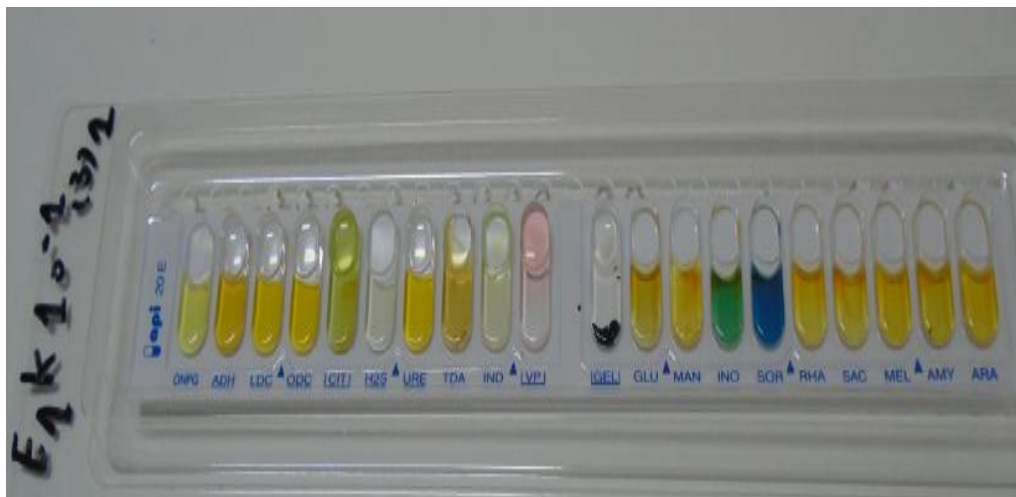
**Galerie 20E:**

La lecture des plaques de Galerie 20E effectuée après 24 à 48h pour les 4 isolats qui ont choisis:

Pour le test TDA : nous avons ajoutées 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

Pour le test IND : nous avons ajoutées 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

Pour le test VP : nous avons ajoutées 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Et nous avons attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.



**Fig21:** Résultats du test de Galerie API 20 E

**Tableau 05.** Résultats du test de Galerie API 20 E.

	E <sub>1.3</sub>	E <sub>1.10</sub>	E <sub>1.18</sub>	E <sub>1.19</sub>
ONPG	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-
H <sub>2</sub> O	-	-	-	-
URE	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-
IND	-	-	-	-
VP	-	+	-	-
GEL	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+
INO	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-
RHA	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+
MEL	-	-	-	+
AMY	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+
OX	-	-	-	-

## II. Discussion:

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* est l'agent causal de la maladie de la tuberculose d'olivier (Gardan *et al.*, 1992). Elle est considérée comme l'une des maladies les plus graves affectant l'olivier (*Olea europaea* L.) dans la plupart des régions de culture d'olivier dans le monde entier et principalement dans les pays méditerranéens, où cette culture a été en croissance pour des siècles. La maladie peut conduire à des dommages dans les oliveraies, causant de graves pertes en terme de production. 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 (Benjama, 1998).

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à la flore bactérienne précisément les *Pseudomonas savastanoi* qui colonisent les galles d'arbres d'olivier. Pour cela, des prospections ont été menées dans deux oliveries situées dans la région de Ain El Ibel à la wilaya de Djelfa. D'après ces prospections, dans la première oliverie aucun symptôme n'a été observé alors qu'au niveau de la deuxième un taux d'infection de 100% a été enregistré.

Pour l'isolement nous avons utilisé deux milieux de cultures LPGA et King B. Après le dénombrement des bactéries, nous avons remarqué que le taux des "*Pseudomonas savastanoi* like bacteria" dans les tumeurs d'olivier analysées varie entre 0 à 25%.

Dans le premier échantillon, nous avons calculé le taux des "*Pseudomonas savastanoi* like bacteria" dans le milieu King B est de  $(9 \times 10^2 \text{ cel.ml}^{-1})$  soit 25% par rapport à la flore totale, et pour le deuxième échantillon  $(1,66 \times 10^1 \text{ cel.ml}^{-1})$  soit 4% par rapport à la flore totale. Quand au troisième échantillon, ce taux est de  $(3 \times 10^2 \text{ cel.ml}^{-1})$  soit 20% par rapport à la flore totale,

Quand au quatrième échantillon nous n'avons pas obtenus des colonies similaires à *Pseudomonas savastanoi*, nous avons obtenu des colonies de couleur jaune et brillantes et lisses. D'après le dénombrement, leur taux sur le milieu King B est de  $(3,4 \times 10^2 \text{ cel.ml}^{-1})$  soit 47% par rapport à la flore total.

Selon Marchi *et al.* (2003), la concentration moyenne des *Pseudomonas savastanoi* a été estimée à  $2.7 \times 10^7 \text{ UFC g}^{-1}$  et celle des bactéries dont leurs colonies sont de couleur jaune à

$2.7 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$ . Sur un totale de 17 tumeurs analysées contenant la bactérie jaune, une seule tumeur contient également des *Pseudomonas savastanoi*.

Les méthodes de caractérisation bactériologiques et les tests biochimiques utilisés pour l'identification des isolats bactériens peuvent être considérées comme indicateurs de l'aspect de ces bactéries, ils nous ont permis de faire une identification préliminaire des isolats.

Une première sélection à l'œil nu nous a permis de choisir les isolats qui montrent les caractères morphologiques des *Pseudomonas savastanoi* (des colonies bactériennes de petite taille, fluorescentes sur King B, rondes brillantes des reliefs bombés et des surfaces lisses), cette sélection nous a permis de retenir 12 isolats bactériens, sur les deux milieux King B et LPGA.

Après la purification des 12 isolats bactériens sélectionnés sur le milieu de King B, nous avons réalisé la coloration de Gram.

La coloration de Gram et la fermentation du glucose ont été des caractères clés pour classer les genres des bacilles à Gram négatif non fermentaires. Pour les résultats de coloration de Gram; tous les 12 isolats étudiés sont des bacilles à Gram négative, ces dernières possèdent une enveloppe externe. Celle-ci est riche en lipides dans lesquels l'alcool peut se dissoudre. Ceci facilite sa pénétration (Guy Leyral, *et al* 1992). Selon Ghafir (2007), les parois cellulaires des bactéries Gram négatives, présentent une couche plus mince de peptidoglycane avec une paroi fine et élastique. Cette caractéristique de la paroi, permet la pénétration de l'alcool qui va décolorer la cellule et permet de la recolorer par la fuchsine. Ces résultats ont été confirmés par le test KOH. Dans ce test, la solution devient visqueuse en présence des bactéries à gram négative. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 60 secondes (Schaad *et al*, 2001). Avec nos isolats, nous avons remarqué la formation d'un fil visqueux chez les 12 isolats, ce qui indique qu'elles sont à gram négatif.

