



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



## **Projet de Fin d'Etudes**

**Licence Sciences & Techniques**

**Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources**

**Extraction des huiles essentielles à partir des PAM et  
leur activité antibactérienne sur la galle du collet de la  
vigne causée par *Allorhizobium vitis. L***

**Présenté par:** Ghita SEHISSIH

**Encadré par:**

P<sup>r</sup> Al FIGUIGUI Jamila : FST FES

D<sup>r</sup> El Hassan ACHBANI : INRA MEKNES

**Soutenu le :**06/06/2018

Devant le jury composé de :

- D<sup>r</sup> El Hassan ACHBANI
- P<sup>r</sup> Al FIGUIGUI Jamila
- P<sup>r</sup> MIKOU Karima

**Année universitaire: 2017/2018**

# DEDICACE

*A la mémoire de ma grand-mère*

*A mon père*

*A ma chère mère*

*A ma sœur*

*A mon frère*

*Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte.*

*Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices et vos encouragements. Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation.*

*Que dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur !*

# REMERCIEMENTS

**Tout d'abord, je remercie DIEU tout puissant, maitre des cieux et de la terre, qui m'a permis de mener à bien ce travail.**

J'adresse mes remerciements à mon encadrante, Mme Jamila Al FIQUIQUI, Professeur au sein de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, qui m'a beaucoup aidée et qui m'a guidée avec beaucoup de patience tout au long de ce stage.

Je tiens à remercier vivement mon encadrant, Dr El. Hassan ACHBANI, Chercheur et Directeur de l'unité de Recherche et de Protection des Plantes de l'INRA de Meknès, pour son accueil, la richesse, la qualité de son encadrement et le partage de son expertise au quotidien, malgré ses charges professionnelles.

Chaleureusement, je tiens à remercier Mr Abdelatif BENBOUAZZA, Technicien au sein de l'unité de Recherche et de Protection des Plantes de l'INRA de Meknès, pour ses conseils, son aide durant toute la période du travail et pour ses bonnes explications qui m'ont éclairée le chemin de la recherche.

Mes vifs remerciements sont également adressés aux membres de jury qui m'ont honoré d'avoir accepté de juger ce travail.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

# SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	1
Liste des figures.....	2
Introduction générale.....	3
Présentation de l'INRA.....	4
Revue bibliographique	
I. Plantes aromatiques et médicinales.....	6
1. Définition.....	6
2. Importances des PAM au Maroc.....	6
3. Exportation des plantes aromatiques et médicinales.....	6
4. Méthodes d'extraction et de distillation des PAM.....	7
4.1. Entraînement à la vapeur d'eau (Alambic).....	7
4.2. Extraction par solvant.....	7
4.3. Hydrodistillation.....	8
II. Huiles essentielles.....	9
1. Définition.....	9
2. Propriétés et utilisation des huiles essentielles.....	9
3. Localisation des huiles essentielles dans les tissus de la plante.....	9
4. Rendement en huiles essentielles.....	10
III. Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	10
1. Généralités.....	10
2. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne.....	11
2.1.Méthode de Vincent " Aromatogramme" .....	11
2.2.Détermination des CMI et CMB .....	12
IV. Activité antibactérienne des HE sur <i>Allorhizobium Vitis</i> :.....	12
1. Généralités sur la vigne.....	12
2. Maladie de la galle du collet de la vigne.....	13
3. Méthodes de lutte.....	13
3.1.Lutte prophylactique.....	13
3.2.Lutte chimique .....	14
3.3.Lutte biologique.....	14
Matériel et Méthodes	
I. Matériels.....	15

1. Matériel végétal.....	15
1.1. Collecte des PAM.....	15
1.2. Généralités sur les PAM utilisées.....	15
1.3. Caractérisation des plantes étudiées.....	16
2. Souche bactérienne.....	17
II. Méthodes.....	17
1. Extraction des huiles essentielles.....	17
2. Calcul du rendement des huiles essentielles.....	18
3. Test d'aromatogramme par les huiles essentielles.....	18
4. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).....	18
4.1. Détermination de la CMI.....	19
4.2. Détermination de la CMB.....	19
Résultats et discussion	
1. Extraction des HE.....	20
2. Rendement en HE.....	21
3. Evaluation de l'activité bactéricide des huiles essentielles.....	22
3.1. Technique d'aromatogramme.....	22
3.2. Détermination de la CMI et la CMB.....	24
Conclusion générale.....	25
Références bibliographiques .....	26

## Liste des abréviations

<i>A.vitis</i>	<i>Allorhizobium vitis</i>
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
EDS	Eau distillée stérile
HE	Huile Essentielle
PAM	Plante Aromatique et Médicinale
CFU	Colony Forming Unit
LPGA	Extrait de levure – Peptone – Glucose – AgarAgar
LPG	Extrait de levure – Peptone – Glucose

## Liste des figures

- FIGURE 1** : Montage d'extraction par entrainement à la vapeur d'eau.
- FIGURE 2** : Montage d'extraction par solvant.
- FIGURE 3** : Montage de l'hydrodistillation.
- FIGURE 4** : Illustration de la méthode d'aromatogramme sur boîte de Pétri.
- FIGURE 5** : *Thymus zygis*.
- FIGURE 6** : *Rosmarinus officinalis*.
- FIGURE 7** : Feuilles de *Corymbia citriodora*.
- FIGURE 8** : *Origanum elongatum*
- FIGURE 9** : Feuilles d'*Eucalyptus dives*.
- FIGURE 10** : *Cistus ladanifer*.
- FIGURE 11** : Feuille de *Laurus nobilis*.
- FIGURE 12** : *Lavandula angustifolia*.
- FIGURE 13** : *Anethum graveolens*.
- FIGURE 14** : *Allorhizobium vitis* sur milieu d'enrichissement LPGA.
- FIGURE 15** : Montage de l'hydrodistillation (Type Clevenger).
- FIGURE 16** : Phase huileuse et organique après l'extraction d'HE.
- FIGURE 17** : Observation du caractère organoleptique d'origan, d'Aneth, du romarin et du ciste.
- FIGURE 18** : Observation du caractère organoleptique du laurier noble et de la lavande.
- FIGURE 19** : Observation du caractère organoleptique du thym et d'eucalyptus mentholé.
- FIGURE 20** : Rendements en HE de quelques PAM testées.
- FIGURE 21** : Inhibition de la croissance d'*A.vitis* par les huiles essentielles.
- FIGURE 22** : Pourcentage d'inhibition des différentes HE testées sur *A.vitis*.
- FIGURE 23** : Résultats de la CMI et la CMB des huiles essentielles étudiées.

