



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 : Abdelatif Chahira

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : Protection des végétaux et de l'environnement

Thème

**Contribution à caractérisation de l'agent
pathogène de la tuberculose de l'olivier dans la
région de wilaya de Djelfa**

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
Mr. Messaoudi O		Président
Mr .Amara Y		Examineur
Mlle. Zaza m		Encadreur

Promotion : sept-2016



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



جامعة عمار ثلجي - الأغواط

كلية/معهد: العلوم
قسم: العلوم الفلاحية

مذكرة ماستر

تقديم الطالب (ة): عبد اللطيف شهيرة

ميدان: العلوم الطبيعية والحياة

شعبة: علوم فلاحية

تخصص: حماية النبات والبيئة

موضوع البحث

المساهمة في تحديد خصائص العامل المسبب لورم الزيتون في منطقة
ولاية الجلفة

أعضاء لجنة المناقشة:

الاسم واللقب	الدرجة العلمية	الصفة
مسعودي عمر		رئيسا
عمارة ياسين		ممتحن أول
زازا مسعودة		مقررا

الدفعة سبتمبر 2016

DEDICACES

A mes très chers parents

*A mes sœurs : Hanane, Aicha, Aya et
Amal, fattoume .*

A mes frères: Hichame, Lamdjed et Zaki.

A mon fiancé : Mohamed.

*A tous ceux qui m'ont aidé dans mes études
Particulièrement :*

*Ben boudina Aya, Rahmani Wafa, Kireche
Fattoume.*

*A tous mes proches, mes amis et tous ceux
qui M'aiment.*

REMERCIEMENTS

Avant tout je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donnés le courage, la volonté, la patience, et la santé durant toutes ces années et que grâce à lui ce travail a pu être réalisé.

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude à **Mlle . zaza masaouda** d'avoir proposé le sujet sur lequel j'ai travaillé, et qui a assuré la direction et l'encadrement du travail présenté dans ce mémoire.*

Je tiens tout d'abord à exprimer mes reconnaissances envers les membres du jury, dont la renommée et la qualité scientifique honore grandement ce travail :

*Monsieur **Mr Mesaoudi O**, qui à bien accepter de présider le Jury de ce mémoire, Monsieur **Mr Amara Y** pour m'avoir fait l'honneur d'être examinateurs de ce travail.*

*J'adresse mes vifs remerciements aux membres et personnels de laboratoire, **Taibi Halima, Renan Zohra, Latrache aicha, Othmani Reguia, Ben Brika Fatim, Neia Chahra, Ben Djerba Nedjwa, Nagaz Mahjouba**, pour leur aide et soutien morale.*

*Enfin, je tiens a remercier vivement mes amis **Bireche zainbe** et **Moussai Nessrine** et **EL-bidi nour Houda** et **Ben boudina Aya** pour leur disponibilité, leurs encouragements durant toutes les phases de l'étude et leurs conseils qui m'avons beaucoup soutenus tout au long de ce travail pratique,
Qu'il prouve ici notre plus grande reconnaissance.*

Résume

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* est l'agent causal de la maladie de la tuberculose d'olivier. Cette maladie est considérée comme une des maladies les plus graves qui touchent l'olivier principalement dans les pays méditerranéens. Les prospections effectuées dans la région de Ain El Ibel à la wilaya de Djelfa ont permis signaler la présence de symptômes typiques de la tuberculose d'olivier.

Le présent travail a pour objectif l'isolement, et l'identification de l'agent responsable de ces symptômes.

D'après le dénombrement bactérien, nous avons remarqué une faible présence des *Pseudomonas savastanoi* like bacteria par rapport à la flore bactérienne totale avec des pourcentages qui varient entre 1 % et 15% dans les échantillons analysés.

L'isolement effectué nous a octroyé la possibilité de sélectionner 32 isolats, l'identification préliminaire des isolats a révélé 22 isolats appartient au genre *Pseudomonas*.

Les tests biochimiques LOPAT réalisés ont montré que 22 isolats testés ont été présentés les caractères du sous-groupe Ib et ils sont des oxydases négative, levane négative, pectinase négative et ne possèdent pas l'arginine déshydrolyase, et Par manque de plantules de tabac le test HR n'a pas été réalisé.

L'identification par la galerie API20NE a permis de déterminer autre espèce différent au lieu d'avoir les *pseudomonas savastanoi* c'est après l'obtention des résultats du logiciel.

Le test de pathogénicité effectué par inoculation des plantules d'olivier s'est traduit par l'apparition des symptômes typiques de la maladie, ce qui démontre que ces bactéries sont pathogènes.

Mots clés : *Pseudomonas savastanoi*, la tuberculose, les tests biochimiques, l'Olivier, identification.

Abstract

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* is the causal agent of the disease of tuberculosis of olive. This disease is considered to be one of the most serious diseases affecting the olive trees mainly in Mediterranean countries. Surveys carried out in the region of Ain El Ibel in Djelfa wilaya helped report the presence of typical symptoms of tuberculosis of olive.

The present work is aimed, isolation, and identification of the agent responsible for these symptoms.

After the bacterial count, we've noticed a low presence of *Pseudomonas savastanoi* bacteria compared to the bacterial flora like total with percentages that vary between 1% and 15% in the samples analyzed.

Performed isolation has given us the possibility to select 32 isolates, the preliminary identification of isolates revealed 22 isolates belongs to the genus *Pseudomonas*. LOPAT biochemical tests performed showed that 22 isolates tested were presented the characters of the subgroup Ib and they are negative oxidases, negative levane, pectinase negative and do not have the dehydrolyase arginine, lack of tobacco seedlings the HR test has not been achieved. The identification by the Galerie API20NE has identified another different species rather than having the *pseudomonas savastanoi* is after obtaining the result of the software. The pathogenicity test performed by inoculation of seedlings of olive resulted in the appearance of the typical symptoms of the disease, which shows that these bacteria are pathogenic.

Key words: *Pseudomonas savastanoi*, tuberculosis, biochemical tests, the olive tree, identification

الملخص

Pseudomonas savastanoi هي العامل المسبب لمرض ورم الزيتون ويعتبر هذا المرض واحدا من اخطر الأمراض

التي تؤثر على أشجار الزيتون الموجودة في بلاد البحر الأبيض المتوسط, أظهرت الاستكشافات إن نباتات الزيتون الموجودة في منطقة عين الإبل ولاية الجلفة معرض لمرض ورم الزيتون, يهدف هذا العمل إلي عزل ، وتحديد العوامل المسؤولة عن هذا المرض

بعد تعداد البكتريا لحظنا انخفاض في نسبة البكتريا *Pseudomonas savastanoi like bacteria* في العينة التي تم عزلها بنسبة تتراوح بين 1 % إلى 15% في كل عينة .

وقد أدت الدراسة المخبرية إلى عزل 32 سلالة حيث سمح التشخيص عن طريق الاختبارات الكيميائية الحيوية 22 سلالة انه ينتمي إلى *Pseudomonas*, وقد أثبتت التحاليل البيوكيميائية LOPAT المعمولة على 22 سلالة تملك نفس موصفات sous-groupe Ib (L- /O- /P- /A- /T) سمح التشخيص المعمول بواسطة galerie API NE20 إلى تحديد نوع آخر مختلف عن *Pseudomonas savastanoi* بين اختبار المرضية الذي اجري على نباتان الزيتون أن هذه الأخيرة أبدت حساسية تجاه العامل الممرض حيث ترجم هذا بظهور أعراض نموذجية للمرض هذا يدل على أن البكتريا مريضة

الكلمات الرئيسية: *Pseudomonas* سافاستانوي، ورم ، الاختبارات البيوكيميائية، الزيتون.

Liste des figures

Figure 01 : cycle végétatif annuel de l'olivier (AFIDOL, 2013)	6
Figure 02 : infection naturelle du cultivar olive.....	15
Figure 03 : Cycle de la maladie du tuberculose d'olivier causée par <i>Pseudomonas savastanoi</i> <i>pv. savastanoi</i>	18
Figure 04 : Synthèse de l'auxine acide indole-3-acétique (AIA) par les gènes <i>iaaM</i> et <i>iaaH</i>	19
Figure 05 : carte géographique qui présente la région de Ain el ibel à la wilaya de djelfa	27
Figure 06 : méthode d'isolement d'agent pathogène	28
Figure 07: méthode de préparation de la suspension d'inoculation de la galerie API NE 20	34
Figure 08: le taux des <i>Pseudomonas savastanoi</i>	37
Figure 9 : Observation microscopique de coloration de Gram de la bactérie.....	38
Figure 10 : Résultats du test croissance en anaérobiose	39
Figure 11 : Résultat du test levane.....	42
Figure 12 : Résultat du test pectinase.....	43
FIGURE 13 : Résultat du test arginine deshydrolase	43
Figure 14 : Résultat du test Pathogénicité sur l'olivier	45

Liste des tableaux

Tableau 01 : Superficies des principaux pays producteurs d'olives dans le monde	8
Tableau 02: Les maladies d'origine abiotiques de l'olivier.....	11
Tableau 03. Table de lecture de la galerie API 20 NE	35
Tableau 04. Résultats des tests d'identification.....	40
Tableau 05. Les résultats de tests LOPAT.....	44
Tableau 06 : les résultats d'identification des isolats utilisant la galerie API 20 NE.....	46

Liste des abréviations

AIA: Acide indo acétique

API: Analyse prophylactic Idex

C° : degré Celsius

CO₂ : dioxyde de Carbone

G⁻: Gram negative

G⁺ : Gram positive

g : gramme

H₂O: l'eau

H: Heure

KB : King B

Kg : Kilogramme

KOH : Hydroxyde de potassium

LPGA : extrait de levure, peptone, glucose, agar

ml : millilitre

Min : minute

NO₃ : Dénitrification

NITE 1 : Nitrate 1

NITE 2 : Nitrate 2

PH : Potentielle d'hydrogène.

T : température.

Zn : Zinc

UFE: unité format colonie

μm : Micro mètre

Table des matières

Table des matières

Résume	I
Liste des figures	III
Liste des tableaux	IV
Liste d'abréviations.....	V
Introduction	1

Synthèse bibliographique

1 Généralités botanique sur l'olivier <i>Olea europea</i> L	1
1.1 Les Caractéristiques biologiques et morphologiques de l'olivier	1
1.2 Description générale	2
1.2.1 Le système racinaire	2
1.2.2 Les organes aériens	3
1.2.2.1 Le tronc.....	3
1.2.2.2 Les charpentières.....	3
1.2.2.3 La frondaison.....	4
1.2.2.4 Le rameau fructifère, inflorescences et fleurs.....	4
1.2.2.4.1 Rameau fructifère.....	4
1.2.2.4.2 Les inflorescences et les fleurs.....	4
1.2.2.5 Le fruit et sa composition chimique.....	5
1.3 Caractéristiques de l'olivier.....	5
1.3.1 Cycle de développement de l'olivier.....	5
1.3.2.- Cycle végétatif annuel	6
1.3.3.- Exigence de l'olivier	6
1.4 Situation mondiale de l'oléiculture.....	7
1.4.1 Situation de l'oléiculture en Algérie	8
1.4.2 Distribution de l'olivier en Algérie	8
1.4.3 Situation de l'oléiculture en Djelfa	9
1.4.4 Variétés de l'olivier cultivé dans le monde.....	9
1.4.5 Variétés de l'olivier cultivé en Algérie	9
1.5 Les principales maladies de l'olivier.....	10
1.5.1 Maladies d'origine abiotique	10
1.5.2 Les maladies biotiques.....	11
1.5.2.1 Les principaux ravageurs de l'olivier	11
1.5.2.2 Les principales maladies fongiques et bactériennes de l'olivier	12
2 Groupe des <i>Pseudomonas</i>	13
2.1 L'espèce <i>P. syringae</i> et ses pathovars	13
3. La maladie.....	14
3.1 Symptomatologie de la maladie	15
3.2 Principaux caractères bactériologiques :	15
3.3 Classification de <i>Pseudomonas savastanoi</i> :	16

3.4 Cycle épidémiologie et maladies.....	16
3.5 Processus d'infection	18
4. Méthodes de contrôle	20
4.1 Mesures réglementaires.....	21
4.2 Mesures de prophylaxie	21
4.2.1 Éradication	22
4.2.2 Sensibilité du cultivar.....	22
4.2.3 Contrôle direct	23
4.2.3.1 Lutte chimique	23
4.2.3.2 La lutte biologique	25

Matériel et Méthodes

1 Matériel biologique	27
1.1 Isolement et l'identification de l'agent causal.....	27
1.2 Dénombrement des bactéries	28
1.3 Production de pigment fluorescent sur milieu King B.....	28
1.4 Méthode de purification.....	29
1.5 Identification de l'agent pathogène	29
1.5.1 Test de gram.....	29
1.5.1.1 Coloration de Gram	29
1.5.1.2 Test KOH	30
1.5.1.3 Teste Hugh et Leifson	30
1-6 Caractères biochimiques.....	31
1.6 .1 Tests deLOPAT.....	31
1.6.1.1 Production de levane sucrase.....	31
1.6.1.2 Test oxydase	31
1.6.1.3 Test pectinase.....	32
1.6.1.4 Arginine dihydrolase	32
2 Les galeries API 20NE.....	33
2.1 La préparation des suspensions	33
3 Pathogénicité sur l'olivier	36

Résultats et discussion

1 les résultats	36
1.1 Isolement de l'agent causal:	36
1.2 Dénombrement bactériens	36
1.3 Identification des isolats bactériens	37
1.3.1 Coloration de Gram	37
1.3.2. Test KOH	38

1.3.3. Test Hugh et Leifson	38
1.3.4 Production de pigment fluorescent	40
1.4. Les Caractères biochimiques	42
1.4.1 Tests de LOPAT	42
1.4.2 Production Levane sucrase	41
1.4.3 Production d'oxydase:	42
1.4.4 Test Pectinase	43
1.4.5. ARGININE DESHYDROLASE	43
1.4.6 Réaction d'hypersensibilité du tabac (HR)	44
1.4.7 Test du pouvoir pathogène	45
1.5 Test de la galerie API 20 NE:	46
Discussions	48
Discussion de galerie api20NE :	51
Conclusion.....	59
Références bibliographiques.....	60
Annexes	69

Introduction

Introduction

En Algérie l'arboriculture fruitière est parmi les cultures essentielles par sa position géographique privilégiée et ses diverses conditions pédo- climatique, a en effet le privilège de mettre en culture plusieurs espèces fruitière et de produire des fruits frais tous long de l'année par exemple : l'olivier (Boutkhal, 2012).

L'olivier (*Olea europaea. L*) est une espèce ligneuse caractéristique du paysage méditerranéen, elle occupe une place fondamentale dans l'alimentation humaine de par le produit qu'il fournit : l'huile d'olive (Lavee, 1997).

Dans le bassin méditerranéen, l'olivier (*Olea europaea. L*) constitue une essence fruitière principale, tant par le nombre de variétés cultivées que par l'importance sociale et économique de sa culture et de son rôle environnemental. Selon (Gomes *et al.*, 2012), il existe plus de 805 millions d'oliviers dans le monde entier dont 98% sont concentrés sur le pourtour méditerranéen. En fait, le patrimoine génétique oléicole mondial est très riche en variétés. Il est constitué par plus de 2,600 variétés différentes (Muzzalupo *et al.*, 2014).

La culture d'olivier revêt en Algérie une grande importance à la fois sociale et économique. La superficie occupée par l'olivier est passée de 165000ha en 1991 à 312000ha en 2008, grâce au plan National de Développement Agricole et Rural (PNDAR) (Kerbaoua, 2008).

L'olivier semble donc avoir perdu du terrain puisque sa culture ne se pratique, aujourd'hui, qu'au nord de la ligne séparant les hauts plateaux de la zone tellienne. Cette situation peut être expliquée par plusieurs alias d'ordre technique (le vieillissement du verger oléicole ; près de 70% des plantations était âgé de plus de 50 ans. L'appauvrissement des sols, dû à un manque de fertilisation) et d'ordre parasitaire, car l'olivier souffre de nombreux déprédateurs et maladies qui limitent la production. Parmi les maladies les plus communes, nous pouvant citer : L'œil de Paon causé par *Spilocaea oleaginea* et la tuberculose de l'olivier (Loussert et Brousse, 1978).

L'agent causal de tuberculose d'olivier est la bactérie *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*, elle provoque la formation de tumeurs sphériques sur le tronc et les branches et moins fréquemment sur les feuilles et les fruits (Smith, 1920 ; Sisto et Iacobellis, 1999) cette bactérie produit des excroissances tumorales due à la synthèse bactérienne de l'Acide Indole

Acétique et cytokinines (Smidt et Kosuge, 1978 ; Comai et Kosuge, 1980 ; Surico *et al.*, 1985 ; Iacobellis *et al.*, 1994 ; Rodri'guez-Moreno *et al.*, 2008).

Des tumeurs semblables à celles induites par la tuberculose d'olivier ont été observées sur des rameaux d'olivier dans une oliverie dans la région de Ain El Ibel à la wilaya de Djelfa. Pour pouvoir identifier les causes de ces tumeurs notre travail a porté sur trois volés;

- ✓ Prospections sur terrain.
- ✓ Isolement et identification de l'agent causale utilisant une série de tests biochimiques (LOPAT, galerie API20NE)
- ✓ Mise en évidence de leurs éventuel pouvoir pathogène.



chapitre 1

Synthèse bibliographique

1 systématique d'olivier *Olea europea* L :

L'olivier appartient à la famille des Oléacées et au genre *Olea* qui se compose de 33 espèces dont la plupart se trouvent en Europe, en Afrique de l'Est et en Afrique australe, ainsi qu'en Asie tropicale. La seule espèce portant des fruits comestibles est *Olea europaea* (olivier), qui se divise en 2 sous espèces *Olea europaea sylvestris* ou oléastre (l'olivier sauvage) et *Olea europaea sativa* ou l'olivier cultivé se différencient par leurs caractères morphologiques et leurs répartitions géographiques. (Van der Vossen *et al.*, 2007).