Plusieurs auteurs, dans la littérature, ont montré que les cellules de *Pseudomonas savastanoi* se présentent sous forme de bâtonnets, Gram négatifs et mobiles (Prévot, 1961)

Concernant le test de croissance en anaérobiose, parmi 12 isolats testés, 08 isolats sont des aérobies strictes capables d'attaquer le glucose en présence de dioxygène uniquement, alors que les 4 isolats aérobies strictes non fermentatives en condition d'anaérobiose. Le milieu de

Hugh et Leifson contient le bleu de Bromothymole qui prend une couleur jaune lorsque il est en milieu acide, ce milieu précise le type de dégradation du glucide (glucose) qui libère des acides et éventuellement des gaz (Schaad *et al.*, 2001).

La faible teneur en peptone et la forte concentration en glucose dans le milieu de Hugh et Leifson, nous permet de vérifier si la bactérie peut utiliser le glucose en présence et absence d'oxygène (Macfaddin. 1985). D'après Schaad *et al.* (1992), les *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* sont des bactéries aérobies strictes.

Tous les isolats étudiés ont produit, sur le milieu King B, un pigment jaune-vert diffusible dans l'agar et fluorescent sous UV (pyoverdine). Ce résultat est conforme à ceux obtenus par Lelliott *et al.* (1966) ; Palleroni (1984) et bultreys *et al.* (2003).

Les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, et la détermination de certaines espèces, ainsi que de connaître certains caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées (Goszczyńska *et al.*, 2000). Pour étudier la pathogénicité des isolats, nous avons utilisé l'ensemble des tests LOPAT, (Lelliott *et al.*, 1966). Les tests de LOPAT permettent de déterminer les caractères métaboliques des *Pseudomonas* et nous permet de différencier entre les espèces de *Pseudomonas* (pathogènes ou non pathogène) (Semal, 1990).

Le résultat du test levane était positif pour 4 isolats et négatif pour 8 isolats. L'enzyme levane sucrase catalyse la synthèse de levane à partir du sucrose et catalyse l'hydrolyse du levane en monosaccharides. La production de levane sucrase extracellulaire est présente chez quelques biovars de *Pseudomonas fluorescences* (Jacques, 1994). La plupart des *Pseudomonas savastanoi* sont des levane négatives (Lelliott *et al.*, 1966). De son côté Marchi a rapporté en (2005) que des isolats issues de tumeurs d'olivier ont donné un résultat positif pour des isolements effectués dans une oliverie en Italie avec ce test.

Le test de l'oxydase est utilisé pour identifier les bactéries qui produisent du cytochrome C oxydase, une enzyme de la chaîne de transport d'électrons des bactéries. Lorsqu'elle est présente, le cytochrome C oxydase oxyde le réactif (Tétraméthyl P Phénylènediamine) en (indophénols) produit final de couleur pourpre. Lorsque l'enzyme est absente, le réactif reste incolore. Pour ce test, 6 isolats uniquement ont été testés et ce, par manque de produits. Tous les isolats testés sont négatifs ce qui signifie simplement que ces organismes ne possèdent pas le cytochrome c oxydase qui oxyde le réactif utilisé. Ils peuvent respirer à

l'aide d'autres oxydases dans le transport d'électrons. D'après la littérature; les *Pseudomonas savastanoi* donnent un résultat négatif pour le test oxydase. (Young *et al.*, 1996) et (Young *et al.*, 2004).

Pour le test pouvoir pectinolytique, nous avons remarqué que tous les 12 isolats donnent des résultats négatifs, le test pectinase permet de mettre en évidence l'activité pectinolytique d'une bactérie c'est-à-dire sa capacité à dégrader la pectine. Ce qui concorde avec travaux faits sur les isolats issus de tumeurs d'olivier qui ne dégradent pas la pectine (Guido *et al.* 2005).

Selon Digat et Gardan (1987), le test Arginine dihydrolase est considéré comme un test déterminatif dans l'identification de *Pseudomonas*. Pour l'ensemble des isolats testés, tous donnent une réaction négative. Il est exprimé par l'apparition d'une couleur rose dans le milieu. Indique qu'il y a eu pas transformation de l'arginine (un acide aminé) par l'enzyme d'arginine dihydrolase. D'après (Haas *et al.*, 1990), l'arginine représente une source d'azote intéressante dans les milieux riches en matière organique, sa dégradation est une voie caractéristique des *Pseudomonas spp.* Fluorescents, elles fonctionnent en absence de l'oxygène et sous conditions dénitrifiées. Les *Pseudomonas savastanoi* sont connues par le fait qu'ils sont incapables de dégrader l'arginine (Guido *et al.*, 2005°

Selon Schaad *et al.* (2001), le test d'hypersensibilité sur tabac met en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie suite au dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac. Le test hypersensibilité sur feuilles de tabac a donné des résultats positifs pour 6 isolats et un résultat négatif pour un seul isolat. D'après Lelliott *et al.* (1966), les *Pseudomonas savastanoi* provoquent une réaction d'hypersensibilité sur feuille de tabac.

D'après les résultats obtenus, les isolats se présentent sous forme de bâtonnets, Gram négatifs, aérobies stricts et capables de produire un pigment jaune-vert fluorescent sur le milieu King B. le test de LOPAT montre que ces isolats sont des levanes négatives, oxydases négatives, arginine négatives, incapables de dégrader la pectine et provoquent une réaction d'hypersensibilité sur feuille de tabac.

D'après ces résultats, six isolats parmi l'ensemble des isolats testés répondent aux caractères primaires du test LOPAT (Levan négative, Oxydase négative, pouvoir pectolytique négative, Arginine négative et l'hypersensibilité sur feuille de tabac est

positive) ce qui nous permet de les affilier à l'espèce *Pseudomonas savastanoi* Groupe I et ce, en se basant sur le schéma de Lelliott *et al.* (1966).

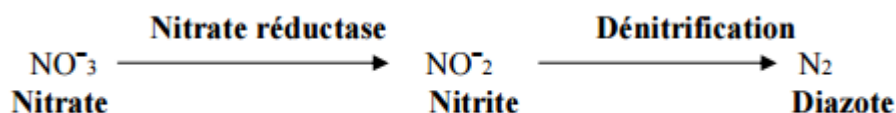
Bien que le test d' Hypersensibilité sur feuille de tabac est largement applicable sur une large gamme de bactéries est ne fonctionne pas avec les phytopathogènes opportunistes. Dans le groupement de *Pseudomonas* fluorescentes selon le test LOPAT (Lelliott *et al.* 1966) par exemple, groupe I, groupe II et groupe II, qui sont fortement pathogènes donnent une réaction de hypersensibilité de tabac claire, tandis que les groupes faiblement pathogène IV et V non. Ainsi parmi les *Pseudomonas* responsable de la pourriture molle, *Pseudomonas viridiflava* ( Lopat groupe II) donne une réaction d'hypersensibilité positive, mais les *Pseudomonas marginalis* (Lopat groupe IV) non.

Le test de pathogénicité effectué sur les plantules d'olivier variété "Chemlal" ; âgées d'une année a révélé le développement des tumeurs au niveau des tiges inoculés, ces tumeurs sont semblables à celles causées, habituellement, par *Pseudomonas savastanoi* (Marchi *et al.*, 2016). Le test de pathogénicité confirme que cette bactérie est pathogène.

