

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Amar Telidji- Laghouat



FACULTE : Des Sciences
DEPARTEMENT : AGRONOMIQUE



MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : Megoussi Meriem

DOMAINE : Science de la nature et de la vie

Filière : Science Agronomiques

OPTION : Protection des végétaux

Thème

**Contribution à l'identification de l'agent causal de
quelques anomalies pathologiques chez l'olivier dans la
région de Laghouat**

Soutenu devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
Mme .Touati-H. Sihem	MCB	Président
Mr. Rahmani Mokhtar	MCB	Examineur
Mlle. ZAZA Messaouda	MAA	Promoteur

Année Universitaire : 2022-2023.

Remerciements

En premier lieu, je remercie **ALLAH** le toute puissant de m'avoir donné la volante, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Je remercie chaleureusement mon encadreur Melle **Zaza M.** pour son aide précieuse et ses conseils éclairés dans la direction de mon travail dans sa meilleure forme, ainsi que pour sa grande disponibilité et son immense gentillesse. Je lui dois une immense reconnaissance et un très grand respect.

Mes remerciements vont particulièrement aux membres du jury Madame **Touat S.** et Monsieur **Rahmamani M.** qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir examiner mon travail et de l'enrichir par leurs propositions. Un grand merci chaleureux pour tous nos collègues. Nous avons partagé ensemble nos doutes et nos craintes, nous n'oublierons jamais tous les moments que l'on a partagés ensemble.

Enfin, je remercie toutes les personnes ayant participé de
près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Dédicaces

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots
ne sauraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la
reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que Je dédie ce Mémoire ...
A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source
de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir,
que dieu le garde dans son vaste paradis ; Mon Père . A la lumière de*

*mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon
bonheur ; Ma mère Aux personnes qui m'ont énormément aidée et Pour
leur soutien morale ; Mes très chers sœurs et Mon frère... À toute Ma
famille . A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études A
toutes celles et à tous ceux qui m'aiment... A tous mes chers amis...*

Introduction	01
Chapitre 01: Généralités sur l'arbre de l'olivier	
1.. Origine et historique de l'olivier	05
2. . Classification botanique de l'olivier	05
3. Description morphologique de l'olivier	06
4. Cycle végétatif annuel de l'olivier	07
5. Exigences de l'olivier	08
6. Répartition géographique	08
6.1 Dans le monde	09
6.2. En Algérie	10
7. Principaux ravageurs et maladies de l'olivier	10
Chapitre 02: La tuberculose de l'olivier	
1. Généralités	14
2. Classification de Pseudomonas savastanoi	14
.3. Symptômes et dégâts	15
4. Processus d'infection	17
5. La lutte contre la tuberculose de l'olivier.	18
Chapitre III:Matériel et méthodes	
1.Rajeunissement des isolats	19
2. Identification phénotypique des isolats	19
3. Tests biochimiques	19
3.1 Coloration de Gram	19
3.2 Test KOH	19
3.3 Test de fluorescence	20
3.4 Test Hugh et Leifson	21
4. Test biochimiques (LOPAT)	21
4.1 Test Levane	21
4.2 Test Oxydase	22

4.3 Test de l'activité pectinolytique	23
4.4 Test d'arginine di hydrolase (ADH)	24
4.5 Test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac	25
Chapitre III: Résultats et interprétations	
1- Les Tests biochimiques	28
1.1 Coloration de Gram	28
1.2 Test KOH	28
1.3 Test de fluorescence	29
1.4 3 Test Hugh et Leifson	30
2. Tests LOPAT	32
2.1 Test Levane	32
2.2 Test Oxydase	33
2.3 Test Pectinase	33
2.4 Test d'arginine di hydrolase (ADH)	34
2.5. L'hypersensibilité sur les feuilles de tabac	35
Discussion général	38
Conclusion et perspectives .	43
Références	
Béblioghrafique	
Résumé	

Liste des abréviations

FAO : Food and Agriculture Organisation of the united nations.

COI : Conseil Oléicole International.

DSA : Direction des Services Agricoles.

g : gramme.

ml : millilitre.

ha : hectare.

n° : numéro.

% : pourcentage.

µm: Micromètre.

q/ha : Quintaux par Hectare.

C° : degré Celsius.

mn : minute.

cm : centimètre.

t: tonne.

h : heure.

m : mètre.

UE : Union Européenne

Qtx : Quintaux.

La liste des Figures

Figure 01 : Répartition des superficies globales dans le monde.

Figure 02 : Symptômes typiques de la tuberculose d'olivier.

Figure 03 : Répartition des zones d'oliviers en Algérie.

Figure 04 : Photo du test KOH (Original, 2023).

Figure 05: Photo d'ensemencement sur le milieu King B.

Figure 06 : Photo du test Hugh et Leifson (Original, 2023).

Figure 07: Photo du test Levane (Original, 2023).

Figure 08 : Photo du test Oxydase (Original, 2023).

Figure 09 : Photo du test Pectinase (Original, 2023).

Figure 10 : Photo du test Arginine dihydrolase (Original, 2023).

Figure 11 : Photo du test Hypersensibilité sur les feuilles de tabac (Original, 2023)

Figure 12 : Résultat du Coloration de Gram (Original, 2023).

Figure e 13 : Résultat du test KOH (Original ,2023).

Figure 14 : Résultat du test Hugh et Leifson (Original, 2023).

Figure 15 : Résultat de test de fluorescence sur King B (Originale, 2023)

Figure 16 : Résultat du test Levane (Original ,2023).

Figure 17 : Résultat du test Oxydase (Original, 2023).

Figure 18 : Résultat du test Pectinase (Origina , 2023).

Figure 19 : Résultats du test Arginine dihydrolase (Originale, 2023).

Figure 20 : Résultat du test de l'hypersensibilité (Original, 2023).

La liste des tableaux

Tableau 01 : Résultats des tests “ KOH, coloration de Gram, la fluorescence et test Hugh et Leifson.

Tableau 02: Résultats des tests LOPAT.

Introduction

Introduction

Olivier (*Olea europaea*), ancien arbre fruité cultivé dans le monde entier notamment le bassin méditerranéen, ayant une grande importance nutritionnelle, économique, et sociale (Guo et al., 2018) il existe plus de 750 millions d'oliviers dans le monde entier dont 95% sont concentrés sur le pourtour méditerranéen (Muzzalupo et al., 2014). . En fait, le patrimoine génétique oléicole mondial est très riche en variétés. Il est constitué de plus de 2600 variétés différentes (Muzzalupo et al., 2014).

L'Algérie est l'un des principaux pays méditerranéens dont le climat est des plus propices à sa culture (Bensemmane, 2009). L'État algérien a consacré un programme important pour le développement de la filière oléicole permettant la plantation de nouveaux vergers et la réhabilitation des anciens. Elle avait lancé un programme de plantation de 500 000 Ha d'olivier en intensif dans le nord et le sud du pays (Argenson, 2004) essentiellement avec les variétés les plus dominantes Chemlal et Sigoise. L'Algérie estime une superficie oléicole d'environ 348 196 ha avec une production moyenne d'environ 40.000 (t) d'huile d'olive et 587 8 (t) d'olive de table (Boulkroune & Guissous, 2016). La filière oléicole en Algérie souffre de multiples contraintes qui entravent son épanouissement, sa modernisation et son ascension. Les maladies et les ravageurs d'olivier sont parmi ces contraintes.

L'olivier peut être attaqué par de nombreux bioagresseurs, essentiellement des insectes, et des maladies. La plupart des maladies de l'olivier sont causées par des bactéries, des virus et des champignons (Latef, 2018). Parmi les maladies fongiques qui constituent véritable menace pour la culture de l'olivier, la verticilliose et l'œil de paon. Cependant, la tuberculose d'olivier et le complexe de dessèchement rapide de l'olivier dénommé CoDiRO du à *Xylella fastidiosa* sont parmi les maladies bactériennes les plus redoutables chez l'olivier, et ce, vu leurs impact sur le rendement (Chliyeh et al., 2014).

La tuberculose d'olivier causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* est considérée comme un problème important pour les cultures d'oliviers en raison de son effet sur la croissance végétative (déclin des branches et des pousses, mort des petites branches et brindilles), le rendement en olives et même éventuellement sur la qualité de l'huile d'olive grâce à des caractéristiques organoleptiques inférieures telles qu'une odeur désagréable et un goût amer et rance (Godena et al., 2012). Les symptômes de cette maladie se manifestent sous forme d'hypertrophies et hyperplasies caractéristiques nommées galles (tumeurs) sur la partie aérienne d'olivier ; rameaux, tronc (Roberto et al., 1990), et occasionnellement sur feuilles et fruits (Ramos et al., 2012 ; Sisto et al., 2004). Cette bactérie peut survivre sur les oliviers en tant qu'épiphyte, et est un agent phytopathogène opportuniste des plaies (Nguyen, 2017). Cette maladie agit sur la croissance des repousses et elle affecte les organes reproducteurs. L'intensité des dégâts provoqués est fortement liée au nombre de tumeurs par arbre. (Benjama., 2003).

Dans le présent travail, des isolats bactériens prévenant d'une oliverie de la région de Laghouat. Ces isolats bactériens ont été isolés à partir de tumeurs d'olivier. Dans l'objectifs de déterminer l'agent causal de ces anomalies pathologiques (tumeurs), nous nous sommes proposées à travers la présente étude de faire identification phénotypiques et biochimiques l'éventuel agent causale de ces nœuds; notre étude constitue une contribution à l'étude de la maladie de la tuberculose d'olivier en Algérie.

Le plan de travail suivi dans ce travail se divise en trois parties : une partie bibliographique qui a porté sur l'olivier et la maladie de tuberculose de l'olivier et une partie pratique qui a été consacré à l'identification de l'agent causal des tumeurs d'olivier par une série de tests biochimiques et biologiques.

Chapitre I :
Généralités sur l'arbre de
l'olivier

CHAPITRE I : Généralités sur l'arbre de l'olivier

1. Origine et historique de l'olivier

L'olivier a une origine très ancienne. Son apparition et sa culture remonterait à la préhistoire, l'origine de l'olivier se trouve précisément dans les pays en bordure de berceau des civilisations qu'est la méditerranée : Syrie, Égypte, Liban, Grèce ou Rome et autres, bien que d'autres hypothèses soient admises mais celle de De Candolle est la plus fréquemment retenue ; qui désigne que la Syrie et l'Iran comme lieux d'origine de l'olivier (Miner, 1995).

