



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence Sciences & Techniques

Lutte biologique contre *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis*, agent causal du chancre bactérien

Présenté par :

AANITRA Chaimae

Encadré par :

P^rAL FIGUIGUI Jamila : **Encadrante FST-FES**

D^rACHBAN El Hassan : **Encadrant INRA-MEKNES**

Soutenu le : 06Juin 2017

Devant le jury composé de :

- ❖ P^r : AL FIGUIGUI Jamila
- ❖ P^r : RACHIQ Saad
- ❖ P^r : ACHBANI El Hassan

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma gratitude et mes vifs remerciements au Professeur EL HASSAN Achbani, Directeur de Recherche, Département de la Protection des Plantes et de l'Environnement à l'INRA de Meknès, pour l'encadrement qu'il m'a prodigué, ses directives, sa disponibilité permanente, ainsi que ses encouragements continus qui nous poussent vers l'excellence au travail.

Mes plus vifs remerciements s'adressent au Professeur ALFIGUIGUI Jamila, Enseignante-Chercheur au Département de Biologie à la Faculté des Sciences et Technique de Fès, de m'avoir guidée avec délicatesse et rigueur tout au long de la rédaction de ce manuscrit. Je ne trouverai jamais les mots les plus appropriés pour exprimer la reconnaissance que je lui porte pour tous ses conseils, pour ses encouragements et pour toutes les fois qu'elle a trouvé le temps nécessaire pour m'écouter.

Mes sincères remerciements vont aussi à HABBADI Khaoula (doctorante à l'INRA de Meknès) ses directives précieuses, sa grande sympathie et sa rigueur scientifique m'ont profondément marqué.

Enfin, je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A mes très chers parents que j'adore

Abdelhak AANITRA ET Zhour BENBOUCHAREB

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect et ma considération

Pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon éducation,

Mon instruction et mon bien être.

Ce travail représente le si peu avec lequel je pourrai les remercier, que DIEU les garde et leur accorde longue vie et bonne santé, afin que je puisse à mon tour les combler et les rendre fiers.

A ma sœur

Ses encouragements et conseils m'ont été d'un grand secours

Ces quelques lignes ne sauront exprimer toute l'affection et l'amour que je lui porte. Puisse DIEU lui procure santé, bonheur réussite et prospérité.

A mes très chers amis

Je les remercie pour leur soutien, tant dans les moments de joie que dans les moments de difficultés.

Je leurs souhaite bonheur, réussite et prospérité.

RESUME

Le chancre bactérien dû à *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis* est une maladie bactérienne de la tomate qui provoque des pertes économiques importantes. La présente étude a pour objectif principal de contribuer à l'élaboration d'une stratégie de lutte biologique intégrée contre la maladie du chancre bactérien provoquée par la bactérie *Clavibacter michiganensis*, et d'étudier le pouvoir antagoniste des souches 2066-7, Ach2-1, 2515-3 et 2328-B5 ainsi que l'effet des huiles essentielles de l'origan, du thym, du romarin et de l'eucalyptus.

L'étude *in vitro* des antagonistes sur le pathogène a été satisfaisante par l'obtention de zones d'inhibition importantes. En effet, les huiles essentielles (HE) de l'origan, thym, romarin et l'eucalyptus exercent un effet antibactérien important contre le pathogène. Ces HE montre une grande efficacité en limitant la progression de la croissance de la bactérie et ils ont assuré une protection de 50%. L'ensemble de ces résultats contribuent à une meilleure compréhension de l'influence de la concentration sur l'activité antibactérienne des antagonistes et des huiles essentielles afin d'orienter leur utilisation en leur faveur pour lutter efficacement contre la maladie du chancre bactérien.

Mots clés : Chancre bactérien, tomate, *Clavibacter michiganensis*, lutte biologique, antagonistes, Huiles essentielles, activité antibactérienne; test *in vitro*.

Sommaire

Liste des figures.....	i
Liste des abréviations.....	ii
Introduction générale.....	1
Présentation de l'INRA	3
Revue Bibliographique	5
Chapitre 1 : Généralités sur la culture de la tomate	5
1- Historique	5
2- Taxonomie	5
3- Superficie et production de la tomate au Maroc.....	6
4- Récolte, manipulation du produit et conditions de conservation.....	7
5- Préférences pédo-climatiques	7
6- Importance économique de la culture	7
I. Généralité sur la maladie du chancre bactérien	10
1- Agent pathogène du chancre bactérien de la tomate.....	10
2- Symptômes du chancre bactérien.....	10
3- Cycle de développement	12
4- Conditions favorables au développement du chancre bactérien.....	12
II. Méthodes de lutte contre le chancre bactérien	12
1- Mesures prophylactiques	13
2- Lutte chimique.....	13
3- Lutte biologique	13
3.1- Utilisation des antagonistes.....	13
3.2- Utilisation des huiles essentielles	14
3.4- Evaluation de l'activité antibactérienne des HE	15
3.5- Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide.....	16
3.6- Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	17

3.7- Concentration minimale bactéricide (CMB).....	17
PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES.....	18
I- Matériel bactérien	18
1- Origine de la bactérie	18
2- Test de confirmation de pathogénicité.....	18
II- Origine des antagonistes.....	19
1- Origine de la souche <i>Ach2-1 (Aureobasidium pullulans)</i>	19
2- Origine de la souche <i>2066-7 (Pantoea agglomerans)</i>	20
III- Extraction des huiles essentielles.....	20
1- Origine des huiles essentielles.....	20
2- Extraction des huiles essentielles.....	20
IV- Evaluation de l'activité antibactérienne des antagonistes et des huiles essentielles in vitro.....	21
1- Tests de confrontation in vitro.....	21
1.1- Test d'aromatogramme pour les antagonistes.....	21
1.2- Test d'aromatogramme pour les huiles essentielles.....	22
1.3- Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).....	22
1.3.1- Détermination de la CMI.....	22
1.3.2- Détermination de la CMB.....	23
PARTIE 3 : Résultats et discussion.....	24
1- Test de pathogénicité sur tabac	24
2- Evaluation de l'activité antibactérienne des antagonistes	24
2.1- Test d'aromatogramme.....	24
3- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	26
3.1- test d'aromatogramme	26
4- Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide (CMIetCMB).....	29
Conclusions et Perspectives	32
Références bibliographiques.....	34

Liste des figures

Figure1 : Pourcentage de la superficie, la production et l'exportation de la tomate au Maroc.

Figure 2 : Production des tomates dans différents pays en Millions de Tonnes.

Figure3 : Evolution de la production des tomates entre 2009 et 2011.

Figure 4 : Symptôme du chancre bactérien.

Figure 5 : Aspect des antagonistes sur milieu LPGA.

Figure 6 : Test de pathogénicité sur tabac de la souche 1616-3.

Figure 7 : (A) Test de pathogénicité sur une feuille de tabac, (B) la même plante inoculée avec de l'EDS.

Figure 8 : Pourcentage d'inhibition des antagonistes vis-à-vis *Clavibacter michiganensis in vitro*

Figure 9: Test d'aromatogramme des antagonistes contre *Clavibacter michiganensis*.

Figure10 : Pourcentage d'inhibition des huiles essentielles contre *Clavibacter michiganensis in vitro*.

Figure 11 : Test d'aromatogramme des huiles essentielles contre *Clavibacter michiganensis*.

Figure 12: Résultats de la CMI des HE de l'origan, eucalyptus, thym et romarin.

Liste des abréviations

ONSSA : Office Nationale de la Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

PAM : Plantes Aromatiques et Médicinales

CMI : Concentration Minimales Inhibitrices

CMB : Concentration Minimales Bactéricides

EDS : Eau Distillée Stérile

UFC : Unité de Formation de Colonies

LPG : Bouillon nutritif à extrait de levure

LPGA : milieu gélosé à extrait de levure

Cmm : *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis*

INTRODUCTION GENERALE

La culture de la tomate (*Lycopersicon esculentum.L*) joue un rôle crucial dans l'économie marocaine, elle vient en tête des cultures maraîchères en occupant une superficie globale de 18 642 ha qui confère au pays une production totale dépassant 1,2 millions de tonnes par an, et représentant 14% de la production agricole globale au cours de la campagne 2005-2006. D'ailleurs, la région du Souss-Massa-Drâa se situe au premier rang aussi bien au niveau de la production qu'au niveau de l'exportation. Toutefois, cette culture est sujette aux attaques de nombreux microorganismes pathogènes et ravageurs. En effet, sa culture intensive a généré et a amplifié les problèmes phytosanitaires d'origine microbienne (Boudyach, 2004). Outre les champignons et les virus, les bactéries pathogènes entraînent une réduction importante de la qualité et du rendement de cette culture (Garteman, 2003).

Le chancre bactérien causé par *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, compte parmi les maladies principales de la tomate. C'est une maladie très contagieuse et destructive aussi bien sous serre qu'en plein champ. Celle-ci peut causer d'importants dégâts qui peuvent aller jusqu'à la destruction totale des récoltes (Boudyach, 2001). Au Maroc, toutes les zones de production de la tomate sont infestées par cette bactérie, dont la sévérité varie d'une région à l'autre (Fatmi et al. 1984). Les semences et les transplants infectés constituent la principale source d'inoculum primaire.