#### Discussion des résultats de la galerie Api 20NE:

La galerie API 20NE est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries à Gram négatif. La galerie API 20NE comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, ces microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

Pour le test  $\text{NO}_3$ , tous les isolats testés ont montré un résultat négatif. Ce test est un test basé sur la recherche du nitrate réductase, il détecte si un organisme est capable de réduire le nitrate selon:



Après l'addition des réactifs nitrites 1 et nitrite 2, nous avons noté l'absence d'une coloration rose-rouge. Cela signifie l'absence des nitrites dans le milieu. Néanmoins, ce résultat ne signifie pas que la souche ne possède pas un nitrate réductase. En effet, l'ajout de la poudre de zinc, capable de réduire les nitrates du milieu, a montré une coloration rose. Cette observation signifie que la souche ne possède pas un nitrate réductase très active, capable de réduire les nitrates du milieu au-delà des nitrites, jusqu'au stade diazote. Alors la réaction du test nitrate est négative ( Delarras, 2014).

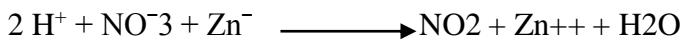
La nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade nitrites selon :



La nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade diazote (gazeux) selon :

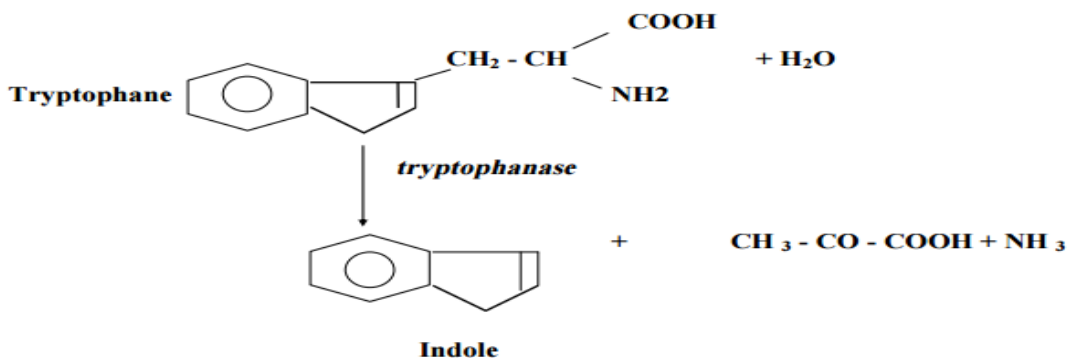


Dans ce cas le test est complété par l'épreuve de Zo-Bell en ajoutant la poudre de zinc qui est un composé capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites :



Selon Janse *et al.*, (1982) les *Pseudomonas savastanoi* sont des nitrates réductase négatifs.

Le test TRP permet de savoir si un organisme peut produire de l'indole à partir de tryptophane. (Camille.2014). Pour ce test, un résultat négatif est observé après l'ajout du réactif de JAMES, montre que les 6 isolats testés n'ont pas produit l'indole.



D'après Janse (1982) les *Pseudomonas savastanoi* sont tryptophanes négatifs.

Pour le test d'Arginine dihydrolase (ADH): Complexe enzymatique capable de dégrader l'arginine en anaérobiose. L'ensemble des isolats testés, tous donnent une réaction

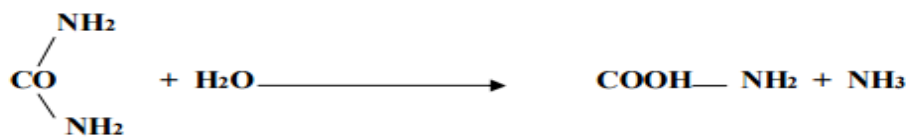
négative. Les *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* ne sont pas capables de transformer l'arginine (un acide aminé) à l'aide de l'enzyme arginine dihydrolase (Gardan *et al.*, 1992).



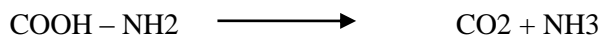
Pour le D- glucose, tous les 6 isolats ont montré une réaction négative. Les 6 isolats sont des aérobies stricts capables d'attaquer le glucose en présence de dioxygène uniquement. Selon Janse *et al.* (1982), les *Pseudomonas savastanoi* sont capables de dégrader le glucose.

Concernant le test uréase, les 6 isolats testés donnent un résultat négatif. Ce test détecte l'enzyme qui scinde l'urée en NH<sub>3</sub> et CO<sub>2</sub>, la couleur jaune n'indique pas l'alcalinisation du milieu, d'après Janse et ses collaborateurs. (1982), les *Pseudomonas savastanoi* ne possèdent pas l'uréase.

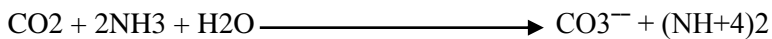
Les bactéries hydrolysent l'urée :



Une uréase très active aboutit à la réaction:



Ensuite les CO<sub>2</sub> + NH<sub>3</sub> se combinent et donnent du carbonate d'ammonium :



Pour le test PNPG; le résultat obtenu par ce test est négatif pour les 6 isolats testés puisque le composé reste incolore. Selon (Janes *et al.*, 1982), les *Pseudomonas savastanoi* donnent un résultat PNPG négatif.

Pour le test esculine, tous les isolats testés sont des esculines positifs et ce, est marqué par la diffusion du citrate de fer ammoniacal dans le milieu qui se manifeste par l'enzyme esculinase (Delarras, 2014).

L'enzyme hydrolase est catalysée par une B-glucosidase, encore appelée esculine, qui coupe la liaison glucosidique entre le glucose et l'esculétine, ce dernier composé se combine avec les ions fer (III) de citrate de fer ammoniacal pour donner un composé de coloration foncée à noir qui diffuse dans le milieu. Les 6 isolats étudiés donnent une couleur vert pâle, le test esculine est alors positif. Mais Gardan *et al.* (1992) rapporte que les *Pseudomonas savastanoi* sont des Esculine négatifs.

Pour le test GEL, nos souches testées donnent un résultat négatif, (pas de diffusion du pigment), l'hydrolyse de la gélatine est un test utilisé pour révéler la présence d'une gélatinase (Delarras. 2014). Les travaux de Gardan *et al.* (1992) ont montré que les *Pseudomonas savastanoi* sont des gélatine négatif.

Les tests d'assimilation montrent que nos isolats testés assimilent: glucose, mannose, mannitol, potassium gluconate, acide caprique, acide malique et trisodium citrae. Une exception pour l'isolat E1.2 qui a donné un résultat négatif avec le test CIT. Pour le reste des tests d'assimilation, nos isolats ont donné des résultats négatifs et seul l'isolat E1.5 a donné un résultat positif pour le test Arabinose,

D'après les résultats de la lecture des tests de la galerie Api 20NE utilisant le logiciel d'identification (API Microsoft Excel), il ressort les isolats testés ont été affiliés à trois espèces différentes de l'espèce recherchée. Les isolats (E1.1, E1.3, E1.4, E1.5) ont donné l'espèce: *Flavimonas oryzihabitans* avec une probabilité de 91.6 %, et l'isolats (E1.2) a donné l'espèce *Sphingomonas paucimobilis* avec la probabilité 88.4 % et L'isolats (E1.6) a donné l'espèce : *Acinetobacter lwoffii* avec une probabilité de 42.7%.