Les premières traces sauvages d'olivier ont été retrouvées en Asie mineure et date d'il y a plus de 14000 ans. Des fouilles sur des sites préhistoriques ont permis de retrouver des feuilles fossilisées datant du paléolithique ou du néolithique ainsi que des traces de charbon et de pollens, en bordure du Sahara datant d'environ 12000 ans avant J-C. on ne connaît pas avec certitude le lieu où l'homme a commencé à cultiver l'olivier, mais on s'accorde pourtant à reconnaître que 3500 avant J-C, elle se serait faite en Syrie (Loumou et Giourga, 2002). Selon Amouretti et Comet (2000), il existe deux théories qui concernent les premiers oléiculteurs : certains mentionnent la Phénicie, d'autres la Crète, ou certains Amphores Pithoi datant de 3500 av. ont été découverts. L'huile d'olive est y constituait l'objet d'un commerce important, car il s'y trouvait des tablettes de compte et d'autres objets.

3. Classification de l'olivier

L'olivier appartient à l'ordre botanique des Ligustales, famille des Oléacées, Cette famille comporte un grand nombre d'espèces différentes réparties à la surface du globe (Wallander et Albert, 2000). L'espèce qui est cultivée dans le monde méditerranéen est l'*Olea europaea* (Lumaret et Ouazzani, 2001) dans laquelle on rencontre l'oléastre ou olivier sauvage, et l'olivier cultivé (*Olea europaea sativa*) (Amouretti, 2000). La classification de l'olivier, selon Therios (2009) est la suivante:

Règne: Plantae.

Embranchement : Magnoliophyta

Sous-embranchement : Magnoliopsida

Classe : Dialypétales

Sous-classe : Lamiales

CHAPITRE I : Généralités sur l'arbre de l'olivier

Famille : Oleaceae

Genre : *Olea*

Espèce : *Olea europaea*

4. Description morphologique de l'olivier

L'olivier Arbre vigoureux qui peut atteindre, non taillé, 10 à 15 m de haut. Généralement il ne dépasse pas 3 à 4 m de haut. Branches tortueuses aux nombreux rameaux arrondis à feuilles oblongues, lancéolées. Fleurit en mai-juin-juillet (suivant la variété) en grappes terminales ou axillaires, donnant des fruits pendants, gros, à formes variées mais peu nombreux. Une très longue culture le rendit généreux et fertile, mais en revanche il devint sensible, délicat au froid ou a la chaleur et multiplia les variétés suivant les contrées ou le micro-climat (Pagnol , 1975)

4.1. Système racinaire

L'olivier présente un système racinaire puissant, qui confère à la plante une adaptation à la profondeur et aux caractéristiques physiques et chimiques du sol. le développement en profondeur peut se situer entre 15 à 150 cm. Selon la texture du sol, dans les sols sablonneux, les racines peuvent atteindre jusqu'à 6m de profondeur. (Civantos, 1998).

□ Le tronc

le tronc d'olivier est tout d'abord lisse, gris verdâtre durant dix années environ. Puis au vieillissement, il se déforme en devenant noueux, crevassé, fendu, élargi à la base et d'une couleur gris foncé presque noire (Pagnol., 1975).

□ Les feuilles

Les feuilles sont persistantes (durée de vie 3 ans), simples, entières, lancéolées, coriaces, vert foncé dessus (cuticule importante), argentées dessous (nombreux polis pour limiter la déperdition d'eau) (Aillaud,. 1988). Les feuilles d'olivier sont riches en triterpènes, flavonoïdes, sécoiridoïdes (Ghedira, 2008).

CHAPITRE I : Généralités sur l'arbre de l'olivier

□ **Les fleurs**

Les fleurs de l'olivier sont petites, et elles sont regroupées sur des grappes composées de dix à cinquante fleurs, en fonction de la variété de l'olivier. Elles sont de couleur blanche, leur centre est jaune et elles sont formées d'un calice de petite taille à quatre pétales, d'une corolle uniforme, de deux étamines et d'un limbe formé à son tour par quatre lobes (Pagnol, 1975).

□ **Le fruit**

Pour les fruits olive, sont des drupes ovoïdes de forme sphérique, vert puis noires à maturité, à mésocarpe charnue et recouvert par un péricarpe lisse et un noyau ou endocarpe fusiforme (Ghedira, 2008).

5. Cycle de développement végétatif de l'olivier

On distingue quatre périodes dans le cycle de l'olivier (l'ITAF, 2013):

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

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

CHAPITRE I : Généralités sur l'arbre de l'olivier

6. Exigences climatiques de l'olivier

6.1. Exigences climatiques

- **Humidité atmosphérique:** Elle peut être utile dans la mesure où elle n'est pas excessive (+60%) ni constante car elle favorise le développement des maladies et des parasites (l'ITAF, 2013).
- **La température :** Il semble que l'olivier a besoin d'amplitudes thermiques jour-nuit supérieures à 10°C, pendant au moins une partie de son cycle annuel : ces amplitudes doivent s'accompagner de températures minimales suffisamment basses pendant la phase d'induction florale et jusqu'à la floraison pendant au moins 2 ou 3 mois (Baldy, 1990).
- **Pluviométrie :** A moins de 350 mm de pluie la culture sans irrigation ne peut être économiquement rentable. En intensif l'irrigation doit être obligatoire et permanente.(l'ITAF, 2013).

6.2. Exigences Édaphiques

- **Sol :** Les sols sableux sont convenables pour l'olivier à condition qu'ils soient bien pourvus en eau et en éléments nutritifs. Et Les sols argileux sont convenables pour l'olivier à condition qu'ils soient bien drainés avec un taux d'argile inférieur à 35% (Masmoudi *et al.*, 2016).
- **Altitude :** L'altitude de culture de l'olivier dépend de l'altitude. Les limites à ne pas dépasser sont de 700 à 800 m pour les versants exposés au nord et de 900 à 1000 m pour les versants exposés au sud (l'ITAF, 2013).

7. Répartition géographique

7.1 Dans le monde

L'olivier est présent sur les six continents : Europe, Amérique du nord, Amérique du sud, Afrique, Asie, Océanie. Toutefois, c'est dans le pourtour méditerranéen que l'on retrouve plus de 90 % des oliviers. Les principaux vergers d'olivier se situent en Espagne, en

CHAPITRE I : Généralités sur l'arbre de l'olivier

Tunisie, en Italie, en Turquie, en Grèce, au Maroc, en Syrie, Portugal et en Algérie (Argenson *et al.*, 1999).

L'olivier (*Olea europaea* L.) est l'un des arbres de production les plus importants et les plus transcendants que l'on trouve dans l'ouest et le centre de l'Italie et de l'Espagne, dans le sud du Maroc et de la Tunisie, dans l'ouest de la Turquie et en Grèce (Loumou et Giourga, 2003). Il sert de source de fruits et d'huile comestibles à des millions de personnes dans diverses régions de Turquie. À l'heure actuelle, la production mondiale d'huile d'olive dépasse 2 500 000 tonnes. En 2015, la production globale des États membres du Conseil oléicole international (COI) était de 2 964 500 tonnes, soit 94 % de la production mondiale. La production de l'UE était de 2 322 000 tonnes, tandis que la production de chaque État membre du COI montrait l'Espagne en tête avec 1 401 600 tonnes, suivie de l'Italie avec 474 600 tonnes, et enfin de la Grèce avec 320 000 tonnes. La Turquie a produit 143 000 tonnes, la Tunisie 140 000 tonnes, le Maroc 130 000 tonnes, l'Algérie 83 500 tonnes et l'Iran 5 000 tonnes (COI, 2015).

Répartition des superficies globales dans le monde. (Source: COI, 2010)		
	Surface en x1000 ha	%
Superficie en production	9 175	87
Superficie non productive	1 321	13
Cultures irriguées	2 266	22
Cultures en sec	8 229	78

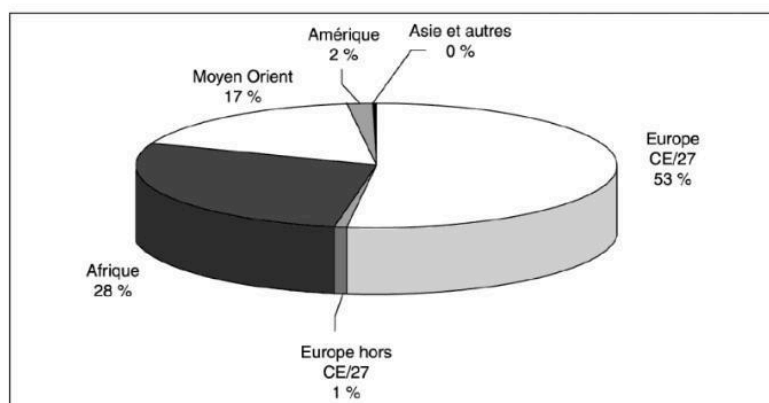


Figure 01: Répartition des superficies globales dans le monde (COI., 2010).

CHAPITRE I : Généralités sur l'arbre de l'olivier

7.2. En Algérie

L'olivier est une culture méditerranéenne par excellence, elle s'adapte très bien aux conditions pédoclimatiques de l'Algérie. Ces dernières années, l'oléiculture a connu une extension très significative dans les régions sahariennes. En Algérie, l'oléiculture joue un rôle économique, social et environnemental important. Le verger oléicole national couvre une superficie de plus 450 mille hectares avec un nombre d'olivier atteignant les 6.200.000 arbres (Amrouni *et al.* , 2021).

Les rendements en olives entre 2000-2010 étaient de 12,8 à 25 kg/arbre puis ces rendements sont passés à 30,7 à 40 kg/arbre durant les cinq dernières années (COI, 2021).

8. Principaux ravageurs les maladies de l'olivier

8.1.Principaux ravageurs

L'olivier est menacé par l'attaque de plusieurs maladies et ravageurs dont les dégâts peuvent avoir des répercussions importants sur le rendement de l'arbre d'olivier.