- **Olivier sauvage ou oléastre** : L'oléastre est généralement un arbuste buissonnant épineux à petites feuilles rondes ou légèrement allongées et à petits fruits sphériques qui contiennent peu d'huile. On le trouve dans les maquis des régions méditerranéennes et il forme même de vraies forêts en Espagne, en Algérie et en Asie Mineure.
- **Olivier cultivé**: L'olivier cultivé est un arbre de 5 à 10 m de haut au tronc sinueux dont l'écorce est crevassée.

Il présente des feuilles lancéolées et des fruits de forme et de teneur en huile assez variables selon la variété considérée (Van der Vossen *et al.*, 2007).

La systématique d'olivier.

1.1 Les Caractéristiques biologiques et morphologiques de l'olivier

D'après Pagnol (1975), la position taxonomique de l'olivier est la suivante :

Domaine : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Scrophulariales*

Famille : *Oleaceae*

Genre : *Olea*

Espèce: *europaea*

Sous-espèce : *europaea*

L'olivier (*Olea europea* L) , espèce caractéristique du paysage méditerranéen appartient à la famille des Oléacées, caractérisée par des fleurs hermaphrodites régulières, à pétales soudées, à deux étamines, à deux ovules par loge.

Ce sont des plantes ligneuses à feuilles opposées et à fruits charnus (Flahault, 1986; Morettini *et al.*, 1972). Le genre *Olea* regroupe 30 espèces différentes, la plupart sont des arbustes ou des arbres, originaires des régions chaudes où les conditions de croissance sont relativement difficiles (Zohary, 1995). Ces espèces sont réparties sur les cinq continents: l'Afrique, l'Asie, l'Amérique, l'Europe et l'Australie (Tous et Ferguson, 1996).

1.2 Description générale

L'olivier (*Olea europea* L.) est un arbre méditerranéen par excellence, originaire d'un climat sub-tropical sec (Lavee, 1997). Il s'adapte bien à des conditions d'environnement extrêmes telles que: la sécheresse, la salinité (Maas et Hoffman, 1977), la chaleur et à des basses températures (Fontanazza et Preziosi, 1969), mais il craint le gel et il s'accommode d'une pluviométrie d'environ 220 mm par an. Il peut s'adapter à divers types de sols, parfois très pauvres et secs, bien aérés mais, il craint humidité'. Son potentiel d'adaptation est dû à l'anatomie spéciale de ses feuilles, de son système racinaire et de son haut niveau de régénération morphologique (Lavee, 1992).

L'olivier peut atteindre en moyenne 10 à 15m de hauteur et un tronc de 1.50 à 2 m de diamètre dans les régions relativement chaudes, à forte pluviométrie ou abondamment irriguées en été (Loussert et Brousse, 1978). Tandis que, dans les climats froids, les arbres sont généralement plus petits. A l'état naturel, il se maintient en boule compacte et épineuse. L'olivier exige une forte luminosité pour la différenciation des bourgeons à fleurs et le développement des pousses. Dans la plupart des cultures, les fruits se retrouvent à la surface de la frondaison et sa fructification est bisannuelle dans toutes les conditions de croissance. L'olivier est une plante diploïde ($2n=46$) à des degrés d'auto-fertilité différents (Lavee, 1997).

1.2.1 Le système racinaire

Le développement du système racinaire dépend des caractéristiques physico-chimiques du sol, des réserves d'eau et l'aération du sol et du type de reproduction. Dans les sols profonds très imperméables, aérés et légers, le système racinaire est à tendance pivotant. Les racines peuvent atteindre 6 à 7 m en profondeur. En revanche, dans les sols lourds, peu ou non aérés et peu profonds, le système racinaire est à tendance fasciculé. Les racines se développent latéralement (superficiellement). Elles sont très ramifiées et portent un nombre élevé de radicelles (Loussert et Brousse, 1978).

Dans les sols à profil non uniforme, l'olivier développe un système racinaire différencié selon la compatibilité et l'aération de couches du sol.

C'est-à-dire, on peut trouver à la fois la forme fasciculée et pivotante (Lavee, 1997). Dans des cultures irriguées, le système racinaire est fasciculé.

La plupart des racines se trouvent concentrées à une profondeur de 60 à 80 cm et seules quelques racines isolées peuvent descendre jusqu'à 1.5 m de profondeur.

Dans les régions où la pluviométrie moyenne est de 200 mm, les racines peuvent aller jusqu'à 6 m de profondeur à la recherche de l'humidité (Lavee, 1997).

Les jeunes plants d'olivier issus de semis donnent naissance à un système racinaire pivotant dominé par une racine principale centrale. Lorsque le plant est transplanté, il développe un système racinaire central (Loussert et Brousse, 1978).

Les jeunes plants produits en pépinière à partir de boutures herbacées forment dès le départ un système racinaire fasciculé à plusieurs racines principales avec un important chevelu (Yakoub-Bougdal, 2007).

1.2.2 Les organes aériens

1.2.2.1 Le tronc

Les jeunes arbres ont un tronc élancé, circulaire et celui des arbres âgés ont un aspect rugueux, tortueux ou cannelé. La hauteur du tronc est plus ou moins développée et cela en fonction des zones de culture et des cultivars (Loussert et Brousse, 1978).

Actuellement, la nouvelle tendance est de réduire son développement. L'écorce et le bois est gris brunâtre et différent entre arbres irrigués et arbres non irrigués. Dans un environnement sec, le tronc développe une couche subéreuse assez épaisse, alors que chez les arbres irrigués, l'écorce est mince et les tissus sont souvent viables (Lavee, 1997).

1.2.2.2 Les charpentières

Les charpentières sont de grosses ramifications, leur vitesse de croissance et de maturation dépend à la fois du cultivar et des conditions d'environnement, la plus solide des branches pleinement développées se transforme en charpentières par concurrence naturelle ou sélection horticole (Lavee, 1997).

1.2.2.3 La frondaison

Elle représente l'ensemble du feuillage. Les feuilles de l'olivier sont persistantes, leur durée de vie est de l'ordre de 3 ans. Elles sont disposées de façon opposée sur le rameau.

Elles sont simples, entières avec des bords lisses, sans stipule, portées sur un court pétiole (Loussert et Brousse, 1978).

Elles sont quelque peu concaves le long de l'axe étroit en direction dorsale inférieure (Lavee, 1997) La forme et la dimension des feuilles varient considérablement en fonction de l'âge du plant, de sa vigueur et de son environnement. La forme peut varier d'ovale, fusiforme et allongée, lancéolée et quelques fois linéaire, de dimension de 3 à 8 cm de long et de 1 à 2.5 cm de large (Brousse et Loussert, 1978).

1.2.2.4 Le rameau fructifère, inflorescences et fleurs

1.2.2.4.1 Rameau fructifère

Le rameau est de quelques dizaines de centimètres suivant la vigueur de l'arbre et de la variété. Il est délimité à sa base par un entre-nœud très court marquant l'arrêt de croissance hivernal. Il porte des fleurs puis des fruits (Loussert et Brousse, 1978).

Ces rameaux se caractérisent par un taux de floraison élevé qui varie suivant sa localisation sur le même arbre et des conditions hivernales.

Selon Hackett et Hartmann (1967) un refroidissement était nécessaire à l'induction et au développement du processus de différenciation des bourgeons à fleurs.

1.2.2.4.2 Les inflorescences et les fleurs

La croissance des bourgeons est uniforme et toutes les parties poussent simultanément. L'inflorescence et les fleurs atteignent leurs grandeurs définitives justes avant la floraison, de Mi-avril à mi-mai selon l'environnement et le cultivar (Lavee, 1997).

La plupart des fleurs se différencient en même temps, elles commencent à grandir individuellement lorsque l'inflorescence atteint 2/3 de sa longueur définitive.

Quant à la morphologie de la fleur de l'olivier, elle est uniforme pour toutes les espèces d'*Olea europea* L. (Lavee, 1997).

Les fleurs sont regroupées en petites grappes dressées, de 10 à 40 en moyenne, suivant la variété (Loussert et Brousse, 1978). Elles sont petites et ovales, les pétales sont de couleur blanc-jaunâtre, très légèrement odorantes, très sensibles au froid et au vent. Seulement 5% des fleurs parfaites assureront après pollinisation et fécondation la production de l'arbre (Lavee, 1986; Martin *et al.*, 1994).

1.2.2.5 Le fruit et sa composition chimique

Est une drupe à mésocarpe charnu, riche en lipides. Sa forme est ovoïde ou ellipsoïde. Ses dimensions sont très variables suivant les variétés (Loussert et Brousse, 1978) Le fruit est constitué de:

L'épicarpe: C'est la peau de l'olive, elle reste attachée au mésocarpe. Elle est recouverte d'une matière cireuse, la cuticule est imperméable à l'eau. A maturation, l'épicarpe passe de la couleur vert tendre à la couleur violette ou rouge puis à la coloration noirâtre.

Le mésocarpe: C'est la pulpe du fruit. Elle est constituée de cellules dans lesquelles sont stockées les gouttes de graisses qui formeront l'huile d'olive durant la lipogenèse qui dure de la fin du mois d'août jusqu'à la véraison.

L'endocarpe: est constitué par un noyau fusiforme, très dur. Sa forme et sa dimension varient suivant la variété. Ainsi, la morphologie du noyau permet de caractériser et d'identifier les cultivars d'olivier (Barranco et Rallo, 1984). L'endocarpe est formé de deux types de cellules : l'enveloppe qui se sclérifie l'été à partir de fin juillet et de l'amandon à l'intérieur du noyau, il contient deux ovaires dont l'un stérile et le second produit un embryon.

1.3 Caractéristiques de l'olivier

1.3.1 Cycle de développement de l'olivier

L'olivier passe par quatre phases, la première est la période juvénile, qui s'étend du semis à la première floraison au cours d'un temps plus ou moins long de 4 à 9 ans.

Des caractères morphologiques permettent de distinguer une plante juvénile.

Un port très buissonnant, des nombreux rameaux portant des ramifications anticipées plus ou moins courtes et aussi des feuilles petites et larges.

La deuxième est la période d'entrée en production qui s'étale de 12 à 50 ans, il commencera à produire tout en poursuivant sa croissance. La troisième est la période adulte qui dure de 50 à 150 ans, il est en pleine maturité et sa production sera très abondante. Enfin la période de sénescence qui est au-delà de 150 ans, vieil, son tronc commence à se creuser, il perd une partie de son écorce et sa production décline (Loussert et Brousse, 1978).

1.3.2.- Cycle végétatif annuel

Le repos hivernal s'étend de novembre à février. A ce stade, le bourgeon terminal et les yeux axillaires sont en repos végétatif. Le réveil printanier est entre mars et avril, se manifeste par l'apparition de nouvelles pousses terminales et l'éclosion des bourgeons axillaires. La floraison est entre mai à juin, dans cette étape c'est la formation des grappes florales, après la nouaison des jeunes fruits apparaissent, ensuite le grossissement des fruits qui atteignent 8 à 10 cm de long. En octobre c'est la maturation des fruits et l'enrichissement en huile (Loussert et Brousse, 1978).

1.3.3.- Exigence de l'olivier

Selon Labaali (2009) l'olivier craint l'humidité, mais supporte par contre des Sécheresses exceptionnelles (apport de trente à quarante litres d'eau, une à deux fois en juillet et aout, et seulement la première année après la plantation et 450 et 600 mm/an, la production est possible à condition que le sol ait des capacités de rétention en eau suffisantes, ou que la densité de la plantation soit plus faible).

Les fortes hygrométries, la grêle et les gelées printanières sont autant de facteurs défavorables à la floraison et à la fructification.

Selon Boutkhil (2012) les zones de plus grande diffusion de l'olivier sont caractérisées par des hivers doux, des températures rarement inférieures à 0°C et des étés secs avec des températures élevées.

D'après Duriez (2004) les exigences édaphiques montre que le système racinaire de l'olivier s'étend de préférence dans les 50 à 70 premiers cm du sol, les racines pouvant aller jusqu'à un mètre de profondeur pour chercher un supplément d'eau.

C'est pourquoi le sol doit être adapté en termes de texture, de structure et de composition sur une profondeur d'au moins un mètre.

1.4 Situation mondiale de l'oléiculture

Bien que l'olivier soit présent dans les quatre continents, environ 98% de la production mondiale de l'huile d'olive provient du Bassin méditerranéen.

L'olivier est considéré comme une espèce caractéristique de la région méditerranéenne. On le rencontre surtout entre le 25^{ème} et 45^{ème} degré de latitude, dans l'hémisphère nord aussi bien que sud. Les implantations des oliveraies en Europe méditerranéenne sont limitée sua nord au 45^{ème} degré de latitude, limite imposée par les froids hivernaux et les fréquentes gelées

printanières. Dans la rive sud de la Méditerranée en Afrique du nord, l'olivier n'est pratiquement plus cultivé au-delà du 25^{ème} degré de latitude, limite imposée par les rigueurs du climat présaharien vers le sud (Argenson *et al.*, 1999).

L'oléiculture joue un rôle prépondérant dans cette région tant sur le plan agro-économique, que social et environnemental (Nasles, 2006). La surface oléicole mondiale est estimée à 8. 600 000 ha pour une production d'environ 17,3 millions de tonnes d'olives, sur laquelle sont plantés plus de 800 millions d'oliviers. Les quatre premiers pays producteurs (Espagne, Italie, Grèce et Turquie) représentent 80% de la production mondiale d'olives et les dix premiers, tous situés dans la zone méditerranéenne (tableau 1).

Tableau 1 : Superficies des principaux pays producteurs d'olives dans le monde (Argenson, 2008).

Année 2006	Superficie en ha	Oliviers cultivés en ha	Prévisions 2010-2012 en ha	Plantation annuelles, prévisions en ha
Espagne	2 476 000	2 300 000	2 500 000	4 000
Italie	1 378 000	1 278 000	1 390 000	2 000
Grèce	1 157 000	1 017 000	1 165 000	1 333
Turquie	815 000	660 000	855 000	6 667
Syrie	547 000	385 000	571 000	4 000
Tunisie	1 698 000	1 460 000	1 722 000	4 000
Maroc	625 000	540 000	850 000	37 500
Egypte	60 000	45 000	65 500	917
Algérie	245 500	190 500	315 000	11 583
Portugal	369 000	335 000	375 000	1 000

1.4.1 Situation de l'oléiculture en Algérie

La production oléicole a atteint 5,8 millions de quintaux en 2012, contre 3,92 millions de quintaux en 2011. Environ 62 % de cette production est constituée d'olives destinées à être transformées en huile (Khris, 2013).

La superficie d'exploitation passant de 165.000 hectares en 1999 et 390.000 hectares en 2012. L'Algérie prévoit d'atteindre un million d'hectares à l'horizon 2014 pour une production annuelle de 100.000 tonnes d'huile d'olive (Mendil, 2013).

1.4.2 Distribution de l'olivier en Algérie

L'oliveraie Algérienne se répartit sur trois zones oléicoles importantes, la zone de la région ouest représentant 31.400 ha répartis entre 5 wilayas (Tlemcen, Ain Temouchent, Mascara, Sidi Bel Abbes et Relizan). Cette zone ouest représente 16,4 % du verger oléicole national.

La zone de la région centrale couvre une superficie de 110.200 ha repartis entre les wilayas Ain- Defla, Blida, Boumerdès, Tizi Ouzou, Bouira et Bejaia. Cette zone centre représente 57,5% du verger oléicole national.

La région du centre Kabylie (Bouira, Bejaia et Tizi Ouzou) détient à elle seule près de 44 % de la surface oléicole national.

La zone de la région Est représentée par des oliveraies de 49.900 ha représentant 26,1 % du patrimoine national et repartis entre les wilayas de Jijel, Skikda, Mila et Guelma (Skour, 2012).

1.4.3 Situation de l'oléiculture en Djelfa

Dans la wilaya de Djelfa, la superficie oléicole a fait un bond gigantesque de 2000 à 2010, passant de 150 à plus de 7.300 ha, dont 4.300 ha entrés en production, avec une production globale de 1,5 million de litres d'huile a été enregistrée en 2013 (DSA)

1.4.4 Variétés de l'olivier cultivé dans le monde

Les variétés dominantes dans le monde sont ceux trouvés en Tunisie comme olive à huile (Chemlali et Chetoui), olive de table (Marsaline). D'autres variétés sont trouvées en Espagne comme l'olive à huile (Hajiblanca et Verdal) et l'olive de table (Manzanille et Gordal sevillana). En Italie nous signalons l'Olive à huile (Moraiolo et Leccino) et l'olive de table (Ascolona Tenera et Santa Caterina) (Loussert et Brousse, 1978).

1.4.5 Variétés de l'olivier cultivé en Algérie

- **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 Beni-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. (Loussert et Brousse, 1978 ; Mendil et Sebai, 2006 ; Oulebsir, 2008 ; Sahli, 2009).

1.5 Les principales maladies de l'olivier

1.5.1 Maladies d'origine abiotique

Il existe plusieurs maladies d'origine abiotique chez l'olivier (tableau 1).

Tableau 2: Les maladies d'origine abiotiques de l'olivier (L oussert et Brousse, 1978).

Type d'incidents	Facteurs favorisants	Manifestation des symptômes
Accidents climatiques	le gel brûlures par insolation	Chute des feuilles ; nécrose des jeunes écorces, infection parasitaire. Dégâts sur jeunes plantations, sur les tissus du tronc et sur charpentières
Accidents Météorologiques	neiges abondantes la grêle les vents violents	Cassure des frondaisons Sur récolte des fruits, cassures et blessures des eunesj écorces, dissémination de la tuberculose. Cassure des charpentières, réduction de la récolte
Asphyxie racinaire	Terrains trop humides et trop argileux	Jaunissement (chlorose), défoliation, arrêt de la croissance végétative, chute précoce des fruits.
Chloroses alimentaires	Carences en éléments indispensables (azote, calcaire et ions Cl^- et Na^+)	Troubles physiologiques graves du végétal

1.5.2 Les maladies biotiques

Les ennemis de l'Olivier sont très nombreux et diversifiés. Ils comptent près de 250 ennemis importants qui sont signalés par différents auteurs (Cautero, 1965). Ils sont repartis entre 90 champignons, 5 bactéries, 3 lichens, 4 mousses, 3 angiospermes, 11 nématodes, 110 insectes 13 Arachnides, 5 oiseaux et 4 mammifères (Gaouar, 1996).