L'ensemble des tests de la galerie ont donné des résultats conformes avec ceux connus chez *Pseudomonas savastanoi*. à l'exception des trois tests ESC, GNT et ARA qui ont donné des résultats différentes celles obtenus avec les *Pseudomonas savastanoi* isolées de l'olivier (Gardan. 1992). Le fait de ne pas avoir l'espèce recherchée met en doute ces trois tests et ce, car le test de pathogénicité et les résultats du test LOPAT ont montrés l'affiliation des isolats à *Pseudomonas savastanoi* et ont confirmé le postulat de Koch par le fait de donner des tumeurs semblables à celles causées, habituellement par *Pseudomonas savastanoi* sur les rameaux d'olivier.

**Tableau 06:** Lecture des résultats d'identification des isolats de la galerie API 20 NE

isolats	Taxon	Remarque	Indice typicité	Probabilité
E.1	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Pas bon	0.06	91.6
E.2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Pas bon	-0.48	88.4
E.3	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Pas bon	0.06	91.6
E.4	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Pas bon	0.06	91.6
E.5	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Pas bon	0.06	91.6
E.6	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Pas bon	-0.24	42.7

Dans la présente étude, après l'isolement, des colonies jaunes se sont développées sur les boîtes d'isolement dans un des échantillons de tumeurs d'olivier. Ces colonies sont bombées et lisses, ces colonies étaient abondantes (47% par rapport la flore totale) dans cet échantillon " quatrième échantillon.

Pour l'identification de ces isolats qui se présentent sous forme de colonies jaunes, nous nous sommes basées sur le protocole de Schaad *et al.* (2001) pour déterminer le genre de ces bactéries. Nous avons choisi 22 colonies pour l'identification. Ces isolats ont été ensemencées sur le milieu d'agar nutritive NA jusqu'à l'obtention d'isolats purs.

L'ensemble des tests chimiques et physiologiques, la coloration de gram, KOH le test YDC, le test Hugh et Leifson, ont été utilisé pour l'identification de ces bactéries.

Le test KOH permet de classer les bactéries en deux groupes: celles de Gram négatif (Gram-) qui sont solubles dans la solution de KOH à 3% et celles de Gram positif (Gram+) insolubles dans la solution de KOH à 3%. D'après ce test, nous avons remarqué la formation d'un fil visqueux chez tous les isolats étudiés, ce qui indique qu'elles sont à gram négatif, les résultats sont confirmés par la coloration de Gram, elle est basée sur la perméabilité plus grands de la paroi des bactéries à gram négatif à l'alcool, elle nous a permis aussi d'observer la forme des cellules bactériennes . Ces isolats se présentent sous forme de bacilles très petits à Gram négatifs.

La paroi des bactéries à Gram négatif se décolore par l'alcool, la couche du peptidoglycane est mince, elle est recouverte d'une membrane trilamellaire lipopolysaccharidique appelée membrane externe; elle est le siège de l'antigène somatique O, elle est très riche en lipide, cette richesse explique le caractère Gram négatif de bactéries (Boulaïbal, 2009).

Le test de Hugh et Leifson est un test qui précise le métabolisme énergétique, il démontre si un glucide peut être catabolisé par voie respiratoire ou par voie fermentative. D'après les résultats de ce test, les 22 isolats sont fermentatives, ce qui peut s'expliquer par le fait que les bactéries ont utilisé le glucose en présence et en absence d'oxygène, le glucose est oxydé en acides, alcools, qui sont libérés dans le milieu qu'ils acidifient sensiblement. Le milieu de Hugh et Leifson contient un indicateur de pH, le bleu de bromothymol, qui prend une couleur jaune en milieu acide (Schaad *et al.*, 2001).

Le test oxydase permet la détection de l'enzyme cytochrome oxydase des bactéries. Les isolats testés restent incolores donc la réaction est négative, Lorsque l'enzyme est absente, ces organismes ne possèdent pas le cytochrome c oxydase qui oxyde le réactif présent dans les disques (Schaad *et al.*, 2001).

Pour le test YDC, c'est un test permet la production du pigment jaune non diffusible par les bactéries, le changement de couleur pour forme un composé coloré en jaune qui indique la réaction positive, et l'absence de coloration c'est la réaction négative. Dans notre travail, tous les isolats testés sur le milieu YDC donnent un résultat positif, l'apparition d'un pigment jaune non diffuse sur le milieu YDC (Marchai *et al.*, 2006). D'après les résultats obtenus par les tests précédents, il ressort que ces isolats appartiennent au genre *Pantoea*.

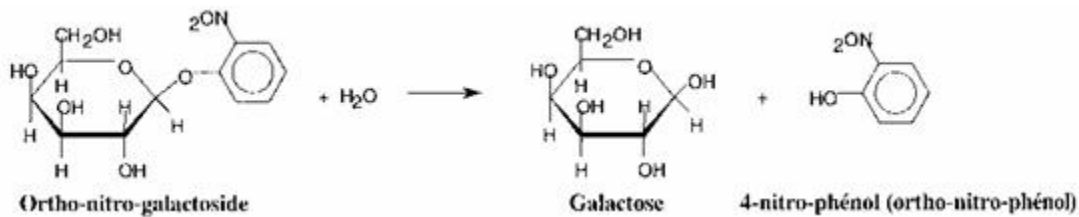
De leur côté Marchai *et al.* (2006), rapportent des colonies jaunes ont été isolées partir des galles, ces isolats ont été identifiés comme étant des *Pantoea agglomerans* et ces bactéries ont été associées à *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* dans les tumeurs. Selon ces auteurs, ces isolats sont des Gram négatives et produit un pigment jaune non diffuse sur le milieu YDC, à la fois aérobie et anaérobie. Et cela concorde avec nos résultats. D'après Grimont *et al.* (2005) in Brian *et al.*, (2012), les *Pantoea* sont des bactéries fermentative.

### Discussion des résultats de la galerie Api 20E:

Pour une identification plus fine des isolats (colonies jaunes) , nous avons utilisées la galerie Api 20E. Il s'agit d'un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

Concernant le test ONPG, pour dégrader activement le lactose, les microorganismes doivent posséder deux enzymes ; la perméase et  $\beta$ -galactosidase.

L'épreuve ONPG permet de mettre en évidence la  $\beta$ -galactosidase qui dégrade l'ONPG soit l'orthonitrophényl-  $\beta$ -D- galactopyranoside qui possède une structure analogue au lactose. Le lactose est formé de deux molécules de glucose et de galactose, tandis que l'ONPG est composé d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose. L'hydrolyse de l'ONPG (composé incolore) libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu, ce processus se fait selon la réaction suivant:



Nous avons observé la couleur jaune pour tous les 4 isolats testés et cela indique que les isolats possèdent la B-galactosidase et sont capables d'hydrolyser l'ONPG en ONP (produit coloré en jaune).

