

## **Liste des abréviations :**

<b>CMI</b>	:	Concentration minimale inhibitrice
<b>CMB</b>	:	Concentration minimale bactéricide
<b>DMSO</b>	:	Diméthylsulfoxyde
<b>ONSSA</b>	:	Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires
<b>LPG</b>	:	Levure, peptone, glucose
<b>LPGA</b>	:	Levure, peptone, glucose, agar
<b>UFC</b>	:	Unité Formatrice de Colonie

## Liste des figures :

	Intitulé	N° de la page
Figure 1	Répartition régionale des vignobles (A), de la vigne de table (B) et de la vigne de cuve (C) au Maroc (ONSSA)	6
Figure 2	Tumeur développée sur le collet de la vigne due à <i>Allorhizobium Vitis</i>	10
Figure 3	Cycle de la maladie du Crown gall de la vigne	11
Figure 4	Test de pathogénicité sur plante de tabac	21
Figure 5	Histogramme représentant le pourcentage d'inhibition de la croissance d' <i>A. vitis</i> par les cinq antagonistes testés	22
Figure 6	Histogramme représentant le pourcentage d'inhibition de la croissance d' <i>A. vitis</i> par les 4 huiles essentielles testées	25

## Liste des tableaux :

	Intitulé	N° de la page
Tableau 1	Taxonomie de la vigne	5
Tableau 2	Classification de l' <i>A. vitis</i>	9
Tableau 3	Liste des souches bactériennes utilisées	15
Tableau 4	Résultats obtenus du test d'aromatogramme par les deux témoins	21
Tableau 5	Résultats obtenus du test d'aromatogramme par les antagonistes	22
Tableau 6	Résultats obtenus du test d'aromatogramme et micro-atmosphère par les deux témoins	23
Tableau 7	Résultats obtenus du test d'aromatogramme et micro-atmosphère par les HE	24
Tableau 8	Résultats de la CMI et la CMB des huiles essentielles étudiées	27

## SOMMAIRE :

Introduction générale.....	1
Présentation de l'INRA.....	3
Première partie : Revue bibliographique	
I. Plante hôte.....	5
1. Historique de la vigne au Maroc ;;	5
2. Taxonomie.....	5
3. Superficie, production et répartition de la vigne au Maroc.....	6
4. Exigences agro-climatiques de la vigne.....	6
5. Variétés de la vigne au Maroc.....	7
6. Cycle végétatif et reproductif de la vigne.....	7
II. Maladies bactériennes de la vigne.....	7
1. Nécrose bactérienne de la vigne.....	8
2. Maladie de Pierce.....	8
3. Galle du collet (Crown gall).....	8
3-1. Historique du Crown gall de la vigne .....	8
3-2. Distribution du Crown Gall dans le monde .....	8
3-3. Caractéristiques de l'agent pathogène.....	8
3-4. Introduction de la bactérie au champ et méthodes de dissémination.....	9
3-5. Symptômes.....	9
3-6. Cycle de maladie.....	10
III. Moyens de lutte contre le Crown gall de la vigne.....	11
1. Lutte prophylactique .....	11
2. Lutte chimique .....	11
3. Lutte biologique .....	12
3.1. Microorganismes antagonistes.....	12
3.2. Huiles essentielles .....	12
Deuxième partie : Matériel et méthodes	
I. Matériel .....	15
1. Souches bactériennes.....	15
2. Matériel végétal.....	15
II. Méthodes.....	16
1. Test de pathogénicité .....	16
2. Evaluation de l'activité antibactérienne des antagonistes .....	17
2.1. Préparation d'une pré-culture .....	17
2.2. Préparations de la suspension bactérienne.....	17
2.3. Test d'aromatogramme par les antagonistes .....	17
3. Evaluation de l'activité bactéricide des huiles essentielles .....	18
3.1. Extraction des huiles essentielles.....	18

3.2. Test d'aromatogramme par les huiles essentielles .....	18
3.3. Test de micro-atmosphère par les huiles essentielles .....	19
3.4. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) .....	19
3.4.1. Détermination de la CMI .....	20
3.4.2. Détermination de la CMB .....	20

Troisième partie : Résultats et discussion

I. Résultat du test de pathogénicité (figure 4) .....	21
II. Evaluation de l'activité antibactérienne des antagonistes .....	21
III. Evaluation de l'activité bactéricide des huiles essentielles .....	23
IV. Détermination de la CMI et la CMB .....	25
Conclusion.....	28
Références bibliographiques.....	30
Annexe.....	33

## INTRODUCTION GENERALE

La vigne est une espèce pérenne appartenant à la famille des Vitacées qui comporte une douzaine de genres et 700 espèces. Le genre *Vitis* qui signifie « baguette courbée » en grec ancien, est composé de 80 espèces dont le plus cultivé à l'échelle mondiale est *Vitis vinifera*. Ce sont des arbrisseaux grimpants qui s'attachent aux supports par des vrilles, et capables de se multiplier par voie sexuée, ou asexuée (bouturage et greffage) (Gary *et al.*, 2003). Cette culture est largement répandue dans les zones tempérées à travers le monde, elle est sujette à plusieurs maladies, dont figure la galle du collet ou le Crown gall causée par *Agrobacterium vitis* L. (Ophel et Kerr., 1990) nommée récemment *Allorhizobium vitis* (Moussavi *et al.* , 2014, 2015). Cette grave maladie est présente dans les zones où la vigne est exposée au gel. Elle se caractérise par la formation de tumeurs au niveau du collet ou des racines, et rarement sur les rameaux et les branches. Elle est très répandue dans le monde, y compris le Maroc, où elle a été signalée pour la première fois en novembre 2008, à cause de l'introduction de 5 plants de vigne asymptomatiques importés d'Italie hébergeant la bactérie et appartenant à la variété RedGlob (Achbani, 2010). Les vignes gravement atteintes subissent une perte de rendement et de vigueur considérable et risquent même de ne pas résister à l'hiver.

Le mécanisme d'infection d'*A.vitis* est très particulier. En effet, il s'agit d'un phénomène de transgénése naturelle dans lequel la bactérie transforme génétiquement les cellules végétales infectées. La formation des tumeurs s'apparente à une transformation génétique, un fragment d'ADN bactérien étant transféré de la bactérie vers la plante, puis intégré dans le matériel chromosomique végétal.

Quand aucun moyen de lutte n'est employé, la maladie cause beaucoup de dégâts au niveau des pépinières et du verger, ainsi elle engendre des pertes financières importantes estimées à des millions de dollars par an (Achbani, 2010). Par ailleurs, la tumeur du collet est une maladie qu'il faut prévenir, puisqu'une fois la plante contaminée, la tumeur demeure dans les vaisseaux de la plante hôte et empêche la conduction de la sève jusqu'à la fin de sa vie.

Vu l'importance de la production de la vigne au Maroc, et sa sensibilité contre la bactérie en question, il est nécessaire de chercher des moyens de lutte contre le Crown gall. Actuellement, il n'y a pas de véritables moyens chimiques efficaces pour le contrôle de la galle du collet sur le terrain. En revanche, de nombreuses recherches concernant la lutte biologique ont donné des effets positifs *in vitro* contre cette bactérie, notamment les huiles

essentielles et les antagonistes. Actuellement le laboratoire de Bactériologie Végétale et de Lutte Biologique de l'INRA de Meknès dispose des souches connues par leurs effets positifs aussi bien sur la croissance des plantes que dans la lutte contre certains agents pathogènes.

Dans cette optique, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Evaluation *in vitro* de l'efficacité de cinq bactéries antagonistes choisies pour le contrôle de la tumeur du collet de la vigne.
- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles du thym, d'origan, d'eucalyptus et du romarin sur la croissance de la bactérie en question.

## **Présentation de l'INRA :**

L'Institut National de la Recherche Agronomique "INRA" a pour mission d'entreprendre les recherches pour le développement agricole. C'est un établissement public dont les origines remontent à 1914 avec la création des premiers services de recherche agricole officiel. Il a connu dernièrement une réorganisation structurelle visant la modernisation de son processus de gestion. Les recherches du centre de Meknès accompagnent la mise en œuvre des plans régionaux adoptés dans le cadre du Plan Maroc Vert et en étroite collaboration avec le développement et la profession.

### **Une mission de recherche ciblée sur le développement agricole**

- Une meilleure connaissance du milieu (naturel et socio-économique) et le développement des technologies performantes pour répondre aux besoins de l'agriculture de notre zone d'action (production de matériel végétal, de connaissances et de méthodes).
- La valorisation et la diffusion des acquis de la recherche agronomique ciblant les environnements semi-aride, sub-humide et de montagne.