# Introduction générale

A travers les âges, l'Homme de toutes les civilisations a eu recours aux Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) pour leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et industrielles. Les plantes médicinales font partie du savoir de base de toutes les sociétés humaines. Sauvages ou cultivées, elles sont utilisées pour se nourrir, se défendre ou se soigner.

Ces plantes, qui ont déjà fourni à la médecine des molécules thérapeutiques majeures, comme l'aspirine et la morphine, sont très peu connues et seulement une minorité d'entre elles est explorée chimiquement. Il resterait entre 300000 et 500000 espèces de plantes à découvrir (UNEP-WCMC, 2002 cité par Guinoiseau, 2010), ce qui laisse présager un nombre conséquent de nouvelles molécules à identifier.

Par ailleurs, ces plantes produisent aussi et naturellement une large gamme de métabolites secondaires contre les microbes et les ravageurs. Parmi ces métabolites, il existe des composés, appelés huiles essentielles, élaborés sous formes de composés volatiles, et représentent l'essence, la partie la plus importante de la plante. Selon la pharmacopée européenne, une huile essentielle (HE) est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie (Mayer, 2012).

Notre étude met en évidence les possibilités d'exploitation des extraits de quelques PAM pour tester leur effet antibactérien sur un agent pathogène de la vigne à savoir *Allorhizobium vitis*. Au Maroc, cette bactérie cause des dégâts importants sur la vigne et aucune méthode de lutte curative n'est possible, car même en absence de la bactérie il y aura progression de la croissance de la tumeur. Par conséquent, toutes les méthodes de lutte sont préventives et concernent notamment la lutte par les produits chimiques. Or, ces derniers ne sont ni efficaces ni anodins vis-à-vis du consommateur et son environnement. Devant ces contraintes, la recherche de nouvelles approches s'impose d'urgence. C'est la raison pour laquelle la lutte biologique par les huiles essentielles nous a apparu très attrayante et mérite largement d'être investiguée.

Notre objectif principal est de contribuer à la valorisation de neuf espèces de PAM par évaluation de leur pouvoir antibactérien sur *Allorhizobium vitis*, agent causal de la galle du collet de la vigne.

## **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.

Ces activités concernent les environnements semi-arides, sub-humides et de montagnes, elles visent :

- 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 du matériel végétal, des connaissances et des méthodes).
- Une valorisation des acquis de la recherche et l'implication de nos partenaires dans la recherche.

Ce Centre Régional de la Recherche Agronomique de Meknès couvre la zone d'action des Directions Provinciales d'Agriculture (DPA) de Boulemane, El Hajeb, Fès, Ifrane, Khénifra, Meknès, Taounate, Taza et Sefrou.

### **Les projets de recherche conduits au niveau du centre s'articulent autour de la :**

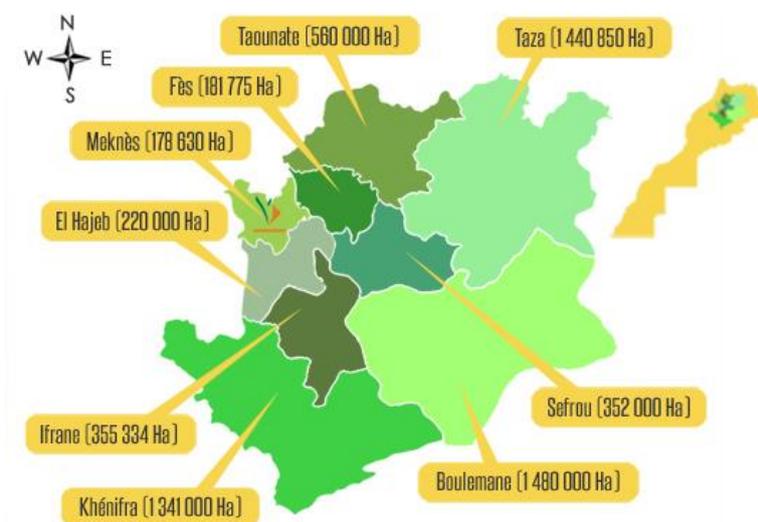
- Gestion intégrée de l'arboriculture;
- Intensification durable des grandes cultures;
- Amélioration et diversification des systèmes de production en zones de montagne du Moyen Atlas;
- Conservation des ressources naturelles, protection de l'environnement et de la biodiversité.

### **Le centre contient plusieurs unités de Recherche :**

- Agronomie et La Physiologie Végétale
- Protection des Plantes

- Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phytogénétiques
- Gestion durable des Ressources Naturelles

Les Domaines Expérimentaux de l'INRA occupent une large superficie :