Pour le test ADH, l'arginine dehydrolase est un complexe enzymatique capable de dégrader l'arginine en anaérobiose, agissant selon deux types de réaction envisageables. La première réaction est une transformation de l'arginine en citrulline et ammoniacque par son activité dihydrolase. La seconde est une décarboxylation de la citrulline en ornithine et ammoniacque (Hildebrand, 1988). Pour ce test, nous avons remarqué que les 4 isolats étudiés sont incapables de dégrader l'arginine

Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à l'enzyme tryptophane désaminase (Test TDA) et cette dernière conduit à la désamination de cet acide aminé en produisant

l'ammoniac et l'acide indole-3- pyruvique. Ce dernier est révélé par l'apparition d'une couleur brune en présence de perchlorure de fer. Les quatre isolats étudiés ont donné une réaction négative qui s'exprime par l'apparition de la couleur jaune (Guillaume. 2005).

Pour le test hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S), le substrat soufré est réduit en présence d'une enzyme qui aboutit e général à la production des hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S); celui-ci se combine avec un sel de fer (citrate de fer) pour donner du sulfure de fer noir (Delarras.2014). Le résultat obtenu par ce test est négatif pour les 4 isolats étudiés.

Pour le test Urée, se fait sur milieu urée tryptophane, appelé improprement milieu Urée Indole le milieu Urée Tryptophane est un milieu synthétique (milieu dont la composition est connue exactement tant qualitativement que quantitativement ). C'est un milieu complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreux germes bactériens, notamment parmi les *Enterobacteriaceae*. La couleur jaune n'indique pas l'alcalinisation (uréase -) (Guillaume. 2005).

Les tests LDC et ODC qui permettent de montrer la présence des décarboxylases et dihydrolase bactériennes par la mise en évidence de l'acidification du milieu et sa réalcalinisation. Nous avons remarqué la couleur jaune qui indique une réaction négative.

Les tests d'assimilation montrent qu'elle n'assimile pas l'inositol (INO), Sorbitol (SOR), mélibiose (MEL), Une exception pour l'isolat E19 qui a donné un résultat positif avec le test MEL. Par contre, une réaction positive est obtenue pour le test de Glucose (GLU), le test Mannitol (MAN), le test Rhamnose (RHA), saccharose (SAC), amygdaline (AMY), et le test arabinose (ARA).

D'après les résultats de la lecture des tests de la galerie Api 20E utilisant un logiciel d'identification (API Microsoft Excel), il ressort que les isolats testés ont été affiliés à trois espèces différentes: *Enterobacter gergoviae*, *Pantoea spp3* et *Pantoea spp4*. Parmi les quatre isolats testés trois appartiennent au genre *Pantoea* et cela concorde avec les résultats obtenu par les tests biochimiques que nous avons fait pour la détermination du genre.

Les isolats (E1.3, E1.19) ont donné l'espèce: *Pantoea spp3* avec une probabilité de 63.6 % ,et l'isolats (E1.18) a donné l'espèce *Pantoea spp4*avec la probabilité 63.6 %.,et L'isolats (E1.10) a donné l'espèce : *Enterobacter gergoviae* avec une probabilité de 72.6%.

Dans beaucoup de travaux effectués sur la tuberculose d'olivier, les chercheurs ont rapporté que la bactérie *Pseudomonas savastanoi* était dans certains cas associée à d'autres bactéries dans les tumeurs et parmi les espèces bactériennes fréquemment isolées c'est des *Enterobacteriaceae*, telles que; *Pantoea agglomerans*, *Erwinia toletana*, *Erwinia oleae* et *Enterobacter* sp (Marchai *et al.*, 2006, Moretti *et al.*, 2011 , Bouaichi *et al.*, 2013). Certains auteurs ont découvert que certaines de ces bactéries peuvent avoir un effet sur les phytohormones et par conséquent sur le développement de ces tumeurs (Marchai *et al.*, 2006 ).

**Tableau :** les résultats d'identification des isolats utilisant la galerie API 20 E:

Les isolats	Taxon	Remarque	Indice de typicité	Probabilité
E <sub>1.3</sub>	<i>Pantoea spp3</i>	Excellent ID	0.84	63.6
E <sub>1.10</sub>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	Mauvaise identification	-1.07	72.6
E <sub>1.18</sub>	<i>Pantoea spp3</i>	Excellent ID	0.84	63.6
E <sub>1.19</sub>	<i>Pantoea spp4</i>	Excellent ID	0.97	68.2

*Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*, est l'agent causal de la maladie de la tuberculose d'olivier, qui est considérée comme l'une des maladies les plus importantes affectant oliviers, ce qui peut conduire à de graves dommages dans oliveraies, causant de graves pertes en termes de production (Quesada *et al.*, 2012 ). La bactérie produit des excroissances tumorales (galle) sur les troncs et les branches des oliviers (*Olea europaea*) en raison de la synthèse bactérienne de l'acide indole acétique et cytokinines (Megan, 2007).

L'objectif de notre travail est une contribution à l'identification de l'agent pathogène de tumeurs sur les rameaux d'olivier.

Après le dénombrement des bactéries, nous avons remarqué que le taux des "*Pseudomonas savastanoi* like bacteria" au niveau des galles d'olivier varie entre 0 à 25%.

Après l'isolement et la purification des bactéries, nous avons obtenu 12 isolats bactériens. Pour la détermination du genre bactérien nous avons procédé d'abord à la coloration de Gram, test KOH, puis au test de croissance en anaérobiose et en fin test de fluorescence sur King B. et pour déterminer l'espèce nous avons utilisé les tests biochimiques (LOPAT). La coloration de Gram montre que les isolats sont des bacilles Gram négatif, le test de croissance en anaérobiose montre que les isolats sont des bactéries aérobies strictes et produit un pigment jaune vert sur le milieu King B.

L'ensemble des tests LOPAT réalisés ont montré que les 12 isolats sont des Levanes négatives, incapables à dégrader le pectine ne possèdent pas d'arginine déshydrogénase et donnent un résultat négatif pour le test oxydase et l'hypersensibilité sur feuille de tabac qui a été réalisé sur huit isolats uniquement donne un résultat positive chez six isolats sur huit testés. Ces résultats sont conformes au profil physiologique de *Pseudomonas savastanoi*.

Le test de pathogénicité effectué sur des plantules de l'olivier a produit des tumeurs correspondant aux symptômes provoqués par la maladie de la tuberculose d'olivier.

Dans la présente étude, des colonies jaunes ont été isolées à partir d'une tumeur d'olivier analysées, après la purification des isolats, nous avons obtenu 22 isolats.

D'après les tests biochimiques, ces bactéries sont des bacilles à Gram négatif, produisent des colonies jaunes sur le milieu YDC, elles sont des oxydases négatives, et à la fois aérobie et anaérobie. L'identification montre qu'elles sont des *Pantoea* sp,

La galerie 20E pour déterminé l'espèce au lieu de *Pantoea agglomerans*.