### **Des orientations de recherche à moyen terme en prise avec les problématiques prioritaires du développement agricole**

- Gestion intégrée de l'arboriculture fruitière ;
- Intensification durable des grandes cultures et diversification des systèmes de culture ;
- Gestion des ressources naturelles et dynamiques des espaces montagnards.
- Valorisation des acquis de la recherche par l'assistance technique, le renforcement des capacités et le transfert de technologies.

### **Des compétences scientifiques et techniques pluridisciplinaires confirmées**

- 26 Chercheurs spécialisés dans différentes disciplines des sciences agronomiques et humaines (amélioration génétique, phytiatrie, biotechnologie, agronomie, physiologie végétale, horticulture, agrométéorologie, pédologie, chimie des sols, agro économie, sociologie et communication) ;
- 18 Techniciens de recherche ;
- Un administrateur ;
- 31 Agents



## Une zone d'action agricole par excellence

Superficie totale : 7 300 000 ha (9,8 % du territoire national).

Economie basée sur une agriculture diversifiée valorisée par une importante industrie agroalimentaire.

## Région à haut potentiel agricole :

- Grandes potentialités en ressources naturelles : richesse pédoclimatique et ressources en eau importantes.
- Diversité des systèmes de culture.
- Industrie agroalimentaire développée.
- L'Agropole de Meknès ; une plateforme de recherche-développement et de promotion des projets d'industrie agroalimentaire.

## Des prestations et services de qualité

- Réalisation d'études et de recherches.
- Conception et réalisation de projets de développement agricole.
- Analyse du sol, eau et plante et diagnostic de l'état sanitaire des cultures.
- Encadrement de thésards, mémorisants et de stagiaires.
- Elaboration de supports de vulgarisation (fiche technique, CD interactif, supports de projection, ...).

**REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

## I- Plante hôte :

### 1- Historique de la vigne au Maroc :

Il y a bien longtemps que la vigne pousse sur les rivages méridionaux de la Méditerranée, notamment ceux du Maroc, qui a toujours été marqué d'une tradition viticole, pour preuve, il est référencé comme l'un des derniers foyers de *Vitis Silvétris* dans la région de l'Atlas (Skiredj *et al.* 2007). Grâce à ses hautes montagnes et à l'influence de refroidissement de l'Atlantique, le Maroc est classé parmi les pays ayant un grand potentiel naturel pour la production des vignes selon la FAO (Food and Agriculture Organisation en 2011).

La plantation des premiers vignobles dans notre pays remonte aux phéniciens par les premiers occupants et à la colonisation romaine dans la région de Volubilis. Les portugais aussi ont laissé leurs empreintes lors de leur installation à Azemmour, Safi et El Jadida par la plantation de quelques vignes qui préfigureront les futurs vignobles de Doukkala. A partir de 1905, la surface en vigne (raisin de cuve) au Maroc a dépassé les 55 000 Ha et la production s'est élevée à 305 millions d'hectolitres. Tout cela est grâce au protectorat français qui a développé la culture de la vigne dans notre pays puisque ses vigneronns ne produisaient pas suffisamment de vin (Skiredj *et al.* 2007).

### 2- Taxonomie : (Tableau 1)

**Tableau 1 : Taxonomie de la vigne**

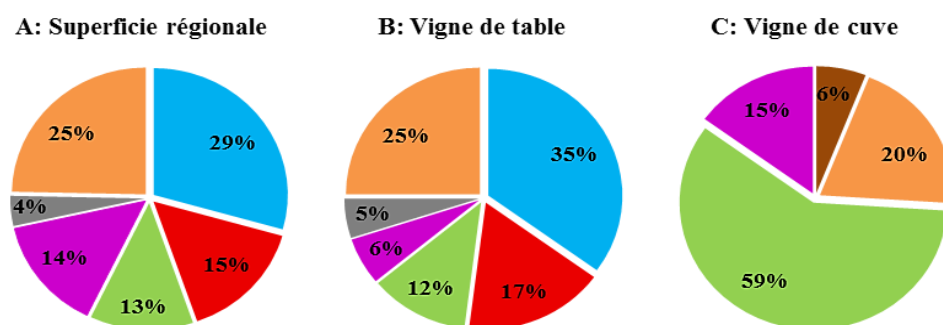
Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Ordre	Vitales
Famille	Vitacées
Classe	Dicotylédones
Genre	<i>Vitis</i>
Espèce	<i>Vitis vinifera</i>

### 3- Superficie, production et répartition de la vigne au Maroc :

La superficie de vignoble national (Figure 1A) a connu une grande évolution durant ces dernières années, cela est due aux différents projets relancés par le Plan Maroc Vert qui ont

favorisé le développement et l'application des normes de qualité ; dans le but de favoriser les produits vitivinicoles marocains. Actuellement au Maroc la vigne couvre une superficie totale de l'ordre de 57 000 ha avec une production annuelle de 440 115 Tonnes occupant ainsi la 4ème place après l'olivier, l'amandier et les agrumes (FAO 2014, MAPM, 2011).

La répartition géographique des vignes de table et de cuve est hétérogène. La principale région qui produit les vignobles de table est la région de Doukkala-Abda (35%) (Figure 1B) alors que pour les vignobles de cuve c'est la région de Meknès-Tafilalet (59%) (Figure 1C) (ONSSA, MAPM, 2011).



**Figure 1: Répartition régionale des vignobles (A), de la vigne de table (B) et de la vigne de cuve (C) au Maroc (ONSSA)**

- Doukkala-Abda
- Meknès-Tafilalet
- Marrakech-Tensift-El Haouz
- Rabat-Sale-Zemmour-Zaer
- Chaouia-Ouadigha
- Gharb-Chrarda BniHssen
- Autres régions

#### 4- Exigences agro-climatiques de la vigne :

La vigne préfère les climats semi-arides et subtropicaux avec des étés secs et chauds sans précipitations et des hivers frais. Pour la croissance des baies et leur maturité, il est nécessaire de disposer d'une atmosphère sèche, d'une température modérément chaude (15- 40°C), d'un fort ensoleillement, d'une forte hygrométrie, d'un temps couvert, des températures basses et des précipitations durant la phase de floraison. La vigne s'adapte à une large gamme de sol mais préfère des sols profonds argilo limoneux, ayant une bonne structure et riches en matière organique. Le pH doit être de 6,5 à 7,5 et la salinité doit être faible. Les besoins en eau sont estimés de 400 à 500 mm (Skiredj *et al.*, 2007).

#### 5- Variétés de la vigne au Maroc :

Le profil variétal de vignoble de table se répartit d'une part en variétés locales qui sont Doukkali et Abbou couvrant respectivement 41,1% et 7% de la superficie du vignoble de

table, d'autre part en variétés étrangères dominées par le Muscat d'Alexandrie (9,4%) et Valency (8,9%). En outre, il existe d'autres variétés introduites récemment plantées soit aux champs ou sous serre telles que : Sultanine, Cardinal, Red Glob, Victoria ... (MAPM, 2011).

Pour la vigne de cuve le profil variétal est dominé par quatre variétés : Cinsault, Carignan, Alicante Bouchet et Grenache qui occupent 70% de la superficie plantée en vigne de cuve. Les cépages améliorateurs ne couvrent que 25% de la superficie réservée au vignoble de cuve. Les plus utilisés restent le Cabernet, le Syrah, le Merlot rouge et le Mourvèdre (MAPM, 2011).

### **6- Cycle végétatif et reproductif de la vigne :**

Le cycle de vie de la vigne s'étend de la fin du mois de mars à la mi-novembre et comprend le cycle reproductif et le cycle végétatif.

Vers le début du mois d'avril, les écailles protectrices qui recouvrent le bourgeon s'écartent, laissant apparaître la bourre. Suite à l'apparition des premières feuilles et des premières grappes, vient la floraison au mois de juin. Lorsque les ovules sont fécondés, les fruits se développent; on parle alors de la phase de nouaison où les baies grossissent tout en restant vertes. Puis, à partir de la mi-juillet, les raisins changent de couleur dans la phase de véraison. Pendant cette phase, la couleur s'affirme et la quantité d'acide diminue fortement, tandis que celle de sucre augmente rapidement.

Les vendanges peuvent commencer une fois la maturité est atteinte, et à partir de mi-novembre, les feuilles commencent à tomber, c'est donc le début du repos végétatif de la vigne. Cette dernière fait ses réserves à partir de la mi-août.