1.5.2.1 Les principaux ravageurs de l'olivier

- **La mouche de l'olivier (*Dacus oleae*)** : cette mouche infecte la quasi-totalité des oliveraies méditerranéennes et provoque souvent de pertes économiques consistantes. Elle prolifère avec l'augmentation de la température et de l'humidité, et occasionne des dégâts importants car elle pond ses œufs dans l'olive qui présente des taches noires entraînant une chute précoce et une augmentation de l'acidité de l'huile. La lutte contre la mouche de l'olivier doit se faire sur l'arbre dès l'apparition des petites pointes noires sur le fruit et au niveau des pressoirs qui constituent le lieu d'hibernation (nettoyage) idéal pour l'insecte. Le piégeage constitue un autre moyen de lutte efficace (Villa, 2003).

- **La teigne de l'olivier (*Prays oleae*)** : C'est un papillon qui attaque les feuilles, les fleurs et les fruits. Les larves entourent les bouquets floraux par des fils en soie provoquant le dessèchement et la chute des bouquets. Cet insecte connaît trois générations annuelles. La première attaque les feuilles (octobre - novembre), la deuxième attaque les fleurs (avril –mai) et la troisième détruit les fruits. La lutte contre la teigne suppose un traitement à deux temps. (À la floraison et à la fructification) avec des insecticides spécifiques à chaque période, ainsi que le piégeage et la lutte biologique (Jardak *et al.* 2000).
- **La zeuzère (*Zeuzera pyrina*)** : c'est un insecte dont les larves creusent des galeries dans les branches et le tronc et provoquent le dessèchement et l'affaiblissement de l'arbre (Coutin, 2003).
- **La cochenille (*Saissetia oleae*)**: c'est un insecte qui suce la sève de l'olivier. Son excrétion appelée miellat est un excellent support de développement de la fumagine.
La femelle pondreuse meurt en donnant des larves qui après trois stade de développement vont donner une femelle pondreuse (Loussert et Brouss ,1978).
- **Le psylle ou coton (*Euphyllura olivina*)**: c'est un insecte proche du puceron qui attaque la fleur de l'olivier. Ses larves vivent en colonie sur les jeunes pousses et les hampes florales où elles consomment la sève en sécrétant une matière blanche floconneuse (Coutin, 2003).

1.5.2.2 Les principales maladies fongiques et bactériennes de l'olivier

- **L'œil de paon (*Cycloconium oleaginum*)** : c'est un champignon qui s'attaque aux feuilles de l'olivier et forme des taches circulaires brunâtres et sombres provoquant leur chute cause d'affaiblissement de l'arbre et d'une diminution de la production. L'attaque de ce champignon commence dès le début de l'automne et entraîne une chute massive de feuilles. La lutte doit se faire en deux temps (en automne et pendant le dernier mois de l'hiver). Les feuilles détachées, source de contamination doivent être éliminées ou pulvérisées (Guechi et Girre,, 2002) .
- **La verticilliose (*Verticillium dahliae*)**: c'est un champignon présent dans le sol et qui envahit l'arbre lors de la montée de la sève au niveau des racines, il provoque le dessèchement des branches. Il n'existe pas de traitement efficace contre cette maladie (Jardak *et al.*, 2000).
- **La fumagine (noir de l'olivier)** : c'est un champignon qui se développe sur le miellat produit par les cochenilles ou le psylle. Les feuilles de l'arbre se recouvrent d'une pellicule noire qui les empêche de respirer et l'arbre a tendance à s'asphyxier.
Le traitement le plus efficace se fait après la taille du printemps (Argenson *et al.*,1999)

Chapitre 2 : Groupe des *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* constitue l'un des 8 genres bactériens incluant des espèces phytopathogènes. Créé en 1884 par Migula, ce genre bactérien compte aujourd'hui de nombreuses espèces qui colonisent le sol rhizosphérique, la phyllosphère, les tissus végétaux et animaux en décomposition, l'eau douce et l'eau de mer. Quelques espèces sont pathogènes des animaux ou de l'homme en particulier *P. aeruginosa* (Gaignard, 1993).

Aujourd'hui les *Pseudomonas* phytopathogènes sont classés dans 2 groupes. Le premier rassemble les bactéries qui n'accumulent pas le poly- β -hydroxybutyrate et produisent un pigment fluorescent, dans lequel on trouve les espèces phytopathogènes *P. syringae*, *P. viridiflava*, *P. cichorii* et *Pseudomonas savastanoi*.

Le second, rassemble des bactéries phytopathogènes accumulant le poly- β -hydroxybutyrate et ne produisant pas pigment fluorescent : de il s'agit *P. solanacearum*, *P. caryophylli*, *P. cepacia* qui sont des espèces phytopathogènes (Gaignard et al., 1993).

2.1 L'espèce *Pseudomonas syringae* et ses pathovars

Pseudomonas syringae, bactérienne phytopathogène, caractérisée par une grande variabilité génétique, physiologique et biologique qui s'exprime au travers des 52 pathovars qui la composent. L'espèce *Pseudomonas syringae*, décrite sur près de 400 espèces végétales (le seul pathovar *syringae* a été signalé sur 177 hôtes), possède 3 propriétés importantes : un pouvoir pathogène, un pouvoir glaçogène et une aptitude à la vie épiphyte.

Le pouvoir glaçogène de l'espèce *syringae* s'exprimant par une capacité à induire une rupture précoce de la surfusion de l'eau ne concerne qu'une fraction de pathovars, essentiellement le pathovar *syringae*. On a montré qu'il était impliqué dans la gélivité des plantes au printemps (vigne, arbre fruitiers, tomate, pomme de terre) et qu'il est l'un des facteurs favorisant les premières phases de l'infection bactérienne.

Le pouvoir pathogène de *Pseudomonas syringae* montre une spécificité d'hôte liée au pathovar considéré, sauf pour le pathovar *syringae* dont la gamme d'hôtes est actuellement contestée par plusieurs auteurs. Le développement de l'infection est conditionné par l'existence de voies de pénétration naturelles (elles sont limitées ou artificielles (blessures) offertes à l'inoculum ; les conditions climatiques pendant les phases initiales de l'infection et durant l'incubation apparaissent capables de moduler l'intensité de l'infection (Gaignard et al., 1993).

D'après Janse (1982) propose la création de la sous-espèce de *Pseudomonas savastanoi*, il classe les souches spécifiques au frêne, à l'olivier et au laurier rose au sein de pathovars séparés :

Pseudomonas syringae subsp savastanoi pv oleae les souches issues d'olivier.

Pseudomonas syringae subsp savastanoi pv fraxini pour les souches issues du frêne.

Pseudomonas syringae subsp savastanoi pv nerii pour les souches issues du laurier rose

Cependant une nouvelle appellation a été donnée pour cette espèce *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi* (Gardan *et al.*, 2000).

3. La maladie

La tuberculose de l'olivier est causée par la bactérie *Pseudomonas savastanoi pv. Savastanoi* (Gardan *et al.*, 1992) représente une grave maladie dans beaucoup d'olivier produisant des zones du bassin méditerranéen, qui affecte les rendements et qualité de huile d'olive. (Schroth et Coll., 1968, 1973).

Elle infecte par des blessures, en particulier les cicatrices foliaires et les plaies de taille. Commencent par une petite cavité en raison de l'effondrement des cellules végétales immédiat et sont plus fréquentes sur les troncs et les branches, et rare sur les feuilles et les fruits. Par la suite, une prolifération de tissu suit la périphérie de la cavité résultant dans le développement tumeur (Smith, 1920; Surico, 1977).

Cette bactérie a la capacité de passer d'un mode de vie épiphytes (Laben, 1981) à un mode de vie parasitaire chaque fois que les plaies de nature diverses permettent à la bactérie d'envahir les tissus de l'hôte (Ciccarone, 1950). Le pouvoir pathogène est due principalement à la phytohormones indole-3-acétique (AIA) et les cytokinines produit (Comai et Kosuge, 1980 ; Nester et Kosuge, 1981 ; Surico *et al.*, 1985).

3.1 Symptomatologie de la maladie

Pseudomonas savastanoi pv *savastanoi* induit des galles parenchymateuses sur plusieurs espèces d'oléacées, dont l'olivier (Lepoivre, 2003) (Figure1).

Les tumeurs sont principalement des tumeurs trouvées sur les tiges et les branches plus âgées (Varvaro et Surico, 1978). Bien que l'agent pathogène a été occasionnellement isolé de fruits, les feuilles et les racines d'oliviers, tumeurs commencent habituellement comme de petites bosses lisses aux nœuds ou sur l'écorce à entre-nœuds. Sur fruit, la maladie se caractérise par des taches circulaires ou irrégulières de 0,5 à 2,5 mm de diamètre..



Figure 2 : infection naturelle du cultivar olive par *Pseudomonas savastanoi* (Young J., 2004)

3.2 Principaux caractères bactériologiques :

Les espèces de *Pseudomonas savastanoi* se sont des bactéries bâtonnets (0.4-0.8 x 1.0-3.0 U), Gram négatives, catalase positive, mobiles avec 1 ou plusieurs flagelles polaires, une croissance plutôt lente, les colonies sont blanches à jaune pâle, circulaires (0,5 – 2,9 mm de diamètre) (Gardan *et al.*, 1992).

Tous les isolats étaient négatifs pour LOPAT : levan, oxydase, arginine dihydrolase et le test de pectinase et induit la réaction d'hypersensibilité lorsqu'ils sont inoculés sur des plantules de tabac.

Cette bactérie produit de l'acide à partir du D (+) galactose, du glucose, du ribose, du saccharose, du D (+) xylose et du mannitol.

Mais elle ne produit pas d'acide à partir du maltose, du D (+) raffinose, de l'érythrol ou de la salicine. Des basses sont produites à partir du L (+) tartrate. L'aesculine, l'arginine, la gélatine et l'amidon ne sont pas hydrolysés.

Pseudomonas syringae pv *savastanoi* ne réduit pas les nitrates et ne produit pas de sulfure d'hydrogène à partir de la cystéine (Smith, 1908).

3.3 Classification de *Pseudomonas savastanoi* :

❖ Domaine	Bactria (Eubactéria)
❖ Règne	Proteobactéria
❖ Phylum	Proteobactéria
❖ Classe	γ-Proteobactéria
❖ Ordre	Pseudomonadales
❖ Famille	Pseudomonasceae
❖ Genre	Pseudomonas
❖ Espèce	<i>Pseudomonas syringae</i>
❖ Pathovar	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>savastanoi</i> (Lepoivre, 2003).

Actuellement la classification a évolué vers une approche phylogénétique par comparaison de séquences nucléotidiques ; essentiellement les gènes codant pour les ARN ribosomique. L'opéron ribosomique (ARN 16S) constitue le fondement de la classification actuelle des procaryotes

3.4 Cycle épidémiologie et maladies

La maladie causée par les bactérie *Pseudomonas 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 des feuilles sans développer les symptômes (Ercolani, 1978, 1991; Varvaro).

La température ambiante dans laquelle *Pseudomonas savastanoi* peut déclencher l'infection est entre 5 et 37 ° c et ce permettrait aux bactéries de causer des infections tout au long de l'année. Cependant, optimal conditions de développement de la maladie sont sur 22-25 °C et les périodes ultérieures avec une probabilité d'infection est élevé sont l'automne et au printemps (Protta, 1995).

Pseudomonas savastanoi peut infecter des oliviers à n'importe quel moment de la formation de l'année de déclenchement de tumeur seulement quand les conditions sont favorables. . Par conséquent, Lorsque les bactéries infectent un olivier à l'automne, les tumeur commencera à développer plusieurs mois plus tard, mais si l'infection se produit au cours du printemps, le temps nécessaire à la formation de tumeur peut être seulement deux semaines (Wilson, 1935).

La diffusion des bactéries *pseudomonas savastanoi* de infecté (ou inoculés) à des arbres non infectés (ou non inoculés) a été suggéré (Quesada *et al.*, 2010). 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, tempêtes aérosols, les insectes et les pratiques culturelles (Horne *et al.*, 1912. Wilson, 1935). par des relations symbiotiques qui existent entre la mouche d'olivier et *Pseudomonas savastanoi* l'insecte à besoin de la bactérie pendant son développement. Au cours de l'oviposition , les œufs sont contaminés par la bactérie qui présente dans le tractus digestif de l'insecte (Wilson, 1935; Hewitt, 1938; Ciccarone, 1950;. Quesada *et al.*, 2010).

Actuellement, la diffusion bactérienne est facilitée par les pratiques culturelles, de nouvelles plantations avec la densité des arbres élevé, une taille sévère fréquente et avec une petite distance entre les plantes (Tous *et al.*, 2007). Les blessures causées par la récolte et l'élagage, ainsi que par la grêle, le gel et les feuilles cicatrices, créent des niches où l'infection se produit (Wilson, 1935, Janse, 1982) et l'infection de l'olivier par *pseudomonas savastanoi* est directement liée au degré de blessure des arbres (Smith *et al.*, 1991).

Les bactéries peuvent survivre à l'intérieur des tumeurs d'une saison à l'autre et lorsque l'humidité est suffisamment élevée, exsudats contenant de grandes quantités de bactéries sont émis dans lequel ils peuvent survivre en tant 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 résumée à la figure 2.

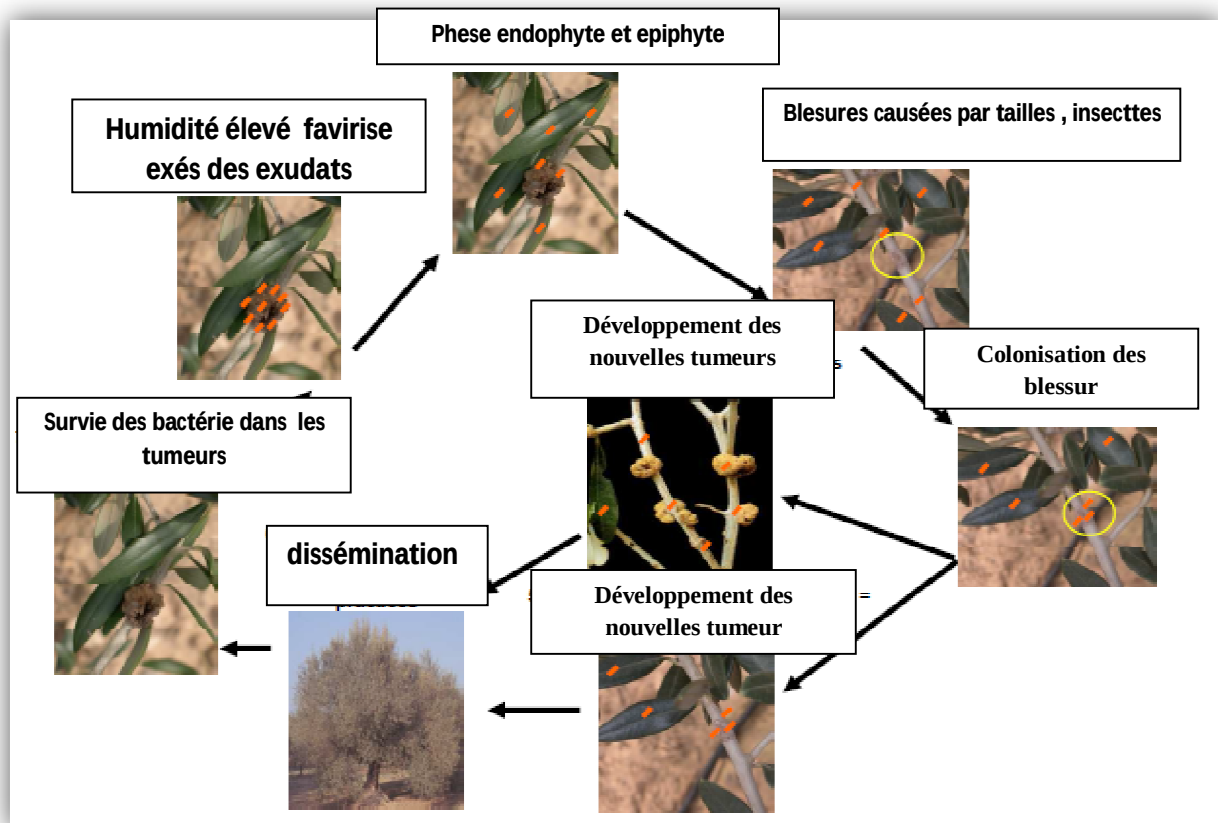


Figure3 : Cycle de la maladie du tuberculose d'olivier causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* (kindly provided by E. Bertolin ., 2003).

3.5 Processus d'infection

Les bactéries *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* provoquent la formation de croissance hyperplasique dans les oliviers, produisant des tumeurs sphériques sur le tronc et les branches et moins fréquemment sur les feuilles et les fruits (Smith, 1920 ; Sisto et Iacobellis, 1999). L'infection par *Pseudomonas savastanoi* et la formation subséquente de tumeur dans les jeunes rameaux d'olivier nécessite l'activité du cambium vasculaire (Wilson, 1965).

L'invasion de l'hôte par la bactérie commence avec la colonisation du site infection, suivie de la désintégration des cellules végétales adjacentes qui conduit à la formation d'une grande cavité autour la région colonisée par les bactéries (Smith, 1920 ; Surico, 1977). L'induction de ces excroissances tumorales (tumeur) est due à la synthèse bactérienne de l'acide indole acétique et cytokinines (Smidt et Kosuge, 1978 ; Comai et Kosuge, 1980). *Pseudomonas savastanoi* contiennent deux copies des gènes *iaaM* et *iaaH* se trouvent dans le plasmide qui sont impliqués dans la synthèse de l'acide indole-acétique (Matas *et al.*, 2009 ; Pérez-Martínez *et al.*, 2008). La synthèse de l'AIA se produit par les réactions

suivantes : L-typtophane-.l'Indoleacetamide-l'acide IndoleAcétique, catalysées par le tryptophane 2-monooxygénase et l'hydrolase (Fig .4) .