Au regard de l'épidémiologie de la maladie du chancre bactérien (transmission par les semences et les plants, survie dans les débris de tomate dans le sol, dissémination par les opérations culturales et en particulier l'ébourgeonnage et l'effeuillage), la lutte contre *Clavibacter michiganensis* nécessite la mise en place d'un programme intégrant plusieurs opérations à différents niveaux de la culture : au cours de la production de la semence, multiplication en pépinière et dans les unités de production. Si à chacun de ces niveaux des mesures préventives adéquates sont prises, il sera possible de bien gérer la maladie et de réduire son impact sur la production.

L'efficacité de la lutte chimique contre le chancre bactérien des agrumes est très limitée. Les traitements à base de sels de cuivre, doivent être ciblés afin de ne pas abîmer

fruits et feuilles et agir pendant 21 jours. En outre, les traitements chimiques utilisés, pour lutter contre cette maladie, ne font que réduire la population du pathogène à la surface des plants ou des semences infectés. Devant cette situation difficile et en plus de la répercussions des traitements chimiques sur la santé de l'Homme et l'environnement, la recherche et le développement de méthodes de lutte alternative sont vivement recommandés. En effet, la lutte biologique est une voie prometteuse et les nombreux travaux de recherche réalisés, un peu partout dans le monde, sur différents agents pathogènes ont abouti à des résultats encourageants, et en font une bonne preuve.

Récemment, le laboratoire de Bactériologie Végétale et Lutte Biologique de L'INRA de Meknès dispose des souches bactériennes antagonistes connues par leurs effets positifs aussi bien sur la croissance des plantes que dans la lutte contre certains microorganismes pathogènes (Achbani, 2014).

La présente étude a pour but l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte contre la maladie du chancre bactérien, tout en fixant les objectifs suivants :

- Evaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*eucalyptus* et d'*origan*, sur *Clavibacter michiganensis*.
- Evaluer, in vitro, l'effet antagoniste des souches *Ach2-1* et *2066-7* contre *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*.

Présentation d'INRA

Centre Régional de la Recherche Agronomique de Meknès: L'expertise scientifique au service du Développement agricole régional.

Le CRRA Meknès est une institution à profond ancrage historique qui développe une stratégie de recherche actualisée pour la production de technologies, connaissances et méthodes. Les recherches du centre 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 : 7300000ha (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.
- Animation de sessions de formation, de perfectionnement et de transfert de technologie.
- Elaboration de supports de vulgarisation (fiche technique, CD interactif, supports de projection, ...).
- Encadrement de thésards, mémorisants et de stagiaires.

PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur la culture de tomate

1- Historique

La tomate est originaire de l'Amérique du sud, précisément de la cordillère des Andes, aujourd'hui partagée entre Pérou, le Chili et l'Equateur, cette région qui présente la plus grande diversité génétique. Elle a été introduite en Europe après la découverte de l'Amérique par les européens et longtemps cultivée en tant que plante ornementale parce qu'au début elle était connue d'être toxique, son utilisation ornementale lui a valu le nom de la pomme dorée ou 'golden apple'.

2- Taxonomie

La tomate, *Lycopersicon esculentum* est une plante appartenant à la grande famille des Solanacées, le genre *Lycopersicon* qui renferme lui-même deux sous-genres ; *l'Eulycopersicon* et *l'Eriopersicon*, ce dernier comprend l'espèce *lycopersicon pimpinelifolium* et *Lycopersicon esculentum*, la première espèce est souvent désignée sous le nom de tomate groseille ou tomate à grappes, ses fruits mesurent moins de 10mm de diamètre. *Lycopersicon esculentum* regroupe des variétés à grands fruits qui poussent à l'état sauvage ou qui sont cultivées comme plantes annuelles ou vivaces. C'est une espèce monoïque et diploïde. De point de vue taxonomique, la systématique de la tomate peut être résumée comme suit :

- **Règne** : Végétal
- **Sous-Règne** : Cormophytes
- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous-Embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Gamopétales
- **Ordre** : Polémoniales
- **Famille** : Solanacées
- **Genre** : *Lycopersicon*
- **Espèce** : *Esculentum* L.

3- SUPERFICIE ET PRODUCTION DE LA TOMATE AU MAROC

La tomate est l'une des cultures les plus importantes parmi les primeurs. Elle représente 27 % de la superficie et assure 63 % de la production globale et 70 % des exportations de primeurs. En effet, avec une superficie moyenne de 5910 ha, le secteur de la tomate assure une production totale de 565 000 tonnes dont 186 213 tonnes sont destinées à l'exportation.

Le secteur de la tomate au Maroc joue un rôle socio-économique important. En effet, sur le plan économique, les exportations de tomate occupent une place importante puisqu'elles rapportent près de 1,1 milliard de DH en devises. Sur le plan social, le secteur est générateur d'emplois puisqu'il crée en moyenne 9 millions de journées de travail par an, au niveau de la production mais aussi du conditionnement et de la transformation... En outre, il joue largement le rôle de courroie de transmission des nouvelles technologies pour le secteur agricole et agro-industriel.

Les principales régions de production sont le *Souss Massa*, *El Jadida*, et *Casablanca* pour les primeurs et la culture d'arrière saison. La plupart des serres sont situées sur le littoral. La culture peut être prolongée jusqu'au mois de mai juin pour une production de primeurs. La densité est de 18.000 à 20.000 plants à l'hectare pour les cultures

sous abris et de 23.000 à 25.000 plants / ha pour les cultures de plein champ.

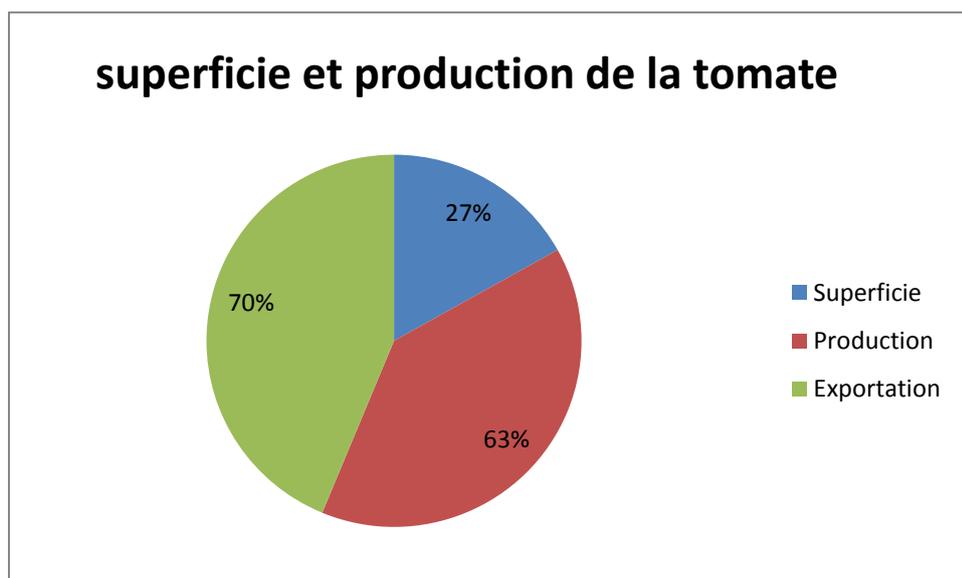


Figure 2 : Production des tomates dans différents pays en Millions de Tonnes

4- Récolte, manipulation du produit et conditions d'une bonne conservation

La récolte peut faire l'objet de 3 à 4 cueillettes échelonnées sur 1 à 2 mois. Les fruits cueillis doivent être manipulés avec soin afin d'éviter leur blessure. Le rendement varie de 40 à 120 T/ha, selon la qualité de l'entretien consacré à la culture et selon les conditions climatiques. Le rendement dépasse rarement 50-60 T/HA en plein champ. En ce qui concerne la conservation, il faut rappeler que la tomate produite sous abris doit être vendue en frais. Au moment de la récolte, le transport à l'usine pose souvent un problème. En effet, le camion doit être disponible afin d'éviter des pertes éventuelles suite au caractère périssable des fruits de la tomate, de plus, Presque tous les agriculteurs produisent en même temps, ce qui augmente le risque de rencontrer des problèmes de transport.

5- Préférences pédo-climatiques

La tomate est une plante de saison chaude. Le début de germination est de 12°C. L'optimum de la croissance des racines est de 15-18°C. En phase de grossissement des fruits, l'optimum de la température ambiante est de 25°C le jour et de 15°C la nuit. Les préférences en types de sol sont très larges. Le sol doit être bien aéré et drainant. L'asphyxie racinaire, même temporaire est préjudiciable à la culture. La teneur en matière organique du sol doit être assez élevée (2-3%) pour obtenir de bons rendements. Le pH optimal du sol est de 5,5-6,8 mais la culture tolère un pH du sol de 7 à 8,5.