## **II- Maladies bactériennes de la vigne :**

La vigne est une culture particulièrement sensible, elle peut être confrontée à plusieurs maladies affectant les racines, le bois, les feuilles et les baies. Selon leur origine, il existe des maladies cryptogamiques, bactériennes, virales ainsi que les attaques par les ravageurs (Odile et al., 2006).

Il existe trois principales maladies d'origine bactérienne sur la vigne :

- 1- Nécrose bactérienne de la vigne :** maladie causée par *Xylophilus ampelinus* qui touche quelques variétés de la vigne et dont les symptômes se traduisent par un dessèchement de bourgeons et de feuilles.

- 2- **Maladie de Pierce** : causée par *Xylella fastidiosa*. Cette bactérie est classée parmi les organismes les plus nuisibles. Elle est responsable de dépérissement de la plante contaminée.
- 3- **Galle du collet (Crown gall)** : maladie causée par *Allorhizobium vitis*.

### 3-1- Historique du Crown gall de la vigne :

*Allorhizobium Vitis* a été isolée pour la première aux États-Unis par Smith et Townsend en 1907 (Stover et al., 1997). En inoculant plusieurs plants, Hedgcock a démontré le caractère tumorigène de la bactérie, ainsi les souches isolées ont montré la capacité d'induire la tumeur sur la pêche et l'abricot (Hedgcock, 1910). Ophel et Kerre en 1990 ont proposé pour la première fois la bactérie sous le nom d'*Agrobacterium vitis* comme agent causal de la tumeur du collet de la vigne.

### 3-2- Distribution du Crown Gall dans le monde :

Au cours des 25 dernières années *Allorhizobium Vitis* a été signalée en Chine, au Japon, au sud d'Afrique, en Europe, au Moyen-Orient, en Amérique du Nord et en Amérique du Sud. Actuellement cette bactérie est reconnue comme la principale espèce causant la galle du collet du raisin. Elle fait partie des bactéries les plus répandues dans le monde, et elle est pratiquement signalée dans toutes les régions productrices des viticultures.

Au Maroc, le crown gall de la vigne a été signalé pour la première fois en novembre 2008, à cause de l'introduction des plants de vigne importés d'Italie.

### 3-3- Caractéristiques de l'agent pathogène :

*Allorhizobium* appartient à la famille des rhizobiacées, classe des *Alpha Proteobacteria* (Tableau 2). Il s'agit d'une bactérie mobile, avec une forme de bâtonnets de 0,6 – 1,0 µm x 1,5 – 3,0 µm. Elle ne forme pas de spores et se déplace grâce à des flagelles (de 1 à 6). La température optimale de croissance de cette bactérie se situe entre 25 et 28°C (Portier., 2004).

**Tableau 2 : Classification d'*A. vitis***

<b>Règne</b>	Bactérie
<b>Embranchement</b>	Proteobacteria
<b>Classe</b>	Alpha Proteobacteria
<b>Ordre</b>	Rhizobiales
<b>Famille</b>	Rhizobiacées
<b>Genre</b>	<i>Allorhizobium</i>
<b>Espèce</b>	<i>Vitis</i>
<b>Nom binomiale</b>	<i>Allorhizobium Vitis</i>

### **3-4- Introduction de la bactérie au champ et méthodes de dissémination:**

*Allorhizobium vitis* est une bactérie introduite au vignoble avec les plants provenant des pépinières, elle est ainsi présente régulièrement dans les sols agricoles. La bactérie peut survivre dans le système vasculaire des vignes pendant plusieurs années, et même si les plants malades sont enlevés, elle pourra survivre jusqu'à 5 ans dans les débris de la culture (Odile, 2006).

La bactérie en question résidant dans le sol près des racines et sur les débris peut directement provoquer des lésions sur le développement des racines et infecter la plante à travers les plaies, où la bactérie entre par blessures causées par les pratiques culturales qui sont parmi les premiers moyens de contamination, soit par l'intermédiaire des machineries du travail ou par les outils de taille. D'autre part, il existe des modes de dissémination naturels causés soit par les insectes, les nématodes, ou par les facteurs climatiques comme le gel hivernal, les éclaboussures lors de pluie et aussi par les eaux de ruissèlement. Notons que la bactérie n'est pas présente dans les sols qui n'ont pas servi à la culture de la vigne et ses niveaux dans le sol diminuent en l'absence de vignes.

### **3-5- Symptômes :**

Les dommages dus à l'hiver favorisent les infections par *A. vitis*. Ses symptômes peuvent s'observer au collet ou sur les racines. Ainsi les tumeurs se traduisent par la présence d'excroissances plus ou moins sphériques, blanchâtres et spongieuses; les plus apparentes se retrouvent sur le pied de vigne et à la base des rameaux, mais les racines peuvent aussi en porter. Les tumeurs deviennent brunes ou noires, se lignifient et se craquent (Figure 2) (Odile, 2006). La grosseur de ces tumeurs peut être inférieure à la grosseur d'un pois comme elle peut atteindre la dimension d'une pomme. Par conséquent,

les tissus vasculaires d'un plant peuvent être partiellement ou complètement obstrués par la tumeur, causant le dessèchement d'un rameau ou du plant entier dès l'arrivée des grandes chaleurs de l'été. Le système vasculaire devient alors non fonctionnel ce qui affecte la translocation de l'eau et des éléments minéraux. Les plantes demeurent naines et ont une apparence frêle, elles présentent des anomalies de coloration du feuillage et produisent peu de fruits. Un flétrissement ou un dépérissement peut être observé (Lacroix, 2003).



**Figure 2 : Tumeur développée sur le collet de la vigne due à *Allorhizobium Vitis***

### **3-6- Cycle de maladie :**

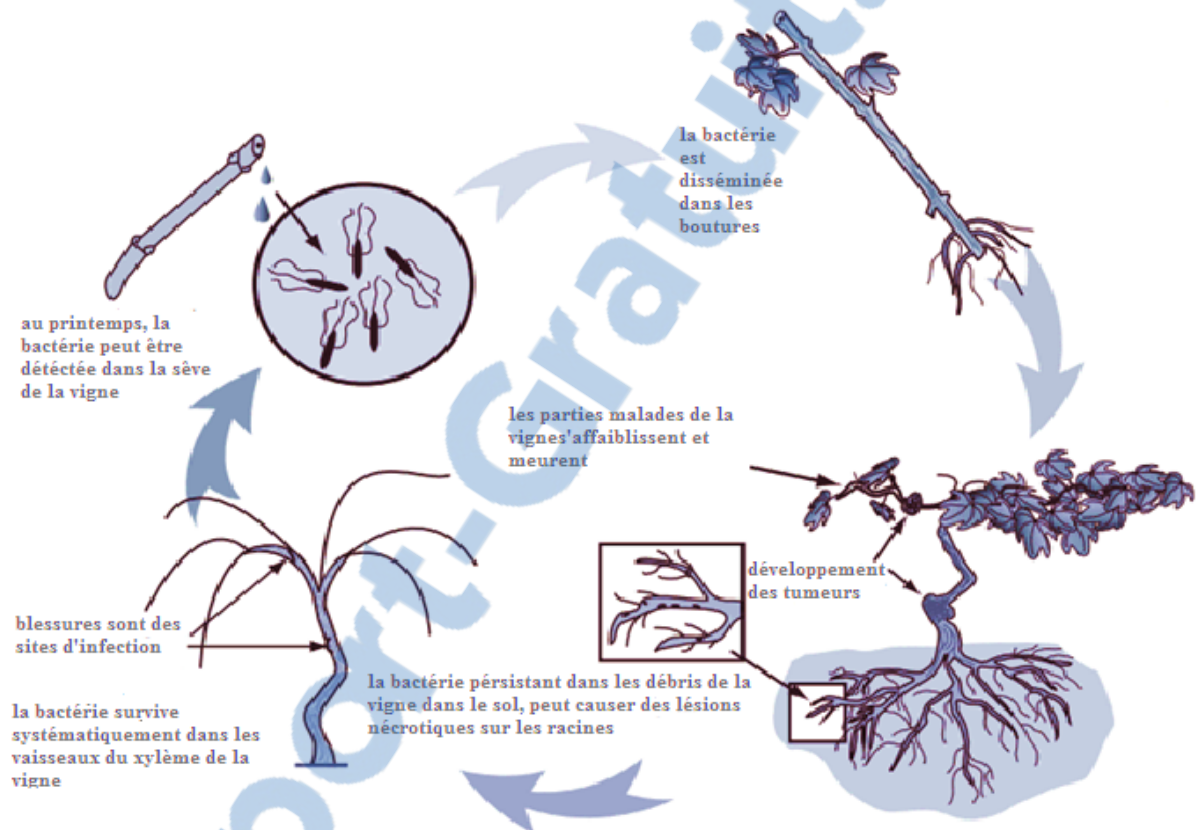
Le mécanisme d'infection des plantes par *A. vitis* est très particulier et peu complexe. Il est donc important de bien le comprendre afin de saisir la grande importance de la lutte préventive et de l'absence de méthode de lutte curative.