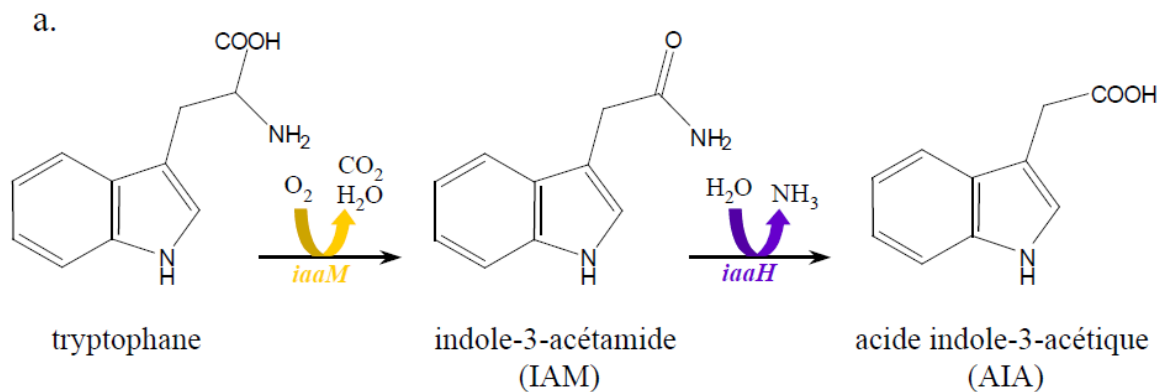


Figure 4 : Synthèse de l'auxine acide indole-3-acétique (AIA) par les gènes *iaaM* et *iaaH*.

Les systèmes de sécrétion protéiques contribuent de façon capitale à l'interaction et la survie des bactéries dans leur environnement et l'exploitation des ressources du milieu ainsi que l'expression de la pathogénie. Chez les bactéries Gram négatif, ils sont nécessaires à la sécrétion ou l'export dans le milieu extracellulaire des facteurs de virulence au travers cellulaire, constituée d'une membrane externe et d'une membrane interne, ou cytoplasmique, séparées par le périplasme (Salmond, 1994). Jusqu'à ce jour, quatre systèmes de sécrétion protéiques majeurs et deux systèmes de sécrétion potentiellement impliqués dans la virulence des bactéries Gram négatif ont été décrits.

Le système de sécrétion de type III (TTSS pour "*type three secretion system*") des bactéries Gram négatif a fait l'objet de nombreux travaux de recherche au cours des 15 dernières années en raison du rôle prépondérant qu'il joue dans la pathogénie de nombreux pathogènes très divers (Genin et Boucher, 2004).

Selon Sisto *et al* (2004), les gènes *hrp/hrc* codent pour la biosynthèse d'un système de sécrétion de Type-III (TTSS) chez les *Pseudomonas savastanoi*

Le T3SS comprend un pilus qui relie la bactérie avec la membrane de l'hôte et le pore qui se forme dans la cellule-hôte pour permettre l'entrée des protéines effectrices de type III (Magie, 1963). Le groupe de gènes de *hrp* réduit la vitalité de la plante en provoquant la fuite d'éléments nutritifs essentiels dans le milieu extracellulaire, en plus de ses rôles, il inhibe le système immunitaire de plante. Les gènes étroitement liés au *hrc* sont responsables sur la réaction hypersensibilité (Janse, 1982) Par ailleurs, il a été signalé que la formation des tumeurs d'olivier dépend-aussi les gènes *hrp* "*hypersensitive response and pathogenicity*" et *hrc* ("*hrp conserved*") et ce, car des mutations à l'échelle des locus *hrp/hrc* induisent un déficit

chez la bactérie dans sa pathogénie et son pouvoir d'induction de la réaction d'hypersensibilité (Sisto *et al.*., 2004).

4. Méthodes de contrôle

Les méthodes utilisées pour contrôler les bactéries phytopathogènes sont basés sur les mesures préventives et curatives et la combinaison des deux devrait être utilisée dans le cadre d'un contrôle intégré.

Les cinq principaux objectifs d'un programme de contrôle de la maladie usine intégrée sont à éliminer ou réduire l'inoculum initial, réduisent l'efficacité de l'inoculum initial, augmenter la résistance de l'hôte, apparition de la maladie retard et ralentir les cycles secondaires (Agrios, 2005). La clé de tout programme de lutte intégrée est une question de durabilité à différents niveaux (Caballero et Murillo, 2003). Sur le plan économique, il doit s'assurer que les bénéfices des agriculteurs et au niveau environnemental, sélectionner les méthodes de contrôle qui minimisent l'impact sur l'environnement.

Et enfin, les méthodes de contrôle par eux-mêmes doivent assurer la durabilité et ils doivent rester efficaces sur temps.

Le suivi d'une stratégie de ce type est indispensable pour assurer une agriculture durable et sûre.

Gestion de bactéries pathogènes dans le domaine de la maladie repose essentiellement sur des procédures préventives, car il est difficile d'éradiquer les pathogènes dès sa créés. En raison de l'impact économique de la maladie de tumeur d'oliviers, cultivateurs acquière un contrôle adéquat méthodes pour surmonter ses répercussions négatives sur le rendement et même sur la qualité du fruit d'Olivier (Quesada *et al.*, 2010 ; Schroth *et al.*, 1973). Contrôle de tumeur d'olive devrait reposer sur une stratégie de lutte intégrée, donnant la priorité aux mesures plus efficaces qui sont de type préventif.

Celles-ci sont très variées et peuvent être regroupés dans des mesures réglementaires, empêchant l'introduction de l'agent pathogène dans les aires protégées et des mesures prophylactiques à réduire ou à éliminer l'agent pathogène ou à entraver son établissement de pépinières ou vergers (Montesinos et López, 1996).

4.1 Mesures réglementaires

Production, entretien et utilisation des végétaux certifiés qui est pathogène libre, est l'une des principales mesures préventives permettant de contrôler les pathogènes des plantes. À cet égard, il est très important que le *Pseudomonas savastanoi* s'affiche dans la liste des organismes nuisibles et maladies qui affectent sensiblement les normes de qualité de plantes, établis par la Commission européenne (Directive N° 92/34/CE) de l'UE.

Comme conseillé par les européens et la Mediterranean Plant Protection organisation (EPPOOEPP), nouvelles plantations d'oliviers s'établisse à l'aide de Psv-gratuit certifié matériel végétal (OEPP, 2006).

4.2 Mesures de prophylaxie

Mesures de prophylaxie visent à réduire ou éliminer les concentrations d'agents pathogènes ou font obstacle à sa création dans une culture et ces mesures peuvent également être de nature eradivative basé sur la sensibilité du cultivar ou de protection directe (Montesinos et López, 1996).

Dans le cas du *Pseudomonas savastanoi*, elles comprennent toutes celles effectuées pour la désinfection des plantes, des machines agricoles contact avec les plantes.

4.2.1 Éradication

La présence des tumeurs dans une arborescence est liée à un niveau élevé de la maladie, après plusieurs années et cela met en évidence la nécessité d'utiliser des méthodes de lutte préventive ou éradication de maintenir les oliviers sans tumeur (Quesada *et al.*, 2010 a). Dans les plantations affectées, la méthode d'éradication serait le déracinement des arbres touchés ou l'utilisation de pratiques culturelles pour réduire la source d'inoculum, effectuant des traitements de cuivre, l'élagage des branches infectées et réduction du nombre de blessures au cours de la saison de croissance et en particulier à la récolte (Beltrá, 1956 ; Penyalver et coll., 1998 ; Trapero et Blanco, 1998 ; Wilson, 1935). Ceci est particulièrement important dans les nouvelles plantations à haute densité et fréquente élagage sévère, où le contrôle avec précision les mesures devraient être surveillés (Tous *et al.*, 2007).

La suppression de nœuds est très laborieuse et ne peut pas être entièrement efficace parce que les nouvelles blessures sont généralement effectués lorsque les tumeurs sont supprimés et les nouveaux nœuds peuvent se développer dans ces blessures dans les années suivantes, même lorsque des produits chimiques préventifs (Wilson, 1935).

L'élagage des branches infectées est plus efficace que la suppression de nœuds comme moins de blessures sont causées à l'Olivier et la charge de l'inoculum bactérien est réduite au minimum (Quesada *et al.*, 2010 ; Teviotdale et Krueger, 2004 ; Wilson, 1935).

Toutes les branches coupées doivent être brûlées dans le même champ pour prévenir la propagation de la maladie (Trapero et Blanco, 1998).

Dans le cas de partiellement contaminés d'oliviers, arbres sains devraient être récoltés et taillés première (Wilson, 1935).

En outre, cultivateurs devraient récolter des olives uniquement par temps sec et évitez d'utiliser des techniques telles que frapper les branches d'Olivier avec des poteaux en bois (Krueger *et al.*, 1999).

4.2.2 Sensibilité du cultivar

L'utilisation de cultivars résistants, ou cultivars de faible susceptibilité aux maladies bactériennes serait celui de la maladie plus appropriée des méthodes de contrôle (Montesinos et López, 1996).

Toute fois, dans des cultures ligneuses, comme les oliviers, éleveurs et phytopathologistes sont gênées par l'amélioration des processus par suite de l'entrée retardée en termes de reproduction lente.

Très peu de données sont disponibles à partir des expériences d'inoculation comparative et se limite à plusieurs cultivars (cinq à huit) d'Italie, Grèce, Maroc et du Portugal (Benjama, 1994 ; Catara *et al.*, 2005 ; Hassani *et al.*, 2003 ; Marcelo *et al.*, 1999 ; Panagopoulos, 1993 ; Varvaro et Surico 1978), À l'exception d'Espagne où 29 cultivars ont été évalués (Penyalver *et al.*, 2006).

Observations sur le terrain ne donnent pas toujours les informations universellement valables sur la vulnérabilité intrinsèque de chaque cultivar, parce que la quantité initiale d'inoculum bactérien diffère entre les plantes et l'infection de facteurs favorisant l'infection peuvent varier dans différents domaines.

4.2.3 Contrôle direct

Mesures de protection directe sont principalement basées sur des principes chimiques ou biologiques et sont utilisées par les agriculteurs lors de mesures prophylactiques n'ont pas réussi à arrêter la progression de la maladie en une seule zone (Montesinos et López, 1996) ou sont combinés avec toutes les autres mesures dans une stratégie de lutte intégrée.

4.2.3.1 Lutte chimique

Lutte chimique contre les maladies des plantes bactérienne n'est efficace que lorsqu'ils sont utilisés dans stratégies préventives avant l'apparition de l'infection ou dès le début de l'infection bactérienne processus (Montesinos et López, 1996).

Plus précisément, la lutte chimique contre la tuberculose d'oliviers a compte tenu des résultats incohérents en expériences sur le terrain et peut également avoir une faible efficacité et même Voir la phytotoxicité pour certains tissus. Cette variabilité est due à plusieurs facteurs, tels que la quantité d'inoculum, synchronisation des traitements, des conditions climatiques, sensibilité du cultivar, méthode de demande de traitement, ou l'état physiologique de la plante hôte.

Composés du cuivre sont le principal traitement chimique préventif recommandé contre la tuberculose d'olivier et leur utilisation est recommandée chaque année lorsqu'il y a un risque d'infection, en printemps et automne avant la saison des pluies, après que les feuilles tombent et surtout après la grêle, gel et d'autres olive d'événements causant des

lésions (Penyalver *et al.*, 1998 ; Protta, 1995 ; Smith *et al.*, 1991 ; Wilson, 1935). une corrélation positive a été trouvée entre l'incidence de la maladie et les pluies de printemps (Teviotdale et Krueger, 2004) et il a été observé que les vents humides dans les zones côtières promouvoir infection (Smith *et al.*, 1991).

Les composés à base de cuivre utilisées dans les oliveraies en Espagne incluent divers sels et préparations (oxychlorures, oxydes, hydroxydes et sulfates) ainsi que leur mélange avec des composés organiques obtenues par synthèse chimique. Un exemple intéressant est la combinaison du sulfate de cuprocalcic plus de mancozèbe parce qu'il a un effet synergétique contre plusieurs maladies bactériennes (Hausbeck *et al.*, 2000 ; Jones *et al.*, 1991 ; Marco, 1983).

Actuellement l'oxychlorure de cuivre est le composé de cuivre plus couramment recommandé contre la maladie de tuberculose d'olivier par les services de vulgarisation espagnole. L'ingrédient actif dans ces produits est l'ion cuivre divalent solubilisé et fois, bactéries et usine exsudats, contiennent des composés qui sont capables de cuivre de solubilisation. Généralement, ces produits ont un effet toxique ou bactériostatique, seulement prévenir la multiplication des bactéries et la plupart des bactéries peut mourir à cause des effets toxiques des ions Cu ⁺⁺, ou entrer dans l'État VBNC (Viable mais Non cultivable) dans lequel ils sont incapables de croître sur un milieu solide. Cet État peut être induit par les ions de cuivre, comme indiquées précédemment pour plusieurs bactéries phytopathogènes (Alexander *et al.*, 1999 ; Gris et Steck, 2001).

Ces produits chimiques préventifs les traitements sont recommandés pour tant pour réduire les populations de *Pseudomonas savastanoi* épiphytes et empêcher leur pénétration à travers les plaies de la plante.

L'efficacité de la lutte chimique de tuberculose d'olivier a été mal évaluée, tant sur le terrain et dans les essais expérimentaux dans des conditions contrôlées.

L'effet des traitements contre l'inoculum épiphyte de *Pseudomonas savastanoi* ou la période optimale d'application ne sont pas bien connues.

Plusieurs études suggèrent que la gestion des populations de *Pseudomonas savastanoi* épiphytes a probablement réduit l'incidence de la maladie de tuberculose d'oliviers (Ercolani, 1978, 1991 ; Lavermicocca & Surico, 1987 ; Quesada *et al.*, 2007, 2010 a).

Dans ce contexte, un programme de lutte chimique utilisant des composés de cuivre a été proposé, basé sur des observations de terrain en Californie (Horne *et al.*, 1912 ; Wilson, 1935).

Les premières expériences de terrain décrites dans la littérature ont été menées en Californie où plusieurs formulations de bouillie bordelaise contrôlée la tuberculose d'olivier présentant des symptômes de phytotoxicité minime dans commercial d'oliviers avec infections à *Pseudomonas savastanoi* (Krueger *et al.*, 1999 ; Teviotdale et Krueger, 2004 ; Wilson, 1935).

Analyses exécutées avec l'hydroxyde de cuivre ont montré qu'une seule application de cuivre post-récolte offrait une protection minime contre la maladie et par la suite, des pulvérisations supplémentaires au printemps étaient nécessaires pour améliorer considérablement son contrôle (Teviotdale et Krueger, 2004).

Les traitements chimiques basés sur les antibiotiques et l'émulsion huile-eau contenant des hydrocarbures ont également été recommandées mais sans encourager les résultats (Scrivani et Bugiani, 1955 ; Schroth et Hildebrand, 1968).

L'utilisation des antibiotiques tels que la streptomycine et Terramycine a réussi dans des conditions expérimentales (Trapero et Blanco, 1998), mais leur application contre les bactéries phytopathogènes est actuellement interdit par la législation de l'UE, bien qu'elle est autorisée dans d'autres pays.

4.2.3.2 la lutte biologique

La lutte biologique est une autre alternative pour contrôler la maladie de la tuberculose d'oliviers, mais est rarement testée contre le *Pseudomonas savastanoi*.

A ce jour, les agents de lutte biologique ont été évalués en utilisant des isolats de *P. fluorescens* (Blightban) et *Pseudomonas savastanoi* mutants produisant des bactériocines, mais sans résultats satisfaisants (Krueger *et al.*, 1999 ; Varvaro et Martella, 1993).

En outre, non pathogènes *Pseudomonas* sp., isolées de la rhizosphère de l'Olivier s'est révélée hostile contre le *Pseudomonas savastanoi* (Rokni-Zadeh *et al.*, 2008). récemment, *P. fluorescens* et *Bacillus subtilis* isolats provenant de noeuds et les feuilles d'oliviers a montré antagoniste activité in vitro contre le Psv (Krid *et al.*, 2010).

Bactériocines sont d'excellents candidats pour l'utilisation dans l'agriculture pour contrôler les bactéries phytopathogènes en raison de leur grande spécificité.

Une bactériocine produite par *P. syringae* pv. *ciccaronei* a été montrée pour inhiber la prolifération et la survie des épiphytes (Lavermicocca *et al.*, 2003). L'efficacité des essais avec des plantes d'oliviers deux ans dans une chambre de culture est équivalente à celle de l'hydroxyde de cuivre, bien qu'il serait intéressant d'évaluer son efficacité en pépinière ou de plantes et de déterminer leur toxicité et leur persistance avant conseiller leur enregistrement commercial.



Chapitre3

Matériel et Méthode

1 Matériel biologique

L'objectif de notre travail est une contribution à l'identification de l'agent pathogène de la tuberculose d'olivier dans la région de Ain el ibel qui situe à 45 Km de la wilaya de Djelfa. Nous avons réalisé dans une première étape une prospection 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 vérification de son éventuel pouvoir pathogène.