Les résultats obtenus dans ce travail sont des résultats préliminaires, nous avons jugé utile de fixer certains points comme objectifs à développer:

- Etudier les caractères génétiques et faire une caractérisation moléculaire complète d'ADN et ARN
- Etudier les interactions entre les *Pseudomonas savastanoi* et les *Pantoea agglomerans*.
- La détection de *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* de la tuberculose d'olivier et d'autres hôtes par Polymersae Chain Reaction (PCR)
- La sélection des souches et l'amélioration du transfert de gènes pour génétiques manipulation de *Pseudomonas savastanoi* isolé de la tuberculose d'olivier-

1. **Alexander E., Pham D., & Steck T.R., 1999:** The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 8, pp. 375-376.
2. **Alloum D., 1974.** L'oléiculture algérienne. Options méditerranéennes n°24. Pp : 45-48.
3. **Argenson C., Regis S., Jourdain J.M., et Vayesse., 1991 :**  
L'olivier. Ed. C.T.I.F.L. 203p.
4. **Argenson C., 2008 :** La culture de l'olivier dans le monde, ses productions, les tendances. Le Nouvel Olivier, 61p.
5. **Baratta B, Di Marco L.** 1981. Control of olive knot attacks on the cultivar Nocellara del Belice. *Informatore Fitopatologico* **31**, 115–116 [English abstract].
6. **Barranco D., 1998 :** Variedades y patrones, In: *El cultivo del olivo*, Barranco, D., Fernández- Escobar, D., & Rallo, L., pp. 56-79, Junta de Andalucía- Mundi-Prensa, ISBN 978-84- 8474-234-0, Madrid, Spain
7. **Bebjama ., A.** 2003. Méthode d'évaluation rapide du degré d'attaque de l'olivier par la tuberculose causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, en verger au Maroc
8. **Benjama A, Walali L, Jananti L, Moukhli A.** 1987. Field reaction of different varieties of olive (*Olea europaea* L.) to olive knot disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (E.F. Smith) Stevens. Third International Working Group on *Pseudomonas syringae* pathovars. Lisbon, Portugal, 1–4 September 1987. pp. 41–52.
9. **Benjama A.,** 1984. isolement et identification de l'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier
10. **Benjama A., 1989 :** Isolement et identification de l'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier au Maroc
11. **Benjama A., 1994 :** Étude de la sensibilité variétale de l'olivier au Maroc vis-à-vis de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, agent de la tuberculose. Cahiers Agricultures, Vol. 3, No. 6, (November/December 1994), pp. 405-408, ISSN 1166-769
12. **Benjama A., Walali L., Janati L., Moukhli A.** 1992. Field reaction of different varieties of olive *Olea europaea* L. to olive knot disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (E.F. Smith) Stevens, El-Awamia 75.41–52.
13. **Bensemmane A., 2009 :** L'oléiculture: Développons le secteur de l'Huile d'Olive en Algérie. Revue Fillaha Innove N°4 Avril-Mai 2009. 23p.

14. **Bottalico., A, Corda.,P**, 1995. Mycosentrospora cladosporioides form olive in Sardinia. Plant disease. pp 320.
15. **Boulanger A.** 2009. Analyse d'un nouveau système CUT impliqué dans l'acquisition et l'utilisation du N-acétylglucosamine par Xanthomonas campestris pathovar campestris. Thèse Doctorat. Université de toulouse. pp 54.
16. **Brown, N. A. 1932. Canker of ash trees produced by a variety of the olive tubercle organism, Bacterium savastanoi. J. Agric. Res. 44:701-722.**
17. **Carbonell E.A., et López M.M., 2010:** 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
18. **Ciccarone A.** 1950. Alterazioni da freddo e da rogna sugli ulivi, esemplificate dai danni osservati in alcune zone pugliesi negli anni 1949–1950. *Bollettino della Stazione di Patologia Vegetale di Roma* 6, 141–74.
19. **Comai L, Kosuge T.** 1982. Cloning and characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi* *Journal of Bacteriology* **149**, 40–6..
20. **Digat., B. et Garden., L.** 1987- Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. Bulletin OEPP, 17 : 559-568.
21. **Ercolani, G.L.** 1991. Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Microbial Ecology*, Vol. 21, No. 1, pp. 35-48, ISSN 0095-3628
22. **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
23. **Ercolani., G.L.** 1971. Occurrence of *Pseudomonas savastanoi* (EF Smith) Stevens as an epiphyte of olive trees, in Apulia. *Phytopathologia Mediterranea* 10, 130–2.
24. **Ferraris, T. 1926.** Trattato di patologia e terapia vegetale, vol. 1, 3rd ed. Hopli, Milan, Italy.
25. **Fradin E, Thomma., B.** 2006. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. - *Mol. Plant Pathol.*, 2006, 7(2), 71-86.
26. **Freeman S. Katan T. et Shabi. E. 1998-** Characterization of Colletorichum species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant disease*, 82, 596-605.
27. **G.E., Stead, D.E., & Takikawa, Y.** 2004. Names of Plant Pathogenic Bacteria Published Since 1995. International Society of Plant Pathology Singleton P., 1990- Bactériologies. Ed. Dunod, Paris, 415P.
28. **Gardan L, Bollet C, Abu Ghorrah M, Grimont F, Grimont PAD.** 1992. DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 606–612.

29. **Gardan, L., Bollet, C., Abu Ghorrah, M., Grimont, F. et Grimont, P. A. D.** (1992). DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse(1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42: 606–12.
30. **Goszczyńska T., Serfontein J. J., Serfontein S. et Safrinet.** 2000. Introduction to practical phytopathology: A manual for phyto bacteriology. ISBN: 0-620-25487-4. Ultra litho (Pty) Ltd, Heriotdale. Johannesburg.
31. **Guido., M, Carlo, Viti, Luiciana, Giovanntti and Guisppe Surico,**2005
32. Guttman, D.S., Gropp S.J., Morgan R.L. et Wang, P.W. (2006) Diversifying selection drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*.
33. **Iacobellis NS** .2001. Olive knot. In ‘Encyclopaedia of plant pathology’. Vol. 2. (Eds OC Malloy, TD Murray) pp. 713–715. (John Wiley & Sons)
34. **Iacobellis.,NS.**2001.Olive knot. In ‘Encyclopaedia of plant pathology’. Vol. 2. (Eds OC Malloy, TD Murray) pp. 713–715. (John Wiley & Sons)
35. **Isaac, I.** 1967. Speciation in *Verticillium*. *Annual Review of Phytopathology* 5: 201-222.
36. Janse 1982. *Phytopathologie principle and practice* .p 221 .
37. .Janse, J.D. 1982. *Pseudomonas syringae* subsp. *Savastanoi* (ex Smith) subsp. Nov., nom. rev., the bacterium causing excrescences on *Oleaceae* and *Nerium oleander* L. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32: 166–169.
38. **Janse, J. D. 1981.** The bacterial disease of ash (***Fraxinus excelsior***) caused by ***Pseudomonas syringae* subsp. savastanoi** pv. ***fraxini***. 11. Etiology and taxonomic considerations. *Eur. J. For. Pathol.* **11:425-438.**
39. **Janse, J. D. 1982.** *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. nov., nom. rev., the bacterium causing excrescences on *Oleaceae* an
40. **Janse., JD.**1982.*Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. Nov., nom. rev., the bacterium causing excrescences on *Oleaceae* and *Nerium oleander* L. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32, 166–169.
41. **Jasques P et al** .1994.les mecanismes biochimiques développés par les pseudomonas fluorescent dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahiers Agric* .n.2.p.301.307.
42. **Kiffer E., et Morelet M.,** 1997.les deutéomycètes : Classification et clés d'identification
43. **Krueger WH, Teviotdale BL, Schroth MN, Metzidakis IT, Voyiatzis DG.**1999. Improvements in the control of olive knot disease. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Olive Growing*. Chania, Crete, Greece, 22–26 September 1997, Vol. 2. (Eds IT Metzidakis, DG Voyiatzis). *Acta Horticulturae* 474, 567–571.
44. **Lapage S. P., P. H. A. Sneath, E. F. Lessel, V. B. D. Skerman, H. P. R.**
45. Lelliot., R et al.1987. Method for diagnostique of bacterial disease of plantes. In: Preece T.( Ed). *Methods in plant pathology*.Blackwell. Oxford. UK.212p
46. **Lelliott R.A., Billing E., and Hayward A.C., 1966:** determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bact.* 29:470-489.