. La mouche de l'olivier

La mouche de l'olive est actuellement le ravageur le plus dommageable en oléiculture car ses attaques affectent très notablement la qualité des olives et de l'huile, Les dégâts engendrés par la mouche sont à la fois d'ordre quantitatif et qualitatif. En effet, le développement de la larve à l'intérieur de l'olive affecte directement l'alimentation du fruit, sa maturation et sa force d'attachement au pédoncule, provoquant ainsi une chute accélérée (Coutin., 2003).

La Teigne de l'olivier

La teigne appartient à la de la famille des Yponomeutidés, effectue trois générations annuelles. Les chenilles des trois premiers stades vivent en mineuses, puis elles dévorent totalement les feuilles. Les cocons sont tissés dans les feuilles repliées par des fils soyeux. Elles pénètrent aussi dans les olives et provoquent leur chute anticipée (Coutin, 2003).

Le scolyte de l'olivier

CHAPITRE I : Généralités sur l'arbre de l'olivier

Le scolyte s'attaque surtout aux branches des et arbres affaiblis. Il se distingue facilement des autres scolytes par ses antennes à massue flabelliforme. Il y a deux ou trois générations par an. Les galeries maternelles de ponte sont profondément creusées dans l'aubier. Les galeries larvaires sont longues et sinueuses. Il vit aussi dans les Frênes et les Lilas (Coutin, 2003).

8.2. Les maladies fongiques

La fumagine

La fumagine, est une maladie fongique provoquée par un complexe de champignons (*Capnodium* ou *Fumago salicina*). Elle se manifeste par un dépôt noirâtre, semblable à de la suie, qui recouvre la surface des feuilles et du bois. se développe sur le miellat sécrété par la cochenille noire de l'olivier. En recouvrant la surface des feuilles, la fumagine limite la photosynthèse et les échanges gazeux de l'olivier. La croissance de l'arbre et la production d'olives s'en trouvent réduites. Dans des cas plus sévères, la persistance de la fumagine peut causer une défoliation (AFIDOL., 2016).

La verticilliose

Le flétrissement verticillien causé par *Verticillium dahliae* est une maladie très fongique répandue dans les vergers d'olivier. Dans le cas de la verticilliose d'olivier deux types de symptômes peuvent s'observer l'apoplexie et le déclin (dépérissement) lent. L'apoplexie se caractérise par un dépérissement rapide des rameaux et des branches, tandis que le déclin lent consiste en un dessèchement rapide des inflorescences accompagné d'une chlorose et d'une nécrose des feuilles (Jurado *et al.*, 1993). Mais généralement c'est en mars et avril que les dessèchements sont les plus spectaculaires.

Chapitre II:

La tuberculose de l'olivier

1. Généralités sur la tuberculose de l'olivier

La tuberculose est considérée comme la première des maladies de l'olivier ayant une référence historique. Le philosophe grec Théophraste (372 - 287 avant JC), affirme que « les oliviers souffrent de callosités, aussi appelées ou nœuds » (Scortichini *et al.*, 2004). En Algérie la maladie est traditionnellement connue, elle était localisée dans la région de l'Est vers les années 1960 (Benjema, 1998).

La bactérie phytopathogène *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Ps. savastanoi*) est un résident commun de la phyllosphère de l'olivier (Ercolani., 1971). Cette bactérie a la capacité de passer d'un mode de vie épiphyte sensu (Laben ., 1981) à un mode de vie parasitaire chaque fois que des blessures de nature diverse permettent à la bactérie d'envahir les tissus de l'hôte (Ciccarone., 1950). Le résultat macroscopique est la formation de nœuds. Dans le processus de différenciation des nœuds, un certain nombre de facteurs de virulence produits par la bactérie jouent un rôle fondamental (Surico *et al.*, 1975) et (Sisto *et al.*, 2004). Cette maladie est considérée comme un problème majeur vu son effet néfaste sur la croissance, le rendement et surtout la qualité de l'huile d'olivier (Guido., 2005).

2. Classification de *Pseudomonas savastanoi*

Pseudomonas savastanoi est une espèce de bactéries Gram-négatif, appartenant à la famille des Pseudomonadaceae. C'est une bactérie phytopathogène qui attaque diverses espèces de plantes. Selon Young (1996), *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* appartient à :

Règne : Bacteria

Division : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : *Pseudomonas*

Espèce : *Pseudomonas savastanoi*

3. Symptômes et dégâts

Les symptômes de la tuberculose d'olivier se manifestent par la production d'excroissances ligneuses tumorales, pouvant atteindre plus de 10 cm de diamètre des tumeurs parenchymateuses de forme régulière à irrégulière, de couleur verte à noirâtre, et à surface lisses à rugueuse, qui se forment principalement sur les jeunes tiges ainsi que sur les branches et les rameaux (Barguigua *et al.*, 2020). Les tumeurs peuvent se former au niveau des sites de développement des bourgeons, aussi peuvent être formées sur des points d'entrée, telles que les plaies de taille, de récolte ou de blessures causées par le gel ou la grêle (Surico, 1986 ; Young *et al.*, 2004). Les jeunes rameaux perdent leur feuillage et se dessèchent quand les tumeurs sont bien développées, quant aux vieux rameaux ils perdent leur vigueur avec le temps, deviennent chétifs puis meurent. Les feuilles et les fruits sont rarement infectés (Quesada *et al.*, 2012).



Figure 02: Les symptômes typiques de la tuberculose d'olivier (Quesada et al., 2012).

4. Cycle biologique :

Le cycle de vie de *Pseudomonas savastanoi* passe par deux phases :

□ **Phase épiphyte:** *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) survit à la fois dans les tissus des tumeurs et comme un épiphyte sur les rameaux, les feuilles et les fruits. Le terme "épiphyte" est dérivé du "épi ; sur et phyte; plante ", ce qui signifie "sur la plante." Parce que l'agent pathogène survit mieux sur des surfaces d'écorce rugueuse que sur les feuilles, les populations des pathogènes sont plus élevées sur les rameaux que sur les feuilles

(Ercolani, 1993). La source potentielle de l'infection des plantes saines sont les bactéries épiphyties (Quesada *et al.*, 2010).

Pseudomonas savastanoi peut déclencher l'infection entre 5° et 37 ° C et cet intervalle permettrait aux bactéries de causer des infections tout au long de l'année. Cependant, les conditions optimales pour le développement de la maladie sont d'environ 22°-25 ° C et les périodes subséquentes subissent forte probabilité d'infection en l'automne et au printemps (Protta, 1995). La bactérie peut infecter l'olivier au tout moment de l'année et la formation des tumeurs se déclenche seulement quand les conditions sont favorables.

□ Phase endophyte :

Les bactéries endophytes sont définies comme des bactéries vivant dans les tissus végétaux sans faire un préjudice matériel (Kado, 1992). Selon d'autres auteurs, Psv pourrait également présenter une phase endophytes, se déplaçant à travers les espaces intercellulaires et même dans les vaisseaux du bois première zone infectée (Penyalver *et al.*, 2006 ; Wilson *et al.*, 1964 ; Wilson *et al.*, 1979).

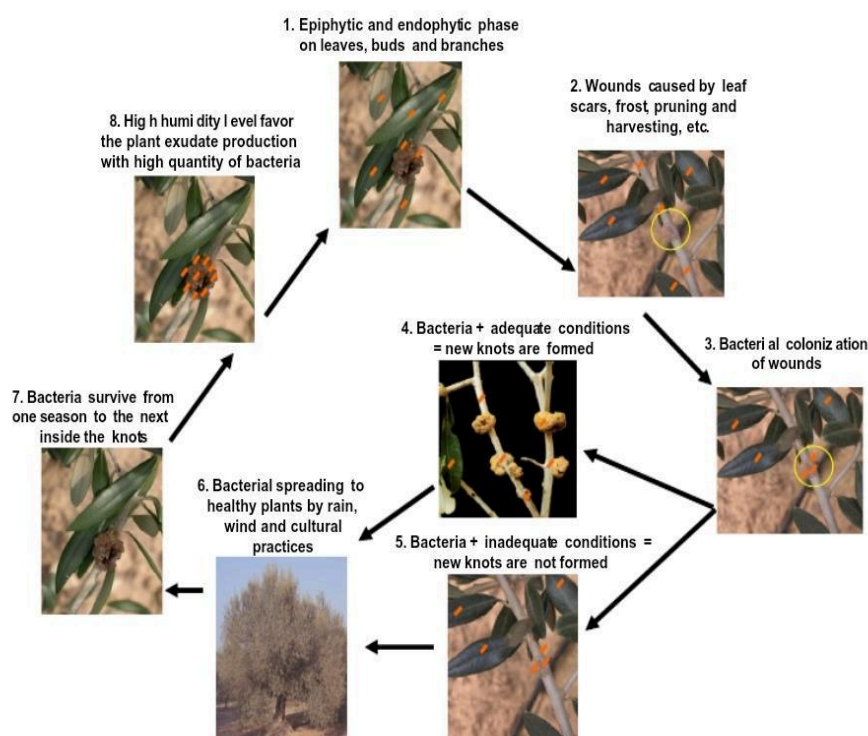


Figure 03: Cycle de la tuberculose d'olivier causée par *pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Bertolini, 2003).

4. Processus d'infection

L'établissement de l'infection nécessite des plaies, Les blessures causées par la récolte, la taille, la grêle, le gel et les cicatrices foliaires permettent à l'agent pathogène de pénétrer dans les tissus végétaux et de générer des nœuds . *P. savastanoi* peut avoir besoin de signaux libérés par les plantes via les plaies pour activer la formation de tumeurs, car lorsqu'il pénètre par les stomates, il n'est pas capable de générer des symptômes visibles (Surico, 1993).

L'agent pathogène colonise initialement les tissus autour du point d'infection et, grâce aux enzymes pectolytiques et hémicellulolytiques, perturbe l'intégrité des cellules hôtes puis peut envahir directement les vaisseaux du xylème (Marchi *et al.*, 2009).