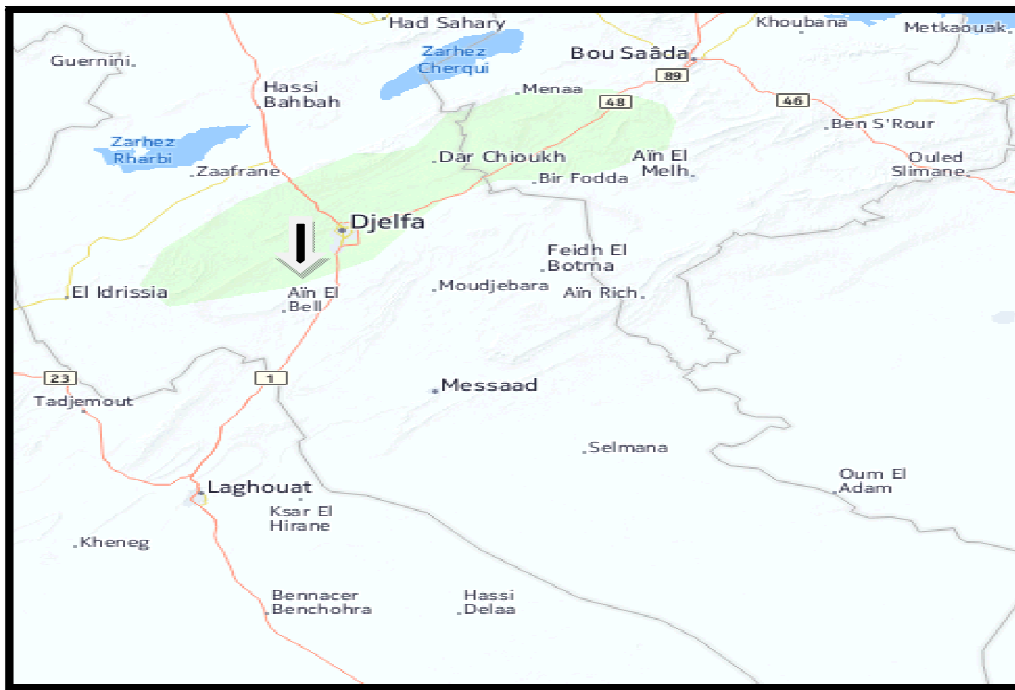


Figure5 : carte géographique qui présente la région de Ain el ibel à la wilaya de djelfa

Les prospections ont porté sur deux oliveraies ; pour la première aucun symptôme n'a été observé par contre dans la deuxième oliveraie qui se situe à 10 Km des symptômes semblables à celle de la tuberculose d'olivier ont été observés. Nous avons calculé les taux d'infection utilisant la formule suite:

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

Les échantillons prélevés par la méthode subjective, Ils sont réalisés à partir des tumeurs bactériennes fraîches des rameaux,

Les échantillons ont été placés dans un sac plastique et transportés directement au laboratoire et conservés au réfrigérateur à 4°C.

1.1 Isolement et l'identification de l'agent causal:

Après avoir reçu les échantillons au laboratoire des tumeurs ayant 1g ont subi une désinfection superficielle par trempage pendant 10 minutes dans de l'hypochlorite de sodium à 1%, puis trois rinçages successives à l'eau distillée stérile.

Les tumeurs sont découpées puis écrasées dans un mortier contenant 9 ml d'eau distillée stérile, la suspension préparée a été transférée dans un tube à essais stérile, Après l'agitation de cette suspension mère, une série de dilution a été réalisée de 10^{-1} jusqu'à 10^{-5} . Pour l'ensemencement, nous avons étalé un volume de 0,1ml par milieu de culture et par dilution à raison de trois répétitions pour chaque boîte, les répétitions augmentent la chance d'isoler un grand nombre d'isolats, deux milieux de culture ont été utilisé ; le milieu KB semi sélective et un milieu général LPGA, l'incubation a été effectuée pendant 5 jours à une température de 27 C° à l'étuve.



Figure 06 : méthode d'isolement d'agent pathogène (origine 2016)

1.2 Dénombrement des bactéries

Pour estimer le nombre des bactéries viables sur les deux milieux en unité formant colonie (UFC), nous avons effectué le comptage des colonies à l'aide de l'appareil compteur de colonies (Klement *et al.*, 1990).

Seules les boîtes ayant 30 à 300 colonies sont retenues. Pour le calcul du taux des bactéries par échantillon nous avons utilisé la formule suivante

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

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

n : Facteur de dilution.

1.3 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 isolats à tester à l'aide d'une anse dans une boîte de Pétri contenant le milieu King B. Les boîtes sont incubées à 27°C pendant 48h (Maury, 1987). Après incubation, la production du pigment fluorescent bleu ou vert vérifie.

1.4 Méthode de purification

Après 48h d'incubation, la sélection des colonies est basée sur les caractères morphologiques de *Pseudomonas savastanoi* tel que la forme, la couleur, le diamètre. Pour la purification des colonies nous avons effectué des opérations de repiquage successives (5 fois) selon la méthode de stries. À l'aide d'une anse de platine jusqu'à obtention de cultures bactériennes pures (Prescott *et al.*, 2007). Ces colonies ont un diamètre variant de 1 à 2 mm elles sont convexes d'une surface lisse et d'un contour rond régulier (Gardan L. *et al.* 1992).

❖ Conservation des isolats

Après purification, les jeunes colonies bactériennes sont aseptiquement transférées et ensemencées dans des tubes à essai contenant un milieu KB inclinée ensuite, incubés à 27°C à pendant 48h puis conservés au réfrigérateur à 4°C.

1.5 Identification de l'agent pathogène

1.5.1 Test de gram

1.5.1.1 Coloration de Gram

Cette coloration permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour la distinction entre les deux grands groupes : bactéries dites Gram + et bactéries dites Gram -. Dont le principe est le suivant.

✓ **Réalisation de frottis**

A l'aide d'une anse de platine nous avons déposé une colonie bactérienne isolée avec une goutte d'eau distillée sur une lame propre, puis nous avons étalé cette colonie et nous l'avons fixé à la veilleuse du bec bunzen.

✓ **La coloration**

Dans cette étape, nous avons utilisé plusieurs colorants où nous avons commencé par quelques gouttes du violet de gentiane, nous l'avons laissé agir pendant 30 secondes à une minute, puis nous avons rincé à l'eau distillée. Avec le lugol (solution d'iode iodo-ioduré) nous avons traité notre lames pendant la même durée, puis nous avons rincé à l'eau distillée. Après ces opérations une décoloration (rapide) a été faite à l'alcool, coloration (versez goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement), jusqu'à l'obtention d'un filet clair.

Nous avons rincé abondamment avec de l'eau distillée (pour stopper la décoloration). En suite nous avons recoloré par la fuchsine pendant 30 secondes à une minute. En fin nous avons lavée doucement à l'eau distillée et séchée la lame à l'aire ambient .

La lecture de résultats de ce test est effectuée par une observation l'objectif 40X et en utilisant une goutte d'huile à immersion 100 X (Singleton, 2005).

1.5.1.2 Test KOH

En parallèle de la coloration de Gram, un test plus rapide a été effectué, qui permet de distinguer entre Gram positif et Gram négatif, sur une lame propre deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 3%), sont mises en contact avec une crème bactérienne en effectuant un mouvement circulaire.

La solution de KOH devient visqueuse en présence de bactéries a gram négatifs. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30 secondes (la formation des filés observable à l'œil nu).

Pour une réaction négative aucune viscosité n'est observée, donc les bactéries sont des grams positifs.

1.5.1.3 Teste Hugh et Leifson

Pour déterminer la voie d'attaque des glucides (glucose en particulier) par les bactéries à Gram négatif, nous avons utilisé le milieu de Hugh et Leifson. Ce milieu est additionné de glucose pour la détermination de la voie d'attaque.

Mais il peut aussi être préparé avec d'autres glucides (lactose, saccharose...) pour étudier leur métabolisme par ces bactéries. Ce milieu contient un indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol qui permet d'apprécier le type de dégradation du glucide (glucose) qui libère des acides et éventuellement des gaz. Il vire au jaune en milieu acide, sinon il conserve la couleur verte du milieu ou il vire au bleu en cas d'alcalinisation.

Ce test consiste à ensemencer la bactérie par piqûre centrale, avec un fil de platine. Pour réaliser une condition anaérobie nous avons ajouté un (01) cm d'huile de paraffine stérile, incubé à une température $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 à 48h.

1-6 Caractères biochimiques

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).

1.6 .1 Tests de LOPAT

1.6.1.1 Production de levane sucrase

Test levane sucrase sert à déterminer si la bactérie polymérise le fructose en polyfructose. A l'aide de l'anse à inoculation, inoculer le milieu de culture levane par stries avec une culture bactérienne jeune.

Après 3 à 5 jours d'incubation à 27°C, l'apparition d'une culture abondante, bombée, muqueuse et brillante indique que la bactérie possède une levane sucrase (Goszczyńska *et al.* 2000).

1.6.1.2 Test oxydase

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif.

Ce test permet de mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semiquinonique rose violacé.

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes, c'est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons.

Dans ces réactions, l'oxygène est réduit en eau H₂O ou en eau oxygénée H₂O₂. Les bactéries qui possèdent l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N,N,N,N-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine qui est un composant du réactif de la recherche du cytochrome oxydase en bactériologie, ce qui donne des produits violacés. (Marchel, 1991).

Ce test est réalisé à l'aide de disques prêts à l'emploi, imprégnés du réactif :

N- diméthyl paraphénylène diamine, sur lequel nous avons déposé une colonie.

La lecture du résultat était immédiate et sans incubation pendant 60s.

1.6.1.3 Test pectinase

Le test pectinase est un test utilisé pour vérifier la capacité des isolats bactériens à dégrader la pectine. Ce test consiste à désinfecter des tubercules de pomme de terre par l'éthanol, puis par l'hypochlorite de sodium à 1 %, suivi par 3 rinçages successifs à l'eau distillée stérile, nous avons coupé en tranches de 7mm d'épaisseur et placé chaque tranche dans une boîte de pétri sur du papier absorbant stérile imbibé d'eau distillée stérile (Bradbury, 1970).

La suspension bactérienne a été préparée à une concentration supérieure à (10^8 UFC/ml), on mettrait des colonies bactériennes jeune âgée de 24h dans l'eau distillée stérile. Nous avons réalisé un petit creux au centre des tranches et nous les avons rempli avec un volume de 0.1 ml de la suspension bactérienne jeune âgée de 24 h. L'incubation des boîtes a été effectuée à une température de 27°C pour 10 à 14 jours.

La réaction est considérée positive par l'apparition de pourriture qui s'accompagne d'une forte odeur. Dans le cas où aucune réaction n'est observée le test est considéré comme négatif.

1.6.1.4 Arginine dihydrolase

L'arginine, c'est un acide aminé, peut être catabolisée dans l'ornithine par une réaction enzymatique qui produit de l'ATP et de NH_3 . La voie est généralement appelée "dihydrolase arginine" car elle implique deux enzymes qui produisent la L-citrulline (arginine desaminase) puis ornithine (ornithine carbamoyltransferase).

Certains *Pseudomonas* sont capables de croître dans des conditions anaérobies en raison de ce mécanisme. À la suite de l'carbamoyl (un produit associé à la production ornithine) une réaction avec l'ADP et le carbamate kinase, de l'ATP, du CO_2 et du NH_3 sont produites, et le milieu devient alcalin. Ceci peut être observé visuellement à cause du rouge de phénol, d'un colorant qui change de couleur en fonction du pH.

Pour ce test les tubes et couvrent avec 1 cm d'huile de vaseline préalablement autoclavée pendant 20 min à 121°C. Incuber pendant 5 jours à 27°C. Le test est positif s'il y a un changement définitif de couleur rouge, dans des conditions anaérobies.

S'il n'y a pas de changement de couleur, le test est négatif. *Pseudomonas fluorescens* et d'essai *P. fuscovaginae* positif, mais *P. cichorii* et test *syringae* *P.* test négatif. (Thornley 1960).

2 Les galeries API 20NE

Cette galerie est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactérie te non fastidieux elle réunit 20 tests à la fois dont 8 sont conventionnelles et le reste sont d'assimilation. Pour l'inoculation de la galerie nous avons suivi les recommandations du fabricant biomireo (2009). Les microtubes quicontien la galerie sont des milieux de culture en état déshydraté, les tests conventionnels ont été inoculés avec une suspension bactérienne saline qui va reconstituer le milieu.

Après la période d'incubation les réactions se traduisent par un changement de couleur spontanée ou bien due à des ajouts de réactifs, les tests d'assimilation sont révélés alors par la présence ou absence des troubles ou pas sur les cupules inoculées.

La lecture des résultatsa été effectuée après 24 h à 48 h d'incubation à 30°C en utilisant le tableau (2) de lecture fournis par le fabricant.

2.1 La préparation des suspensions

Deux suspensions bactériennes ont été préparées pour l'inoculation de la galerie API 20NE nous avons réalisés deux méthodes différentes selon la nature du test et ces exigences, pour les tests conventionnels la solution d'inoculation a été issue d'une à quatre colonies bactériennes âgé de 24h et disperser dans 9ml d'eau physiologique à 0.9%.Pour les tests d'assimilation la suspension a été Prépare en ajoutant 200 µl de la première suspension dans une ampoule de milieu 0.85 Na Cl, fourni avec la galerie.

Les solutions sont été mises dans les tubes qui leurs convient à l'aide d'une pipette Pasteur stérile en évitant la formation des bulles d'air (Figure 3).

Les cupules des tests TRP, GLU, et ADH, ont été remplis avec l'huile de vaseline pour créé un environnement d'anaérobiose. La lecture des résultats a été faite après 24h et 48 h d'incubation à une température de 30°C, à l'aide d'un guide (voir tableau 3)

Figure 7: méthode de préparation de la suspension d'inoculation de la galerie API NE 20

Tableau3. Table de lecture de la galerie API 20 NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYME S	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	nitrate de potassium	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 +NIT 2 / 5 min	
				Incolore	Rose rouge
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min	
				Rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRYPTOPHANE)	JAMES / immédiat	
				vert pâle jaune	Rose
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUCOSE)	bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	Jaune	orange rose rouge
URE	Urée	0,76	UREase	Jaune	orange rose rouge
ESC	Esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	Jaune	Gris Marron Noir
GEL	Gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD- Galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	1,56	Assimilation glucose	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	1,4	Assimilation arabinose	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	1,4	Assimilation mannose	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	1,36	Assimilation mannitol	Transparence	Trouble
NAG	N-acetyl-glucosamine	1,28	Assimilation N-acétyl-glucosamine	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	1,4	Assimilation maltose	Transparence	Trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	Assimilation potassium gluconate	Transparence	Trouble
CAP	acide caprique	0,78	Assimilation acide caprique	Transparence	Trouble
ADI	acide adipique	1,12	Assimilation acide adipique	Transparence	Trouble
MLT	acide malique	1,56	Assimilation acide malique	Transparence	Trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	Assimilation trisodium citrate	Transparence	Trouble
PAC	acide phénylacétique	0,8	Assimilation acide phénylacétique	Transparence	Trouble

3 Pathogénicité sur l'olivier

Le test du pouvoir pathogène a été effectué sur des oliviers âgés d'une année. Des blessures de 0,5 cm de longueur ont été étatisées avec un scalpel stérile dans la zone cambiale de la tige de chaque plantule. Chaque site blessé, a été inoculé avec 10 µl d'une suspension bactérienne ajustée à (10^8 UFC/ml).

L'incision est ensuite couverte par papier aluminium stérile pendant une semaine. Vingt isolats bactériens ont été choisis pour la réalisation de ce test tout en faisant quatre incisions par plantules. Une Plantule témoin a été inoculée avec eau stérile seulement.

Les plants inoculés ont été incubés à 23-27 °C.



Chapitre 4

Résultats et discussion

1 les résultats

L'objectif de notre travail est une contribution à l'identification de l'agent pathogène de la tuberculose d'olivier dans la région de Ain el ibel à la willaya de Djelfa.

Les prospections ont porté sur deux oliveraies ; pour la première aucun symptôme n'a été observé par contre dans la deuxième oliveraie le taux d'infection était de 100% au niveau de cette oliverie.

L'examen visuel qui se repose sur l'observation des symptômes caractéristiques de la maladie est complété par des recherches plus approfondies pour confirmer la présence de la maladie en question, et ce ci par une série de tests au laboratoire.

1.1 Isolement de l'agent causal:

L'isolement de l'agent pathogène à partir des rameaux infectés a été réalisé sur deux milieux de culture KB et LPGA, L'aspect macroscopique des colonies est observé directement sur la gélose après trois jours d'incubation, il permet de connaître la forme, le contour, la texture, la couleur des colonies.

1.2 Dénombrement bactériens

Pour dénombrer le taux de "*Pseudomonas like bacteria*" dans les trois échantillons de tumeurs infectés par cette bactérie Le comptage des colonies bactériennes a été réalisé sur les deux milieux King B et LPGA après trois jours d'incubation. Pour cela, nous avons utilisé la formule de Klement *et al.* (1990) .

Dans le premier échantillon, nous avons constaté que le taux de la bactérie est de 15% par rapport la flore totale, et pour le deuxième échantillon est de 6.26 % par rapport la flore totale. Quand au troisième échantillon, ce taux est de 1% par rapport la flore totale.

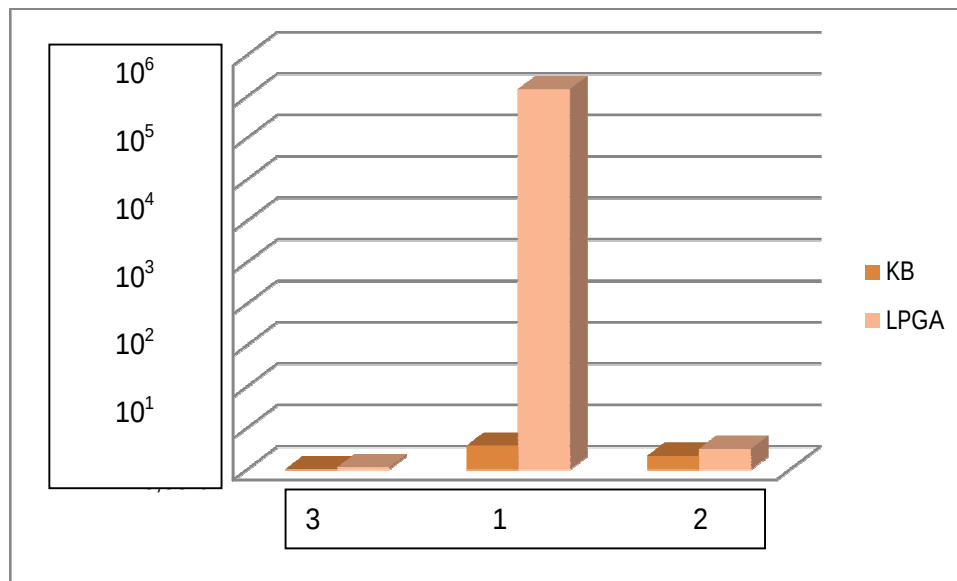


Figure 08: le taux des *Pseudomonas savastanoi*

1.3 Identification des isolats bactériens

Une série de purifications successifs sur le milieu KB, nous a octroyé la possibilité de sélectionner 32 isolats, présentant les mêmes caractères cultureux de l'agent pathogène recherché *Pseudomonas savastanoi* (des colonies de couleurs blanche ou crème, lisse, plate, et luisants) (Gardan *et al.*, 1992).