Dans le cas d'*A. vitis*, même si la bactérie est présente dans le sol, le processus d'infection ne peut débuter que si la plante présente une blessure. Lorsque les cellules végétales sont blessées il y a libération des exsudats comme signal de stress qui attire la bactérie. Cette dernière se dirige vers les tissus de la plante blessée grâce à son potentiel de mobilité. Une fois sur place, la bactérie se fixe aux cellules de la plante. Ensuite, elle transfère une partie de son matériel génétique qui s'intègre à celui de la plante. À la suite de ce transfert, le fonctionnement de la plante se voit modifié. Premièrement, il y a une production accrue d'hormones de croissance (cytokinines et auxines) qui se traduit par une croissance désordonnée et illimitée engendrant l'apparition de tumeurs. Deuxièmement, il y a la synthèse et la libération de composés particuliers, appelés opines, servant de nutriments pour la bactérie. Ces composés font en sorte que la tumeur devienne un environnement riche en



éléments nutritifs propices pour la croissance des bactéries (Figure 3). Une fois que son matériel génétique est transféré à la plante, il n'est plus nécessaire que la bactérie soit présente pour que la tumeur poursuive sa croissance.

Les tumeurs sont envahies par des organismes saprophytes engendrant leur décomposition. Cette dégradation implique une libération de bactéries dans le sol. Facilement disséminées, ces dernières se propagent vers une plante saine et engendrent à nouveau le développement de tumeurs (Lacroix, 2003).



**Figure 3 : Cycle de la maladie du Crown gall de la vigne**

### **III- Moyens de lutte contre le Crown gall de la vigne:**

Une fois que la plante est infectée par *A. Vitis*, il n'existe pas de méthode de lutte curative, car même en absence de la bactérie il y aura progression de la croissance de la tumeur. Par conséquent les méthodes de lutte doivent être préventives.

#### **1- Lutte prophylactique :**

Il est important d'utiliser du matériel de reproduction propre, comme moyen de lutte préventif contre l'*A. Vitis*, car les plants infectés peuvent demeurer asymptomatiques jusqu'à l'arrivée de l'hiver. Comme il faut bien désinfecter les outils lors de la taille, éviter les

plantations trop denses, et minimiser les blessures aux tiges et aux racines lors des pratiques culturales.

Lorsqu'il est connu que la bactérie est présente dans un sol, il faut assurer une rotation avec une plante non sensible pour une période de 2 à 3 ans sans oublier d'assurer un bon contrôle des populations d'insectes et de nématodes.

## **2- Lutte chimique :**

Le contrôle chimique est un procédé onéreux qui s'est souvent révélé inefficace contre *A. Vitis*. Malheureusement les essais effectués jusqu'à nos jours ont donné des résultats très décevants qui ne valent même pas la peine de prendre le risque de disperser des substances délétères dans l'environnement. Ces moyens de lutte ont compris l'utilisation de désinfectants généraux tels que l'hypochlorite de sodium à 0,5%, le cuivre et les antibiotiques. Sauf que ces traitements ne tuent les bactéries qu'à la surface du matériel végétal, ainsi que les antibiotiques qui sont utilisés dans la thérapie humaine ne sont pas utilisées comme produits phytosanitaire (Tolba et Soliman, 2013).

## **3- Lutte biologique :**

La lutte biologique consiste à utiliser des organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs et par des agents pathogènes.

Des recherches importantes sur l'emploi de la lutte biologique comme moyens pour protéger les vignes contre la tumeur du collet ont été menées dans plusieurs laboratoires et semblent très prometteuses. Actuellement ces moyens utilisés de façon préventive ont donné des résultats intéressants contre *l'A. Vitis*, parmi lesquels nous citons :

### **3-1- Microorganismes antagonistes :**

Une des stratégies pour lutter contre la galle du collet est l'utilisation des microorganismes antagonistes non pathogènes, tels que les virus, les bactéries, les levures et les champignons. Un agent de lutte biologique efficace ne doit pas seulement être antagoniste, mais il doit aussi pouvoir survivre de façon stable dans la plante cible et / ou dans son environnement tout en gardant une grande efficacité contre l'agent pathogène.

### **3-2- Huiles essentielles :**

Les huiles essentielles, ou essences aromatiques végétales, sont des substances odorantes, volatiles, huileuses donc de nature hydrophobe, totalement solubles dans l'alcool,

l'éther et dans les huiles végétales et minérales (Burt., 2004). Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits (Burt, 2004), mais également à partir des gommages qui s'écoulent du tronc des arbres. Beaucoup d'entre elles ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (Valnet, 2005). La composition des huiles essentielles varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte. L'hydrodistillation reste le moyen le plus employé pour produire les huiles essentielles, en particulier à des fins commerciales (Burt, 2004).

Concernant l'activité antibactérienne des huiles essentielles, la première mise en évidence de leurs actions contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix. Depuis, plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leurs pouvoir antifongique (Moleyar et Narasimham 1986 ; Soliman et Badeaa 2002 ; Jazet et *al.*, 2009) antibactérien (Bourkhiss et *al.*, 2007 ; Magina et *al.*, 2009), antioxydant (Bouzouita et *al.*, 2008) et insecticide (Erlor et *al.*, 2006 ; Tang et *al.*, 2007 ; Cheng et *al.*, 2009). Actuellement il existe diverses méthodes utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles.

- **Méthode d'aromatogramme:** L'aromatogramme est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. C'est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne. Cette méthode est la plus utilisée car elle est la plus fiable, la plus simple, et la moins onéreuse. Elle repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles à l'intérieur d'une boîte de Pétri dans un milieu nutritif solide. A la surface de ce milieu, la suspension de la bactérie à étudier est uniformément ensemencée. Après 10 à 15 minutes, le surplus est éliminé dans la hotte à flux laminaire jusqu'à ce que la gélose soit sèche. Des disques stériles de papier Wattman imprégnés d'une quantité d'huile essentielle à l'état pur sont déposés au centre des boîtes. Celles-ci sont ensuite fermées puis incubées à 37 °C pendant 24h. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant ainsi des halos autour des disques appelés zone d'inhibition qui est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse exprimé en millimètre. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est

sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante (Guerin-Fauble., 1999).

- **Méthode de micro-atmosphère** : La différence entre cette méthode et celle de l'aromatogramme réside principalement dans la position du disque imprégné des huiles essentielles qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétri, renversée après fixation de l'huile essentielle sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. Alors l'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte et peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés.
- **Méthode de diffusion en puits** : Cette méthode a été proposée en 1994 par Cooper et Woodman et reprise par Shroeder et Messing en 1949. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution d'huile essentielle de concentration connue. L'huile essentielle diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire facilement mesurable à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (Eymard., 2003).
- **Méthode de dilution** : Dans cette méthode les huiles essentielles à tester peuvent être directement mélangées en concentration connues au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide. Le milieu est ensuite inoculé avec un taux déterminé de microorganismes. Après incubation, on note la présence ou l'absence de prolifération microbienne. La lecture peut être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre. Le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (Robert., 2000).

# MATERIEL ET METHODES

## I- Matériel :

### 1- Souches bactériennes :

L'agent pathogène utilisé dans notre travail est la bactérie *A. vitis* souche S4 (souche de référence) qui fait partie de la collection du Laboratoire de Phytobactériologie et de Lutte Biologique de l'INRA de Meknès. Elle a été isolée de plant de vigne de la région de Meknès ayant des symptômes de la galle du collet.

Quant aux antagonistes testées dans cette étude, ils sont constitués de 5 souches de bactérie différentes, appartenant à la collection du laboratoire précité (Tableau3).