6- Importance économique de la culture

Le fruit de tomate est le légume le plus consommé dans le monde, soit à l'état frais ou après transformation. De point de vue économique son importance pourrait être analysée selon trois échelles : mondiale, nationale et régionale.

- **A l'échelle mondiale**

La tomate est le produit horticole le plus cultivé grâce à sa production, d'ailleurs, plus de 124 millions de tonnes ont été produites en 2009 (FAO, 2012). La Chine vient au premier rang (45,36 millions de tonnes), suivie par les Etats-Unis d'Amérique (14,18) puis L'Inde (11,14). Au niveau de l'Afrique, l'Egypte est le premier producteur (10,27 millions de tonnes) suivie du Maroc (1,23 millions de tonnes).

De 1978 à 2009, la production mondiale a été en progression continue malgré tous les problèmes climatiques et/ou phytosanitaires, cette dernière est passée de 48 millions de tonnes en 1978, à 74 millions en 1992, 89 millions en 1998, et a atteint plus de 124 millions tonnes en 2009. Par estimation, environ 30 % des tomates produites à l'échelle mondiale sont destinées à la transformation, mais ce pourcentage varie d'un pays à l'autre.

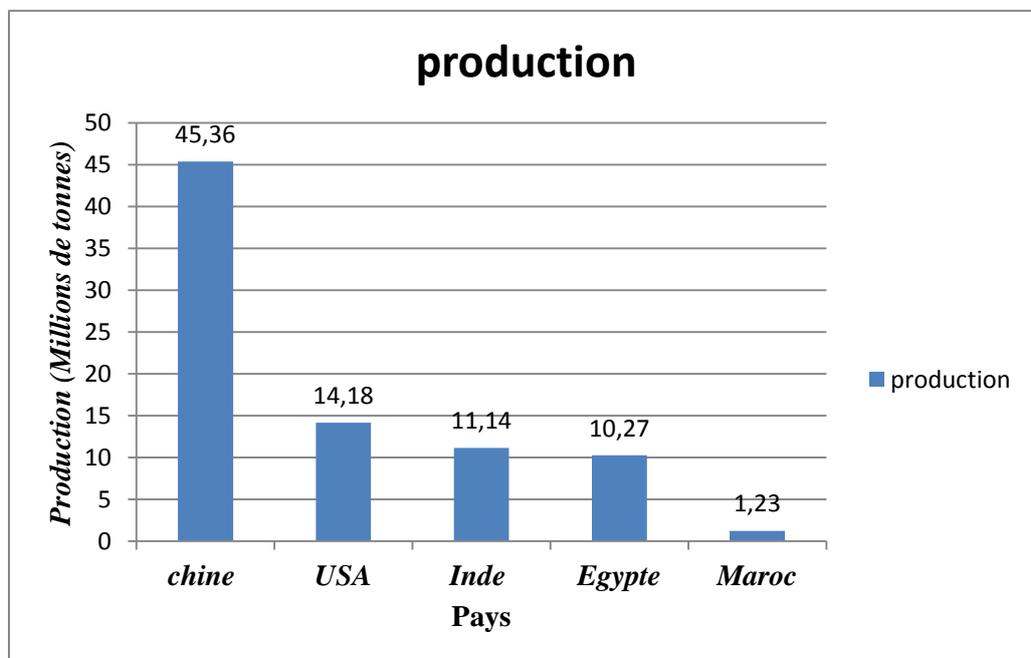


Figure 2 : Production des tomates dans différents pays en Millions de Tonnes

- **A l'échelle nationale**

La culture de la tomate joue un rôle crucial dans l'économie marocaine, elle vient en tête des cultures maraîchères en occupant une superficie globale de 18 642 ha qui confère au pays une production totale qui dépasse 1,2 millions de tonnes par an, et qui a représenté 14% de la production agricole globale au cours de la campagne 2005-2006. Cependant une baisse de production a été révélée au cours de la campagne 2009/2010, elle est due essentiellement aux attaques des cultures par le ravageur *Tuta absoluta* qui infecte entièrement les espèces végétales de la famille des Solanaceae principalement la tomate (*Lycopersicon esculentum*). De plus la quantité exportée de la tomate atteint 323135 Tonnes en 2009, avec une part du marché de 5% dont ses exportations sont destinées essentiellement aux pays de l'Union Européen (UE) et dont la France représente le principal marché d'accueil (86% du volume total des exportations).

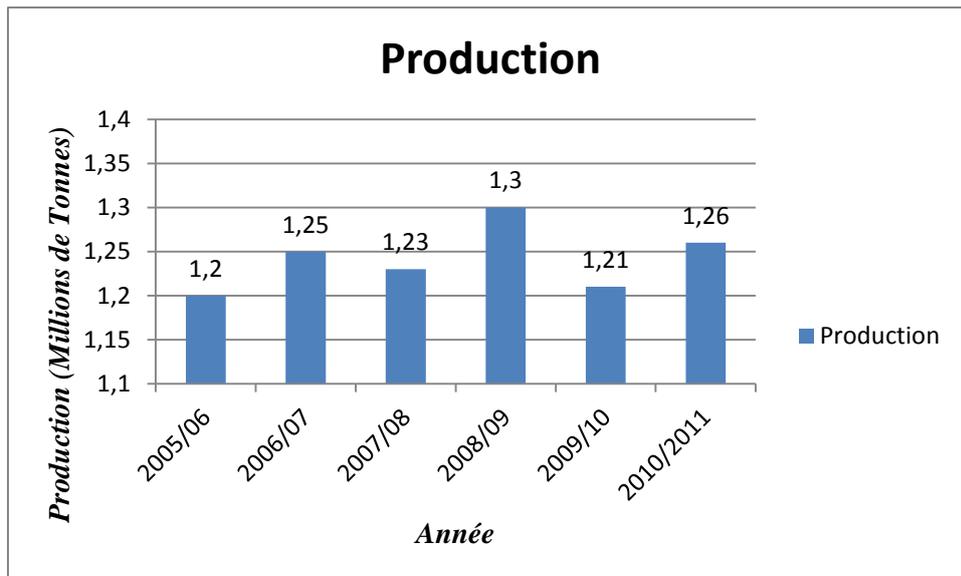


Figure3 : Evolution de la production des tomates entre 2009 et 2011.

- **A l'échelle régionale**

L'infrastructure florissante installée dans la région du Souss-Massa-Drâa, les conditions environnementales favorables, les conditions climatiques particulièrement clémentes en hiver et le sol sablonneux se réchauffant rapidement dans la région du Massa, constituent toutes les circonstances de base d'une production fruitière précoce et élevée. Cette infrastructure inclut également les installations d'abris serres, des dizaines de stations de conditionnement, une main d'œuvre qualifiée. Pour toutes ces raisons, la région Souss-Massa Draa est devenue la première région horticole du pays (El Fadl et Chtaina, 2010). En effet, cette région a produit environ 58% de la tomate primeur nationale durant la campagne agricole 2010/2011. La production évaluée en 2011/2012 s'élève à 800904 tonnes contre 639671 tonnes en 2009/2010 soit une hausse de presque 25%. Il faut noter aussi que la campagne agricole 2009/2010 s'est marquée par une chute de production aussi bien sous serre qu'en plain champs suite aux aléas climatiques qu'a connus la région durant cette campagne

I. Généralité sur la maladie du chancre bactérien

1- Agent pathogène du chancre bactérien de la tomate

Clavibacter michiganensis est l'agent causal du chancre bactérien. Cette bactérie particulièrement destructrice se développe sous certaines conditions climatiques, notamment des températures très chaudes et une forte humidité. Elle se propage par le biais des semences infectées, des opérations culturales (récolte, taille effeuillage...), des micro-blessures causées par l'eau. Il s'agit d'une bactérie phytopathogène, Gram positif, de la famille des Microbacteriaceae appartenant au groupe des actinomycètes (Park, 1993). Le genre *Clavibacter* contient une seule espèce, *Clavibacter michiganensis* (Cm), divisée en cinq sous-espèces selon l'hôte spécifique.

2- Symptômes du chancre bactérien

- **Symptômes externes:**

- **Sur Feuilles:**

Le premier symptôme du chancre bactérien sur une culture de tomate est l'apparition de plages nécrotiques au niveau des folioles, qui flétrissent unilatéralement, entraînant un jaunissement puis un brunissement et enfin un dessèchement de la moitié de la feuille.

Au fur et mesure de progression de la maladie, le flétrissement se généralise à toute la plante. Il est plus au moins brusque et toujours irréversible.

- **Sur Tiges:**

Sur tige, pétioles et pédoncules, peuvent apparaître de longues stries brunâtres ou des pustules de 1 à 2 mm de diamètre, donnant naissance en cas de forte chaleur et d'humidité relative élevée à des chancres ouverts contenant des exsudats bactériens.