Le développement de *Pseudomonas savastanoi* au sein du végétal s'accompagne de la sécrétion d'auxine bactérienne, entraînant une multiplication anarchique des cellules du bois. Cela conduit à la formation d'un chancre. Cette excroissance présente à sa surface un exsudat riche en bactéries et constitue une nouvelle source de contamination. Sous l'action des pluies et du vent, les bactéries sont ensuite disséminées au sein de l'arbre et du verger. En cas de vent violent, la bactérie peut être dispersée au sein d'aérosols sur plusieurs centaines de mètres autour du foyer initial. L'infection reste généralement localisée au niveau du point d'entrée de la bactérie. Dans des cas plus sévères, la bactérie est véhiculée par la sève et l'infection se propage aux parties voisines. Les branches se recouvrent alors d'un chapelet de galles (AFIDOL., 2019).

5. La lutte contre la tuberculose de l'olivier

Le traitement chimique au cuivre n'a aucun effet sur les arbres atteints, les ions de ce dernier peuvent être toxiques pour *Pseudomonas savastanoi* et peut également induire un état viable non cultivable, les polyphénols qui bloquent la formation des nœuds plus efficacement que le cuivre. Les moyens les plus efficaces de lutter contre la maladie serait d'utiliser des cultivars ou des variétés résistantes ou moins sensibles aux maladies bactériennes des plantes (Smith *et al.*, 1991).

Comme pour la plupart des maladies bactériennes, une lutte biologique est essentielle contre l'agent pathogène. *Bacillus subtilis* produit des antibiotiques tels zwittermicine-A et la Kanosamine, ainsi que d'autres lipoprotéines antimicrobiennes. Il a été démontré qu'une

protéine produite à partir de *Bacillus subtilis* réduit la taille des nœuds d'olives causée par *Pseudomonas savastanoi* (Krid *et al.*, 2012).

Chapitre III :

Matériel et méthodes

1. Rajeunissement des isolats

Les colonies de ces isolats ont fait l'objet de plusieurs repiquages sur le milieu KB jusqu'à obtention des d'isolats pures. Les boitesensemencées seront incubées à l'étuve à une température 27C° pendant 24 à 48 h

2. Les tests biochimiques

Ces tests permettent l'identification de caractères morphologiques et métabolique , parmi la forme , la structure des parois , production des pigment , les voies d'utilisation du glucose (fermentative ou oxydative) la coloration de gram , test KOH, fluorescence sur King B et test Hugh et Leifson_(Schaad., 1988).

2.1. Test de coloration de Gram

La coloration de gram est un test utilisé pour distinguer deux grands groupes bactériens: les bactéries gram négatif et les bactéries gram positif et permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne (Camille, 2014).

La technique de coloration de Gram consiste à prélever une colonie jeune âgée de 24 ou 48 heures et la mettre sur une lame avec une goutte d'eau distillée stérile pour faire un écouvillon en circulation. Puis, le frottis est séché et maintenu au-dessus d'une flamme. Le frottis sera enduit de violet de gentiane, qui doit être appliqué 1 minute puis rincer à l'eau de robinet , Après le Lugol, il sera ajouté et laissé agir pendant une minute pour améliorer la liaison du premier colorant avant d'être laver à l'eau du robinet . Une décoloration est faite à l'alcool 95° pendant 30 secondes suivi par un rinçage à l'eau ; ensuite le frottis sera recoloré par la fuchsine pendant 10 secondes puis rincé avec l'eau et séché. Une observation microscopique du frottis est faite à l'objectif X 40 et ,en utilisant une goutte d'huile à immersion à l'objectif X100 (Gutmann et williamson, 1987).

2.2. Test KOH

C'est un test qui a pour but de distinguer entre les bactéries gram positif et bactéries gram négatif, sur une lame microscopique nous avons s-mélangé goutte d'une solution de KOH (hydroxyde de potassium) à 3% et avec de colonies bactérienne âgée de 24heures en effectuant des mouvements circulaires. Après quelques secondes le mélange est tiré vers le

haut; s'il y aura une formation d'un filament entre la boucle de l'anse et la lame s'épaissit lorsque les bactéries sont des gram négatives sera visqueuse et formera une chaîne mucoïde dans les 30 secondes. S'il n'y a pas de viscosité observée la réaction est considérée comme négative, ce cela signifie que les bactéries sont des gram positifs) (Suslow *et al.*, 1981).



Test KOH (Original, 2023).

Après avoir effectué les tests de Gram et de catalase, les isolats à tester sur milieu King B en boîtes de pétri ont été incubés à une température de 27°C pour trois jours. Les colonies qui se sont développées sur milieu King B en boîtes de pétri ont été observées sous une lampe émettant une lumière ultraviolette ayant une longueur d'onde 254 – 360 nm (Lelliott *et al.*, 1966).

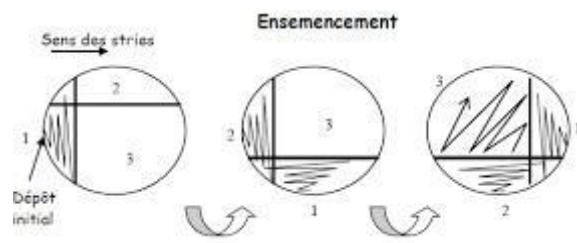


Figure 05 : Photo d'ensemencement sur le milieu King B .

2.4. Test hugh et Leifson

Le test hugh et leifson permet de vérifier si la bactérie étudiée utilise une voie métabolique oxydative ou fermentaire. Nous avons prélevé une colonies bactérienne âgée de 24h et à l'aide d'une anse de platine stérilisée nous avons ensemencé deux tubes gélosés contenant milieu Hugh et Leifson par piqure centrale l'un des deux tubes a été placé dans des condition anaérobies en ajoutant une couche d'huile de vaseline stérile d'environ 1.5 cm d'épaisseur à la surface de tube. Les deux tubes ont

été incubés à une température de 27° pendant 48 heures. Nous avons fait deux lectures une après 24heures et une deuxième après 48 heures (Francois *et al.*, 2012)

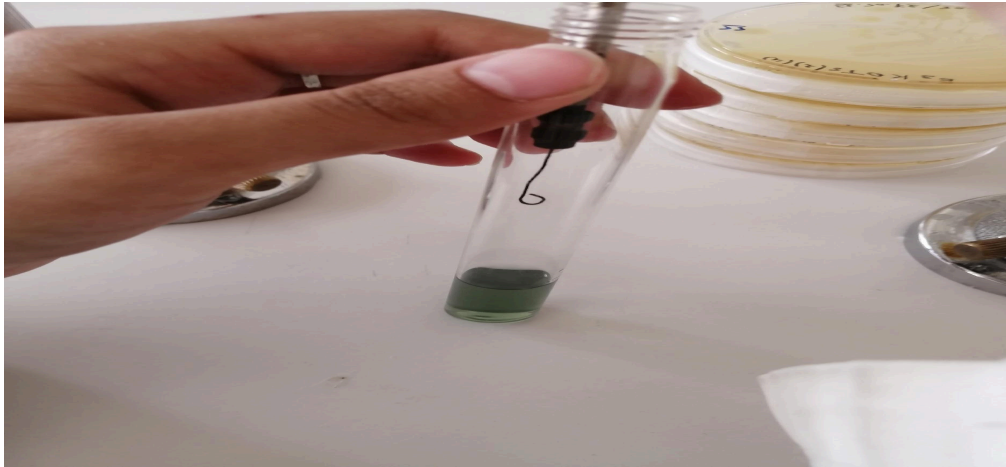


Figure06: Photo de Test Hugh et Leifson (Originale, 2023).

3.Test LOPAT

pour distinctif et permettent de différencier les souches appartenant au genre de *pseudomonas* nous avons utilisé les cinq tests suivants :(test de levan , présence d'oxydase , présence de pectinase , présence de l'arginine déshydrolase et tes d' Hypersensibilité sur feuilles de Tabac)(schaad., 1988).

3.1.Test Levane

Ce test permet de vérifier la polymérisation du fructose en poly-fructose par la bactérie testée. (Marchi *et al.*, 2005). A l'aide de l'anse de platine, l'ensemencement d'une colonie bactérienne jeune se fait par une série de stries sur une boîte de Pétri contenant le milieu Levane, puis incubées à 27° C pendant 3 à 5 jours. Le développement de colonies blanchâtres et convexes avec un aspect plutôt crémeux indique que la bactérie possède l'enzyme Levane-sucrase(test positive)et un possède un aspect lisses, très visqueuses légèrement sur élevées) cela nous permet de considérer nos isolats testés comme des levan négatifs (Goszczyńska *et al.*, 2000) et (Moretti *et al.*, 2008).



● **Figure07: Photo de Test Levane (Originale, 2023).**

3.2. Test Oxydase

Le test oxydase permet de mettre en évidence la présence (ou non) du complexe enzymatique: cytochrome-oxydase (cytochrome C19) dans la chaîne respiratoire des bactéries). Ce test est réalisé en utilisant des des bâtonnets d'oxydase. Un de ces des bâtonnets est placé dans une boîte de Petri vide. On dépose sur celui-ci une colonie bactérienne jeune âgée de 24 heures, en utilisant une pipette Pasteur stérilisée au préalable. Après écoulement de 60 secondes, l'apparition d'un composé coloré en violet qui est l'indophenol suite à l'oxydation du réactif phénylenediamine indique un résultat positif. En cas d'absence de couleur indique un résultat négatif (Steel, 1961).



Figure08: Photo de test Oxydase (Original, 2023).

3.4. Test Pectinase

Le test Pectinase permet de vérifier l'activité pectinolytique d'une bactérie c'est-à-dire sa capacité à dégrader la pectine présente dans un milieu de culture spécifique ou des tranches de pomme terre .Dans notre essai, on a utilisé les tranches de la pomme de terre comme source de pectine. Les tranches sont stérilisées à l'éthanol (95%) puis lavées à l'eau distillée stérile et séchées. Les tranches ont été déposées dans une boîte de pétri contenant du papier filtre mouillé, des colonies bactériennes fraîchement prélevées ont été inoculées au centre des rondelles et incubées à 27° C pendant sept à quatorze jours, l'odeur indésirable et l'apparition de nécrose signifie la présence de l'enzyme pectinase (Ghanney et al 2016.,)

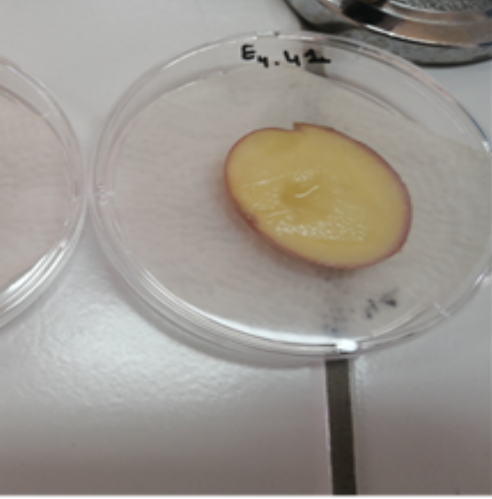


Figure09: Photo de Test pectinase (Originale, 2023).