**Tableau 3 : Liste des souches bactériennes utilisées**

Souches bactériennes	Date de prélèvement	Région	Echantillon
S4 d' <i>A.vitis</i>	*	*	Souche de référence
2626-5	09/12/2014	El Hajeb	Pommier variété Golden
2328-B5			Pommier variété Golden
2021-2	31/12/2012	Fès	Pommier variété Délicieux
2515-3	05/01/2014	Imouzzar Kandar	Pommier variété Golden
2066-7	08/03/2012	Taounat	Olivier

### 2- Matériel végétal:

Quatre plantes aromatiques et médicinales ont fait l'objet d'extraction des huiles essentielles afin de tester leur activité biologique:

- ▶ **Thym** (*Thymus officinalis*) : C'est un arbrisseau de petite taille qui peut former des touffes bien étalées sur le sol. Les feuilles florales sont différentes des feuilles caulinaires, en général fortement dilatées à leur portion inférieure. Il est rencontré dans les broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur sols rocaillieux bien drainés. Ce genre comporte plus de 300 espèces. Ce sont des plantes rampantes ou en coussinet portant de petites fleurs roses pâles ou blanches appartenant à la famille des lamiacées, qui fait partie des plantes aromatiques vu sa richesse en huiles essentielles.
- ▶ **Romarin** (*Rosmarinus officinalis*) : C'est un arbrisseau de la famille des lamiacées qui fait 0,50 à 1,50m de longueur, et qu'on rencontre le plus souvent en grandes masses. Il est très touffu, odorant, et il a de nombreuses tiges souvent dressées et très feuillées.

Le romarin est connu à l'échelle mondiale comme plante aromatique et médicinale qui fait l'objet d'usages multiples allant du simple usage de la médecine traditionnelle aux multiples usages industriels comme la pharmacologie, l'agroalimentaire et autres (Bhar et Balouk., 2011)..

- ▶ **Origan** (*Origanum vulgare*) : Ce mini arbuste pérenne, à port dressé ou étalé appartient à la famille des lamiacées. Ses feuilles sont de forme et de taille différente, contenant des poils glandulaires ou non à leur surface. Ses glandes sécrétrices s'étendent également sur la tige et sur les bractées. Les fleurs sont bisexuées, de couleur blanche ou pourpre, groupées aux sommités des tiges.

L'origan est connu par ses propriétés antiseptiques, ainsi que ses vertus médicinales et aromatiques.

- ▶ **Eucalyptus** : C'est un arbre qui appartient à la famille des Myrtacées qui possèdent toute une gamme de mécanismes d'adaptation et ont une croissance rapide, ce qui leur permet d'être présents dans de nombreux environnements.

L'eucalyptus est utilisé pour ses vertus sur l'appareil respiratoire, ainsi pour soigner les bronchites, la toux, les rhumes ou la sinusite en phytothérapie. En confiserie l'eucalyptus est utilisé principalement dans la fabrication de gommes au goût de menthe. Comme on peut l'acheter sous forme des huiles essentielles ou des gélules.

## **II- Méthodes :**

### **1- Test de pathogénicité :**

Avant de commencer tout notre travail concernant la lutte contre le Crown gall de la vigne, un test de pathogénicité est nécessaire pour confirmer la virulence de l'*A. vitis* que nous disposons. Dans ce cadre, une suspension bactérienne a été préparée dans un tube à essai contenant 9ml de l'eau distillée stérile à partir d'une culture jeune de 24h. Ensuite la suspension est injectée dans le limbe d'une feuille de tabac à l'aide d'une seringue stérile. Après 24 heures, nous vérifions la surface de l'injection qui nous montre une lésion bien visible. Cela confirme alors la présence d'un organisme phytopathogène, ainsi la virulence de l'*A.vitis*.

## **2- Evaluation de l'activité antibactérienne des antagonistes :**

### **2-1- Préparation d'une pré-culture :**

Avant la réalisation des tests antibactériens il fallait d'abord réactiver par réensemencement les cinq bactéries antagonistes testées, ainsi que la souche mère de l'agent pathogène *A. vitis* S4 conservée au laboratoire sur milieu solide LPGA (annexe), et ce la veille de la réalisation des tests. L'ensemble a été incubé à 27°C pendant 24h pour avoir des cellules bactériennes à leur phase exponentielle de croissance.

A partir de cette souche bactérienne fraîche, quelques colonies sont cultivées sur le même milieu que la souche mère, pour servir dans les différents tests.

### **2-2- Préparations de la suspension bactérienne :**

A partir des jeunes cultures préalablement préparées, deux à trois colonies identiques et bien isolées sont prélevées dans 9ml d'eau distillée stérile. Après agitation au vortex pendant quelques secondes, nous ajustons la suspension bactérienne homogène à une concentration équivalente à  $10^8$  CFU/ml, en utilisant la spectrophotométrie avec une longueur d'onde  $\lambda = 620\text{nm}$  grâce à un spectrophotomètre.

### **2-3- Test d'aromatogramme par les antagonistes :**

Pour procéder à ce test, 100 $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne déjà préparée ( $10^8$  CFU/ml) est ensemencée par inondation de la gélose LPGA solide préalablement versée dans des boîtes de Pétri. La surface des boîtes est séchée sous hotte à flux laminaire avant la remise du couvercle en place. Après séchage, des disques de papier Wattman stériles de 5 mm de diamètre servent pour prélever la crème de chaque antagoniste testé à l'aide d'une pince, puis déposés sur la gélose au milieu des boîtes.

Afin de mieux suivre l'effet des antagonistes, deux témoins sont réalisés. Le premier dit négatif avec un disque sur lequel sont versés 2 $\mu\text{l}$  d'eau distillée stérile. Le deuxième dit positif avec un disque d'antibiotique servant pour la comparaison et qui est dans notre cas la streptomycine.

Après incubation à  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24h, les diamètres d'inhibition autour de chacun des disques ont été mesurés en millimètres. Ainsi le pourcentage d'inhibition est calculé par la relation suivante :



### Calcul du pourcentage d'inhibition :

$$\% \text{ d' inhibition} = \left[ \frac{(T - Cb)}{T} \right] * 100$$

Avec:

- **Témoin** : la charge bactérienne du témoin négatif.
- **Charge bactérienne** : le diamètre de la colonie de l'agent pathogène après l'action des antagonistes.

### 3- Evaluation de l'activité bactéricide des huiles essentielles :

#### 3-1- Extraction des huiles essentielles:

L'extraction des huiles essentielles de thym de romarin d'origan et d'eucalyptus ont été isolées des parties aériennes (feuilles) des plantes par hydrodistillation. L'extraction a été réalisée au laboratoire d'extraction au sein de l'INRA.

Sur un montage comprenant un Clevenger avec retour, des échantillons de 200g de romarin, de thym, d'origan et d'eucalyptus ont été distillés séparément dans deux litres d'eau distillée pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huiles, en traversant le réfrigérant, se condensent et chutent dans le Clevenger. L'eau et l'huile se séparent par différence de densité. L'huile est ensuite récupérée pour être utilisée dans nos tests.

#### 3-2- Test d'aromatogramme par les huiles essentielles :

L'activité antibactérienne des huiles essentielles du thym, d'origan, d'eucalyptus et du romarin est mise en évidence par la méthode de diffusion sur les disques de Wattman stériles. Ainsi 100µl de la suspension bactérienne déjà préparée ( $10^8$  CFU/ml) est utilisé pour ensemencher par inondation la gélose LPGA solide préalablement versée dans des boîtes de Pétri. La surface des boîtes est séchée sous hotte à flux laminaire avant la remise du couvercle en place. Après séchage des disques, des disques de papier buvard stériles de 5 mm de diamètre sont déposés sur la gélose au milieu des boîtes et imbibés par 2µl de chaque huile essentielle testée pure.

Comme dans le test précédent, deux témoins servant pour la comparaison sont réalisés. Le premier dit négatif avec un disque sur lequel sont versés 2µl d'eau distillée stérile. Le deuxième dit positif avec un disque d'antibiotique qui est dans notre cas la streptomycine.

Après incubation à  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24h, les diamètres d'inhibition autour de chacun des disques ont été mesurés en millimètres. Ainsi le pourcentage d'inhibition est calculé par la relation suivante :

**Calcul du pourcentage d'inhibition :**

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[ \frac{(T - Cb)}{T} \right] * 100$$

Avec:

- **Témoin** : la charge bactérienne du témoin négatif.
- **Charge bactérienne** : le diamètre de la colonie de l'agent pathogène après l'action des HE.