Pour l'identification préliminaire des isolats, nous avons adopté le schéma proposé par Schaad *et al.* (2001). Selon ce protocole, la détermination du genre bactérien au quel sont affiliés nos isolats, repose sur les résultats des tests suivants: test de gram, test KOH. Hugh et Leifson et la fluorescence sur king B.

1.3.1 Coloration de Gram

Suite à la coloration de Gram, l'observation microscopique des frottis bactériens colorés à l'objectif (×40). parmi les 32 isolats, 29 isolats ont une forme bacille de couleur rose, 03 isolats sont des bacilles à Gram positif de couleur violet.

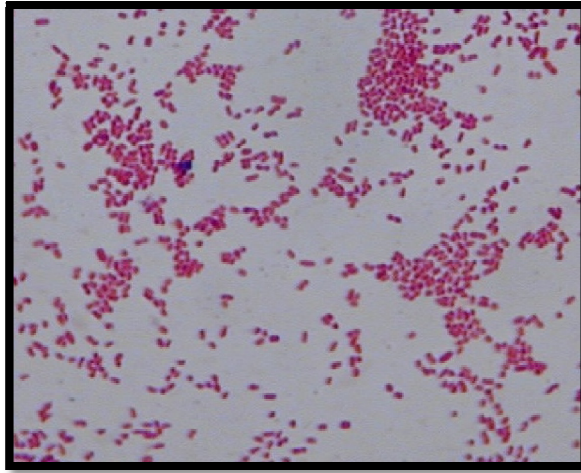


Figure 9 : Observation microscopique de coloration de Gram de la bactérie.

1.3.2. Test KOH

Pour le test KOH, sur un total de 32 isolats testés 29 ont montré une réaction positive, cela veut dire que ce sont des Grams négatifs alors que 03 isolat n'ont montré aucun changement lors de leur contact avec la solution de KOH et cela indique que ce sont des Grams positifs.

Les Gram positifs ont été éliminés alors que les Gram négatifs ont été gardés pour effectuer le reste des tests de caractérisation.

1.3.3. Test Hugh et Leifson

Après 24 à 48 heures d'incubation pour 26 isolats nous avons observé un virage de la couleur du vert au jaune pour le tube qui ne contient pas de l'huile (Cf. Figure 9).

D'après ces résultats, nous pouvons dire que les 26 isolats sont des bactéries Oxydatif non fermentatives.



Figure 10 : Résultats du test croissance en anaérobiose (Original, 2016)

1.3.4 Production de pigment fluorescent

Après 48 heures, nous avons obtenu une pigmentation jaune vert fluorescent sur le milieu King B pour l'ensemble des isolats (cf, tableau 4), avec des intensités variables.

Tableau 04. Résultats des tests d'identification

		Pigment fluorescents	Coloration de gram	KOH	Hugh et leifson
1	E2.1	+++	G ₋	+	+
2	E2.2	+++	G ₋	+	+
3	E2.3	+++	G ₋	+	+
4	E2.4	+++	G ₋	+	+
5	E2.5	+++	G ₋	+	+
6	E2.6	+++	G ₋	+	+
7	E2.7	+++	G ₋	+	+
8	E2.8	+++	G ₋	+	+
9	E2.9	+++	G ₋	+	+
10	E2.10	+++	G ₋	+	+
11	E2.11	+++	G ₋	+	+
12	E2.12	+++	G ₋	+	+
13	E2.13	+++	G ₋	+	+
14	E2.14	+++	G ₋	+	+
15	E2.15	+++	G ₋	+	+

16	E2.16	+++	G ₋	+	+
17	E2.17	+++	G ₋	+	+
18	E2.18	+++	G ₋	+	+
19	E2.19	+++	G ₋	+	+
20	E2.20	+++	G ₋	+	+
21	E2.21	+++	G ₋	+	+
22	E2.22	+++	G ₋	+	+
23	E2.23	+++	G ₋	+	+
24	E4.24	+	G ₋	+	-
25	E4.25	+	G ₊	-	-
26	E4.26	+	G ₋	+	-
27	E4.27	+	G ₋	+	-
28	E4.28	-	G ₋	-	+

1.4. Les Caractères biochimiques

Les test biochimique connus sous le nom LOPAT sont réalisés pour l'identification des bactéries, il n'en demeure pas moins qu'il sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines groupe des bactéries phytopathogènes, Dans le groupement de *pseudomonas fluorescents* par exemple Groupes I, II et III, qui sont fortement pathogénie et donner une réaction d' hypersensibilité claire, tandis que les groupes IV et V sont faiblement pathogènes (Lelliot *et al.*, 1966).

1.4.1 Tests de LOPAT

1.4.2 Production Levane sucrase

Après 5 jours d'incubation, 30 isolats ont donné un résultat négatif (Cf. tableau 5), C'est-à-dire aucune polymérisation du fructose en poly-fructose, pour les 02 isolats nous avons observé des colonies blanchâtres et brillantes ce qui traduit par une polymérisation du fructose en poly-fructose.

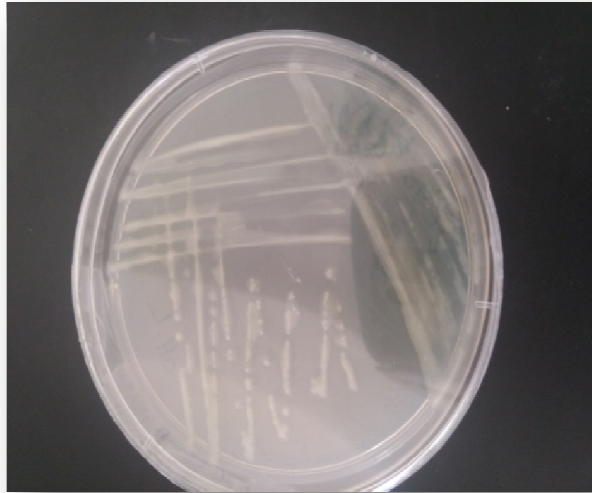


Figure 11 : Résultat du test levane(Original ,2016)

1.4.3 Production d'oxydase:

Concernant les tests oxydase, parmi les 32 isolats nous avons testé seulement 6 isolats par manque de produit, d'après ce test 5 isolats ont donné une réaction négatif, c'est à dire qu'il n'y a pas eu de coloration violette, Quand à l'isolat restant une coloration bleu violète a été obtenue en contact avec le disque d'oxydase, ce qui signifie que c'est une oxydase positive.

1.4.4 Test Pectinase

Après 14 jours d'incubation, pour 32 isolats nous n'avons pas observé de pourriture des tranches de pomme de terre (Cf. figure 11), ainsi que de leur odeur, ces isolats sont incapables de dégrader le pectine, ce sont des pectinases négatives (Bradbury, 1970).



Figure 12 : Résultat du test pectinase.(Original,2016)

1.4.5. ARGININE DIHYDROLASE

Le test sert à déterminer si la bactérie transforme l'arginine (un acide aminé) à l'aide de l'enzyme arginine déshydrolase. Une réaction positive indique qu'il y a eu transformation de l'arginine par l'enzyme arginine déshydrolase (coloration rougée) (Thornley, 1960)

Après 5 jours d'incubation, les résultats obtenus indiquent que les 32 isolats ne sont pas capables de transformer l'arginine car la coloration du milieu reste rose (Cf. figure)



FIGURE 13 : Résultat du test arginine deshydrolase (ORIGINAL, 2016)

1.4.6 Réaction d'hypersensibilité du tabac (HR)

Le déclenchement de la réaction d'hypersensibilité dans les plantes par des bactéries phytopathogènes est toujours utilisé comme un outil de diagnostic, Pour manque de plantules de tabac ce test n'a pas été réalisé.

Tableau 05. Les résultats de tests LOPAT.

TESTE		Levane	Péctinase	Arginie Déshydro	Oxydase
1	E2.1	–	–	–	–
2	E2.2	–	–	–	–
3	E2.3	–	–	–	–
4	E2.4	–	–	–	
5	E2.5	–	–	–	–
6	E2.6	–	–	–	–
7	E2.7	–	–	–	
8	E2.8	–	–	–	
9	E2.9	–	–	–	
10	E2.10	–	–	–	
11	E2.11	–	–	–	+
12	E2.12	–	–	–	
13	E2.13	–	–	–	
14	E2.14	–	–	–	
15	E2.15	–	–	–	
16	E2.16	–	–	–	–
17	E2.17	–	–	–	
18	E2.18	–	–	–	–
19	E2.19	–	–	–	
20	E2.20	–	–	–	
21	E2.21	–	–	–	
22	E2.22	–	–	–	
23	E2.23	–	–	–	

24	E4.24	–	–	–	
25	E4.25	–	–	–	
26	E4.26	–	–	–	
29	E4.27	–	–	–	
30	E4.30	+	–	–	

1.4.7 Test du pouvoir pathogène

Dans l'objectif de vérifier le pouvoir pathogène de nos isolats, nous avons inoculé des plantules d'olivier variété Chemlal utilisant un inoculum à une concentration de 10^8 cel/ml. Après deux mois de la date d'inoculation, 14 isolats parmi 20 testés ont développés des tumeurs similaires à celles observées dans l'oliverie d'origine. Pour les plantules témoins inoculées par l'eau distillée aucun symptôme n'a été enregistré.



Figure 14 : Résultat du test Pathogénicité sur l'olivier

1.5 Test de la galerie API 20 NE:

Les tests concernés sont les tests conventionnels et des tests d'assimilation dont les résultats sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau 06 : les résultats d'identification des isolats utilisant la galerie API 20 NE.

Test/souche	E2.1	E2.2	E2.3	E2.5	E2.6	E2.11
NO ₃	–	–	–	–	–	–
TRP	–	–	–	–	–	–
GLU	–	–	–	–	–	–
ADH	–	–	–	–	–	–
URE	–	–	–	–	–	–
ESC	+	+	+	+	+	+
GEL	–	–	–	–	–	–
PNG	–	–	–	–	–	–
GLU	+	+	+	+	+	+
ARA	–	–	–	–	–	–
MNE	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+
NAG	–	–	–	–	–	–
MAL	–	–	–	–	–	–
GNT	+	+	+	+	+	+
CAP	+	+	+	+	+	+
ADI	–	–	–	–	–	–
MLT	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	–	+	+
PAC	–	–	–	–	–	–
Oxy	–	–	–	–	–	+

Tableau 07 : les résultats du galerie api 20NE après l'utilisation de l'logiciel.

Les souches	Taxon le plus probable	remarque	Indice de typicité	Probabilité
E2.1	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Pas bon	-0,34	90,5%
E2.2	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Pas bon	-0,34	90,5%
E2.3	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	PasBon	-0,34	90,5%
E2.5	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Pas bon	0,6	88,1%
E2.6	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Pas bon	-0,34	90,5%
E2.11	<i>Peudomonasflouresens</i>	Pas bon	-0 ,15	46 ,4 %

Discussions

La tuberculose d'olivier est une maladie des plantes causée par *Pseudomonas savastanoi*. Les symptômes se manifestent sous forme d'excroissances appelées tumeurs figurant sur les feuilles et les rameaux infectés.

La formation de tumeurs est une réponse de la plante à la production bactérienne de fortes concentrations de l'acide indole acétique (AIA) (Smidt *et al.*, 1978).

Des tumeurs semblables à celles induites par la tuberculose d'olivier ont été observées sur des rameaux d'olivier dans une oliverie dans la région de Ain El Ibel à la wilaya de Djelfa.

Lors des prospections le taux d'infection était de 100% au niveau de cette oliverie.

Pour pouvoir identifier les causes de ces tumeurs nous avons effectué un travail dont l'objectif est l'isolement et l'identification de l'agent responsable de ces tumeurs et la mise en évidence de son éventuel pouvoir pathogène l'isolement de l'agent pathogène à partir des rameaux infectés a été réalisé sur deux milieux de culture KB et LPGA. Des colonies bactériennes se sont développées après trois jours d'incubation les colonies des bactéries phytopathogènes apparaissent plus lentement que les colonies des bactéries saprophytes (Goszczyńska *et al.*, 2000) par ailleurs, l'aspect des colonies obtenues sur le milieu king B était semblable à celui obtenu par Gardan *et al.* (1992).

Les colonies sont de couleur blanche ou crème, lisse, plate, et luisantes pour dénombrer le taux de *Pseudomonas like bacteria* dans les trois échantillons de tumeur infectés par cette bactérie nous avons effectué l'isolement sur deux milieux de cultures différentes LPGA et KB. Dans le premier échantillon nous avons constaté que le taux de la bactérie dans le milieu KB (21.6×10^{-2} cellule.mL⁻¹) soit 15% par rapport à la flore bactérienne totale.

Quand au deuxième échantillon le taux de bactérie dans le milieu KB (115×10^{-3} cellule.mL⁻¹) soit 6.26 %. par rapport à la flore bactérienne total.

Dans le troisième échantillon le taux de bactérie dans le milieu KB (6×10^{-4} cellule.mL⁻¹) soit 1%. par rapport à la flore bactérienne total.

D'après le dénombrement bactérien, nous avons remarquer une faible présence des *Pseudomonas savastanoi like bacteria* par rapport à la flore bactérienne totale avec des pourcentages qui varient entre 1 % et 15%.

Selon (Marchi *et al.*, 2006) les Résultats de l'étude de la maladie de tuberculose d'oliviers dans le centre de l'Italie en 2002 et 2003 ont montré que les *pseudomonas savasatanoi* n'est pas le seul organisme vivant en tumeur , car Il y a aussi des bactéries saprophytes blancs ou jaunes, qualifiées de *Pantoea agglomeransa* été trouvé associé à

l'agent pathogène *Pseudomonas savastanoi* dans 70 % de tumeur examinés (García de los Ríos, 1989) . Le pourcentage de *pseudomonas savastanoi* dans le tumeur à été isolé a seulement qui varient entre 5 à 10 % par rapport à la flore bactérienne totale (García de los Ríos, 1989).

L'Identification- de nos isolats a été faite en se basant sur les tests phénotypiques décrites par (Schaad *et al.*, 2001) : production des pigment fluorescent sur milieu KB, production levane ,l'activité de l'oxydase , l'activité arginine dihydrolase et l'activité pectinolytique , réaction d'hypersensibilité sur le tabac, .

L'isolement effectué à partir de tumeur nous a octroyé la possibilité de sélectionner 32 isolats, présentant des caractéristiques morphologiques semblables à celles des *Pseudomonas savastanoi* . Après une série de purifications successifs sur le milieu KB, nous avons utilisé le test de coloration de gram et le test KOH, nous ont permit d'effectuer une distinction précoce entre les isolats à Gram négatif et les isolats à Gram positif en se basant sur la structure de la paroi de ces derniers. Après avoir effectué ce test nous avons obtenues 29 isolats à Gram négatif donnant une réaction positif avec la solution de KOH et 03 isolats à Gram positif donnant une réaction négatif avec la solution de KOH.

La solution de KOH 3% présente une action destructive sur la paroi des cellules des bactéries à gram négatif alors qu'elle ne fait rien pour la paroi des cellules bactérienne à Gram positive. Lorsqu'elle est mélanger avec un petit volume de les solution KOH 3% pendant un temps qui ne dépasse pas 60secondes , cela provoque une lésion de la paroi de la cellule suivit de la libération de l'ADN ce qui donne un aspect visqueux, cette réaction indique que la bactérie est une Gram négatif (Bejot, 2015).

D'après les résultats de la coloration de Gram, 29 isolats sont des bacilles à Gram négatifs et trois isolats uniquement sont des gram positifs. (Gardan *et al.*, 1992) rapportent que *Les pseudomonas savastanoi* se sont des bactéries bâtonnets (0.4-0.8 x1.0-3.0U), Gram négatives, mobiles avec 1 ou plusieurs flagelles polaires, une croissance plutôt lente, les colonies blancs à jaune pâle, circulaire (0,5 – 2,9 mm de diamètre).

Pour le test de la production de pigment fluorescent, 32 isolats ont produit, sur le milieu King B, un pigment coloré diffusible dans l'agar et fluorescent sous UV (pyoverdine). Selon (Janse, 1982) les *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi* produit un pigment fluorescent bleu-vert sur milieu spécifique B de King qui diffuse dans la gélose ; certaines souches produisent un pigment brun.

Concernant le test de croissance en anaérobiose, nous avons utilisé le milieu Hugh et Leifson qui possède un indicateur d'acidification (le bleu de bromothymol), ce dernier devient

jaune pour les bactéries actives, (la dégradation du glucide qui libère des acides et éventuellement des gazes) (Marchal *et al.* 1991). Parmi Les 32 isolats testés, 26 uniquement ce sont des bactéries aérobies stricte attaquent le glucose uniquement en présence de dioxygène, et les (06) isolats restant donnent des résultats négative en condition d'anaérobie ce qui s'explique par le fait que ces bactéries dégradant le glucose par voie fermentative (Surico, 1977) rapportent que *Les pseudomonas savastanoi* se sont des aérobique strict.

Les test biochimique connus sous le nom LOPAT sont réalisés pour l'identification des bactéries, il n'en demeure pas moins qu'il sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines groupe des bactéries phytopathogènes, Dans le groupement de *pseudomonas fluorescents* par exemple Groupes I, II et III, qui sont fortement pathogénie et donner une réaction d' hypersensibilité claire, tandis que les groupes IV et V sont faiblement pathogènes (Lelliot *et al.*, 1966).

Pour le test de LOPAT, nous avoues réaliser test levane sucrase, test oxydase, test pectinase et teste arginine sauf le test d'hypersensibilité sur tabac par le manque les plantules de tabac.

Le test levane est négatif chez 30 isolats et cela revenant à l'absence l'enzymes fructanes sucrase qui polymérise la fraction de fructose du saccharose en levane (Munir *et al.*, 2010) et positif chez 02 isolats.