3.5.TEST Arginine

Ce test sert à déterminer la présence ou l'absence de l'arginine dihydrolase,. dans ce test, une colonie bactérienne jeune âgée de 24 heure a été ensemencée dans deux tubes contenant milieu arginine semi solide par piqure centrale; l'un des deux tubes est couvert avec 1.5 cm d'huile de vaseline stérile. Ces tubes sont ensuite incubés à l'étuve à 27°C ;

Après 4 jours d'incubation, le test est considéré comme positif s'il y a un changement de couleur rose en rouge dans des conditions d'anaérobiose, s'il n'y a pas de changement de couleur, le test est dite négatif (Thornley, 1960)



Figure10:photo de test Arginine (originale, 2023).

3.6. Test d'hypersensibilité sur feuilles de Tabac

Le test d'hypersensibilité permet de mettre en évidence la réaction rapide de défense de la plante contre la pathogénicité bactérienne par le dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac. Pour ce test, nous avons injecté une suspension bactérienne, d'une culture jeune âgée (24 à 48 heures) (à une concentration d'environ 10^8 cfu/ml) entre l'épiderme et le parenchyme palissadique d'une feuille de tabac à l'aide d'une seringue. Le test est considéré positif s'il apparaît au bout de 24 heures, une plage nécrotique correspondant à la zone infiltrée. Le test est négatif si aucune réaction n'est observée (Schaad *et al.*, 2001).



Figure11: Photo du test de l'hypersensibilité sur feuilles de tabac (Original , 2023).

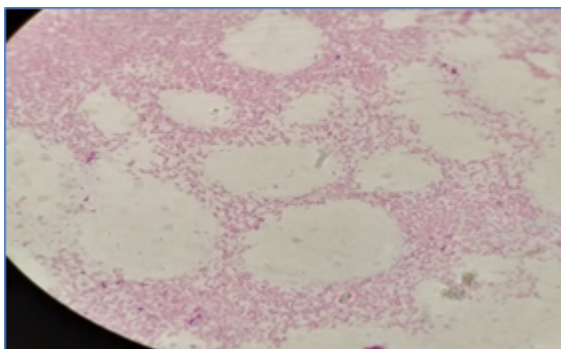
Chapitre 03
Résultats et
interprétations

1- Les résultats des Tests Genre

Pour l'identification et la détermination du genre bactérien avons nous effectué une étude macroscopique basée sur (l'aspect des colonies, production de pigment fluorescent sur milieux King B) et nous avons étudié les caractères micro morphologiques et biochimiques (coloration de Gram , KOH et test Hught et Leifson) (Lelliot.,1987).

1.1 Test coloration de gram

D'après l'observation microscopique faite à l'objectif 40x et à immersion à l'objectif 100x toutes les bactéries se colorent en rose et elles ont une forme bacille ce qui confirme que ce sont des gram négative. Chez les bactéries à gram négatif, la paroi est riche en lipides et laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane par contre les bactéries à gram positives qui se colorent en violet sont dotées d'une simple paroi avec une grande quantité de peptidoglycane , les bactéries à Gram négatif , composées de moins de peptidoglycane mais prouvées d'une membrane externe supplémentaire (Gutmann et williamson., 1987)



un frottis d'un isolat coloré par la technique de 100X à immersion) (Originale, 2023)

coloration de gram nous avons fait le test KOH Pour tous les isolats nous avons observé l'augmentation de la viscosité du KOH à 3 % et la formation d'un filament mucoïde ce qui confirme que ces bactéries sont à Gram négatif (Suslow *et al.*, 1981). En présence d'hydroxyde de potassium, les parois des cellules gram négatives sont dégradées. KOH dissout facilement la fine couche de peptidoglycane des parois cellulaires des bactéries gram négatives la désintégration de la paroi cellulaire à gram négative lyse la cellule et libère son contenu y compris L'ADN. en conséquence, un matériau chromosomique visueux est libéré, ce qui rend la suspension bactérienne épaisse et filandreuse . le visqueux et la solution collent à la boucle au toucher (Ryu., 1938).

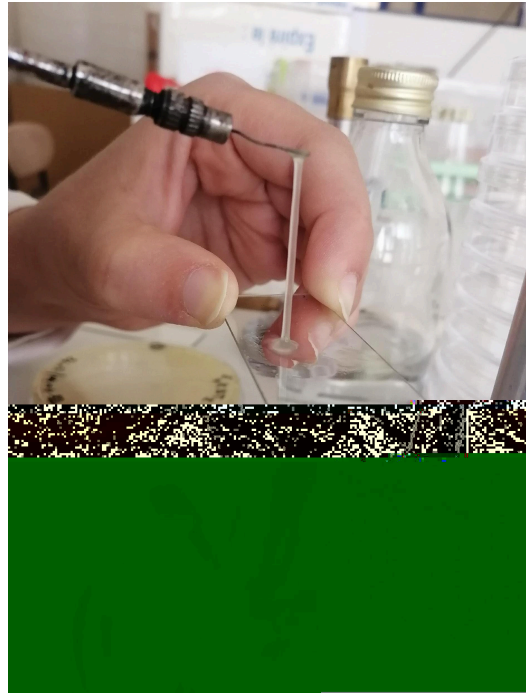
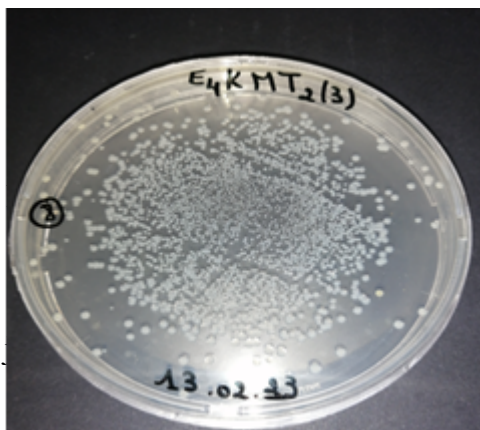


Figure 13: Résultats de test KOH (Originale, 2023)

1.3. Test de Fluorescence sur King B

Tous les 25 isolats ensemencés sur le milieu King B ont présenté une fluorescence caractéristique typique de *Pseudomonas savastanoi*, jaune-vert détectable sous ultraviolets à une longueur d'onde de 360 nm (King et al., 1954). La fluorescence observée est due à la présence de pigment fluorescent. Le gélose King B favorise la production de pyoverdine et inhibe par ailleurs la production de pyocyanine. Le phosphate de potassium augmente la concentration en phosphore apporté par la peptone et stimule ainsi la production de fluorescéine (Yvonne et Dennis, 1987).



Test de fluorescence sur King B (Originale, 2023)

En conclusion, nous avons observé un virage du couleur bleu au blanc dans les tubes avec huile aucun changement n'a été

observé et ce, chez tous les 25 isolats testés la couleur jaune dans les tubes sans huile indique que la bactéries dégrade le glucose (le glucide est oxydé en présence d’oxygène produisent de l’acide. le produit acide est décrit par le changement de couleur du bleu de bromothmol, qui est un indicateur de couleur PH contenu dans le milieu les bactéries sont oxydative mais, dans les tube avec huile les résultat signifie que le glucide oxydé en acides et alcools en absence d’oxygène . les bactérie sont fermentative (Schaad *et al.*, 2001).

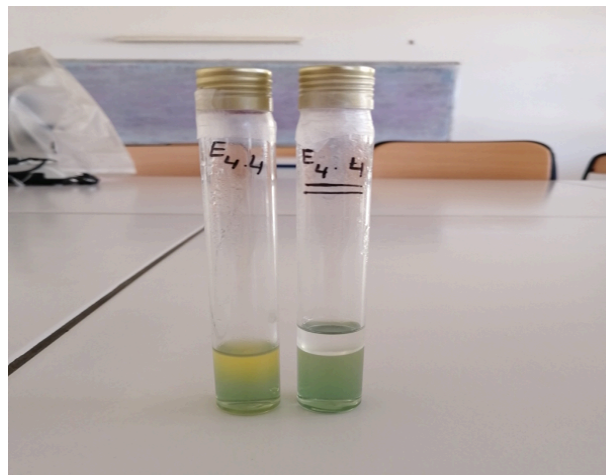


Figure15: Résultat de test Hugh et Leifson (Originale, 2023)

Tableau 01 : Résultats des tests “ KOH, coloration de Gram, la fluorescence et test Hugh et Leifson”.

Les codes	Coloration de Gram	KOH	Fluorescence sur KB	Hugh et Leifson			
				Après 24h		Après 48h	
				Sans huile	Avec huile	Sans huile	Avec huile
M1	G-	-	F	+	-	+	-
M.2	G-	-	F	+	-	+	-
M.3	G-	-	F	+	-	+	-
M.4	G-	-	F	+	-	+	-

M.5	G-	-	F	+	-	+	-
M.6	G-	-	F	+	-	+	-
M.7	G-	-	F	+	-	+	-
M.8	G-	-	F	+	-	+	-
M.9	G-	-	F	+	-	+	-
M.10	G-	-	F	+	-	+	-
M.11	G-	-	F	+	-	+	-
M.12	G-	-	F	+	-	+	-
M.13	G-	-	F	+	-	+	-
M.14	G-	-	F	+	-	+	-
M.15	G-	-	F	+	-	+	-
M.16	G-	-	F	+	-	+	-
M.17	G-	-	F	+	-	+	-
M.18	G-	-	F	+	-	+	-
M.19	G-	-	F	+	-	+	-
M.20	G-	-	F	+	-	+	-
M.21	G-	-	F	+	-	+	-
M.22	G-	-	F	+	-	+	-
M.23	G-	-	F	+	-	+	-
M.24	G-	-	F	+	-	+	-
M.25	G-	-	F	+	-	+	-

Les résultats des tests biochimiques (Coloration de Gram , KOH , fluorescence sur King B et test hugh et leifson) montrent que les 25 isolats testés sont des bacilles à Gram négative , prouduisent un pigment fluorescent sur le milieu King B et sont des aérobies strictes.