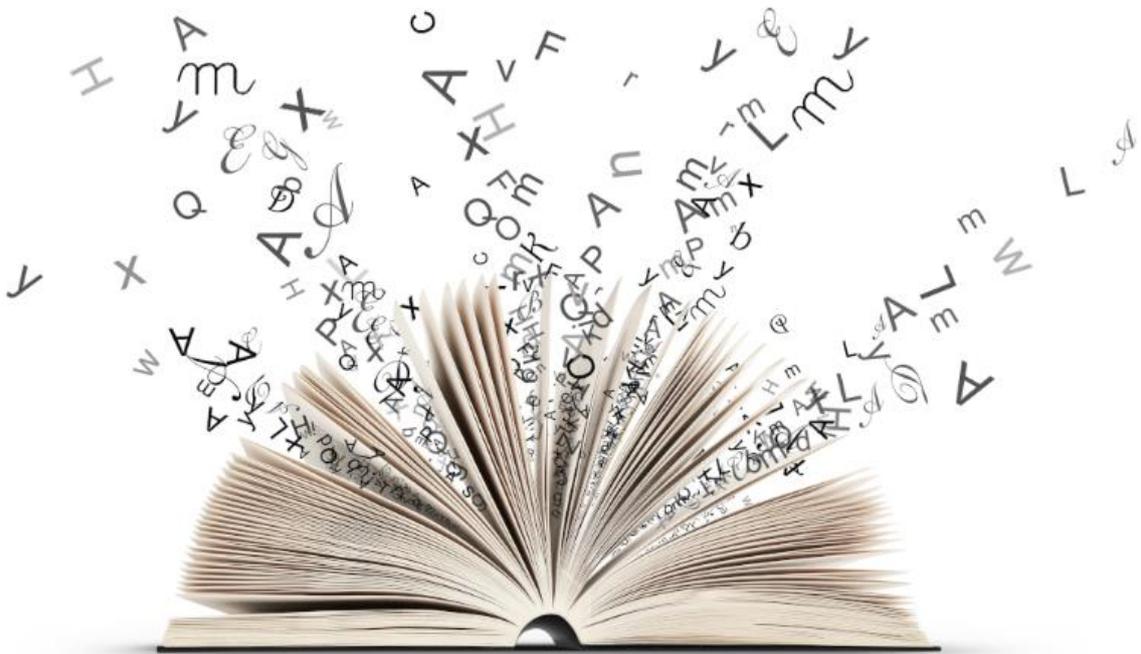


**L'INRA MEKNES assure des prestations et des services de qualité :**

- 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, ...).

# Revue

# Bibliographique



## **I. Plantes aromatiques et médicinales:**

### **1. Définition:**

Une plante est dite médicinale lorsqu'un de ses organes possède des activités pharmacologiques, pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. On n'utilise généralement qu'une partie de la plante: la racine, feuille, la fleur, la graine...

Une plante aromatique est une plante utilisée en cuisine et en phytothérapie pour les arômes qu'elle dégage, et son huile essentielle que l'on peut extraire. Ces plantes aromatiques sont cultivées selon les besoins pour leurs feuilles, tiges, racines, graines, fleurs, écorce...

### **2. Importances des PAM au Maroc:**

Le Maroc, grâce à son climat méditerranéen et ses caractéristiques géomorphologiques, bénéficie de conditions favorables pour le développement d'une flore riche et variée comprenant un important potentiel en plantes aromatiques et médicinales (PAM) souvent endémiques. Ce caractère original lui confère des conditions pédoclimatiques qui se reflètent sur sa végétation très diversifiée. Le Maroc constitue un véritable réservoir phytogénétique en méditerranée par ses 41 écosystèmes et 7000 espèces végétales dont 4200 espèces de plantes vasculaires. Parmi cette diversité floristique, 600 espèces sont réputées pour leur usage aromatique et en médecine traditionnelle (Hmammouchi, 2001). Toutefois, seules 80 espèces sont timidement exploitées (Id Taleb, 2003).

### **3. Exportation des plantes aromatiques et médicinales**

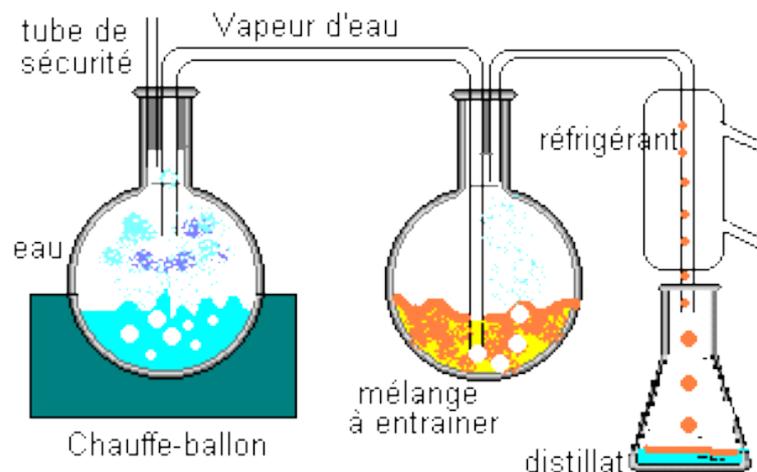
Les plantes aromatiques et médicinales (PAM) récoltées au Maroc sont essentiellement exportées à l'état brut. Les PAM ne sont valorisées sur place que pour l'extraction des huiles essentielles ou autres extraits aromatiques, et des eaux florales. Exporter le végétal séché reste plus rentable que de l'exporter transformé en huile.

Le Maroc, classé 12<sup>ème</sup> exportateur mondial des PAM, exporte principalement vers l'Union européenne, puis vers d'autres destinations plus récentes comme le Japon et le Canada. Avec ces nouveaux marchés, le volume des exportations est passé de 4.530 tonnes en 2002 à 12.368 tonnes en 2014. Leur valeur passant sur la même période de 67 millions de DH à 233 millions de DH d'après les données du Haut commissariat aux eaux et forêts pour l'année 2016.

#### 4. Méthodes d'extraction et de distillation des PAM:

##### 4.1. Entraînement à la vapeur d'eau (Alambic):

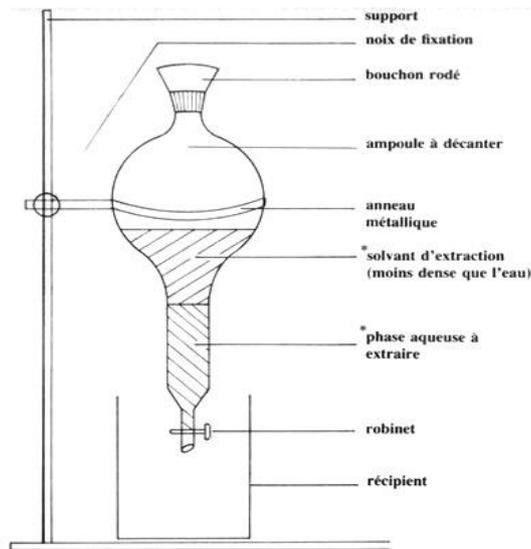
L'entraînement à la vapeur d'eau est une méthode officielle pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydro distillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules s'éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange: eau + huile essentielle (Figure1). Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier est formé. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (El Haib, 2011).