La production de levane sucrase extracellulaire, est présente chez tout les pathovars de *P. syringae*, chez *P. chlororaphis*, quelques biovars de *P. fluorescens* (Hettwer *et al.*, 1995), cependant elle est absente chez *P. savastanoi* (Scortichini *et al.*, 2004)

Donc nos résultats sont identiques à ceux de (Moretti *et al.*, 2008) qui rapportent que tout les isolats de *Pseudomonas savastanoi* donnent un réaction négative pour le test levane.

Le but du test oxydase est la recherche d'enzyme cytochrome C chez les bactéries, par manque de produit six isolats ont été testé parmi ces isolats cinq sont négatif et cela revenant à l'absence du cytochrome C dans la chaîne respiratoire de ces bactéries.

D'après (Marchal *et al.*, 1991) La respiration de ces bactérie est par phosphorylation oxydative soit en shuntant le cytochrome C₂, soit en utilisant une voie métabolique accessoire, comme la voie cytochromique indirecte. Quand à l' isolat restant, il est oxydase positif, cela peut s'expliquer par la présence du cytochrome oxydase qui catalyse la réaction d'oxydation du cytochrome C par l'oxygène moléculaire. Ainsi le cytochrome oxydase oxyde le cytochrome C qui va, à son tour, oxyder le N,N,N,N tétraméthyl-1,4-phénylène diamine, substrat qui prend une coloration violet foncé (Minor *et al.*, 1989).

Selon (Schaad *et al.*, 2001) qui rapportent que tout les isolats de *Pseudomonas savastanoi* donnent une réaction négative pour le test oxydase .

L'arginine représente une source d'azote intéressante dans les milieux riches en matières organiques. Elle constitue une source d'énergie en aérobiose et en anaérobiose. La complexité du catabolisme de l'arginine révèle l'intérêt de ce substrat pour les microorganismes (Cunin *et al.*, 1986)..

Il existe quatre voies distinctes d'assimilation de l'arginine. Ces voies mettent en jeu d'autres acides aminés comme la citrulline, l'ornithine, la proline ou le 4-aminobutyrate. Elles sont largement indépendantes les unes des autres et sont différemment utilisées selon les besoins bactériens (Thornley, 1960).

Tous les isolats donnent une réaction négative puisque les bactéries sont incapable de dégrader l'arginine par l'enzyme ADH en libérant de l'ammoniac et des amines qui alcalinisent le milieu.

D'après les résultats des recherches de (Smith, 1908) les test arginine chez les *Pseudomonas savastanoi* sont tous négatifs ce qui convient a nos résultats.

Le test pectinase permet de distinguer entre les bactéries qui possèdent ou pas l'activité pectinolytique d'après ce test une absence de pourriture a été constaté chez les 32 isolats sur les tranches de pomme de terre après 14 jours d'incubation. Tous les résultats négatifs.

D'après les résultats des recherches de (Gardan *et al.*,1992) les test pectinase chez les *Pseudomonas savastanoi* sont tous négatifs ce qui convient a nos résultats.

Concernant le test la réaction d'hypersensibilité sur le tabac, utilise pour confirme le pouvoir pathogène d'une bactérie suite au dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac (Schaad *et al.*, 2001).

Pour manque de plantules de tabac ce test n'a pas été réalisé. Si certaines espèces végétales sont inoculées avec des bactéries pathogènes qui ne sont pas un agent pathogène de maladies, un mécanisme de défense rapide dans la plante est déclenché. Les cellules végétales dans la zone envahie meurent, limitant les pathogènes envahisseurs en empêchant toute propagation au reste de la plante (Goszczyńska *et al.*, 2000) .

La bactérie comprend un système enzymatique (qui est différent pour toute les bactéries) d'où la nécessité de la réalisation des testes biochimiques révélateur au laboratoire (le plus utilisé Teste de LOPAT).

Le résultat de test biochimique LOPAT Pour *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi* et comme suit :

Caractéristique	Levane	Oxydase	Pectinase	Arginine	Hypersensibilité Sur le Tabac
Résultat	-	-	-	-	/

Détermination de la pathogénicité et l'accomplissement des postulats de Koch sont une étape très importante dans l'identification des bactéries phytopathogènes (Goszczynska *et al.*, 2000) .

Concernant le test de pathogénicité pour confirmer les postulats de koc , l'inoculation des plantules d'olivier utilisant la méthode décrite par Klement *et al.*(1990) nous a permis vérifier le pouvoir pathogène de vingt isolats.

Après 1 mois de l'inoculation. 14 isolats ont produit des tumeurs semblables à celles causées, habituellement par *Pseudomonas savastanoi* sur les rameaux d'olivier, et aucunes tumeurs n'a été observées chez les six isolats restants et ce bien que les conditions dans les quelles nous avons réalisé notre expérimentation n'ont été vraiment idéales.

Les *Pseudomonas savastanoi* exige des conditions climatiques favorables dont la température ambiante peut déclencher l'infection est entre 5 et 37 ° c et ce permettrait aux bactéries de causer des infections tout au long de l'année. Cependant, les conditions optimal de développement de la maladie est entre 22-25 °C et les périodes ultérieures avec une probabilité d'infection est élevé sont l'automne et au printemps (Protta, 1995).

La bactérie cesse de ce multiplié à une température atteint les 37°C ou que la concentration en chlorure de sodium est de 5% (Janse, 1982). Le pH de la croissance est voisin de neutralité (6,8 à 7,0) ; les PH minimale et maximal respectivement de 5,6 et 8,5 (Stapp, 1958).

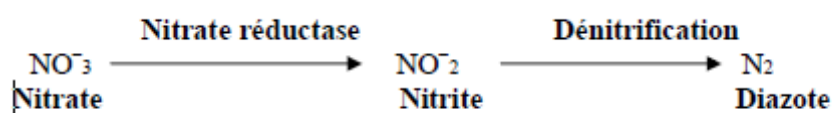
Discussion de la galerie api20 NE :

En ce qui concerne les tests de la galerie API20NE utilisée dans l'identification de nos isolats, parmi les 32 isolats, nous avons testé seulement 6 isolats et ce, par manque de Galeries

Pour les tests de la Galerie, API20NE les tests conventionnels sont effectués pour étudier la capacité des isolats à transformer des produits à l'aide des enzymes, une réaction positive révèle la présence d'une réaction enzymatique (après addition de réactifs appropriés pour le test NO_3 et TRP).

Les résultats obtenus avec tout les tests conventionnels sont accord avec les résultats de ces tests chez des souches de *Pseudomonas savastanoi* (Gardan *et al.*, 1992) sauf le test ESC qui a donné résultats positif au lieu de donné un résultat négatif , Nous avons donc pensé à deux éventualités , possibilité de contamination par une souche à caractère ESC (+), ou il s'agit d'une autre souche.la dernière suggestion est la plus loin vu les résultats du test LOPAT .

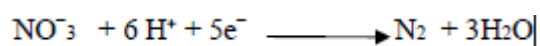
Pour le test NO_3 , nitrate réductase catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites dont leur mise en évidence est réalisée en utilisant le réactif de Griess. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification selon la réaction suivante:



L'enzyme nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade nitrites selon la réaction :



L'enzyme nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade diazote (gazeux) selon la réaction



Le réactif NIT1+NIT2, prend une teinte rose- rouge en présence d'ions nitrites , ce qui

indique que la bactérie possède une nitrate-réductase qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrites.

L'absence de coloration rouge ne signifie pas obligatoirement que la bactérie testée ne possède pas la nitrate-réductase, car elle peut posséder une nitrate-réductase très active qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade diazote N_2 et une bactérie possédant une telle enzyme consomme tous les nitrates du milieu. 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 la réaction suivante ;



L'apparition d'une teinte rouge indique la formation d'ions nitrites par l'action du zinc, donc cela signifie la présence des ions nitrates dans le milieu, donc la bactérie ne possède pas de nitrate-réductase, les résultats des six isolats sont tous négatifs c'est à dire qu'elles incapables de réduire les nitrates-(Marchal *et al.*,1991).

Production d'indole

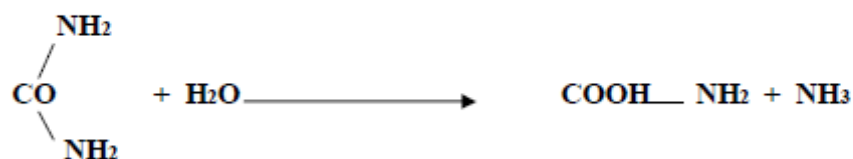
L'indole est obtenu de la dégradation du tryptophane, grâce à une enzyme bactérienne « la tryptophanase ». Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. L'indole est apolaire, donc soluble dans les solvants organiques et réagit fortement en milieu acide avec le para diméthylamino-benzaldehyde contenu dans le réactif de Kovacs par les réactions suivantes (Marchal *et al.*,1991);

D'après ce test, les 6 isolats testés-ont donné une réaction négative par l'apparition de couleur jaune .

Production de l'uréase

Toutes nos isolats testés ont donné une réaction négative avec le test de l'uréase (URE) cela s'explique par l'absence de l'enzyme de l'uréase chez ces espèces. En cas de présence de l'enzyme de l'uréase, l'urée est transformée en carbonate d'ammonium et il en résulte une alcalinisation du milieu suivant la réaction (Marchal *et al.*,1991) .

Les bactéries hydrolysent l'urée :



Une uréase très active aboutit à la réaction :



Ensuite les $\text{CO}_2 + \text{NH}_3$ se combinent et donnent du carbonate d'ammonium :



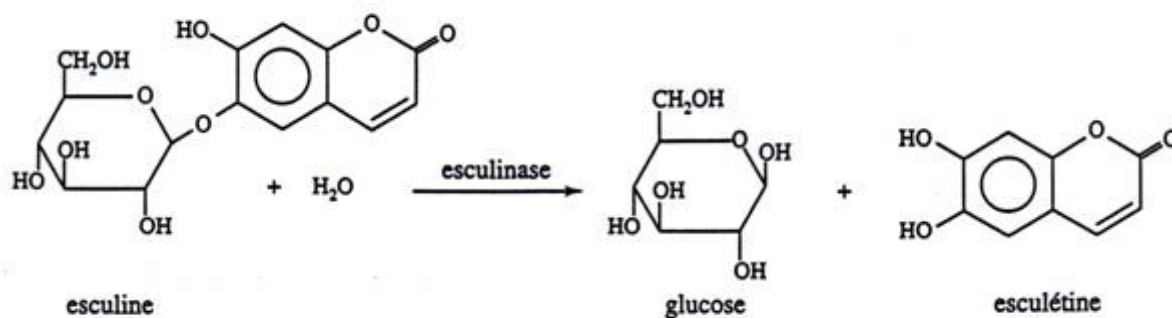
Le carbonate d'ammonium formé alcalinise le milieu, ce qui traduit le virage de l'indicateur coloré.

Les six isolats sont tous négatifs pour les tests ADH et GLU. Les résultats de la plaque API20NE sont compatibles avec les résultats obtenus par ces deux tests qui sont également effectués par le test LOPAT.

Pour le test PNPG, les six isolats sont négatifs ce qui veut dire qu'ils sont incapables de scinder le lactose en glucose et galactose, grâce à l'enzyme intracellulaire la β -galactosidase, cette réaction ne peut être possible qu'en présence d'une autre enzyme, également intracellulaire, la β -galactoside perméase assure la pénétration du lactose dans la cellule bactérienne et par conséquent sa fermentation (Delarras, 2014).

Quant au test Gélatine (GEL), tous les isolats donnent une réaction négative, ce qui peut s'expliquer par l'incapacité de la bactérie à hydrolyser la gélatine (Lansing, 2008).

Pour le test esculine (ESC), tous les isolats sont positifs, Certaines bactéries *Enterococcus*, *Pseudomonas*, ex-*Pseudomonas* (Delarras, 2014), peuvent hydrolyser l'esculine grâce à un β -glucosidase qui se traduit par libération du glucose et esculétine. L'esculétine se lie au citrate de fer ammoniacal présent dans le milieu pour former un complexe brun-noir correspondant à une réaction positive (Sands, 1990).



D'après les résultats d'assimilation des sucres qui ont donné une réaction négative avec les sucres: L- arabinose, D- maltose, au lieu d'avoir un résultat positif comme il a été signalé par Benjama (1989)

Les tests d'assimilation sont réalisés afin de définir la capacité des isolats bactériens à utiliser les différents types de sucres. d'après ces tests, La majorité des isolats sont capables d'assimiler la plupart des sucres; GLU, , MNE, MAN, GNT ,CAP ,MLT ,CIT mais chez le isolat E2.5 le résultat est négatif, ce qui signifie soit une erreur de travail ou bien une contamination par une souche différente . Les sucres que les isolats ne sont pas capables d'assimiler sont ARA , NAG, MAL , ADI, PAC;

Les résultats obtenus avec les tests conventionnels sont en accord avec les résultats L. Gardan *et al*, (1992) qui indique que les *Pseudomonas syringae pv savastanoï* sont des oxydases négatives et qu'ils ne réduisent pas les nitrates et ne produit pas de sulfure d'hydrogène à partir de la cystéine et que L'aesculine, l'arginine et la gélatine ne sont pas hydrolysés par ces bactéries.

Selon Benjama(1989) les *Pseudomonas syringae pv savastanoï* assimilent le : D- glucose, L- arabinose, D- mannose, D- mannitol, D- maltose.

D'Après Marchi *et al*.(2005), les *Pseudomonas syringae pv savastanoï* sont utilisent comme les seules sources de carbone le Dgluconate, le méso-inositol et le mannitol, mais pas l'érythritol, DLhomoserine, DL-lactate, D-xylose.

D'après l'utilisation du logiciel d'identification de galerie API20NE, les résultats obtenus avec les isolats (E2.1, E2.2, E2.3, E2.5, E2.6) donnent l'espèce *Flavimonas oryzihabitans*, elle prennent différentes probabilités mais chez le isolat E2.11 donnent *Pseudomonas fluorescens* au lieu d'avoir les *Pseudomonas savastanoi*. Le fait de ne pas avoir l'espèce recherchée met en doute les trois tests, (ARA, MAL) qui donnent résultats négatif et ESC donne résultats positive et ce, car le test de pathogénicité a confirmé le postulat de Koch par le fait de donner des tumeurs semblable à celles causées, habituellement par *Pseudomonas savastanoi* sur les rameaux d'olivier.

Pour l'isolat E2.11 c'est tout à fait logique puisque les *Pseudomonas fluorescens* sont des oxydases positives Pour les autres isolats sachant que le test oxydase chez les *Pseudomonas savastanoi* négatif.

Conclusion

Conclusion

L'olivier présente une remarquable rusticité et une plasticité lui permettant de produire dans des conditions difficiles (adaptation à une large gamme de sol et une insuffisance de l'irrigation), mais sa productivité reste toujours limitée par plusieurs facteurs biotiques et abiotiques. La tuberculose d'olivier constitue la maladie principale de la faible productivité de cette culture.

Lors de nos prospections effectuées dans la région de Ain El Ibel à la wilaya de Djelfa le taux d'infection était de 0% au niveau de la première oliverie et de 100% au niveau de la deuxième oliverie.

L'isolement réalisé à partir des tumeurs d'olivier ont permis de sélectionner 32 isolats bactériens présentant les caractères morphologique des espèces de *Pseudomonas savastanoi*, Après une série de purifications successives sur le milieu KB, l'utilisation des tests physiologiques et biochimiques ont permis l'identification préliminaire des isolats montre que 22 isolats sont des bacilles à Gram négative, aérobie stricte, capables de produire pigment fluorescent sur king B et qu'ils appartiennent alors au genre *Pseudomonas*. Les tests biochimiques réalisés ont montré que les 22 isolats identifiés répondent aux caractères primaires du LOPAT et ils sont des oxydases négative, levane négative, pectinase négative et ne possèdent pas l'arginine déshydrogénase, et font partie des *Pseudomonas* du groupe Ib. Le test de pathogénicité effectué sur les plantules d'olivier a induit le développement des tumeurs typiques aux symptômes provoqués par la maladie de la tuberculose d'olivier. L'identification par la galerie API20NE a permis d'obtenir *Flavimonas oryzae*, *Pseudomonas fluorescens* au lieu d'avoir les *Pseudomonas savastanoi* sachant que le test de pathogénicité a 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..

Enfin et pour faire suite à cette étude, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées comme perspectives :

- D'effectuer des analyses par PCR pour l'identification de ces isolats
- D'étudier l'interaction hôte / pathogène, ce volet de recherche peut apporter un complément d'information sur le mode pathogénique de *Pseudomonas savastanoi*
- D'étudier le pouvoir antagoniste de certains agents de bio contrôle "*in vitro* et "*in planta*" si possible et l'utilisation de substances naturelles antimicrobiennes comme certaines huiles essentielles de notre région vis à vis des souches pathogènes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Alexander E., Pham D. et Steck R., 1999.** The viable-but-nonculturable conditionis.
a. Induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 8, pp. 375-376.
2. **Agrios G.N., 2005.** *Plant Pathology*. 5 ème Ed. , Elsevier Academic Press, ISBN 0-12- 044565-4, San Diego, CA
3. **Argenson C., 2008.** La culture de l'olivier dans le monde, ses productions, les tendances. Le Nouvel Olivier, 61p.
4. **Argenson C. Regis S., Jourdain J.M., et Vayesse ., 1991.** L'olivier .Ed.C.T.I.F.L.203p.
5. **Barranco D. 1998.** *cultivo del olivo*, pp. 56-79.
6. **Bensemmane A., 2009 .** L'oléiculture: Développons le secteur de l'Huile d'Olive en Algérie. *Revue Fillaha Innove* N°4 Avril-Mai 2009. 23p.
7. **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.
8. **Benjama A., 1989** Isolement et identification de l'agent pathogène de la tuberculose de l'olivier au Maroc.
9. **Boutkhil S., 2012.** Les principales maladies fongiques de l'olivier (*Olea europea*) en Algérie : répartition géographique et importance. Thèse de Magistère, Univ. Oran, 133 p.
10. **Bradbury J.F., 1970.** Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. of Plant Pathology*, pp.213-218.
11. **Cautero F.A., 1965.** *Enfermedades y plagas de l'olives*. Pub. De l'Ministerio de l'agricultura, Madrid.17 p.
12. **Catara V., Colina P., Bella P., Tessitori M. & Tirrò A., 2005.,** Variabilità di *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in un'area olivicola della Sicilia e comportamento di alcune varietà di olivo alle inoculazioni [*Olea europaea* L.]. *Tecnica Agricola*, Vol. 57, No. 1/2, pp. 41-52.
13. **Caballero P. & Murillo J., 2003.** *Protección de cultivos. Conceptos actuales y fuentes de información* (First edition), Universidad Pública de Navarra, ISBN 84-9769-014-1 .