3.Le test LOPAT

Nous avons utilisé le test LOPAT pour déterminer les caractères métaboliques (production de Levane, présence d'oxydase, dégradation de pectinase, présence de l'arginine déshydrolyase et Hypersensibilité du tabac) chez nos isolats (Schaad., 1987).

3.1. Test levane

Après 4 jours d'incubation des 25 isolats sur un milieu levane, nous avons observés un aspect lisses, très visqueuses légèrement sur élevées indique que aucune polymérisation du fructose en poly-fructose n'a été faite, et cela nous permet de considérer nos isolats testés comme des levane négatifs (Moretti *et al.*, 2008).

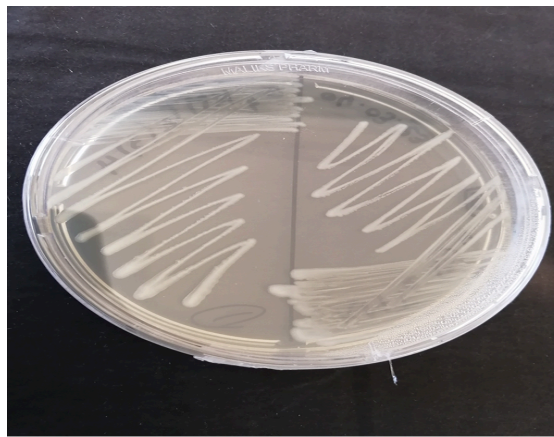


Figure16: Résultat de test Levane (Originale, 2023).

2.3. Test Oxydase

Le résultat de ce test montre qu'après 10 secondes d'inoculation de colonie bactérienne âgées 24h dans des bâtonnets d'oxydase nous n'avons observées aucun coloration violette chez tous les isolats ce qui se traduit par l'absence de l'enzyme : cytochrome-oxydase (cytochrome C19) dans la chaîne respiratoire des bactéries., Ce qui confirme que toutes les isolats sont des oxydase négatif (Steel, 1961).



Figure 16: Résultat de test Oxydase (Originale, 2023)

2.4. Test Pectinase

Dans ce test, nous avons observé que les parmi les 25 isolats testés ; 22 isolats étaient négatifs pour l'activité pectinolytique après quatorze jours d'incubation car nous n'avons pas observé de pourriture sur les tranches de pommes de terre. Cette réaction négative traduit que les isolats n'ont pas la capacité à dégrader la pectine présente dans les rondelles de la pomme de terre (Ghanney *et al.* , 2016) Nous avons aussi observée chez 3 isolats présence d'une nécrose autour du creu d'inoculation ainsi qu'une odeur indésirable s'échappant de la boîte ce qui indique que ces bactéries dégradent la pectine.

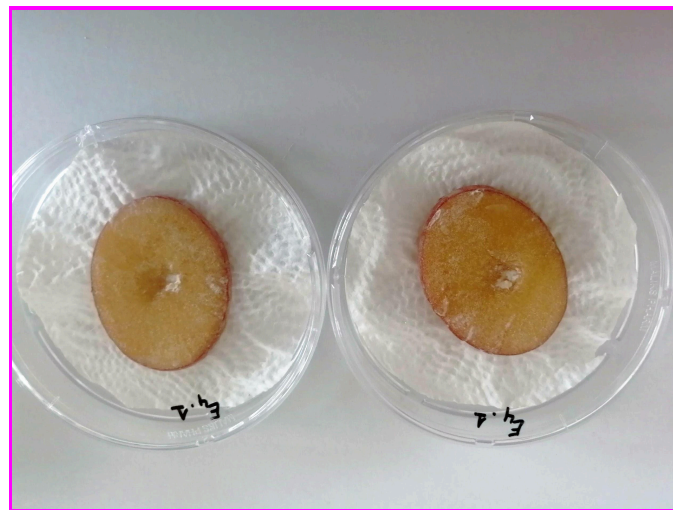


Figure17 : Résultats négatifs de Test pectinase (Originale, 2023).

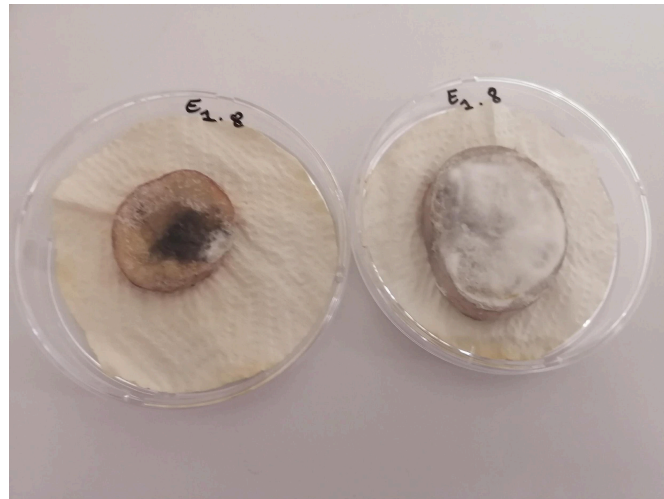


Figure18 : Résultats positifs de Test pectinase (Originale, 2023).

2.5. Test Arginine

Après 4 jours d'incubation aucun changement de couleur n'a été observé, la couleur des tubes reste rose chez tous les 25 isolats testés ce qui indique que ce test arginine négative et montre qu'il y a transformation de l'arginine en citrulline et ammoniac. Et décarboxylation de la citrulline en ornithine et ammoniac (jonathan,2007).



Figure18: Résultat de test Arginine di hydrolase (Originale,2023)

2.6. Test d'hypersensibilité sur les feuilles de Tabac

Dans ce test nous avons testé 8 isolats par manque de plantules de tabac. Après 24h nous avons observé dessèchement et des plages nécrotiques dans les zones d'inoculation ce qui indique que toutes les isolats utilisées sont pathogène (Schaad *et al.*, 2001).

La réaction d'hypersensibilité est une se caractérise par la mort rapide des cellules autour du site d'infection. Cela entraîne une nécrose étendue des tissus atteints. Dans les nécroses s'accumulent des substances toxiques (phytoalexines) dirigées contre l'agent pathogène. Selon chim jost et pierre jost,, (2016). La nécrotisation des cellules dans le cas de la réaction d'hypersensibilité est liée à la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et d'oxyde d'azote NO. La réaction d'hypersensibilité est également associée à une libération d'éthylène et autres substances chimiques volatiles. On observe aussi un changement rapide d'influx et d'efflux de cations dans les cellules et une lignification des parois cellulaires entourant le site nécrosé. Plusieurs enzymes sont induites : protéases, chitinases, glucanases dont les produits de dégradation de leurs substrats agissent en tant qu'éliciteurs conduisant la plante à synthétiser d'autant plus de phytoalexines .



Figure19 : Résultat de Test d'hypersensibilité sur les feuilles de Tabac (originale, 2023).

Tableux 02 :Résultats des tests LOPAT

Les codes	Test levane	Test oxydase	Test pectinase	Test d'arginine di hydrolase	Test d'hypersensibilité sur tabac
M.1	-	-	-	-	+
M.2	-	-	-	-	+
M.3	-	-	+	-	
M.4	-	-	-	-	
M.5	-	-	-	-	+
M.6	-	-	-	-	
M.7	-	-	-	-	
M.8	-	-	+	-	
M.9	-	-	-	-	
M.10	-	-	+	-	
M.11	-	-	-	-	+
M.12	-	-	-	-	
M.17	-	-	-	-	
M.18	-	-	-	-	+
M.19	-	-	-	-	
M.20	-	-	-	-	
M.21	-	-	-	-	
M.22	-	-	-	-	+
M.23	-	-	-	-	
M.24	-	-	-	-	+
M.25	-	-	-	-	+

Discussion

D'après les résultats du test LOPAT effectués sur 25 isolats, nous avons confirmé que 25 isolat sont des levanes négatifs, des oxydases négatifs et des arginine négatifs alors que 22 isolats sont des pectinase négatifs (ne dégradent pas la pectine). Pour le test tabac pour 8 isolats donne une réaction positive.

Discussion

Discussion

L'olivier est parmi les plus anciens arbres fruitiers cultivés principalement dans les pays méditerranéens, cet arbre est bien connu pour son intérêt alimentaire et thérapeutique. La tuberculose d'olivier est une maladie bactérienne affectant les oliviers (*Olea europea* L). L'agent causal est le *Pseudomonas savastanoi*, responsable de la formation des noeuds (galles) sur le tronc et les rameaux. Cette maladie fait des ravages sur l'oléiculture en Algérie (Malki *et al.*, 2020).

L'objectif de cette étude est l'identification de l'agent causal de quelques anomalies pathologiques chez l'olivier dans la région de Laghouat, Pour identifier les espèces existantes nous avons réalisé les tests biochimiques pour 25 isolats bactériens. Ces tests sont utilisés pour déterminer les caractères macroscopiques et microscopique et biochimiques (coloration de gram, test KOH, test de fluorescence sur King B) et les voies d'utilisation du glucose (fermentative ou oxydative) test Hugh et Leifson.

D'après l'observation microscopique effectuée suite à la coloration de Gram, les 25 isolats se colorent en rose et elles ont une forme bacille car elles retiennent la coloration rose ce qui montre que se sont des *Pseudomonas* Gram négative. Mirik *et al.*, (2011) et Benyoub *et al.*, (2019) et Zucchini., (2023) rapportent que la bactérie *Pseudomonas* isolées de l'olivier est à Gram négative de forme bâtonnet.