**Figure 1:** Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.

##### 4.2. Extraction par solvant:

Ce procédé permet d'extraire les métabolites secondaires non volatiles de la plante (les extraits bruts). Elle permet de récupérer des familles chimiques variées telle que les alcaloïdes, les flavonoïdes et les tannins. Selon la polarité du solvant utilisé, il y a formation de composés apolaires, peu polaires, moyennement polaires ou polaires (Figure2).



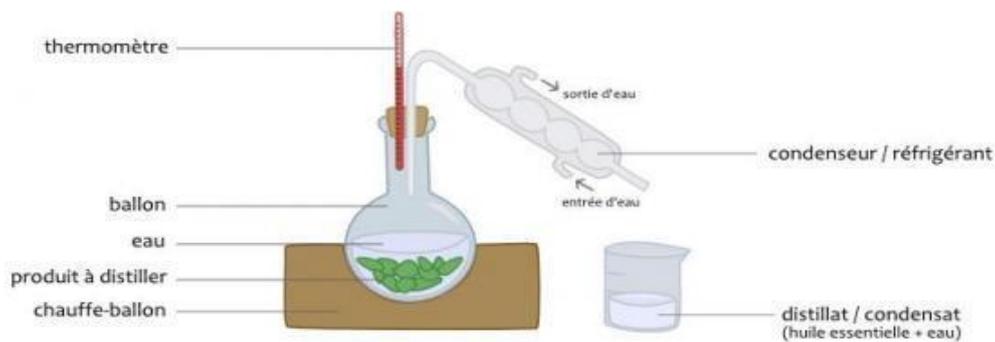
**Figure 2** : Montage d'extraction par solvant

#### 4.3. Hydrodistillation:

L'hydrodistillation consiste à porter à ébullition un mélange d'une partie de la plante et de l'eau sous l'action de la chaleur, les cellules s'éclatent et libèrent des composés organiques odorants et volatils. La vapeur d'eau formée entraîne les composés organiques à l'état gazeux vers le réfrigérant (Figure3). La condensation de ce mélange gazeux, provoque l'apparition de deux phases liquides:

- Une phase huileuse et très odorante, appelée huile essentielle, contenant la majorité des composés odorants.
- Une phase aqueuse, odorante, appelée eau aromatique, qui n'en contient que très peu.

La durée d'une hydrodistillation est donc variable et peut atteindre plusieurs heures, selon la nature du matériel végétal à distiller. Cette durée influence aussi bien le rendement que la composition chimique de l'HE. En principe plus le poids moléculaire des substances composant l'HE est élevé plus la durée est grande (Lucchesi, 2005).



**FIGURE 3** : Montage de l'hydrodistillation

## **II. Huiles essentielles:**

### **1. Définition:**

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 gommés qui s'écoulent du tronc des arbres. Beaucoup d'entre elles ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, antioxydantes, 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 (Delaquis et al., 2002 ; Burt, 2004).

### **2. Propriétés et utilisation des HE**

Parmi les propriétés les plus connues des HE nous citons :

- ✓ Le pouvoir antiseptique: Elles détruisent les microbes ou empêchent leur développement (thym, eucalyptus...).
- ✓ Le pouvoir antibactérien: Les phénols possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols, aldéhydes etc.
- ✓ Le pouvoir antiviral: Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles. Aujourd'hui, les HE constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques.
- ✓ Le pouvoir antiparasitaire: Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites.
- ✓ Activité antioxydante: L'activité antioxydante des extraits végétaux permet de contribuer à la fabrication de produits plus écologiques dans le domaine de l'extraction pour l'agro-alimentaire.

### **3. Localisation des HE dans les tissus de la plante**

Les huiles essentielles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et se forment dans le cytoplasme de certaines cellules végétales spécialisées. Elles peuvent être stockées et emmagasinées dans diverses structures de la plante, tels que les poils sécréteurs ou les

trichomes, les cellules épidermiques, les cellules sécrétrices internes, les poches sécrétrices et les canaux sécréteurs.

On peut dire alors que les huiles essentielles peuvent provenir de différents organes de plantes (Tableau 1).

**Tableau 1:** différents organes utilisés en distillation (Marie-Cécile PIBIRI).

<b>Organe</b>	<b>Type</b>	<b>Exemple de plante</b>
Partie sous terrain	Racine	Vétiver
	Bulbe	Ail
	Rhizome	Gingembre
Partie végétative	Tige	petits grains
	Bois	bois de rose, cèdre, santal
	Ecorce	Cannelle
	Feuille	Sauge, eucalyptus, Thym, menthe
	Bourgeon	Pin
	Fleur	encens, myrrhe, ylang-ylang, rose, lavande
Fruit	Fruit	Orange
	Graine	muscade, anis

#### **4. Rendement en huiles essentielles:**

Le rendement en HE dépend de nombreux facteurs tels que le stade phénologique, les conditions pédologiques, la technique d'extraction, la durée de séchage, la température, l'humidité relative etc, (Dermane 1985). Une autre étude réalisée par Rodolfo en 2006 a montré que le rendement d'extraction est en fonction de l'origine de la plante, par exemple, le rendement du géranium varie selon le pays d'origine : France (0,15%), Portugal (0,2%), USA (0,18%).

### **III. Activité antibactérienne des huiles essentielles:**

#### **1. Généralités:**

La première action des huiles essentielles des PAM contre les bactéries a été mise en évidence en 1881 par Delacroix, Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004).

Ces dernières années, le recours aux plantes aromatiques et médicinales pour extraire des molécules à activité antibactérienne envers les phytopathogènes est en accroissement continu. Ainsi, des études ont montré que certains constituants chimiques des HE ont des propriétés bactéricides (Kunle et al., 2003), et fongicides (Hammer, 2003).