14. **Comai L., Kosuge T., 1980** . Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology*.
15. **Coutin R., 2003**. Les insectes de l'olivier. *Insects*, no130, p.p. : 19-22.
16. **Del Ri'o C., Ferná'ndez-Garci'a., MD., Caballero JM.2001**. Variability and classification of olive cultivars by their vigor. *Acta Horticulturae* 586, 229–32.
17. **Delarras C., 2014**. pratique en microbiologie de laboratoire ,pp 117-118
18. **Dhayanithi N.B., Ajith Kumar T.T., Kathiresan K.(,2010)**. Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *Journal of Environmental Biology*.
19. **Duriez J. M., 2004**.Guide du planteur d'oliviers. Ed. Laguedoc-Roussillon, 22 p.
20. **DSA ., 2015**. Statistiques de l'oléiculture de Djelfa. Document de travail. Djelfa
21. **Ercolani, GL.,1978**.*Pseudomonas savastanoi* and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field. *Journal of General Microbiology* **109**, 245–257.
22. **Flahault R., 1986.Olivier**. Ann. Ecole Nat. Agric. Montpellier, France. T II. In : Fertilidad de las variedades d'oliveEspanola. Garcia A., Ferreira J., Frias L. et Fernandez A. (Eds), Sem. Oleic. Int., 6-17 Octobre 1975, Cordoue, Espagne, pp. 25-28.
23. **Fontanazza G., Preziosi P.1969**. L'Olivierla basse température. Osservazioni su 37 cultivar d ellolie 20 cultivar da tavola. L'Italia Agricola,pp . 7-8.
24. **Gaignard J., Luisetti.,1993**. *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, gla_cog_ene et pathogene.Agronomie, EDP Sciences,,
25. **García de los Ríos J.E., 1989**. Estudio acerca de la tuberculosis del olivo. Thesis (Ph.D.).Universidad Complutense de Madrid, Spain
26. **Gaouar-Benyelles N., 1996**. Apport de la biologie des populations de la mouche de l'olivier *Bactrocera* (*Dacus*) *oleae* Gmel (Ditera : *Tephritidae*) à l'optimisation de son contrôle dans la région de Tlemcen. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen, Algérie, 116 p.
27. **Gardan L., Bollet C., Abu Ghorrah M., Grimont F., Grimont P., 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*.
28. **Grey B.E. et Steck T.R., 2001**. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and*
29. *Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 9, (September 2001), pp.

30. **Goszczynska T., Serfontein J. J., Serfontein S. et Safrinet., 2000.** Introduction to practical phytopathology: A manual for phytobacteriology, pp. 9-20.
31. **Guechi A., Girre, L., 2002.** Recherche et analyse d'un effet mutagène des extraits de feuilles d'olivier parasitées par le champignon *Cycloconium oleaginum* Cast. Sciences et Technologie, Algérie.
32. **Genin S. et Boucher C., 2004.** Lessons learned from the genome analysis of
33. *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*.
34. **Hassani D., Buonauro R. et Tombesi A., 2003.** Response of some olive cultivars, hybrid and open pollinated seedling to *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *International Conference on Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens*, In: *Pseudomonas syringae and related pathogens: biology and genetic*, , pp. 489-494
35. **Hettwer U., Gross M. et Rudolph K., 1995.** Purification and Characterization of an Extracellular Levan sucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *J. Bacteriol.*
36. **Horne, T., Parker, B., Daines, L.L., 1912.** The method of spreading of the olive knot disease. *Phytopathology*.
37. **Hackett W.P., Hartmann H.T., 1967.** The influence of temperature on floral initiation the olive.
38. **Iacobellis NS., Sisto A., Surico G., Evidente A., DiMaio E., 1994.** Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* subsp. *Savastanoi* mutants defective in phytohormone production. *Journal of Phytopathology*.
39. **Iacobellis N.S., Sisto A., Surico G., Evidente A., DiMaio, E., 1994.** Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* mutants defective in phytohormone production. *J. Phytopathol.* 140, 238e248.
40. **Jacques B., 2015.** Technique de coloration qui est la plus utilisée dans l'étude et la classification des bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et à Gram-négatif.
<file:///C:/Users/Sarah/AppData/Local/Temp/COLORATION%20DE%20GRAM%20-%20Encyclop%C3%A6dia%20Universalis.html>.
41. **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*.

42. **Janse J.D., 1991.** Pathovar discrimination within *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* using whole cell fatty acids and pathogenicity as criteria. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 79–84.
43. **Jardak T., Jarraya A., Ktari M. et Ksantini M., 2000.** Essais de modélisation sur la teigne de l'olivier, *Prays oleae* (Lepidoptera, Hyponomeutidae). Olivæ.
44. **Klement Z., Mavridis A., Rudolph K., Vidaver A., Pérombelon M.C.M. et Moore L.W., 1990.** Inoculation of plant tissues. In: *Methods in Phytobacteriology*. pp. 96-131.
45. **Khris B., 2013.** Agriculture : performances pour l'oléiculture et l'agrumiculture en 2013, Rédaction radio net, 2 p.
46. **Krid S., Rhouma A., Mogou I., Quesada J.M., Nesme X. et Gargouri A., 2010.**
47. *Pseudomonas savastanoi* endophytic bacteria in olive tree knots and antagonistic potential of strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Plant Pathology*, Vol. 92, No. 2, (July 2010), pp. 335-341.
48. **Krueger W.H., Tevitodale B.L., Scroth M.N., Metzidakis I.T. et Voyiaztsis D.G., 1999.** Improvements in the control of olive knot disease, In: *Proceedings of the third International Symposium on Olive Growing* Metzidakis, I.T. & Voyiaztsis, D.G., No.474, pp.
49. **Labaali K., 2009.** Caractéristiques chimiques du sol des oliviers en période de fin floraison et début nouaison. Mémoire ing. Agronomie, Univ. Cadi Ayad, Marrakech .56 p.
50. **Lavee S., 1986.** Olive. In: *Handbook of fruit set and development*. Monselive., pp. 261-276.
51. **Lansing M., Prescott P., Harley A., (2008).** Microbiologie. 3ème Ed. bocck université. 112p .
52. **Lavee S., 1992.** Evolution of cultivation techniques in olive growing », in olive oil quality. Florence, pp. 37-44.
53. **Lavee S., 1997.** Biologie et physiologie de l'olivier. In : *Encyclopédie Mondiale de L'Olivier*. COI (Ed.), Madrid, Espagne, pp. 60-110.
54. **Lavermicocca, P., Surico, G., 1987.** Presenza epifitica di *Pseudomonas syringae* pv.savastanoi e di alter batteri sull'olivo e sull'oleandro. *Phytopathol. Mediterr.*
55. **Lepoivre P., 2003.** Phytopathologie bases moléculaires et biologiques des pathosystème et fondements des stratégies de lutte. 1ère ed. Beock Université. 73 p.

56. **Lavermicocca P., Valerio F., Lonigro S.L, Lazzaroni S., Evidente A. et Visconti, A. 2003.** Control of olive knot disease with a bacteriocin, In: *Pseudomonas syringae and related pathogens: Biology and Genetics*, pp. 451-457.
57. **Lelliott R.A., Billing E. et Hayward A.C., 1966.** Determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads.
58. **Loussert et BrousszG., 1978** .L'olivier technique agricole et production Méditerranéenne. Ed. Maisonneuve et Lorose ,468 p.
59. **Maas E.V., Hoffman G.J., 1977.**Crop salt tolerance-current assessment-ASCEJ. Irrig. Drain. Div., 103: 115-134.
60. **Marchal N., Bourdon J.L.et Richard, CL., 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris ., pp.51-143 .
61. **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, pp. 614-624, ISSN 0032-0862
62. **Marchi G , Viti C . , Giovannetti L. and Surico G.,2005.** Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy.
63. **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., pp.51-56.
64. **Maury M., 1987.** Milieux et réactifs du laboratoire Pasteur. Paris, France.
65. **Matas I.M., Pérez-Martínez I., Quesada J.M., Rodríguez-Herva J.J., Penyalver R. et 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. 100-103.
66. **Marcelo A., Fernández M., Fatima Potes M., & Serrano J.F., 1999.** Reactions of some cultivars of *Olea europaea* L. to experimental inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, In: *Proceedings of the third International Symposium on Olive Growing*.
67. **Magie A.R., 1963.** Physiological factors involved in tumor production by the

- oleander knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi*. Thesis (Ph. D.). University of California, Davis, USA
68. **Mendil M., 2013.** Des objectifs ambitieux qui tardent à se réaliser, revue de presse. Ed. PME/PMI, 50 p.
69. **Mendil M. et Sebai A., 2006.** Catalogue national des variétés de l'olivier. 100 p.
70. **Moretti P., Ferrante T., Hosni F., Valentini A., D'Onghia M., Fatmi . et and Buonauro; 2008.** Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Strains Collected from Olive Trees in Different Countries.
71. **Morettini A., Bini G., Bellini E., 1972.** Comportamento di alcune cultivar di olivo de tavola francesi e spagnole nella Maremma Toscana. Rev. Della Orto-Floriofrutticoltura Ital.
72. **Marco, G.M. & Stall R.E., 1983.** Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease*, Vol. 67, pp. 779-781.
73. **Montesinos, E. & López M.M., 1996.** Métodos de control de las bacteriosis, In: *Patología Vegetal.*, pp. 653-678.
74. **Mendil M., 2009.** L'oléiculture: Expériences algériennes. Revue Fillaha Innove N°4 Avril-Mai 2009. 23p.
75. **Montesinos E. & López M.M., 1996.** Métodos de control de las bacteriosis, In: *Patología Vegetal*, Llácer, G., López, M.M., Trapero, A., & Bello, A., pp. 653-678, Sociedad Española de Fitopatología- Phytoma España, S.L.- Grupo Mundi-Prensa, S.A., ISBN 84-921910-0-7, Valencia, Spain .
76. **Muzzalupo I ; Vendramin G.G et Chiappetta A., 2014.** Genetic Biodiversity of Italian Olives (*Olea europaea*) Germplasm Analyzed by SSR Markers. The Scientific World Journal, 12 pages.
77. **Nasles O., 2006.** L'olivier, outil d'entretien du territoire dans les pays méditerranés. *Nouvel Olivier*, 52: 3-5.
78. **Oulebsir R., 2008.** L'olivier en Kabylie, entre mythes et réalités. Paris. Harmattan, pp . 60-66.
79. **Ouzari H., Khsairi A., Raddadi N., Jaoua L., Hassen A., Zarrouk M., Daffonchio, D., et Boudabous A., 2008.** Diversity of auxin-producing bacteria associated .
80. **Pagnol J., 1975.** l'olivier. Ed. Edition Aubanel. p. 70
81. **Panagopoulos C.G., 1993.** Olive knot disease in Greece. *EPPO Bulletin*.

82. **Panagopoulos CG., 1993.** Olive knot disease in Greece. *Bulletin OEPP. EPPO Bulletin. European and Mediterranean Plant Protection Organisation.*
83. **Papadopoulos D., Schneider D., Meier-Eiss J., Arber W., Lenski R.E., Blot M.,(1999).** Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria.
84. **Protta U., 1995.** Le malattie dell' olivo. *Informatore Fitopatologico*, No. 12 ., p126.
85. **Penyalver R., García A., Ferrer A., Bertolini E., Quesada J.M., Salcedo C.I., Piquer J., Pérez-Panadés J., Carbonell E.A., del Río C., Caballero J.M., & López M.M., 2006.** Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology*, Vol. 96, No.3, pp. 313-319.
86. **Prescott., Harly. et Kelin., 2007.** Microbiologie. 2th Ed. Boeck-wesmael.Bruxelles.
87. **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.*
88. **Quesada J.M., Penyalver R., Pérez-Panadés J., Salcedo C.I., 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.
89. **Rodríguez-Moreno L., Barcelo'-Munñoz A., Ramos C.,2000.** In vitro analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pvs. *savastanoi* and *nerii* with micropropagated olive plants. *Phytopathology*.
90. **Rojas A.M., 1999.** Análisis fenotípicos, genéticos y filogenéticos de flora endofítica asociada a *Pseudomonas savastanoi*. Thesis (Ph. D.). Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain
91. **Rojas A.M., García de los Ríos J.E., Fischer-Le Saux M., Jiménez P., Reche P., Bonneau S., Sutra L., Mathieu-Daudé F. & McClland M., 2004.** *Erwinia toletana* sp. nov., associated with *Pseudomonas savastanoi*-induced tree knots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 54, No. 6, (November 2004), pp. 2217-2222.
92. **Rokni-Zadeh H., Khavazi, K., Asgharzadeh A., Hosseini-Mazinani M. & De Mot, R.,2008.** Biocontrol of *Pseudomonas savastanoi*, causative agent of olive knot disease: antagonistic potential of non-pathogenic rhizosphere isolates of fluorescent
93. *Pseudomonas. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, Vol.73, No. 1, pp. 199-203.

94. **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.
95. **Salmond G. P. C., 1994.** Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*.
96. **Sands, D.C. 1990.** Physiological criteria: Determinative tests. In: Methods in Phytobacteriology, Ch. 1.7. Z. Klement, K. Rudolph, and D.C. Sands, eds. Akadémiai Kiadó, Budapest. pp. 133-143.
97. **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.
98. **Schroth M.N., Osgood JW., Miller TD., 1973.** Quantitative assessment of the effect of the olive knot disease on olive yield and quality. *Phytopathology*
99. **Schroth MN., Hildebrand DC., O'Reill HJ. , 1968 .** Off-flavor of olives from trees with olive knot tumors. *Phytopathology*, pp .524–525.
100. **Scortichini M., Rossi M. P., Salerno M., 2004.** Relationship of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from Italian olive trees and patterns of host genetic diversity. *Plant Pathol*, pp 491–497.
101. **Scrivani P. & Bugiani A., 1955.** Messa a punto de un metodo per la riproduzione artificiale della rogna dell'Olivo e risultati dei primi saggi terapeutici a mezzo di sostanze antibiotiche. *L'Italia Agricola*, Vol. 92, pp. 361-369.
102. **Sekour B., 2012 .** Phytoprotection de l'huile d'olive vierge (H.O.V) par ajout des plantes,
103. **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.
104. **Smite M. and Kosice 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*.
105. **Smidt M., Kosuge T., 1978.** The role of indole-3-acetic acid accumulation by alphamethyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. *Physiol. Plant Pathol*.
106. **Smith E. D., 1908.** Recent studies on the olive tubercule organism. *Bull. Bur. Plant Ind. U. S. Dep. Agric.*

107. **Surico G, Iacobellis NS, Sisto A.,1985.** Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokine's in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi*. *Physiological Plant Pathology* ,pp 309–320.
108. **Surico G., 1977.** **Histological** observations on tumours of olive knot. *Phytopathologia Mediterranea*,pp 109–125.
109. **Teviotdale B.L. & Krueger W.H., 2004.** Effects of timing of copper sprays, defoliation,rainfall, and inoculums concentration on incidence of olive knot disease. *Plant Disease*, Vol. 88, No. 2, (February 2004), pp. 131-135.
110. **Thornley M.J., 1960.** The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative Bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Applied Bacteriology*, pp37-52.
111. **Tous J., Ferguson L., 1996.** Méditerranéen fruits. *In: Progress in New Crops*. ASHS Press, Arligton VA,pp. 416-430.
112. **Trapero A. & Blanco M.A., 1998.** Enfermedades, *In: El cultivo del olivo*, pp. 461-507.
113. **Tous J., Romero A. & Hermoso J.F., 2007.** The hedgerow system for olive growing. *Olea FAO Olive Network*, No. 26, pp. 20-26.
114. **Varvaro L, Surico G., 1978.** **Multiplication** of *Pseudomonas savastanoi* (E.F. Smith) Stevens in olive (*Olea europaea* L.) tissues. *Phytopathologia Mediterranea* , pp .179–186.
115. **Villa P., 2003.** La culture de l'olivier. Ed. De Vecchi S.A. Paris.95p
116. **Wilson E.E., 1935.** The olive knot disease: its inception, development and control.
117. **Wilson E.E. & Ogawa J.M., 1979.** Fungal, bacterial, and certain nonparasitic diseases of fruit and nut crops in *California*, Division of Agricultural Sciences, and University of California.
118. **Wilson E.E., 1965.** Pathological histogenesis in oleander tumors induced by *Pseudomona savastanoi*. *Phytopathology*, Vol. 55, pp. 1244-1249.
119. **Yakoub B.,Chérifi D.,Bonaly J.,2007.** Production de vitroplants d'*Olea europea* va Chemlal, pp.125-127.
120. **Zohary D., 1995.** Olive, *Olea europea* (Oleaceae). *In: Smartt J. et Simmonds N.W.*, "Evolution of Crop Plans". Longman Scientific et Te chnical. United Kingdon, pp. 379-282.

Annexe

Annexe 1. Les milieux de cultures utilisés**1. LPGA**

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

2. King B

Peptone	20g
Glycérol	15ml
K ₂ HPO ₄	1.5g
MgSO ₄	1.5g
Agar	20g
Eau distillée	1L

3. Levane

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

4. Arginine

Bactopeptone	1g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	0.3g
Agar bactériologique	3g
Rouge de phénol (solution 0.1%)	1mg
Arginine	10g
Eau distillée	1L

5. Hugh et Leifson

Bactopeptone	2g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	0.3g
Bleu de prométhymol 1%	3ml
Glucose	10g
Agar	3g
Eau distillée	1L