Les bactéries Gram-positives et Gram-négatives se distinguent en bactériologie par leur couleur de base, cruciale pour leur identification. En effet, le violet de gentiane colore les composants cytoplasmiques, et après cette période de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Les bactéries Gram négatives ont des membranes riches en lipides qui permettent à l'alcool (ou alcool + acétone) de traverser et de décolorer le cytoplasme, tandis que les bactéries Gram positives ont des membranes qui agissent comme une barrière imperméable à l'alcool, gardant la couleur violette du cytoplasme dans ce test nous avons confirmé que tous les isolats sont des bacilles à gram négative (Camille, 2014)

Test KOH comme complément efficace à la coloration de gram a été très utile pour la différenciation rapide et précise et en se basent sur la structure de la paroi de les bactéries initialement isolées à partir de tissus végétaux Cette méthode utilise la rupture rapide de la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives dans une solution alcaline libérant de l'acide

désoxyribonucléique qui provoque le filetage visqueux. Les bactéries Gram-positives ne se lysent pas dans 3% de KOH (Suslow *et al.*, 1981).

Et d'après le test KOH ces isolats ont formé un filament visqueux en contact avec la solution KOH. Ce qui confirme que ce sont des gram négative. D'après Oulebsir *et al.* (2017), les isolats bactériens issus de tumeurs d'olivier sont des gram négative.

Le test de fluorescence est un test qui confirme la fluorescence sur le milieu King B. Les 25 isolats bactériens testés ont présenté une fluorescence caractéristique typique de *Pseudomonas savastanoi* . sur le milieu King B, jaune-vert détectable sous ultraviolets à une longueur d'onde de 360 nm (King *et al.*, 1954). La gélose King B favorise la production de pyoverdine et inhibe par ailleurs la production de pyocyanine. D'après (Sisto *et al.* (2007), Les bactéries isolées à partir des branches d'olivier de différentes plantes hôtes en Italie montrent une fluorescence typique de *Pseudomonas savastanoi*. sur le milieu King B. De leur côté Mirik *et al.*, (2011) rapportent également que les isolats provenant de l'olivier sont fluorescentes.

Dans le test Hugh et Leifson, chez tous les isolats, le tube sans huile vire au jaune alors que les tube avec huile aucun changement de couleur n'a été observé. Ce qui permet de dire que la bactérie dégrade le glucose et qu'il s'agit de bactéries aérobies strictes. Nos résultats s'accordent avec ceux de Benjama, (2003) , qui rapporte que les *Pseudomonas* isolées à partir de tumeurs d'olivier sont des aérobies strictes.

Les résultats des tests biochimiques (Coloration de Gram , KOH , fluorescence sur King B et test hugh et leifson) montrent que les 25 isolats testés sont des bacilles à Gram négative , produisent un pigment fluorescent sur le milieu King B et sont des aérobies strictes. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par . Benjama, (2003) Mirik *et al.*, (2011), Oulebsir *et al.*, (2017) et zucchini., (2023). Ce qui confirme les isolats sont des *Pseudomonas*.

Le test LOPAT a été utilisé pour confirmer les caractéristiques métaboliques de des isolats. Ce test comporte cinq tests (production de Levane, présence d'oxydase, dégradation de pectinase, présence de l'arginine déshydrolyase et Hypersensibilité sur tabac).

Les 25 isolats ensemencés sur le milieu Levane présentent un aspect lisses, très visqueux légèrement. Cet aspect indique qu'aucune polymérisation du fructose en poly-fructose n'a été faite. Pour cela, ces isolats sont considérés comme des levanes

négatives. Ces résultats sont en accord avec celles rapportées par (Moretti *et al.*, 2008) qui ont étudié 53 isolats de *P. savastanoi* provenant de 05 pays différents : Albanie, Italie, Maroc, Portugal et Turquie . D'après Turco *et al.*, (2022), il existe des isolats issus de tumeur d'olivier capables de polymériser le fructose en poly-fructose. Ce qui renforce la possibilité de trouver des levanes positives également dans le cas de la tuberculose d'olivier.

Le test oxydase chez les 25 isolats donne une réaction négative ce qui se traduit l'absence de l'enzyme: cytochrome-oxydase (cytochrome C19) dans la chaîne respiratoire des bactéries. Nos résultats s'accordent avec ceux de Khezri *et al.* (2019) et Mirik *et al.* (2011) qui rapportent que les *Pseudomonas* isolées à partir de tumeurs d'olivier n'ont pas la capacité d'oxyder le réactif du test oxydase.

D'après les résultats obtenus du test pectinase, 3 isolats étaient positive alors que 22 isolats étaient négatifs, cette réaction négative indique que les isolats n'ont pas la capacité de dégrader la pectine présente dans les rondelles de la pomme de terre ; Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Guido *et al.*, (2005) et Scortichini *et al.*, (2004) qui rapportent que les isolats *Pseudomonas* issus des tumeur d'olivier n'ont pas d'activité péctinolytique.

Les résultats du test Arginine dihydrolase chez les 25 isolats montrent qu'aucun changement de couleur n'a été observé dans les tubes cela indique que ces isolats bactériens n'ont pas pu faire la dégradation de l'arginine en anaérobiose par l'enzyme Arginine dihydrolase. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Khezri *et al.* (2019) et Krid *et al.* (2011) qui rapportent que les *Pseudomonas savastanoi*. sont des bactéries incapables de dégrader l'arginine.

Les résultats de test de l'hypersensibilité sur les feuilles de tabac chez 8 isolats donne une réaction positive par dessèchement et nécrose dans les zones d'inoculation ce qui confirme que toutes les isolats testés sont pathogènes. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Hassona *et al.* (2022) et Koscak *et al.* (2023).

La réaction d'hypersensibilité (RH) est un mécanisme complexe de défense induit par une plante suite à l'infection par des agents pathogènes. Elle implique la mort de cellules végétales, l'expression de tout un arsenal de réponses de défense, dont l'induction d'une résistance systémique acquise régulées par des signaux endogènes (Baillieul., 1996).

D'après les résultats du test LOPAT effectués sur 25 isolats, nous avons confirmé que 25 isolats sont des levanes négatifs, des oxydases négatifs et des arginine négatifs alors que 22 isolats sont des pectinase négatifs (ne dégradent pas la pectine). Pour le test tabac pour 8 isolats donne une réaction positive. Ce qui nous permet de considérer ces huit isolats comme des *Pseudomonas savastanoi*. Nos résultats sont en accord avec ceux de plusieurs chercheurs qui ont étudié l'agent causal de tuberculose de l'olivier (Koscak et al., 2023; Hassona et al., 2022).

Le test de pathogénicité est un test très utile pour confirmer le pouvoir pathogène des isolats bactériens, L'intervalle de température dans lequel *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* peut déclencher l'infection se situe entre 5° et 37° et cet intervalle permettrait aux bactéries de causer des infections tout au long de l'année. Cependant, les conditions optimales pour le développement de la maladie sont d'environ 22-25 °C et les périodes subséquentes subissent une forte probabilité d'infection en l'automne et au printemps (Protta, 1995) Dans notre, ce test n'a pas été effectué.

Conclusion

CONCLUSION

L'olivier est parmi les plus anciens arbres fruitiers cultivés principalement dans les pays méditerranéens, cet arbre est bien connu pour son intérêt alimentaire et thérapeutique

L'olivier est sujet à plusieurs attaques parasitaires d'ordre fongique, tel que le *Cycloconrum oleagtnsum*, d'ordre entomofogiques tels que le *Dacus oleae*, *Euphyllura olivina*, *Sesserra olea*, ou d'ordre bactériologiques telle que *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Ce dernier agent pathogène provoque la tuberculose de l'olivier.

La tuberculose de l'olivier est la principale maladie bactérienne de l'olivier. Elle est causée par *Pseudomonas savastanoi*. La bactérie s'installe sur les blessures et provoque des tumeurs aériennes sur différentes parties du végétal, Elle constitue un sérieux problème pour la production des olives, réduit la capacité de production, affaiblie la plante et la prédispose à l'attaque par d'autres maladies ou stress abiotiques.

Notre travail, a pour but l'identification de l'agent causal de quelques anomalies pathologiques chez l'olivier dans la région de Laghouat

Nous avons d'abord, une identification phénotypique de 25 isolats bactériens avec des tests biochimiques ; coloration de Gram test KOH test Hugh et Leifson grâce à ces caractéristiques biochimiques nous avons pu confirmer que tous les isolats testés appartient au genre *Pseudomonas*. et les résultats du test LOPAT, montrent que 25 isolats testés sont des levane négatifs, arginine négatifs et des oxydases négatifs et 23 isolats ne dégradent pas la pectine concernant le test de tabac 8 isolats uniquement ont réagi positivement. Ce qui confirme que ces 8 isolats sont des *Pseudomonas savastanoi*. Nos résultats concordent avec les travaux des chercheurs qui travaillé sur la tuberculose d'olivier dans plusieurs pays (Italie, Albanie, Italie, Maroc, Portugal et Turquie.

Cette maladie (la tuberculose) est considérée comme un problème majeur par son effet néfaste sur la croissance, le rendement et surtout la qualité de l'olive. C'est pourquoi elle a été étudiée dans plusieurs pays pour trouver des moyen de lutte Pour faire suite à cette étude, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées comme perspectives :

Perspectives

Il est nécessaire d'approfondir l'étude sur la maladie pour voir la possibilité de trouvé un moyen de lutte.

CONCLUSION

D'étudier l'interaction hôte/pathogène, ce volet de recherche peut apporter un complément d'information sur cette pathologie qui menace l'oléiculture partout.

Références bibliographiques

Références est bibliographiques

Références bibliographiques

Afido, (2019). Association Française Interprofessionnelle de l'Olive, Bulletin de Santé du Végétal Olivier, <https://afidol.org/bulletin-de-sante-du-vegetal-olivier-2019/>.

Benzina F., Sahir-Halouane F., Hamed K., Algerian isolates of fluorescent *Pseudomonas* spp. as potential biological control against wilt pathogen (*Verticillium dahliae*). *Plant Omics journal*. POJ 9(1) (2016) 48 -60.

Benjama, A.(2003). Méthode d'évaluation rapide du degré d'attaque de l'olivier par la Tuberculose cause par *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* en verger au Maroc, *Fruits*, 58 : 213-219 .

Benjama A (1988). Parasitic olive diseases in Morocco, *Olivae* 20, 21–33.

Hassouna M , Mebdoua S , Mahdi KH , Messad S and Salim L ,RESEARCH ARTICLE BIOSCIENCE RESEARCH, 202219(1):726-737. OPEN ACCESS Investigating the spread of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* the causal agent of Olive knot disease in Algeria .