**3-3- Test de micro-atmosphère par les huiles essentielles :**

Cette technique consiste à déposer des disques de papier Wattman stériles imbibés d'une quantité déterminée 5µl d'huile essentielle au milieu des couvercles des boîtes de Pétri et non au contact direct avec la géloseensemencée. Les boîtes sont ensuite fermées avec leurs couvercles en bas puis, incubées à  $28^\circ\text{C}$  pendant 24h. Après incubation, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire lorsque le disque est bien centré. Ceci exprime l'effet inhibiteur des huiles essentielles exercé sur les microorganismes testés. Les résultats se lisent avec un pied à coulisse et s'expriment par un diamètre en mm, et le pourcentage d'inhibition est calculé.

**3-4- Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) :**

La détermination des CMI et des CMB a été réalisée pour les huiles essentielles ayant une meilleure activité antibactérienne contre les agents pathogènes, tout en se basant sur la technique de dilution en milieu liquide couplée avec l'étalement sur milieu solide telle qu'elle est décrite par Chabert et Daguet en 1985. Les milieux liquides et solides utilisés sont respectivement LPG (annexe) pour la détermination des CMI et LPGA pour la détermination des CMB.

### **3-4-1. Détermination de la CMI :**

La détermination de la CMI consiste à inoculer, par un inoculum standardisé 0,5 de Mac Farland, qui est dans notre cas l'*A.vitis*, une gamme de concentrations décroissantes en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice, qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle présentant une activité antibactérienne intense sur toute croissance de l'agent pathogène, ainsi quatre séries de tube correspondant chacune à une huile essentielle d'origan, de thym, de romarin et d'eucalyptus ont été utilisées. Ces derniers remplis avec 4.5ml du milieu LPG, supplémentés de 0,01 % de DMSO, ont été inoculé avec 20 µL d'un inoculum bactérien, de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (108 UFC.mL<sup>-1</sup>). Par la suite, 400 µL des huiles essentielles à tester sont placés dans le premier tube de chaque gamme, et une dilution en cascade est effectuée de manière à obtenir une gamme de concentrations comprises entre 80 mg.mL<sup>-1</sup> et 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>. Les tubes ainsi préparés, sont ensuite placés à 28°C, sous agitation, pendant 24 heures.

Le lendemain de l'expérience, 50µl /1mL de la résazurine est ajoutée dans chaque tube, et les tubes sont ensuite incubés à 28°C durant 2 heures sous agitation.

La CMI correspond donc à la plus petite concentration d'huile essentielle qui ne produit pas de changement de coloration de la résazurine du bleu au rose.

### **3-4-2. Détermination de la CMB :**

La concentration minimale bactéricide correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial. Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle.

Dans notre protocole, la CMB est déterminée par étalement de 20 µL du contenu de chaque tube, dont la concentration est supérieure ou égale à la CMI, sur le milieu solide (LPGA). Parmi les concentrations, la CMB est celle qui ne laisse survivre pas plus de 0,01% des bactéries de la suspension de départ, après 24 heures d'incubation.

# RESULTATS ET DISCUSSION

### I. Résultat du test de pathogénicité (figure 4) :

L'injection des feuilles de tabac par une suspension bactérienne d'*A.vitis* a révélé la présence de lésions au bout de 24h, ce qui confirme la virulence de la bactérie.





**Figure 4 : Test de pathogénicité sur plante de tabac**



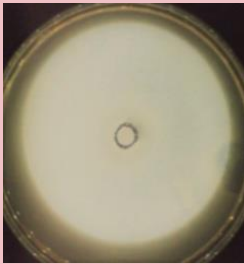
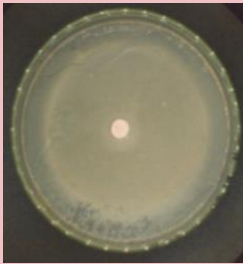
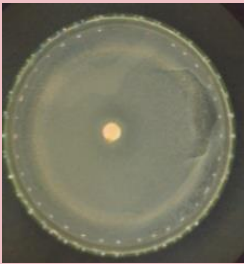
### II. Evaluation de l'activité antibactérienne des antagonistes :

L'activité antibactérienne des cinq antagonistes testées a été évaluée par la méthode de diffusion par disque. Les résultats du test d'aromatogramme par les antagonistes sont présentés dans le tableau 5, tandis que ceux des deux témoins, la streptomycine et l'eau distillée stérile, sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Résultats obtenus du test d'aromatogramme par les deux témoins**

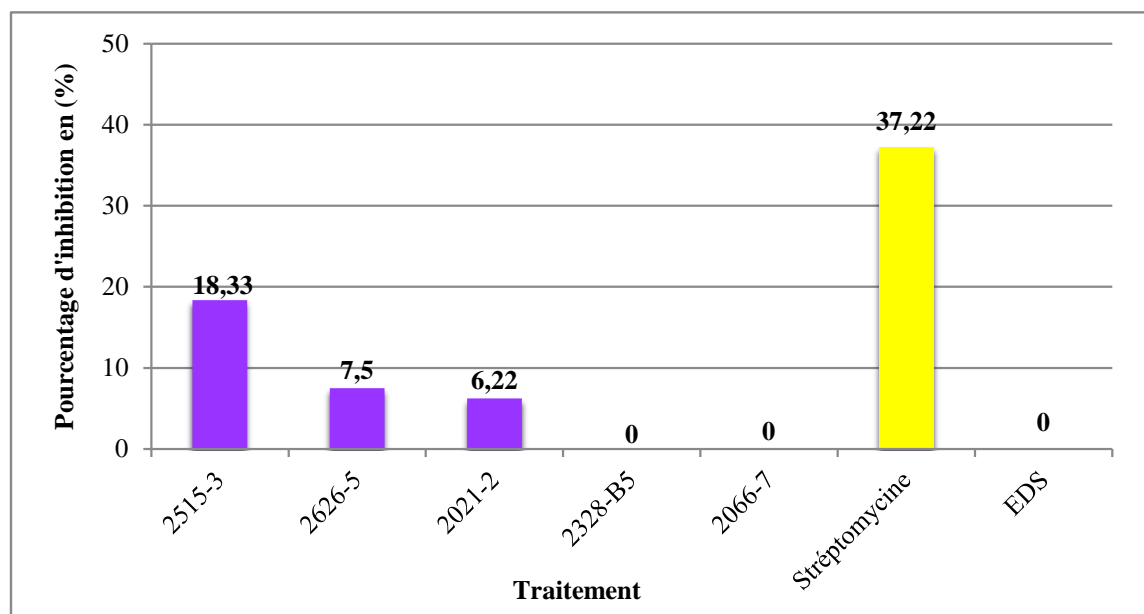
Aromatogramme	
Streptomycine	EDS
	

**Tableau 5 : Résultats obtenus du test d'aromatogramme par les antagonistes**

	2515-3	2626-5	2021-2	2328-B5	2066-7
Aromatogramme					

Le premier antagoniste testé qui est le 2515-3 présente une zone d'inhibition importante, ce qui lui permet d'être en première place comme antagoniste ayant une bonne activité antibactérienne contre l'*A. vitis* suivi des deux autres, le 2626-5 et le 2021-2 ayant presque la même zone d'inhibition, la différence est de quelques micromètres. La zone d'inhibition provoquée par ces deux traitements est très petite, mais elle reste bien meilleure que celle des deux derniers antagonistes 2328-B5 et 2066-7 qui n'ont pas agi sur la bactérie en question, et n'ont donné aucun halo autour du disque.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé pour les 5 antagonistes utilisés (figure5).







**Figure 5 : Pourcentages d'inhibition de la croissance d'*A. vitis* par les cinq antagonistes testés**

Parmi ces derniers, le meilleur est le 2515-3 puisqu'il a le plus grand pourcentage d'inhibition ; par rapport aux quatre traitements qui suivent ; avec une valeur de 18,33%. Le deuxième antagoniste 2626-5 présente un pourcentage d'inhibition de 7,5%. Suivi du troisième traitement 2021-2 qui a donné uniquement 6,22%. Quant aux deux derniers 2328-B5 et 2066-7 ils ont été tolérés par l'*A. vitis*, parce que leur pourcentage d'inhibition est égal à zéro.