Par ailleurs, des observations au microscope électronique illustrent ces études en montrant les dommages de cellules des microorganismes suivants:

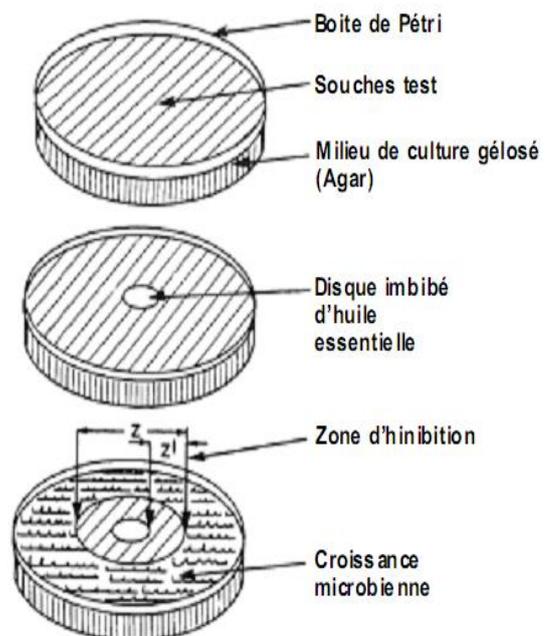
- *Staphylococcus aureus* en contact avec des HE de l'arbre à thé riches en phénols (Franchomme et al., 1990),
- *Escherichia coli* visiblement très endommagé par l'origan après une minute de contact (Burt et Reinders, 2003),
- Lyse des cellules bactériennes provoquée par la citronnelle de Java (Billerbeck, 2000).

## 2. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne:

### 2.1. Méthode de Vincent " Aromatogramme" (1967).

L'aromatogramme est une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d'HE.

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose préalablementensemencée avec une suspension de la bactérie à tester. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition (Figure 4). Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique, plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Fauchère et Avril, 2002).



**Figure 4 :** Illustration de la méthode d'aromatogramme sur boîte de Pétri.

## 2.2. Détermination des CMI et CMB par dispersion des HE dans le milieu de culture:

Cette technique de détermination des CMI par contact direct en milieu gélosé ou liquide, consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration croissante de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe à étudier. En effet, la CMI est défini comme étant la concentration de l'HE la plus faible pour laquelle la croissance bactérienne est totalement inhibée. Par conséquent la CMB correspond à la concentration permettant de tuer 99,99% des micro-organismes. Celle-ci est appréciée par étalement après culture.

Ces méthodes sont adaptables aussi bien aux antibiotiques qu'à d'autres substances bactéricides (Perry, 2002).

## IV. **Activité antibactérienne des HE sur *Allorhizobium Vitis*:**

### 4.1 Généralités sur la vigne:

La vigne est une espèce pérenne appartenant à la famille des Vitacées qui comporte une douzaine de genres et 700 espèces (Galet, 1991). C'est un arbrisseau ligneux capable de se multiplier par voie sexuée, ou asexuée (bouturage et greffage) (Gary et al., 2003).

La vigne croît dans les régions chaudes ou tempérées et compte de multiples espèces dont la *vitis vinifera*, le fruit de la vigne, appelé raisin, peut quant à lui être consommé en tant que fruit frais et se dénomme alors tout simplement « raisin de table » ou « raisins secs » si séché, et peut bien sûr être pressé pour fabriquer du jus de raisin. Ce jus instable nécessite toutefois une stérilisation rapide pour être conservé en tant que jus de fruit, voire une transformation pour devenir du vin par un processus de fermentation alcoolique (Galet, 1991).

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).

#### 4.2 Maladie du Crown gall de la vigne:

La galle du collet ou la tumeur du collet (Crown gall) est la maladie bactérienne la plus fréquente sur la vigne causée par *Agrobacterium vitis* L. (Ophel et Kerr, 1990) nommée récemment *Allorhizobium vitis* (Moussavi et al 2014, 2015). 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 cinq plants de vigne asymptomatiques importés d'Italie hébergeant la bactérie et appartenant à la variété RedGlob.

La maladie est causée par un plasmide, dit plasmide Ti. Cette bactérie est naturellement présente dans les sols, mais lorsque les conditions sont favorables, elle provoque des tumeurs sur le collet. Le déclenchement du processus infectieux de la bactérie nécessite la présence d'une blessure au niveau de la vigne (porte d'entrée) ainsi qu'une température convenable située entre 20 et 31°C. Suite au stress de la blessure, la vigne secrète notamment des composés phénoliques, ce qui attire *A. Vitis* vers le site de la blessure.

Un fragment de son plasmide Ti, l'ADN-T (ADN de transfert) est transféré dans le génome de la cellule végétale. Cette intégration de l'ADN-T se traduit d'une part par la production des phytohormones (auxines et cytokines) qui induit une division incontrôlée de la cellule hôte et par conséquent la formation des tumeurs, et d'autre part par la production des opines qui sont des composés utilisés par la bactérie pour sa propre croissance (Achabni, 2016).

Les tumeurs formées sur le collet de la vigne bloquent les tissus vasculaires, ce qui affecte la circulation de l'eau et des éléments minéraux et par conséquent entraîne la perturbation de la croissance de la vigne (Achbani, 2016).

La propagation de la maladie au sein du vignoble s'effectue à travers les sols contaminés, la pluie, les eaux d'irrigation, les insectes, les animaux, et l'Homme au cours des pratiques culturales (Achbani, 2016).

#### 4.3 Méthodes de lutte:

Une fois 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 sont généralement préventives.

##### 4.3.1. Lutte prophylactique :

Il est important d'utiliser du matériel de reproduction propre, comme moyen de lutte préventif contre l'*A. Vitis*, car les plantes infectées peuvent demeurer asymptomatiques jusqu'à l'arrivée

de l'hiver. Aussi 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.

#### 4.3.2. 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 (Tolba et Soliman, 2013).

#### 4.3.3. 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 pour protéger la vigne contre la tumeur du collet sont menées dans plusieurs laboratoires et semblent très prometteuses. Actuellement des moyens de lutte biologique utilisés de façon préventive ont donné des résultats intéressants contre *l'A. Vitis*, parmi lesquels nous citons :

- 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.
- Huiles essentielles : Les HE présentent un moyen de lutte efficace contre les agents pathogènes grâce à leurs pouvoir antifongique (Moleyar et Narasimham 1986 ; Soliman et Badaea, 2002 ; Jazet et al., 2009) antibactérien (Bourkhiss et al., 2007), antioxydant (Bouzouita et al., 2008) et insecticide (Erler et al., 2006 ; Tang et al., 2007 ; Cheng et al., 2009). Actuellement il existe diverses méthodes pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles à savoir la méthode d'Aromatogramme, la méthode de micro-atmosphère et la méthode de dilution.