- **Sur Fruits:**

Les plantes attaquées produisent des fruits de petit calibre qui chutent précocement et qui portent de petites taches blanchâtres dont le centre légèrement surélevé, brunit et s'entoure d'un halo jaune clair. Ces taches mesurant 3 à 6 mm de diamètre se présentent sous forme d'un œil d'oiseau d'où l'appellation anglo-saxonne 'bird's eye spot'.

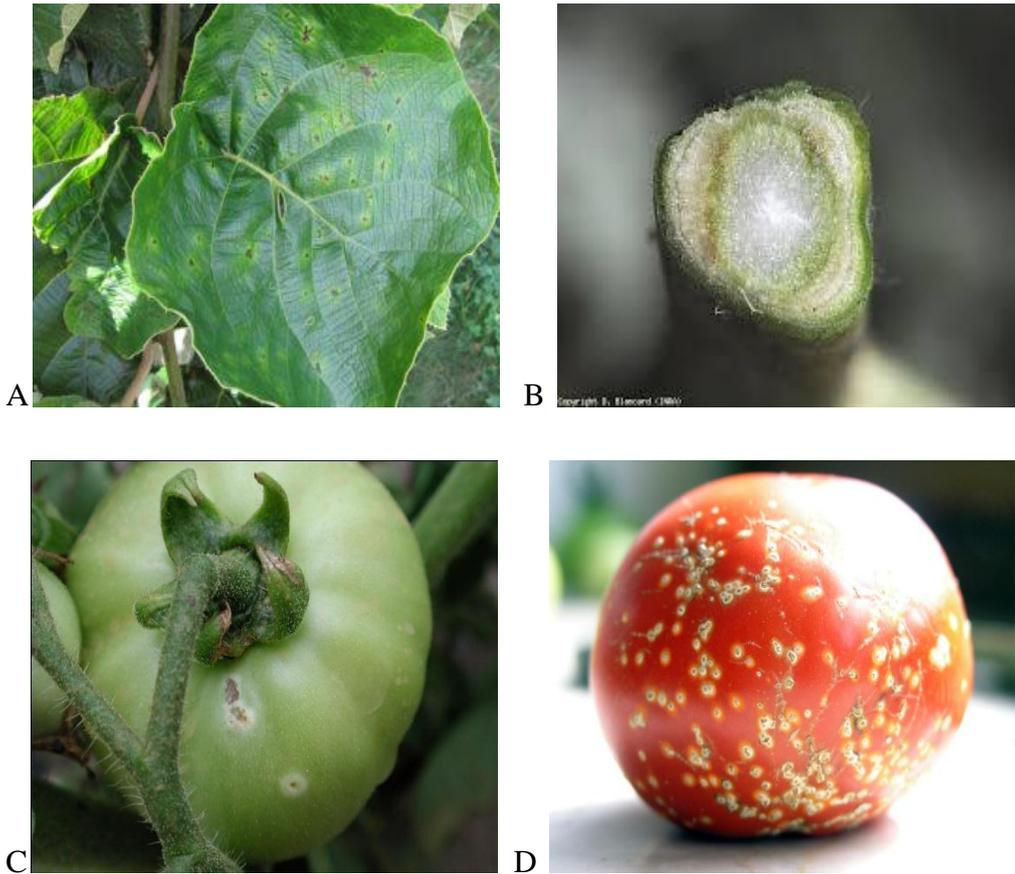


Figure 4 : symptôme du chancre bactérien, A/ sur feuille, B/ sur tige, C/ sur fruit immature, D/ sur fruit mature

- **Symptômes internes:**

Les symptômes internes du chancre bactérien sur la tomate se caractérisent par le brunissement du système vasculaire. Une coupe longitudinale de la tige, des pétioles et même des pédoncules d'une plante malade, laissent apparaître une coloration brunâtre des vaisseaux. C'est à la jonction des pétioles et de la tige que ces colorations sont très prononcées et par conséquent plus faciles à déceler.

De même, une coupe longitudinale d'un fruit de tomate peut montrer une coloration brune jaunâtre du système vasculaire avec production d'exsudat bactérien. Cette coloration, souvent plus marquée au niveau du point d'attache du fruit avec le pédoncule, démontrant l'origine de l'infection du fruit.

3- Cycle de développement

La bactérie se conserve dans le sol, les débris végétaux (tiges), sur divers matériels (goutteurs, pots...), sur les structures des abris, les outils, les semences ainsi que les tuteurs en bois et les composts. Elle pénètre par les blessures de taille et par les racines. Sa phase d'incubation dure quelques semaines après pénétration, la bactérie se propage dans le xylème et provoque un flétrissement unilatéral puis général de la plante avec apparition des chancres ouverts aussi bien sur les tiges que sur les pétioles des feuilles.

4-Conditions favorables au développement du chancre bactérien:

La maladie du chancre bactérien se développe plus rapidement dans des conditions favorables à la croissance de la tomate : température de l'air et du sol de 28°C, humidité relative et humidité du sol de 80%, pH du sol légèrement alcalin, forte densité de plantation, faible intensité lumineuse, brumisation ou irrigation par aspersion, fumure excessive (surtout en azote) et dans tout type de sol avec une préférence pour les sols légers et sablonneux.

La sévérité de la maladie varie considérablement d'une saison à l'autre, trois facteurs doivent être réunis en même temps :

- **Plante sensible** : la sensibilité de la plante varie avec l'âge et les pratiques culturales, c'est pourquoi, pour une même variété, sous un même climat, les dégâts provoquée par les infections de la bactérie seront variables selon :
- **Agent Pathogène virulent**
- **Conditions climatiques** : la température, l'intensité de la lumière et l'humidité (sol et de l'atmosphère) ont une grande influence à la fois sur l'hôte et le pathogène surtout sur la croissance. La bactérie exige une température comprise entre 5 et 30°C, avec une moyenne de 25 à 27°C.

II. Méthodes de lutte contre le chancre bactérien

La lutte contre la brûlure bactérienne peut s'effectuer grâce à l'intégration de diverses stratégies. Le programme de lutte doit comprendre la prévision de la maladie par réduction des niveaux d'inoculum au départ de la culture, limitation des facteurs favorisant la multiplication, la transmission de la bactérie et le suivi de la pratique culturale, et l'application ponctuelle de produits pour le contrôle des maladies.

Actuellement aucun produit n'est capable de contrôler la maladie après son apparition car tous les traitements utilisés sont préventifs, par conséquent presque toutes les stratégies de contrôle ont pour objectif plutôt de prévenir l'arrivée de l'agent pathogène dans les chantiers plutôt que de l'éliminer.

1- Mesures prophylactiques

- Protéger les plantes par un traitement de cuivre ou éliminer tous les organes ou parties d'organe infectés en les coupant à 50cm ou 100cm en dessous des symptômes visibles pour réduire l'inoculum secondaire.
- Désinfecter les mains ou les outils de travail avec l'eau de javel ou de préférence avec une solution alcoolisée.
- Éviter les blessures des plantes pour réduire l'inoculum primaire.
- Ne pas déplacer les plantes infectées ou menacées vers des zones saines.
- Réaliser un désherbage et éliminer toute sorte de parasite animal, végétal.
- Arracher et éliminer les hôtes sauvages.
- Réaliser des conférences ou des campagnes de sensibilisation sur la maladie ainsi que sur les différentes stratégies de lutte.

2- Lutte chimique

La lutte chimique utilise les pesticides qui visent à rendre la surface des plantes défavorable pour la propagation de l'agent pathogène et l'empêche ainsi à pénétrer dans la cellule hôte. Dans le cas de la bactérie comme les produits chimiques utilisés ont des composés cupriques comme l'oxyde de cuivre ou un mélange de cuivre et d'huile ainsi que les antibiotiques (streptomycine, oxytétracycline). D'autres composés chimiques sont utilisés tels que l'harpin, fosetyl-aluminium et le prohexadione, ces produits activent le mécanisme de défense naturel de la plante ou bien réduisent le taux d'infection. (Psallidas et Tsiantos, 2000).

3- Lutte biologique

3.1- Utilisation des antagonistes

Plusieurs études ont été réalisées pour développer les méthodes de lutte biologique contre le chancre bactérien, y compris les antagonistes qui agissent grâce à leur capacité de prévenir ou de diminuer le risque d'infection chez les plantes hôtes et également de limiter la propagation de la maladie. Les agents de contrôle utilisés actuellement appartiennent

principalement à deux espèces : *Pantoea agglomerans* (bactérie ,2066-7) (ewing, jife 1972), et *Aureobasidium pullulans* (levure, Ach2-1).

- *Pantoea agglomerans* : bactérie qui produit des composés inhibant la croissance de *Clavibacter Michiganensis*.
- *Aureobasidium pullulans* : appartient aux levures noires, cette espèce résiste à des environnements caractérisés par des conditions nutritives oligotrophiques, des températures élevées, et des stress osmotiques.
- *Bacillus sp* : bactérie utilisée dans la lutte contre le chancre bactérien, elle agit par compétition nutritive.

Les tests réalisés sur les agents antagonistes précités ont manifesté un haut pouvoir antagoniste, ce qui montre leur efficacité de limiter cette maladie, le but de ces tests est le contrôle de l'infection des vergers par la suppression de la bactérie durant la période de la floraison. Car cette dernière a besoin de se multiplier d'abord sur la surface de l'hôte avant de la pénétrer (Johnson et Stockwell, 1998).