47. **Lelliott R. A., Billing E. et Hayward A. C.** 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *Journal App. Bacterial.* **29**: 470-489.
48. **Levin AG, Lavee S, Tsrur. L.** 2003. Epidemiology and effects of Lousert R et Brousse G. 1978. *L'olivier technique agricole et production méditerranéenne*. Ed. G.P. Maisonneuve et Larose. 437p.
49. **Loussert et Broussz G., 1978** : *L'olivier technique agricole et production Méditerranéenne*. Ed. Maisonneuve et Larose ,468 p.
50. **Maas E.V., Hoffman G.J., 1977** : Crop salt tolerance-current assessment-ASCEJ. *Irrig. Drain. Div.*, 103: 115-134.
51. **Marchal N., Bourdon J.L., et Richard C.L., 1991** : *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries* .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.
52. **Marchal N. et Bourdon J.L.** 1973- *Milieux de cultures et identification biochimique des bactéries*. Ed. Doin, Paris, 179p.
53. **Marchi G., Sisto A., Cimmino A., Andolfi A., Cipriani M.G., Evidente A., & Surico G., 2006**: Interaction between *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Pantoea agglomerans* in olive knots. *Plant Pathology*, Vol. 55, No. 5, (October 2006), pp. 614- 624, ISSN 0032-0862
54. **Marchi ., 2005**. Spread of levan positive populations pseudoonas the causa agent of olivr knot, in central Italy, *European Journal of plante pathology* 2005 p.112
55. **Marchi G, Viti C, Giovannetti L, Surico.** 2005. Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. *European Journal of Plant Pathology* 112, 101–12.
56. **Martin G.C., Ferguson L., Polito V.S., 1994**: Flowering, pollination, fruiting, alternate bearing and abscission. *In: Olive production manual*. Ferguson L., Steven Sibbett G. and Martin G.C. (Eds.), Univ. California Div. Agr. Natural Resources; Oakland, CA. Publ.,
57. **Matas I.M., Pérez-Martínez I., Quesada J.M., Rodríguez-Herva J.J., Penyalver R., & Ramos C., 2009** *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* contains two *iaaL* paralogs, one of which exhibits a variable number of a trinucleotide (TAC) tandem repeat. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 4, (February 2009), pp. 1030-1035, ISSN 0099-224
58. **Matas I.M., Pérez-Martínez I., Quesada J.M., Rodríguez-Herva, J.J., Penyalver, R. & Ramos C., 2009**. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* contains two *iaaL* paralogs, one of which exhibits a variable number of a trinucleotide (TAC) tandem repeat. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 4, (February 2009), pp. 1030-1035, ISSN 0099-2240.

59. **Matas, I.M.** 2010. Genómica funcional de la interacción *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*- olivo. Thesis (Ph. D.). Universidad de Málaga, Spain
60. **Mendil M et Sebai A., 2006.** Catalogue national des variétés de l'olivier. 100p.
61. **Moore, W. E. C., and L. V. H. Moore (ed.). 1989.** Index of bacterial and yeast nomenclatural changes, p. 49. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
62. ***Nerium oleander* L.** Int. J. Syst. Bacteriol. **32:166-169.**
63. **Osman.,WA, Tarabeih.,AM, Michail.,SH.** 1980. Studies on the distribution of olive knot disease induced by *Pseudomonas savastanoi* in Iraq. *Mesopotamia Journal of Agriculture* **15**, 235–243 [English abstract]
64. **Pagno I.J., 1975** - l'olivier. Ed. Edition Aubanel. p. 70
65. **Pecnold, P. C., and R. G. Grogan. 1973.** Deoxyribonucleic acid homology groups among phytopathogenic *Pseudomonas* species. Int. J. Syst. Bacteriol. **23** :111-121.
66. **Pérez-Martínez I., Zhao Y., Murillo J., Sundin G.W., Ramos C.** 2008. Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids. J Bacteriol. ;190:625–635
67. **Pérez-Martínez, I., Zhao, Y., Murillo, J., Sundin, G.W., & Ramos C.** 2008. Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids. Journal of Bacteriology, Vol. 190, No. 2, (January 2008), pp. 625-635, ISSN 0021-9193
68. **philippe . L.** 2007 les phytopathogènes- chapitre 4 phytopathologie ED. New York 432p
69. **Plleroni., N. J.** 1984. Genre 1 *Pseudomonas* Migula. Bergey's Manual of systemic Bacteriology. Krieg NR. Holt JG. Ed. Vol. **1**: 141-199p.
70. **Prévot A.,** 1961. Traité de systématique bactérienne. Dunod, Paris.
71. **Protta, U.** 1995. Le malattie dell' olivo. Informatore Fitopatologico, No. 12, pp. 16-26, ISSN0020-0735
72. **Quesada J.M., García A., Bertolini E., López M.M., Penyalver R., 2007:** Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* from symptomless shoots of naturally infected olive trees. Int. Microbiol. **10**, 77e84.
73. **Quesada J.M., Penyalver R., Pérez-Panadés J., Salcedo C.I.,**
74. **Quesada, J.M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C.I., Carbonell, E.A., & López, M.M.** 2010. 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
75. **Resende MLV, Flood J, Ramsden JD, Rowan MG, Beale MH, Cooper RM.** 1996. Novel phytoalexins including elemental sulphur in the resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to verticillium wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) PhysiolMol Plant Pathol. **48**:347–359.
76. **Robb. 1978.** A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. N. Z. J. Agric. Res. **21**:153-177.