# Matériel et Méthodes



## I. Matériel:

### 1- Matériel végétal:

#### 1.1. Collecte des PAM

Des sorties de prospection et de collecte des plantes ont été réalisées au préalable sur la zone de Sidi Yahya pour la récolte d'eucalyptus mentholé et citronné, et sur la zone de Tazouta pour la récolte du thym, d'origan et du ciste. Les espèces récoltées sont placées dans des sacs propres et numérotés. Au laboratoire, chaque espèce est séchée à l'ombre, et protégée de la lumière du soleil pour éviter la transformation chimique des composés de la plante.

Pour les autres plantes utilisées, à savoir la lavande, l'aneth et le laurier noble, elles ont été mises à notre disposition par le laboratoire de Phytobactériologie et de Lutte Biologique de l'INRA de Meknès.

#### 1.2. Généralités sur les PAM utilisées

Neuf plantes aromatiques et médicinales ont fait l'objet de nos essais (Tableau2).

**Tableau 2** : Origine des espèces végétales utilisées

Nom français	Nom scientifique	Famille	Localité	Date de prélèvement
Thym	<i>Thymus zygis</i>	Lamiacées	Région de Tazouta	15/05/2018
Origan	<i>Origanum elongatum</i>	Lamiacées	Montagne de Bouyblane	15/05/2018
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiacées	Région de Tazouta	15/05/2018
Eucalyptus mentholé	<i>Eucalyptus dives</i>	Myrtacées	Région sidi Yahya (El Gharb)	17/04/2018
Eucalyptus citronné	<i>Corymbia citriodora</i>	Myrtacées	Région Sidi Yahya (El Gharb)	17/04/2018
Ciste	<i>Cistus ladaniferus</i>	Cistacées	Adrej	15/05/2018
Laurier noble	<i>Laurus nobilis</i>	Lauracées	Meknès (Agouray)	06/2017
Aneth	<i>Anethum graveolens</i>	Apiacées	Meknès (Ain jiry)	06/2017
Lavande	<i>Lavandula angustifolia</i>	Lamiacées	INRA Meknès	04/2017

### 1.3. Caractérisation des plantes étudiées

Notre collection de plantes est composée de neuf échantillons à savoir :



**Figure 5 :** *Thymus Zygis*



**Figure 6 :** *Rosmarinus officinalis*



**Figure 7 :** Feuilles de *Corymbia citriodora*



**Figure 8 :** *Origanum elongatum*



**Figure 9 :** Feuilles d'*Eucalyptus divers*



**Figure 10 :** *Cistus ladanifer*



**Figure 11 :** *Laurus nobilis*



**Figure 12 :** *Lavandula angustifolia*



**Figure 13 :** *Anethum graveolens*

## 2- Souche bactérienne :

La souche bactérienne utilisée dans nos tests est la souche S4 d'*A.vitis* (souche de référence) qui fait partie de la collection du laboratoire de Phytobactériologie et de Lutte Biologique de l'INRA de Meknès (Figure 14).



**Figure 14 :** *Allorhizobium vitis* sur milieu d'enrichissement LPGA.

## II. Méthodes:

### 1. Extraction des huiles essentielles:

L'extraction des huiles essentielles des neuf espèces est faite à partir des parties aériennes (feuilles) des plantes par hydrodistillation. L'extraction a été réalisée au laboratoire d'extraction au sein de l'INRA.

Dans un ballon, sur un montage de type Clevenger (Figure 15), 200g de feuilles du romarin sont ajoutées et additionnées de deux litres d'eau distillée. Les vapeurs chargées d'huiles traversent le réfrigérant et se condensent. L'eau et l'huile se séparent par différence de densité. Après 3 heures l'huile est récupérée dans un tube et est prête à l'utilisation.



**Figure 15 :** Montage de l'hydrodistillation  
(Type Clevenger)

NB : Le même protocole est adopté pour le thym, l'origan, le ciste, l'eucalyptus mentholé, l'eucalyptus citronné, l'aneth, le laurier noble et la lavande.

## 2. Calcul du rendement des huiles essentielles

Le rendement de la distillation a été calculé par rapport à la masse de la matière utilisée selon la formule suivante :

Avec :  $V_m$  = Volume de l'huile essentielle.

TH = Taux d'humidité.

Le taux d'humidité est calculé par la relation suivante :

Avec :  $M_f$  = Masse fraîche.

$M_s$  = Masse sèche.

$$R\% = \frac{V_m}{100 \times (100 - TH)} \times 100$$

$$TH\% = \frac{M_f - M_s}{M_f} \times 100$$

## 3. Test d'aromatogramme par les huiles essentielles:

L'efficacité des huiles essentielles sur la souche S4 d'*Allorhizobium Vitis* est évaluée par la technique d'aromatogramme, pour ce faire, 100 $\mu$ l de la suspension bactérienne titrée à 10<sup>8</sup> CFU/ml estensemencée dans un milieu LPGA solide préalablement préparé et versé dans des boîtes de Pétri. La surface des boîtes est séchée sous la hotte à flux laminaire avant la remise du couvercle en place. Après séchage des disques de papier Wattman stériles de 5 mm de diamètre sont déposés sur la gélose au milieu des boîtes. Lesquels seront imbibés par 3 $\mu$ l de chaque huile essentielle pure. Un témoin dit négatif contenant un disque imbibé par 3 $\mu$ l d'eau distillée stérile est également préparé. Toutes les boites sont incubées à 28  $\pm$  1°C pendant 24h. Lendemain les diamètres d'inhibition sont mesurés en millimètres et le pourcentage d'inhibition est calculé par la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{D_1}{D_2} \times 100$$

Avec:  $D_1$  = Diamètre de la zone d'inhibition.

$D_2$  = Diamètre de la boîte de pétri.

## 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. Les milieux liquides et solides

utilisés sont respectivement LPG (Annexe 2) pour la détermination des CMI et LPGA (Annexe 1) pour la détermination des CMB.