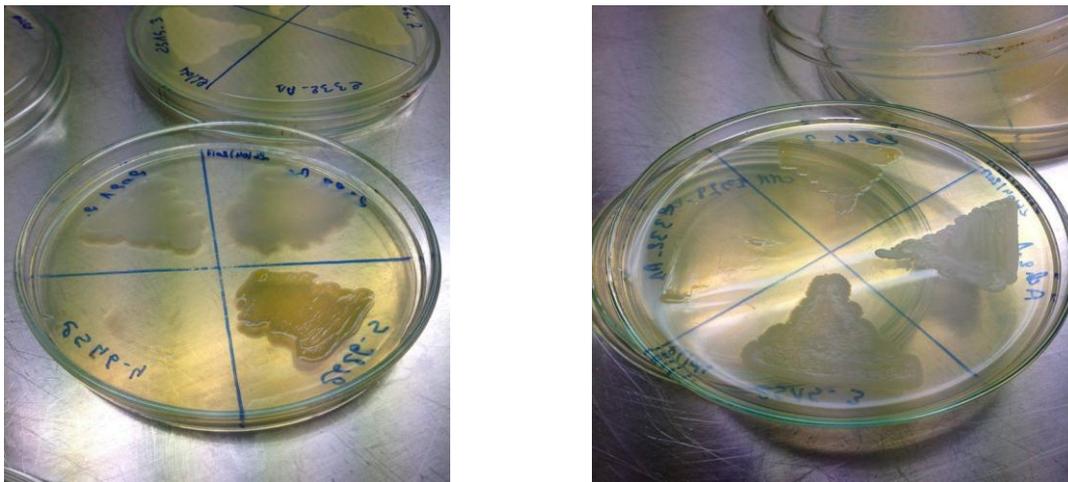


Figure 5 : Aspect des antagonistes sur milieu LPGA

3.2- Utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) ont occupé une place importante dans la vie quotidienne des populations qui les utilisaient autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. La connaissance des HE remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un même récipient rempli d'eau, des plantes odorantes des pierres brûlantes. La vapeur

dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'HE (Robbert, 2000).

Certaines plantes médicinales sont aromatiques mais celles qui sont aromatiques sont toutes médicinales. Elles renferment les HE dans leurs bois, fruits, écorce, graines, racines, et les parties aériennes en quantité variable (Kalemba et Kunucka, 2003).

3.3- Mécanismes d'action antibactérienne

Les mécanismes par lesquels les HE exercent leur activité antibactérienne sont mal connus, du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des HE. Il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. (Dorman et Deans, 2000).

3.4- Evaluation de l'activité antibactérienne des HE

Il existe une diversité des méthodes utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des HE. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des HE dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à des faibles concentrations.

- **Aromatogramme** : l'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disques ou méthode par diffusion au milieu gélosé. La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester puis les déposer à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées zones d'inhibition. 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. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'HE sur le germe testé. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en mm, soit en traduisant en croix le degré d'activité. Le calcul de diamètre est déterminé comme suite :

$$\%Inhibition = (D1/D2) \times 100$$

OU D1 : Diamètre de la zone d'inhibition

D2 = 90mm = Diamètre de la boîte de Pétri

- **Méthode de micro-atmosphère :**

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans des boîtes de Pétri sur le milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné des HE qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée après fixation de l'HE sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé l'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte de pétri, et cette dernière peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés.

- **Méthode de diffusion en puits :**

Cette Méthode a été proposée en 1946 par Cooper et Woodman, elle assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'HE de concentration connue. L'HE diffuse radicalement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne.

3.5- Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

La détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique d'une HE est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur le milieu de culture.

- S'il y a croissance bactérienne, l'HE a un effet bactériostatique sur la souche testée.
- Au contraire, s'il y a absence de croissance bactérienne l'HE présente un effet bactéricide vis-à-vis de la souche.

3.6- Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher une croissance bactérienne visible. La CMI n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur.

3.7- Concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est la petite concentration de l'agent inhibiteur ne laissant subsister que 0.01% au moins de survivant de l'inoculum initial après 18h d'incubation à 26°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide de l'HE.

PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel biologique

1- Origine de la bactérie

La souche pathogène utilisée dans ce travail est la souche Cmm 1616-3 de *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis*, celle-ci fait partie de la collection du laboratoire de Phytobactériologie et de la lutte biologique de l'INRA de Meknès, isolée en 2008 à partir de la tomate de Casa blanca.

La dite souche 1616-3 a été conservée à 4°C, elle a été régénérée en l'inoculant sur un milieu d'enrichissement, qui est le bouillon nutritif LPG (Extrait de levure-peptone-Glucose), puis en incubant à la température ambiante du laboratoire sous agitation pendant 72h. La suspension bactérienne régénérée et ensuite ensemencée sur milieu d'enrichissement LPGA (Extrait de levure-peptone-Glucose-Agar).

2- Test de confirmation de pathogénicité

Afin de confirmer la virulence de la souche 1616-3 de *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis*, un test sur tabac s'est avéré nécessaire. En ce sens, une suspension bactérienne a été préparée, dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile, à partir d'une culture de la souche en phase exponentielle de croissance 1616-3. Cette suspension est par la suite injectée dans le limbe d'une feuille de Tabac à l'aide d'une seringue stérile. Au bout de 24 heures, nous vérifions la surface de l'injection qui devrait montrer une lésion dans le cas d'un organisme phytopathogène.



Figure 6 : test sur tabac de la souche 1616-3

II. Origine des antagonistes

Les antagonistes choisis dans ce travail sont : la levure Ach2-1 (*Aureobasidium pullulans*), la bactérie 2066-7 (*Pantoea agglomerans*) grâce à leur réputation en tant qu'agents de lutte biologique contre la maladie du chancre bactérien.

1- Origine de la souche Ach2-1 (*Aureobasidium pullulans*)

La souche Ach2-1, appartient à l'espèce *Aureobasidium pullulans* et a été isolée à partir de la surface des pommes « var. Golden Delicious » (Achbani,2005). Cette dernière a été conservée par lyophilisation et transférée dans un tube contenant 9 ml du milieu LPG, puis laissée en agitation à 120 tours/mn pendant 2 heures. Deux volumes de 0.05 ml et 0.1 ml de cette suspension ont été étalés, chacun sur une boîte de Pétri contenant le milieu LPGA et PDA, le premier volume a été étalé par stries en trois secteurs et le deuxième a été étalé sur la boîte toute entière. Après 48 heures d'incubation à 26°C, il y'a eu formation de colonies individuelles.

Une colonie individuelle de chaque milieu a été prélevée puis repiquée dans une boîte de Pétri contenant le milieu LPGA. Celle-ci est fermée par la suite puis incubée à 26°C pour une durée de 48 heures.

2- Origine de la souche 2066-7 (*Pantoea agglomerans*)

La deuxième souche antagoniste est *Pantoea agglomerans*, elle a été isolée à partir des échantillons d'olivier d'origine de Méknes, en 2012. *P. agglomerans* est commercialisée au Canada sous le nom de « BlightBan C9-1 », La bactérie agit par antibiose en produisant deux antibiotiques à savoir pantocines A et B qui inhibe la croissance de *Clavibacter michiganensis*.

2- Origine de la souche 2515-3

La troisième souche antagoniste a été isolée partir des échantillons de pommier variété golden de Imouzzar Kandar en 2014.

3- Origine de la souche 2021-2

Cette souche antagoniste a été isolée à partir des échantillons de pommier variété délicieux en 2012 de Fès.

III. Extraction des huiles essentielles

1- Origine des huiles essentielles

Les huiles essentielles issues des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) utilisées dans cette étude sont :

- **Origan** : *Origanum compactum* est une plante aromatique à la tige droite et légèrement velue, parfois rougeâtre et aux feuilles poilues, et ovales. Elle pousse en liberté dans les régions montagneuses de la Méditerranée.
- **Eucalyptus** : est un arbre de la famille de Myrtacées, les jeunes feuilles sont rondes et opposées, les fleurs n'ont pas de pétales, il peut atteindre des records de 130 m dans son aire d'origine. C'est une plante aromatique.
- **Thym** : est un genre de plantes couramment appelées thym ou serpolet de la famille des Lamiacées. Ce genre comporte plus de 300 espèces. Ce sont des plantes rampantes ou en coussinet portant de petites fleurs rose pâle ou blanches. Ces plantes sont riches en huiles essentielles et à ce titre font partie des plantes aromatiques.
- **Romarin** : arbrisseau vivace originaire du bassin méditerranéen, le romarin est une plante rustique connue pour ses feuilles aromatiques et sa douce floraison. Les fleurs, du bleu au blanc pur en passant par le rose, apparaissent dès le début

de l'année et font le bonheur des pollinisateurs. Un sol bien drainé et une exposition en plein soleil sont idéaux pour son développement.