Guido, M., Carlo V., Luciana G & Guisepe S., (2005). Spread of levan positive populations of *Pseudomonas savastanoi* PV. *Savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy, European Surico, G et Lavermicocca, P. (1989). Un milieu semi sélective pour l'isolement de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Phytopathology*. 79:185-190. *journal of plant pathology* (2005). 112: 101-112.

C. Moretti, P. Ferrante, T. Hosni, F. Valentini, A. D'Onghia, M. Fatmi, and R. Buonauro ,(2008).Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Strains Collected from Olive Trees in Different Countries.

Syahri Y F, Baharuddin, Fachruddin and Yani A., 2019. Biochemical tests and identification of potential indigenous bacteria from nickel post-mining land in Pomalaa. *IOP : Earth and Environmental Science* 382 pp : 2-3.

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

A. BARGUIGUA1 , I. ZAHIR1 , S. YOUSSE1 , N. FIKRI1 , B. YOUSSE.2019.Rev. Mar. Sci. Agron. Vét. (2019) 8(3): 331-338 . Prospection des maladies microbiennes de l'olivier dans la région Tadmor-Azilal .

Orchards Laura Košćak , Janja Lamovšek , Edyta Đermić , Stefania Tegli , Igor Gruntar and Sara Godena . (2023). Identification and Characterisation of *Pseudomonas savastanoi* PV. *Savastanoi* as the Causal Agent of Olive Knot Disease in Croatian, Slovenian and Portuguese Olive (*Olea europaea* L.) .*Plants* 2023, 12, 307.

Ouzari H , Khsairi A ,Raddadi N , Jaoua L , Hassen A , Zarrouk M , Daffonchi D and Boudabous A .,2008 .Research Paper Diversity of auxin-producing bacteria associated to *Pseudomonas savastanoi*-induced olive knots.

Références est bibliographiques

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

Ghedira K(2008). L'olivier .Pharmasognosie.vol89 N°10 ,84p.

Ramos, C., Matas, M.I., Bardaji, L., Aragon, I., et Murillo, J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* : some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13: 998-1009.

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

Sisto, G., Iacobellis, N.S., et Sisto, A., (1985). Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, *Physiological Plant Pathology*, 26: 309-320.

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

Steel, K.J. (1960). The oxydase Reaction as a Taxonomic Tool, *National Collection of Type Cultures, Journal of General and Applied Microbiology*, London N.W. 9, 25: 297-306.

Coutin Remi ., 2003 Les insectes de l'olivier.

Afido, (2020). Association Française Interprofessionnelle de l'Olive, *Bulletin de Santé du Végétal Olivier*, <https://afidol.org/bulletin-de-sante-du-vegetal-olivier-2020/>.

Ghanney et al ., 2016 Preliminary investigation on the Olive knot disease(*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) in the Tunisian southeast.

Jean PAGNOI(1975) L ' O L I V I E R 3 édition Préface de P. BONNET Président de la Fédération Internationale d'Oléiculture illustré d'une plume du Maître Graveur R. C.

Nihad salahat and hassan abukaoud 2016Olive TreesOlives, Olive Oil(*Olea Europaea*) p 7 et p30.

Georges j. Aillaude L'olivier et huile d'olive , le point de vue des botanistes.

G. Surico & G. Marchi Olive Knot Diseases New Insights into the Ecology, Physiology and Epidemiology of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* .

Jonathan Mitchell Bebel Stargrovet Dwight L. McKee *TreasureHerb, Nutrient, and Drug Interactions: Clinical Implications and Therapeutic*.

Samira Krid, Mariem Gharsallaoui, Mohamed Ali Triki et Ali Rhouma(2001) EPIDEMIOLOGIE ET ETIOLOGIE DE PSEUDOMONAS SAVASTANOI PV. SAVASTANOI, AGENT CAUSAL DE LA TUBERCULOSE DE L'OLIVIER EN TUNISIE

Références est bibliographiques

M. Scortichini, M. P. Rossi, M. Salerno(2004) Relationship of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from Italian olive trees and patterns of host genetic diversity.

Matteo Zucchini, Antonietta Maoloni, Enrico Maria Lodolini, Ilario Ferrocino, Lucia Aquilanti, Davide NeriKnot (2023) formation and spread along the shoot stem in 13 olive cultivars inoculated with an indigenous pathobiome of 7 species of *Pseudomonas* including *Pseudomonas savastanoi* .

Yan-Chim Jost- Jean-Pierre Jost(2016) stoStratégie de défense des plantes contre les maladies et les parasites .

M. Mirik, Y. Aysan and F. SabinCHARACTERIZATION OF PSEUDOMONAS SAVASTANOI pv. SAVASTANOI STRAINS ISOLATED FROM SEVERAL HOST PLANTS IN TURKEY AND REPORT OF FONTANESIA AS A NEW HOST.

Senem Filiz Doksöz, İmam Adem Bozkurt Journal of Plant Pathology 102 (4), 1173-1177, 2020A new and simple pathogenicity test using carrot slices for *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, causal disease agent of olive knot.

Thomas graham house ,science park, Milton Road, Cambridge CB44WF ,UK the Royal Society of chemistry 1996 MICROBIOLOGY FOR ANALYTICAL CHEMIST .

DELARRAS Camille 2014 pratique en microbiologie de laboratoire.

Laurent Gutmann Russell Williamson(1987) Chargé de recherche à l'InsermParoi bactérienne et bêta-lactamines.

Yvonne S. Cody and Dennis C. Gross Characterization of Pyoverdinpss, the Fluorescent Siderophore Produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Silvia Turco, Mounira Inas Drais, Luca Rossini, Elena Chaboteaux Yaseen Jundi Rahi Complete genome assembly of the levan-positive strain PVF11 of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* isolated from olive knots in Central Italy

Laura Koščak, Janja Lamovšek, Edyta Dermić Stefania Teali laor Gruntar Plants 12 (2), 307, 2023 Sara Identification and characterisation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* as the causal agent of olive knot disease in Croatian, Slovenian and Portuguese olive .

ANNEXE

Références est bibliographiques

Composition des milieux cultures :

1-Milieux de culture (g/l)

King B :

Mélange de peptone.....20.0g/l

Phosphate dipotassique.....1.5g/l

Sulfate de magnésium.....1.5g/l

Agar bactériologique.....14.0g/l

PH final : 7 et 7.5 à27°C

Hugh et Leifson

Peptone.....02g

Chlorure de sodium.....05g

Hydrogénophosphate de potassium.....0,3g

Glucose.....10g

Bleu de bromothymol.....0,03g

Eau distillée.....1L

PH = 7,2

Levane :

Extrait de levure.....2g/l

Peptone.....5g/l

Na Cl5g/l

Saccharose.....50g/l

Gélose.....20g/l

Eau distillée.....1L

Ph : 7.0-7.2.

Arginine :

Peptone1g/l

Sodium chloride..... 5 g/l

Références est bibliographiques

Dipotassium hydrogen phosph.....	0.3g/l
L-Arginine	10. g/l
Rouge de phenol.....	0.016g/l
Agar.....	3. 0g/l
Eau distillée.....	1l

Résumé

Résumé

L'olivier est parmi les plus anciens arbres fruitiers cultivés principalement dans les pays méditerranéens, cet arbre est bien connu pour son intérêt alimentaire et thérapeutique. La tuberculose est une maladie bactérienne affectant les oliviers causés par *Pseudomonas savastanoi*

L'objectif de cette étude est l'identification de l'agent causal de quelques anomalies pathologiques chez l'olivier dans la région de Laghouat. L'identification a été basée sur une étude macroscopique et microscopique et des tests biochimique ; Les résultats des tests d'identification ; coloration de gram, test KOH et test Hugh et leifson et le test de Fluorescence montrent que 25 isolats confirme le genre *Pseudomonas*. D'après les résultats du test LOPAT, 25 isolats testés sont des levane négatifs, arginine négatifs et des oxydases négatifs alors que 22 isolats sont des pectinase négatifs Pour le test tabac 8 isolats donne une réaction positive.. Ce qui confirme que Les 8 isolats sont des *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Mots clé: L'olivier , tuberculose, LOPAT, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

الملخص

تعتبر شجرة الزيتون من أقدم الأشجار المثمرة التي تزرع بشكل رئيسي في دول البحر الأبيض المتوسط، ومرض السل هو مرض بكتيري يصيب أشجار الزيتون تسببه بكتيريا *Pseudomonas savastanoi* .

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد العامل المسبب لبعض التشوهات المرضية في أشجار الزيتون بمنطقة الأغواط. تم تحديد لهوية العزلات البكتيرية على أساس الاختبارات البيوكيميائية والفسيزولوجية. أظهرت نتائج الاختبارات التعرف على صبغة الجرام واختبار KOH واختبار hugh et leifson واختبار fluorescence أن الـ 25 عزلة التي تم اختبارها تنتمي إلى جنس *Pseudomonas*. وبحسب نتائج اختبار LOPAT فإن 25 عزلة التي تم اختبارها هي سلبية Levane ، سلبية arginine، سلبية oxydase ، و22 عزلة سلبية petinase، وبالنسبة لاختبار التبغ فإن 8 عزلات أعطت نتيجة فعل إيجابي، مما يؤكد أن الـ 8 عزلات هي عبارة عن *Pseudomonas savastanoi*.

الكلمات المفتاحية: الزيتون، سل الزيتون، *Pseudomonas savastanoi*، LOPAT،

Résumé

Abstract:

The olive tree is among the oldest fruit trees cultivated mainly in Mediterranean countries. Olive knot is a bacterial disease affecting olive trees caused by *Pseudomonas savastanoi*.

The objective of this study is the identification of the causal agent of some pathological anomalies in olive trees in the Laghouat region. Identification was based on biochemical and physiological tests. The results of the Gram staining identification tests, KOH test and Hugh and Leifson test and the Fluorescence test show that the 25 isolats tested belong to the *Pseudomonas* genus. According to the results of the LOPAT test, 25 isolates tested are levan negative, arginine negative and oxidases negative while 22 isolates are pectinase negative. For the tobacco test 8 isolates give a positive reaction. Which confirms that the 8 isolates are *Pseudomonas savastanoi*.

Key words: olive, olive knot , LOPAT, *Pseudomonas savastanoi* .