#### 4.1. Détermination de la CMI :

Cette technique permet de mettre en évidence l'huile essentielle présentant une activité antibactérienne intense sur la croissance d'*A. Vitis*. Pour ce faire, trois tubes pour chaque huile essentielle sont remplis avec 3 ml du milieu LPG (Annexe 2). Les tubes sontensemencés, par la suite, avec 50µL d'une suspension bactérienne d'*A.vitis*. 400 µL des huiles essentielles à tester sont placées dans le premier tube de chaque gamme. Une dilution en cascade est ainsi effectuée de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 0.001% et 0.5%. Un témoin dit positif sans huile essentielle est aussi préparé. Les tubes sont ensuite placés à 28°C, sous agitation, pendant 24 heures.

Le lendemain, 50µl /1ml de la résazurine est ajoutée dans chaque tube, qui sont incubées par la suite à 28°C durant 2 heures sous agitation.

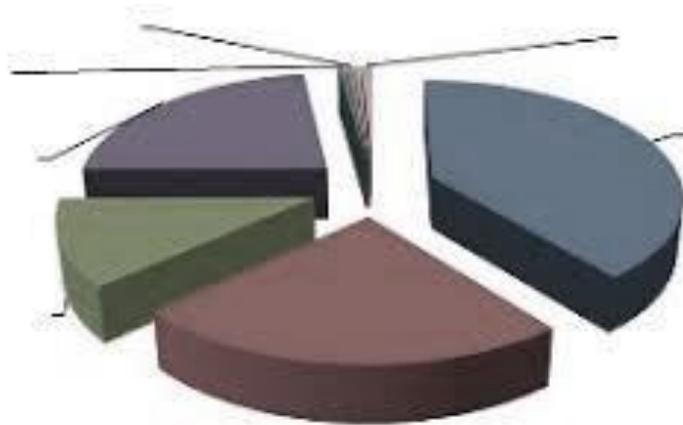
La CMI correspond donc à la plus petite concentration d'huile essentielle qui ne produit pas de changement de coloration de la résazurine du bleu au rose.

#### 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.

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 le milieu solide LPGA (Annexe1). Parmi ces concentration celle qui ne laisse survivre qu'au plus 0,01% des bactéries de la suspension de départ, après 24 heures d'incubation, est la concentration bactéricide inhibitrice CBI.

# Résultats et discussion



## I. Huiles essentielles :

### 1. Extraction des HE

L'extraction des HE par hydrodistillation provoque l'apparition de deux phases, une phase huileuse et une phase organique (Figure 16). Les huiles essentielles ont des propriétés organoleptiques communes comme le fait d'être liquides à température ambiante, d'être volatiles et entraîna- bles à la vapeur d'eau, mais elles possèdent aussi des caractéristiques organoleptiques qui diffèrent d'une plante à l'autre, à savoir la coloration (Tableau 3) et l'odeur.

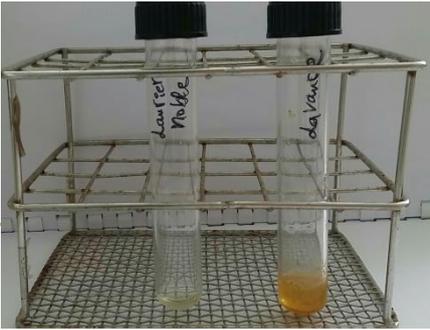


**Figure 16 :** Phase huileuse et organique après l'extraction d'HE

**Tableau 3 :** Quelques caractéristiques organoleptiques des plantes testées.

PAM	couleur	Plantes testées
<i>Origanum elongatum</i>	Liquide jaune	
<i>Anethum graveolens</i>	Liquide jaune clair	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Liquide jaune clair	
<i>Cistus ladaniferus</i>	Liquide jaune	

**Figure 17 :** Observation du caractère organoleptique d'origan, d'Aneth, du romarin et du ciste.

<i>Laurus nobilis</i>	Liquide jaune clair	
<i>Lavandula angustifolia</i>	Liquide jaune orangé	
<i>Thymus zygis</i>	Liquide jaune foncé	
<i>Eucalyptus dives</i>	Liquide jaune clair	

**Figure 18 :** Observation du caractère organoleptique du laurier noble et de la lavande.

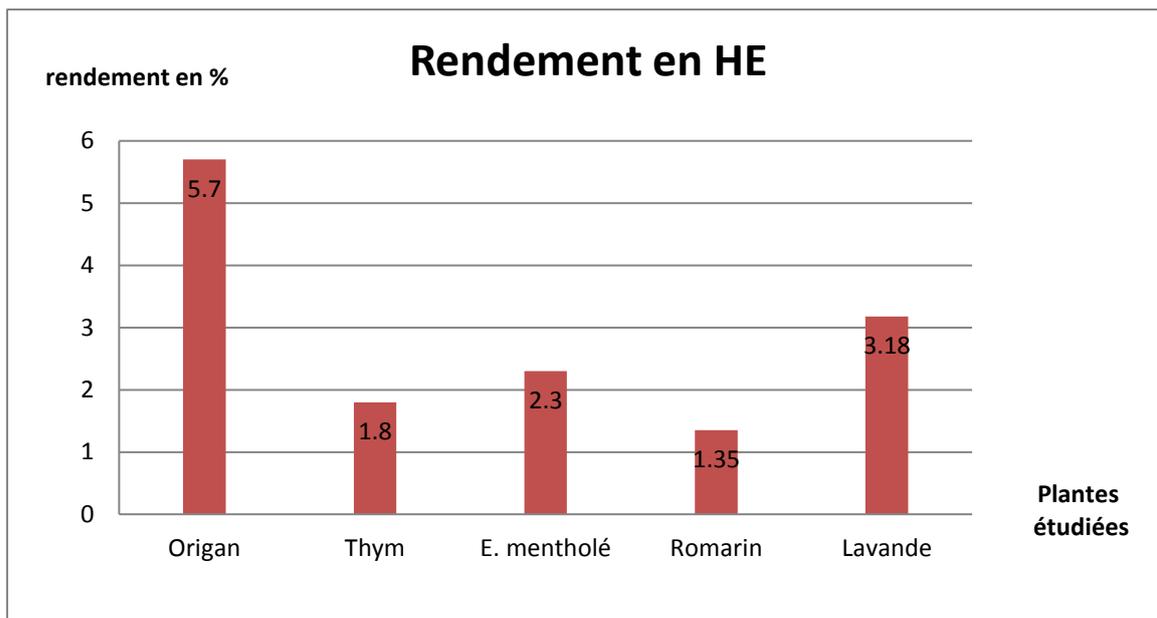
**Figure 19 :** Observation du caractère organoleptique du thym et d'eucalyptus mentholé.