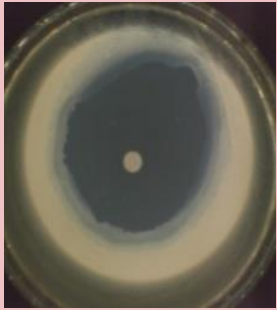
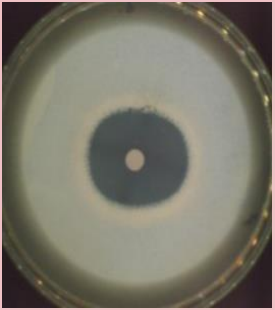


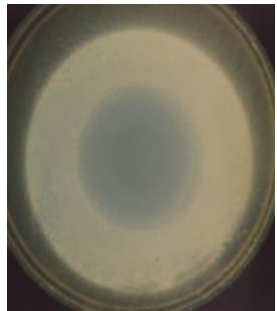
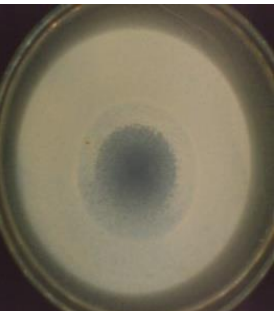


### III. Evaluation de l'activité bactéricide des huiles essentielles :

L'activité bactéricide des huiles essentielles de l'origan, du thym, d'eucalyptus et du romarin a été évaluée par la méthode de diffusion par disque. Les résultats du test d'aromatogramme et de la micro-atmosphère par les HE sont présentés dans le tableau 7, ainsi que ceux des deux témoins, la streptomycine et l'eau distillée stérile, sont présentés dans le tableau 6.

**Tableau 6 : Résultats obtenus du test d'aromatogramme et micro-atmosphère par les deux témoins**

	Streptomycine	EDS
Aromatogramme		
Micro-atmosphère		

**Tableau 7 : Résultats obtenus du test d'aromatogramme et micro-atmosphère par les HE**

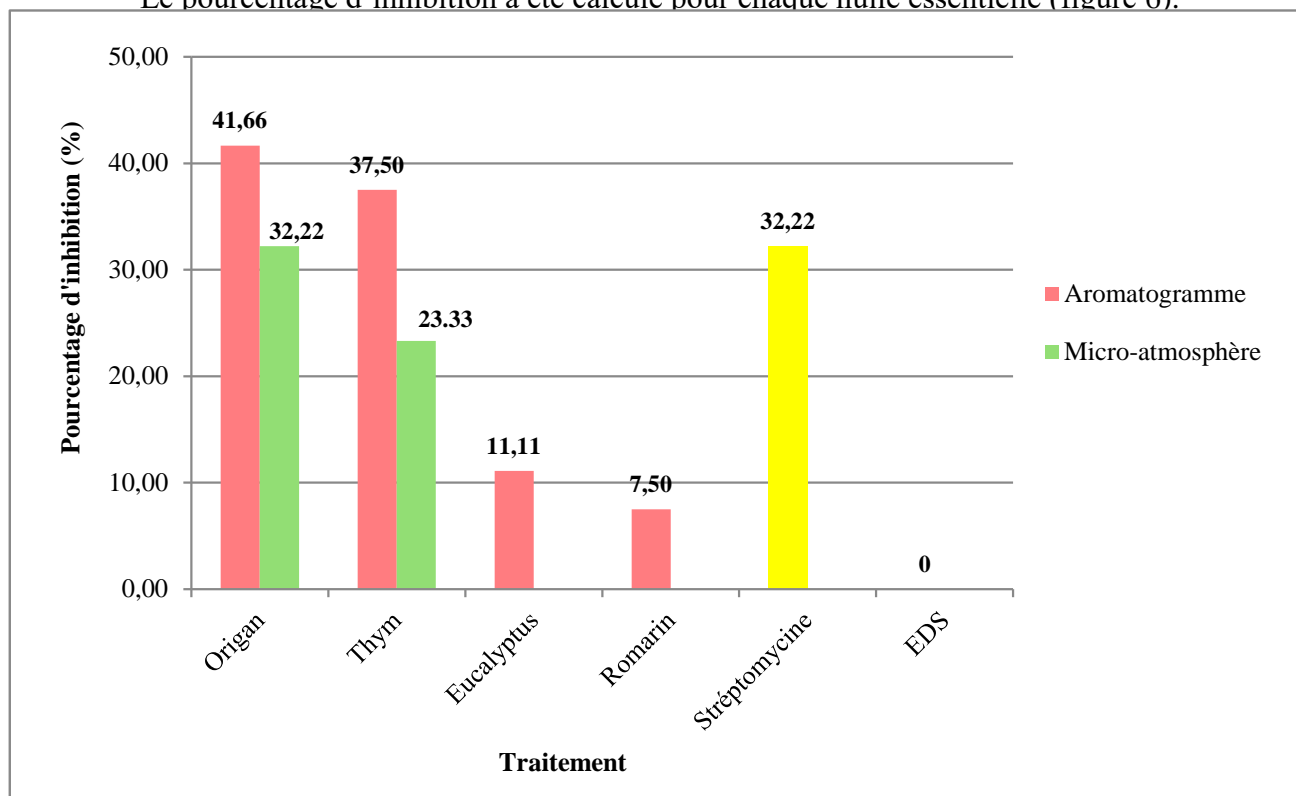
	<b>Origan</b>	<b>Thym</b>	<b>Eucalyptus</b>	<b>Romarin</b>
<b>Aromatogramme</b>				
<b>Micro-atmosphère</b>				

L'huile d'origan présente la plus grande zone d'inhibition, en aromatogramme comme en micro-atmosphère par rapport au témoin, ce qui explique sa grande capacité bactéricide contre l'*A. vitis*. La zone d'inhibition provoquée par l'huile de thym vient en deuxième place après l'origan, elle aussi bien visible en aromatogramme qu'en micro-atmosphère. En revanche, l'huile d'eucalyptus ne présente aucune zone d'inhibition en micro-atmosphère, mais elle agit assez bien en aromatogramme. Pour l'huile du romarin, elle présente la zone d'inhibition la plus petite, et n'a eu aucun effet sur la bactérie en micro-atmosphère.

D'après ces résultats, nous pouvons dire que parmi les quatre huiles essentielles testées, celle d'origan et du thym restent les meilleures, puisque leurs zones d'inhibition dépassent largement celle de la streptomycine. En outre cette dernière ne présente aucun effet en micro-atmosphère.



Le pourcentage d'inhibition a été calculé pour chaque huile essentielle (figure 6).



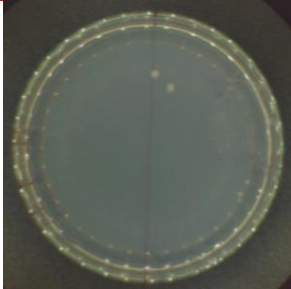
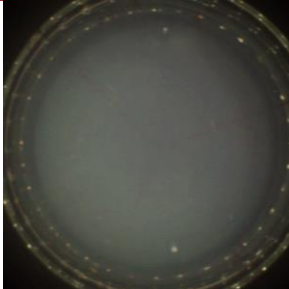
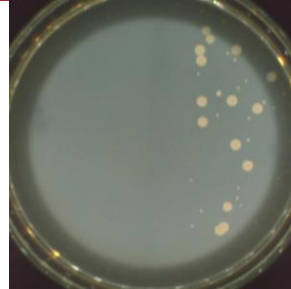
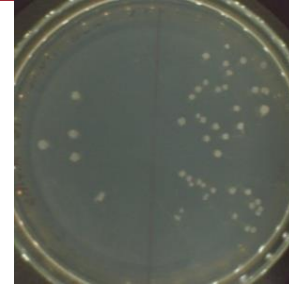
**Figure 6 : Pourcentages d'inhibition de la croissance d'*A. vitis* par les 4 huiles essentielles testées**

L'huile d'origan est placée en premier, puisque son pourcentage d'inhibition en aromato-gramme est égal à 41,66% et 32,22% en micro-atmosphère, ces valeurs dépassent celle de la streptomycine qui est un antibiotique de référence et qui a un pourcentage d'inhibition de 32,22% en aromato-gramme et 0% en micro-atmosphère. Pour l'huile du thym, les résultats sont très intéressants, ce dernier dépasse aussi le pourcentage d'inhibition de la streptomycine, avec une valeur de 37,50% en aromato-gramme et 23,33% en micro-atmosphère. En troisième position vient l'huile d'eucalyptus avec un pourcentage de 11,11% en aromato-gramme et 0% en micro-atmosphère. Et en dernier lieu, l'huile de romarin a donné 7,5% comme pourcentage d'inhibition en aromato-gramme, et 0% en micro-atmosphère.

#### **IV. Détermination de la CMI et la CMB :**

Les tests de détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) ont donné les résultats présents dans le tableau 8.