2- Extraction des huiles essentielle

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétale. En général le choix de la méthode d'extraction dépend de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles...), de la nature des composés (flavonoïdes, les tannins), la quantité d'HE contenue dans le végétal et la fragilité des constituants des HE dans des conditions de température élevée.

Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet la libération des molécules odorantes contenues des les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Puisque la température d'ébullition de mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullitions des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique (eau + HE) distille à une température égale à 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Il est ensuite refroidi et condensé dans le vase florentin. Une fois condensées, eau et les molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'HE.

La durée d'une hydro-distillation peut considérablement varier, pouvant atteindre 3 heures pour récupérer les molécules lourdes.

IV- Evaluation de l'activité antibactérienne des antagonistes et des huiles essentielles in vitro

1- Tests de confrontation in vitro

1.1- Test d'aromatogramme pour les antagonistes

Pour évaluer l'effet des antagonistes sur *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis*, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur des disques stérile. Ainsi 100µl de la suspension du pathogène déjà préparée avec une concentration connue estensemencée par inondation sur le milieu LPGA préalablement versée dans des boites de Pétri. La surface des boites est séchée sous la hotte à flux laminaire avant la remise des

couvercles en place. Après séchage, un volume de 2 µl de la suspension des antagonistes a été mis sur les disques du papier buvard stériles de 5 mm de diamètre placés au centre de la boîte de Pétri. Aussi, ce test a inclut deux témoins. Le premier dit négatif avec un disque sur lequel sont versés 2 µl d'EDS, le deuxième dit positif avec un disque qui contient un antibiotique qui va nous servir de comparaison et qui est dans notre cas la streptomycine. Pour chaque antagoniste deux répétition sont réalisées. Toutes les boites sont incubées à 26°C durant 48 heures. La lecture a été faite par la mesure de la zone d'inhibition autour du disque en cm et le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

- $\%Inhibition = (D1/D2) \times 100$ *OU D1 : Diamètre de la zone d'inhibition*
D2 = 90mm = Diamètre de la boîte de Pétri

1.2- Test d'aromatogramme pour les huiles essentielles

La technique de l'aromatogramme est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Pour mettre en évidence l'activité des HE nous avons utilisé la méthode de diffusion sur les disques stériles décrite ci-dessus.

1.3- Concentrations minimales inhibitrices (CMI)et bactéricides (CMB)

La détermination des CMI et des CMB a été réalisée selon la technique de dilution en milieu LPG liquide couplée avec l'étalement sur milieu solide, elle est décrite par Chabert et Daguet en 1985. Les milieux liquides et solides sont respectivement LPG pour la détermination du CMI et LPGA pour la CMB.

1.3.1- Détermination de la CMI

La détermination des CMI est réalisée pour les huiles essentielles ayant une meilleure activité antibactérienne contre l'agent pathogène, tout en se basant sur la technique de dilution en milieu liquide, 400 µL de l'huile essentielle à tester sont placés dans un tube stérile contenant 4,6 mL de milieu LPG, supplémenté en Tween 80. Une dilution a été effectuée de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 80 mg.mL⁻¹ et 0,3 mg.mL⁻¹. Après, 13 µL d'un inoculum bactérien sont déposés dans chacun des tubes de la gamme, qui sont ensuite placés à 37°C, sous agitation, pendant 24 heures. Un témoin de la croissance

bactérienne, pour lequel 13 μL de l'inoculum ont été déposés dans du milieu LPG-Tween 80, est également réalisé.

La CMI de l'huile essentielle testée est déduite à partir du premier tube de la gamme dépourvu de croissance bactérienne. Chaque expérience est répétée trois fois au cours de trois expériences successives

1.3.2-**Détermination de la CMB**

La CMB est déterminée par étalement de 50 μL du contenu de chaque tube, dont la concentration est supérieure ou égale à la CMI, sur milieu LPGA. Parmi ces concentrations, celle qui ne laisse pas survivre plus 1% des bactéries de la suspension de départ, après 24h d'incubation, est appelée CMB.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

1- Test de pathogénicité sur tabac

Les feuilles de tabac inoculées avec la bactérie ont manifesté une réaction de sensibilité qui s'est traduite par la formation de lésions visibles après 24h d'inoculation, se qui confirme la virulence de la bactérie.



Figure 7 : test de tabac (A) sur une feuille de tabac, (B) la même plante inoculée avec de l'EDS

2- Evaluation de l'activité antibactérienne des antagonistes

2.1- Test d'aromatogramme

Les zones d'inhibition, représentées par le diamètre de la zone circulaire indiquant l'absence de croissance du pathogène sont donné par la figure 9.

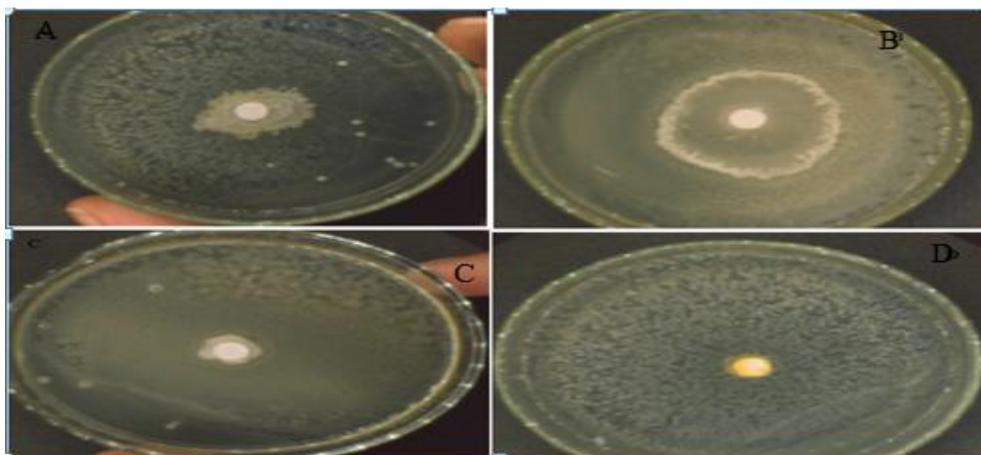


Figure 9: Test d'aromatogramme des antagonistes contre *Clavibacter michiganensis*. A/ zone d'inhibition de la souche 2328-B5, B/ zone d'inhibition de la souche 2515-3, C/ zone d'inhibition de la souche Ach2-1, D/ zone d'inhibition de la souche 2066-7

L'analyse de ces résultats montre que les antagonistes testés exercent une action inhibitrice variable sur la bactérie *Clavibacter michiganensis*. Ainsi, la souche 2515-3 vient en tête avec une large zone d'inhibition, suivie par la souche 2328-B5 qui représente une zone plus petite que celle du premier antagoniste, par contre les deux dernières souches Ach21 et 2066-7 présentent des petites zones d'inhibitions.

Les pourcentages d'inhibitions des antagonistes vis-à-vis la bactérie sont représentée par la figure 8 :

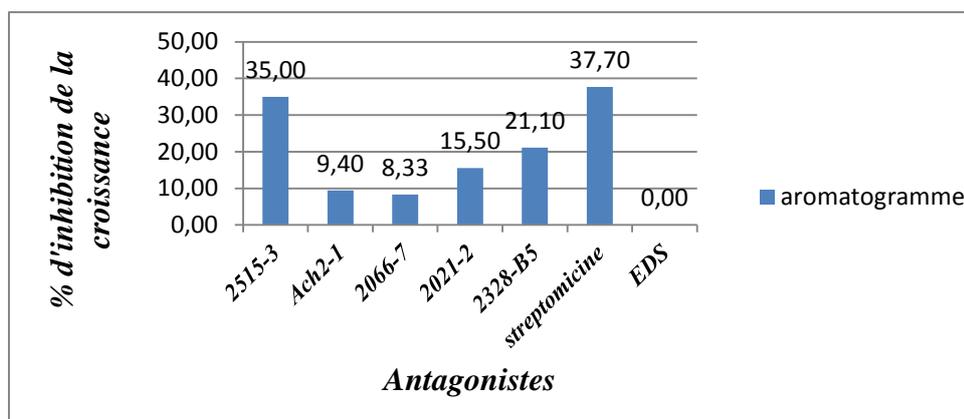


Figure8 : Pourcentage d'inhibition des antagonistes vis-à-vis de *Clavibacter michiganensis*

Les résultats obtenus montrent une activité antagoniste variable. Ainsi les pourcentages d'inhibition obtenus pour les 5 antagonistes varient entre 8.33% et 35%. Comparativement à l'action inhibitrice de l'antibiotique, ces résultats montrent que la souche 2515-3 a un pourcentage d'inhibition remarquable et proche à celui obtenu par la streptomycine à savoir 35% contre 37,7% respectivement. Les souches Ach2-1 et 2066-7 sont les antagonistes qui manifestent les plus faibles actions inhibitrices du pathogène. Leurs pourcentages d'inhibition respectifs sont de 8.33% et 9.40%.