77. **Roger., C.** 1990. Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Verticillium wilt on yield of olive trees (cvs. Barnea and Souri) irrigated with saline water in Israel. *Phytoparasitica* 31:333–343
78. **Ruffaldi.,GB** .1972. Olive pruning. *Informatore Agrario* 28, 7807–7809 [English abstract]
79. **Sahli Z., 2009** : Produits de terroir et développement local en Algérie Cas des zones rurales de montagnes et de piémonts. Options méditerranéennes, Les produits de Terroir, les Indications Géographiques et le Développement Local Durable des Pays Méditerranéens. Pp : 306-338
80. **Salmond G. P. C.**1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. **32**:181-200
81. **Sands, D. C., M. N. Schroth, and D. C. Hildebrand. 1970.** Taxonomy of phytopathogenic pseudomonads. *J. Bacteriol.* **101**:9-23
82. **Schaad N. W., Jones J. B., Chun W., 2001:** Initial identification of common genera. In: Schaad N. W., Jones J. B. and Chun W. (eds.). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, pp. 84–120. Third edition. APS, St. Paul, MN.
83. **Sebald., M. et Petit., J.C., 1997-** Mémento techniques de microbiologie. Ed. Corlet, Paris.
84. **Seeliger, and W. A. Clark (ed.). 1975.** Internationalcode of nomenclature of bacteria. **1975** Revision. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
85. **Sisto A, Cipriani MG, Morea M.**2004. Knot formation caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive plants is hrp-dependent. *Phytopathology* 94, 484–9.
86. **Sisto A., Cipriani M.G., Morea M.** 2004.Knot formation caused by *Pseudomonas savastanoi* subsp. *savastanoi* on olive plants is hrp/hrc dependent. *Phytopathology*;94:484–489. [PubMed]
87. **Sisto, A., & Iacobellis, N.S.**1999. La “Rogna dell’ olivo”: aspetti patogenetici, epidemiologici e strategie di lotta. *Olivo & olio*, Vol. 2, No. 12, pp. 32-38, ISSN 1127-0713
88. **Sisto, A., Cipriani, M.G., & Morea, M.**2004. Knot formation caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive plants is hrp-dependent. *Phytopathology*, Vol. 94,. 484-489, ISSN 0031-949X
89. **Skerman, V, B. D., V. McGowan, and P. H. A. Sneath (ed.), 1989.** Approved lists of bacterial names. Amended edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
90. **Smidt M., Kosuge T., 1978:** The role of indole-3-acetic acid accumulation by alphanmethyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. *Physiol. Plant Pathol.* 13, 203e214.

91. **Smidt M., Kosuge T.** 1978. The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha-methyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation in oleander. *Physiol Plant Pathol* ; 13:203–214.
92. **Smith E.D., 1908:** Recent studies on the olive tubercle organism. *Bull. Bur. Plant Ind. U. S. Dep. Agric.* **131:2543**
93. **Smith E. D, 1908.** Recent studies on the olive tubercle organism. *Bull. Bur. Plant Ind. U. S. Dep. Agric.* **131:2543**
94. **Smith, E.F.** 1920. Pathogenicity of the olive knot organism on hosts related to the olive. *Phytopathology*, Vol. 12, pp. 271-278, ISSN 0031-949X
  
95. **Smith, I.M., Dunez, J., Lelliot, R.A., Phillips, D.H., & Archer, S.A.** 1991. *Manual de enfermedades de las plantas*, Editorial Mundi-Prensa, ISBN 84-7114-358-5, Madrid, Spain
96. **Stevens F. L., 1913.** The fungi which cause plant disease. Macmillan Co., New York.
97. **Surico G, Iacobellis NS, Sisto A,** 1985. Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiological Plant Pathology* **26, 309–20.**
98. **Surico G, Sparapano L, Lerario P, Durbin RD, Iacobellis NS.** 1975. Cytokinin-like activity in extracts from culture filtrates of *Pseudomonas savastanoi*. *Experientia* 31, 929–30.
99. **Surico., G.** 1977. Histological observations on tumours of olive knot *Phytopathologia Mediterranea* **16**, 109–125 [English abstract].
100. **Teviotdale, B.L., & Krueger, W.H.** 2004. Effects of timing of copper sprays, defoliation rainfall, and inoculum concentration on incidence of olive knot disease. *Plant Disease*, Vol. 88, No. 2, (February 2004), pp. 131-135, ISSN 0191-2917,
101. **Varvaro L, Surico.** 1978. Moltiplicazione di *Pseudomonas savastanoi* (EF Smith) Stevens nei tessuti dell'Olivo (*Olea europea* L.). *Phytopathologia Mediterranea* 17, 178–86.
102. **Varvaro, L., & Ferrulli, M.** 1983. Sopravvivenza di *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Smith) Young et al. sulle foglie di due varietà di olivo (*Olea europea* L.). *Phytopathologia Mediterranea*, Vol. 22, No. 1/2, (April 1983), pp. 1-4, ISSN 0031-9465
103. **Wilson, E.E., & Ogawa, J.M.** 1979. Fungal, bacterial, and certain nonparasitic diseases of fruit and nut crops in California, Division of Agricultural Sciences University of California, ISBN 093187629X Berkeley, USA,
104. **Wilson, E.E.** 1935. The olive knot disease: its inception, development and control. *Hilgardia*, 9, pp. 233-264
105. **Young, J.M., Saddler, G.S., Takikawa, Y., De Boer, S.H., Vauterin, L., Gardan, L., Gvozdyak, R.I., & Stead, D.E.** 1996. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Review of Plant Pathology*, 75, 721-763.
106. **Young., JM .** 1987. Orchard management and bacterial diseases of stonefruit. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* **15**, 257–266.



---

**Composition de milieux de culture****Milieu LPGA :**

Extrait de levure	5g
Bactopeptone	5g
Glucose	10g
Agar bactériologique	18g
Eau distillé	1L

**Milieu King B :**

Peptone	20g
Glycérol	15ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5g
MgSO <sub>2</sub>	1.5g
Agar	20g
Eau distillé	1L

**Milieu ARGININE :**

Bactopeptone	1g
NaCl <sub>2</sub>	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3g
Agar bactériologique	3g
Rouge de phenol	10ml
Solution 0.1%	
Arginine	10g
Eau distillé	1L

**Milieu LIVANE:**

Extrait de levure	20g
Bactopeptone	15g
NaCl <sub>2</sub>	1.5g
Saccharose	1.5g
Agar bactériologique	15g
Eau distillé	1L

**Milieu YDC (Yeast Dextrose Carbonate de calcium et agar) :**

Extrait de levure	10g
CACO <sub>2</sub>	20g
Glucose	20g
Agar	18g
Ph=7.2	

**Milieu hugh et leifson :**

Bactopeptone	2g
NaCl <sub>2</sub>	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3g
Bleu de promothymol	1% 3ml
Glucose	10g
Agar	3g
Eau distillé	1L

**Milieu NA:**

Extrait de levure	3g
Pactopeptone	5g
Agar	18g
Ph=7.2	