**Tableau 8 : Résultats de la CMI et la CMB des huiles essentielles étudiées**

	<b>Origan</b>	<b>Thym</b>	<b>Eucalyptus</b>	<b>Romarin</b>
<b>CMI</b>	0,6mg.mL-1	1,25mg.mL-1	5mg.mL-1	2,5mg.mL-1
<b>CMB</b>	 20mg.mL-1	 20mg.mL-1	 80mg.mL-1	 80mg.mL-1

Nous constatons que parmi les 4 CMI obtenues, celle de l'huile d'origan est la plus petite avec une valeur de 0,6 mg.mL-1. Suivi par l'huile du thym, avec 1,25mg.mL-1 comme CMI. Puis par l'huile du romarin, avec 2,5mg.mL-1. Et finalement l'huile d'eucalyptus a la plus grande CMI avec une valeur de 5mg.mL-1.

Concernant la CMB de l'huile essentielle, elle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de toute colonie bactérienne ou dans laquelle 0,01% de bactéries ont pu croître (tableau 8). Ainsi l'huile essentielle d'origan et de thym s'avèrent les plus actives d'après leur CMB, puisqu'elles ont provoqué le maximum d'inhibition de la croissance d'*A. vitis* à partir de 20mg.mL-1 seulement. Ensuite vient l'huile d'eucalyptus et de romarin avec une CMB correspondant à 80mg.mL-1.

## CONCLUSION

Après réalisation du test d'aromatogramme, trois antagonistes, 2515-3, 2626-5 et 2021-2 se sont avérés efficaces avec des pourcentages d'inhibition qui sont respectivement 18,33%, 7,5% et 6,22%. En revanche, les deux autres antagonistes n'ont eu aucun effet sur la bactérie.

Concernant l'activité antibactérienne des HE mise en évidence par le test d'aromatogramme et de la micro-atmosphère, les résultats obtenus montrent une grande efficacité des huiles essentielles d'origan et du thym avec des pourcentages d'inhibition qui sont respectivement 41,66% et 37,56% en aromatoigramme, et 32,22% et 23,33% en micro-atmosphère, puis une CMB correspondant à 20mg.mL<sup>-1</sup> seulement. Pour l'huile d'eucalyptus et du romarin, l'activité antibactérienne était moindre et soulignée seulement en aromatoigramme, avec des pourcentages d'inhibition qui sont respectivement 11,11% et 7,50%. En outre, leur CMB reste plus élevée et égale à 80mg.mL<sup>-1</sup>.

Les résultats obtenus dans cette étude sont relativement satisfaisants, cependant, des travaux de recherche complémentaires sont à envisager pour mettre au point un produit fini capable d'être commercialisé. Dans ce but, il faudra envisager de :

- Etudier les caractéristiques des bactéries antagonistes (étude écologiques et traçage), et aussi comprendre les mécanismes d'action utilisés dans le biocontrôle de la maladie de la galle du collet, dans le but de développer un biopesticide commercialisé efficace quelle que soit les circonstances de son utilisation.
- Chercher et trouver des moyens de formulation des huiles essentielles étudiées *in vitro* pour éviter le problème d'évaporation et de perte d'efficacité, afin de les utiliser aux champs.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE

**Achbani 2010 : Achbani. El.H., (2008).** Le Crown Gall une bactérie qui fait peur aux viticulteurs

**Bhar H et Balouk A., (2011).** Les plantes aromatiques et médicinales. Le jardin d'expérimentation de l'INPMA, l'espace marocain n° 68 / 2°.

**Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M. et Chaouch A., (2007).** Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc, *Afrique Science*, 3 (2), 232-242.

**Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M. et Chaabouni M.M., (2008).** Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*, *J. Soc. Chim. Tunis.*, 10, 119-125.

**Burt S., (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.

**Cheng S., Huang C., Chen Y., YU J., Chen W., and Chang S., (2009).** Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species, *Bioresour. Technol.*, 100, 452-456.

**Erler F., Ulug I., and Yalcinkaya B., (2006).** Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*, *Fitoterapia*, 77, 491-494.

**Eymard S., (2003).** Mise en évidence et suivi de l'oxydation lipides au cours de la conversation et de la transformation de chinchard (*trachurus trachurus*), choix des procédés. Thèse de Doctorat en Génie des procédés, Ecole doctorale en Génie des Procédés : Spécialité Biochimie. Nante. France.

**Gary C., Brisson N., Gaudillere JP., Duarte M., (2003).** Modélisation d'une espèce ligneeuse pérenne à fruits charnus: la Vigne. Séminaire STICS, Arles: 36-37.

**Guerin-Fauble V. et Carret G., (1999).** L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées Nationales GTV-INRA, 5-12.

**Hedgecock C G., (1910).** Fiel studies of the Crown Gall of the grape. US.Dep. Agric. Bur. Plant ind. Bull. 183.

**Jazet Dongmo P.M., Tatsadjieu L.N., Tchinda Sonwa E., Kuate J., Amvam Zollo P.H., and Menut C., (2009).** Essential oils of *Citrus aurantifolia* from Cameroon and their antifungal activity against *Phaeoramularia angolensis*, *African Journal of Agricultural Research*, 4(4), 354-358.

**Lacroix M., (2003).** La tumeur du collet et de la tige causée par *Agrobacterium*. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, direction de l'innovation scientifique et technologique.

**Magina M.D.A., Dalmarco E.M., Wisniewski A., Simionatto E.L., Dalmarco J. B., Pizzolatti M. G., and Brighente I. M. C., (2009).** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species, *J. Nat. Med.*, 63, 345-350.

**MAPM, 2011: Anonyme, (2011).** Situation de l'agriculture marocaine N9. Ministère d'agriculture et de la pêche maritime. 202: 141-143.

**Moleyar V. and Narasimham P., (1986).** Antifungal activity of some essential oil components, *Food Microbiology*, 3, 331-336

**Moussavi et al 2014: Mousavi SA, Osterman J, Wahlberg N, Nesme X, Lavire C, Vial L, Paulin L, de Lajudie P, Lindstrom K (2014).** Phylogeny of the *Rhizobium*-*Allorhizobium*-*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen.nov. *Syst Appl Microbiol* 37(3): 208-215.

**Odile C., Bacon R., Lasnier J., et McFadden-Smith W., (2006).** Guide d'identification des principales maladies de la vigne Faivre A, 1982. La galle du collet ou tumeur à *Agrobacterium*. *Phytoma*, 34,33-36

**Odile G., (2006).** Studies on the crown gall disease of flower crops.pathogenicity and inculum potential of causal bacterium.*ann.phytopathol.Soc.*, 50 ,205-217.

**Ophel et Kerr, 1990: Ophel K, Kerr A (1990).** *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int J Syst bacteriol* 40: 236-241.

**Portier P., (2004).** Sélection d'écotypes bactériens pathogènes et non-pathogènes par la plante en relation avec la différenciation en espèces génomiques chez *Agrobacterium* spp.Diplôme de Doctorat, Université CLAUDE Bernard – Lyon 1.

**Robert G., (2000).** Les Sens du Parfum. Osman Eroylls Multimedia. Paris. 224 p.

**Skiredj A.,Walali D.M.L., El Attir H., (2007).** LA VIGNE (*Vitis vinifera*)

**Soliman K.M. and Badeaa R.I., (2002).** Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi, *Food Chem. Toxicol.*, 40, 1669-1675.

**Stover EW., Swarz H.J., and Burr T.J., (1997).** Susceptibility of a diverse collection of vitis genotypes to Crown gall caused by *Agrobacterium vitis*, *J, Am, So, Enol, vitis-* 48:26-32.

**Tolba I.H., Soliman M.A., (2012).** Efficacy of native antagonistic bacterial isolates in biological control of crown gall disease in Egypt. Faculty of Agriculture, Ain Shams University. *Annals of agricultural science.*

**Tang G.W., Yang C.J., and Xie L.D., (2007).** Extraction of *Trigonella foenum-gracum* L. by supercritical fluid CO<sub>2</sub> and its contact toxicity to *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae), *J. Pest. Sci.*, 80, 151-157.

**Valnet M., (2005).** Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth *International Journal of Food Microbiology.* 85, p:73-81.

## ANNEXE

### Milieus de culture :

#### LPG :

Extrait de levure : 5g

Peptone : 5g

Glucose : 5g H<sub>2</sub>O: 1L

Eau distillée : 1 L

#### LPGA:

Extrait de levure : 5 g

Peptone : 5 g

Glucose : 10 g

Agar : 18 g

Eau distillée : 1 L