L'interprétation de la sensibilité de la souche *Clavibacter michiganensis* vis-à-vis des antagonistes a été faite sur la base du seuil limite de sélection des antagonistes, et ce selon les travaux de Xu et Gross (1986) et ceux d'Amkraz et *al.*, (2009). La valeur du seuil a été déterminée en un pourcentage d'inhibition supérieur ou égal à 14%. Selon ce critère, 3 souches antagonistes parmi les 5 testées seraient satisfaisantes en lutte biologique voir très satisfaisantes contre le chancre bactérien de la tomate. Il s'agit des souches 2021-2, 2328-B5 et 2515-3 classées par ordre croissant des valeurs d'inhibition du pathogène.

D'autres études menées sur les antagonistes bactériens du C.m.m., ont montré que *Pseudomonas spp. fluorescents* est parmi les antagonistes qui réduisent significativement l'incidence du chancre de la tomate et sont colonisatrices des racines de la plante hôte. L'efficacité de ces souches retenues est ensuite évaluée en pots sous serre ; l'incidence du chancre bactérien est ralentie après la bactérisation des semences et des racines des plants de tomate. De même, au cours des dernières années, des chercheurs de l'Université McGill, en collaboration avec l'industrie québécoise de la tomate de serre, ont isolé et caractérisé plusieurs souches de rhizobactéries avec une forte activité anti-Cmm (Smith, 2012). Dans notre étude, l'effet antagoniste des souches de levure et la bactérie utilisées pourrait être expliqué soit par l'occupation de l'espace, moyen très connu chez la levure antagoniste ou par l'élimination physique ou par la production de substances inhibitrices, qui ont empêché le pathogène d'utiliser les nutriments nécessaires à sa survie.

Par ailleurs, les deux souches Ach 2-1 et 2066-7 qui ont donné les plus faibles inhibitions sur le C.m.m., ont été utilisées dans la lutte biologique contre la pourriture molle de la pomme de terre causée par *Pectobacterium carotovorum pv. carotovorum* et ont révélées des résultats satisfaisants (URPP (CRRRA, Meknès)).

3- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

3.1- Test d'aromatogramme

Les résultats illustrant les diamètres d'inhibition obtenus suite à la confrontation HE – pathogène, sont présentés dans la figure 11.

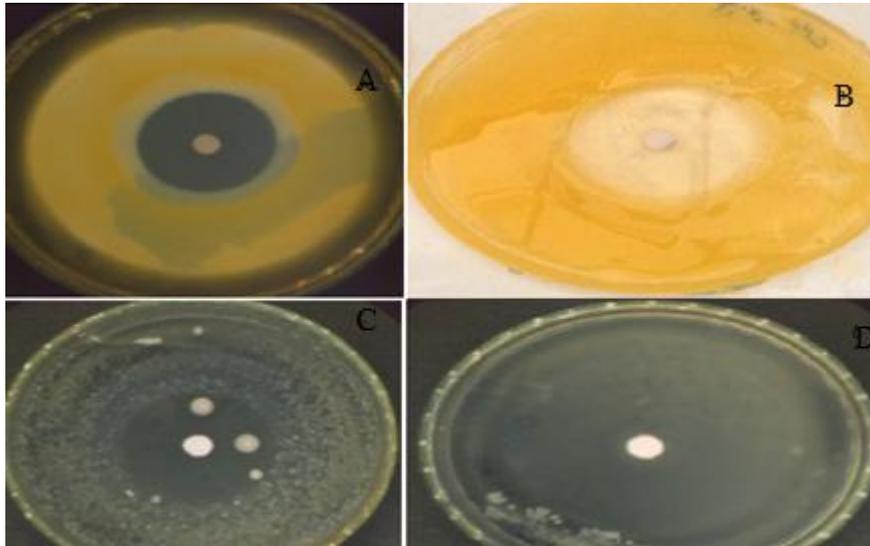


Figure11 : Test d'aromatogramme des huiles essentielles contre *Clavibacter michiganensis*. A/ zone d'inhibition du thym, B/ zone d'inhibition de l'origan, C/ zone d'inhibition du témoin positif (streptomycine), D/ témoin négatif (EDS).

Ainsi nous constatons que *Clavibacter michiganensis* manifeste une sensibilité variable aux HE testés. Les HE du thym et de l'origan ont un effet inhibiteur très important sur ce pathogène avoisinant l'effet inhibiteur de l'antibiotique de choix.

L'action inhibitrice des HE testées, exprimés en pourcentage d'inhibition est illustrée par la figure suivante :

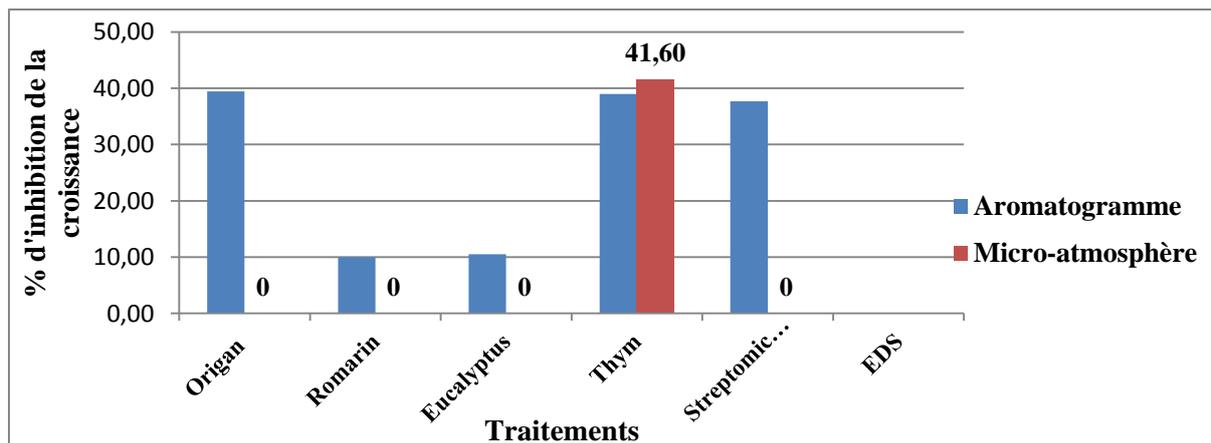


Figure 10 : Pourcentage d'inhibition des huiles essentielles contre *Clavibacter michiganensis*

D'après les résultats obtenus, l'origan et le thym ont montré un fort effet inhibiteur sur la croissance bactérienne avec un pourcentage d'inhibition respectif de 39.44% et 39%, dépassant ainsi le témoin positif représenté par la streptomycine qui a donné un pourcentage d'inhibition de 37.7%. Les HE du romarin et de l'Eucalyptus, quant à leur action inhibitrice, elle s'est montrée environ 4 fois moins importante que celles de l'origan et du thym. Leur pourcentage d'inhibition ne dépasse pas 10.5%. Il est à noter également, que parmi les HE testées, seule celle du thym a montré un effet inhibiteur très puissant en micro atmosphère avec un pourcentage d'inhibition plus important que celui obtenu par aromatoigramme (41,6% contre 39%).

Ces essais réalisés *in vitro*, nous permettent ainsi de sélectionner les plantes à pouvoir inhibiteur élevé sur *Clavibacter michiganensis* parmi celles testées, il s'agit du thym et d'origan. Plusieurs travaux réalisés sur les HE d'origan ont rapporté des résultats similaires. Ainsi, le travail mené par Ichou (2010) a rapporté un pourcentage d'inhibition dépassant 55%. De même, les résultats rapportés par Khatour en 2011 ont montré que les HE d'origan ont un grand pouvoir antibactérien *in vitro* avec des pourcentages d'inhibitions qui varie entre 44% et 45.5%. Ce pourcentage a été évalué à 66% par Dossoumou en 2013.

Ces résultats ont une grande importance dans le domaine de lutte contre *Clavibacter michiganensis*. En effet, ils peuvent être utilisés en remplacement à la streptomycine utilisée comme témoin positif dans cette étude. C'est un antibiotique qui est recommandé dans plusieurs pays, à titre d'exemple : en Amérique du nord (Manulis et al, 1998), en Nouvelle-Zélande, ainsi qu'en Hollande, en Allemagne et en suisse selon des règles restrictives précises

(McManus et al, 2002). En effet, les antibiotiques doivent être utilisés avec précaution en raison de leur éventuelle phytotoxicité (Belaskri, 2006). D'autre part, leur utilisation a été interdite dans de nombreux pays du fait de l'apparition des résistances plasmidiques chez beaucoup de pathogènes (Vanneste, 1995).

Toutes ces raisons fond que les HE dont celle de l'origan (*Origanum compactum*), ou du thym, peuvent être utilisées comme alternative à la streptomycine dans la lutte biologique. Leurs actions antibactériennes ont été mise en évidence également sur d'autre espèces comme *Esherichia coli* et *Staphylococcus aureus* en tant que bactéries et *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* et *Penicillium digitatum* en tant que champignons responsables des moisissures des fruits et des légumes (Bouhid et al., 2005). Ces auteurs ont également mis en évidence que l'HE d'origan, a témoigné d'une forte action antibactérienne même vis-à-vis des souches multi-résistantes aux antibiotiques telle que *Pseudomonas aeruginosa* responsable de maladie nosocomiale dans les hôpitaux. Par ailleurs, d'autre auteurs on soutenu ce même constat pour l'origan (Dorman et al., 2000 et Satrani et al., 2008) dont l'HE testée a un pouvoir bactéricide, *in vitro*, sur *Clavibacter michiganensis*. L'activité antibactérienne de ces HE est due principalement à leurs profil chimique et la présence de composés dotés d'activité antibactérienne (Ettayebi et al., 1999 ; Ultee et al., 2000).

4- Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide (CMI et CMB)

La concentration minimale (CMI), correspond à la plus faible concentration d'HE capable d'inhiber la croissance bactérienne. La CMI correspond à la plus faible concentration, dépourvue de croissance bactérienne, de la gamme testée. La lecture est effectuée après l'ajout de la résazurine. Celle-ci est responsable d'une différence de couleur permettant de confirmer (couleur rosâtre) ou infirmer (couleur bleue) la présence de la bactérie vivante.(Figure 12)

Les résultats obtenus ont montré que parmi les quatre huiles essentielles testées, l'origan représente un effet inhibiteur à la concentration 1.25 mg/ml, la même valeur a été obtenu pour le l'eucalyptus et le Thym, alors que l'effet inhibiteur chez le romarin à été observé a une concentration 5 mg/ml.



Figure 12: Résultats de la CMI des HE de l'origan, eucalyptus, thym et romarin

La CMB de l'huile essentielle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie. Après 48h, nous constatons que les huiles essentielles du romarin et de l'eucalyptus ont montré une CMB de 80mg/ml, suivit par l'origan avec une concentration de 40 mg/ml, et à la fin le Thym présente une concentration bactéricide de 20 mg/ml.

Il est à signaler que les valeurs de CMI et la CMB sont très variables. Ainsi, Bouamama et al. (2006) ont rapporté que la CMI des extraits des feuilles de *Citrus monspeliensis* et *C. villosus* est comprise entre 0,78 et 50 mg ml⁻¹. Sarah et al. (2012) ont montré que la CMI de l'extrait méthanolique des feuilles de *Psidium guajava* varie entre 0,391 et 1,563 mg ml⁻¹ selon les agents phytopathogènes. Cette distribution différentielle des valeurs CMI est liée à la sensibilité de la souche bactérienne testée, à l'efficacité de la PAM utilisée mais elle est aussi très influencée par le protocole et le solvant d'extraction ainsi que le type d'organe utilisé (Montazeri et al. 2011 ; Modarresi-Chahardehi et al 2012).

Conclusion et Perspectives

Le travail réalisé au sein de l'institut de l'INRA de Meknès visait à lutter biologiquement *in vitro* contre la maladie du chancre bactérien par l'utilisation de cinq antagonistes (levure, bactérie) et quatre huiles essentielles issues de quatre plantes aromatiques.

Dans le même objectif de lutte biologique, les plantes médicinales restent une source fiable en substances biologiques antimicrobiennes. Les extraits de plantes pourraient donc constituer une alternative moins coûteuse et respectant la santé de l'Homme pour éliminer les ennemis des cultures. Dans le cadre de notre étude, des résultats encourageants sont notés. Les plus prometteuses déterminées sont celles extraites de l'origan et du thym pour lesquelles le pouvoir antibactérien s'est montré aussi important que celui de l'antibiotique de choix à savoir la streptomycine et donc pouvant être utilisées en remplacement à celle-ci. Ceci pourrait contourner les problèmes associés à son utilisation principalement celui de la résistance développée éventuellement. Concernant les résultats des antagonistes la souche 2515-3 a présenté des résultats encourageants et remarquables par apport à la streptomycine. De même, la détermination des CMI et des CMB a révélé un effet bactéricide intéressant renforçant l'adoption de ce type de substance comme moyen de lutte alternative contre le chancre de la tomate.

Les traitements testés dans cette étude peuvent être considérés comme une alternative pour le contrôle du chancre bactérien de la tomate vu les résultats satisfaisants obtenus *in vitro*, ainsi, la lutte biologique *via* l'emploi des antagonistes et des huiles essentielles pourrait être une méthode de protection prometteuse contre cette maladie tout en respectant l'environnement.

Références bibliographiques

- Achbani E.H., Mounir R., Jaafri S., Douira A., Benbouazza A., Jijakli M.H., 2005.** Selection of antagonistic of postharvest apple parasites: *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. *Commun Agric app Biol Sci.* 2005; 70(3),143-9.
- Amkraz N, Boudyach E H, Boubaker H , Bouizgarne B B, Ait Ben Aoumar A (2009).** Screening for fluorescent pseudomonades, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 26:1059–1065
- Belskri A., 2006.** Incidence de la maladie du crown galle de l'eucalyptus dans les pépinières forestières de l'ouest Algerien. Mémoire pour l'obtention de Diplôme de Magister en forésterie Université Abou Belkaid-Tlemecen. Biocontrol treatments to prevent blue mould on apples during cold storage. *International biot.* 2006 23, 223-229.
- Boudyach E H, Fatmi M, Boubaker H, Ait Ben Aoumar A, Akhayat O (2004)** Effectiveness of fluorescent pseudomonads strains HF 22 and HF 142 to control bacterial canker of tomato. *J. Food. Agr. Environ.* 2 (3&4):115-120.
- Boudyach E H, Fatmi M, Akhayat O, Benizir E et Ait Ben Aoumar A (2001)** Selection of Antagonistic Bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and Evaluation of Their Efficiency Against Bacterial Canker of Tomato, *Biocontrol Science and Technology*, 11:1, 141-149
- Bouhid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Senhaji N., Skeli et Abrini J., 2005.** L'effet antibactérien in vitro de l'huile essentielle d'*origanum compactum* vis-à-vis de Souches d'origine clinique.
- Dorman H. et Deans G, 2000.** Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *Jornal of applied Microbiology.* 200 88(2), 308-316.
- El Fadl A et Chtaina N (2010).** Etude de base sur la culture de la tomate au Maroc ; Programme Régional de lutte intégrée contre les organismes nuisibles
- Fatmi M, Eddaoudi M, Achbani E, Colin J (1984)** Importance du *Corynebacterium michiganensis* pv *.michiganensis* dans la culture de la tomate au Maroc. *Eléments d'épidémiologie. Hommes, terre et eau.* 57 : 9-14.

- Gartemann K-H, Kirchner O, Engemann J, Gräfen I, Eichenlaub R, Burger A (2003).** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology* 106,179–191.
- Hosseini, F., Adlgostar, A., & Sharifnia, F., 2013.** Antibacterial Activity of *Pistacia atlantica* extracts on *Streptococcus mutans* biofilm. *International Research Journal of Biological Sciences*. 2 (2): 1-7.
- Kalembe D., et Kunucka A., 2003** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 2003 10 813-829.
- Khatour I., 2012.** Valorisation et caractérisation des effets bactericide, fungicide et insecticide des extraits des quelques plantes aromatiques et médicinales naturelles et cultivées. Mémoire du projet de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Technique Option : Bio-Ingénierie, faculté sciences et techniques, Settat, 74.
- Lee, J., Dossett, M., Finn, C., E., 2012.** Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*, 130 (4):785-796.
- Manulis S., Kleitman F., Dror O., David L. et Zutra D., 1998** Characterization of the *Erwinia amylovora* population in Israel. *Phytoparasitica*. 1998 26 (1), 39-46.
- McManus P., Stockwell V., Sundin G. et Jones A., 2002.** Antibiotic use in plant agriculture. *Phytopathol.* 2002 40, 443-465.
- Modarresi-Chahardehi, A., Ibrahim, D., Fariza-Sulaiman, S., Mousavi, L., 2012.** Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *Revista de Biología Tropical*, 60(4), 1567-1576.
- Montazeri, N., Baher, E., Mirzajani, F., Barami, Z., & Yousefian, S. 2011.** Phytochemical contents and biological activities of *Rosa canina* fruit from Iran. *J. Med. Plant. Res.* 5(18): 4584-4589.
- Park, Y.-H., Suzuki, K.-I., Yim, D.-G., Lee, K.-C., Kim, E., Yoon, J.-S., Kim, S.-J., Kho, Y.-H., Goodfellow, M., & Komogata, K. (1993).** Suprageneric classification of peptidoglycan group B actinomycetes by nucleotide sequencing of 5S ribosomal RNA. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64, 307- 313.
- Psallidas PG , Tsiantos J., 2000** *CAB International*. 200 199,234.

Robert G.,2000. Les sens du Parfum.Osman Eryolles Multimedia. 2000, 224

Sarah, S. N., Sijam K., Omar D., 2012. Antibacterial activity of psidium guajava L. methanol leaf extract against plant pathogenic bacteria in the genera Pectobacterium and Xanthomonas. Int. J. Appl. Biol. Pharmac. Technol. 3: 246-252.