## 2. Rendement en HE

L'examen des rendements en HE des espèces étudiées est d'une grande importance, car il permet d'avoir une idée précise sur les quantités nécessaires pour traiter une maladie donnée.

L'histogramme de la figure 20 montre que, les rendements en HE de ces espèces se divisent en trois catégories:

- Des rendements relativement élevés chez l'origan avec 5,7% suivi de la lavande avec 3,18%.
- Des rendements moyens chez l'eucalyptus mentholé et le thym avec des valeurs qui sont respectivement : 2,3% et 1,8%
- Des rendements faibles chez le romarin avec une valeur de 1.35%.



**Figure 20** : Les rendements en HE de quelques PAM testées.

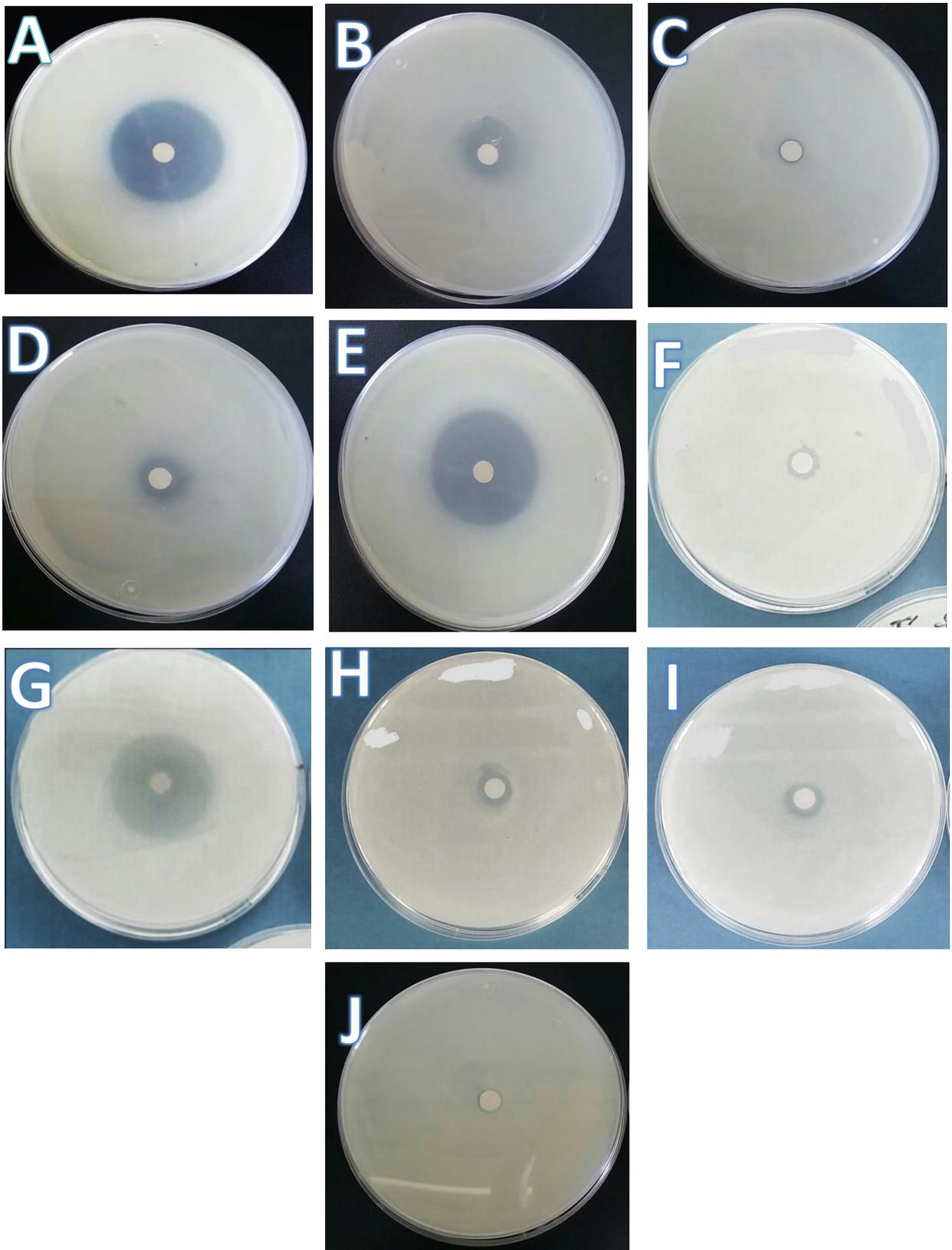
Les rendements en HE dépendent de nombreux facteurs à savoir le stade phénologique de la plante, les données pédoclimatiques, le procédé de séchage et les techniques d'extraction. Dans notre cas par exemple, le rendement calculé pour le thym n'est que de 1.8% et se trouve ainsi inférieur à celui rapporté par El Idrissi en 2007 et dont la valeur est de 3.17%.

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

#### 3.1. Technique d'aromatogramme

L'activité bactéricide des huiles essentielles utilisées a été évaluée par la méthode de diffusion par disque. Les résultats obtenus montrent que toutes les plantes testées ont inhibé la croissance de ce pathogène (Figure 21), mais à des degrés différents selon les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (Figure 22).

Ainsi, les HE de l'origan et du thym se distinguent par des diamètres les plus élevés soit respectivement 3.45 et 3.35 cm, ce qui prouve leurs grande capacité bactéricide contre *A.vitis*. La zone d'inhibition provoquée par l'huile d'Eucalyptus citronné, d'Aneth, de lavande, du laurier noble, du ciste et d'Eucalyptus mentholé viennent respectivement en troisième, quatrième, cinquième, sixième, septième et huitième place, elles représentent une zone d'inhibition moyenne et agissent assez bien en aromatoigramme, donc elles ont une capacité bactéricide moyenne. Pour l'huile du romarin, elle présente la zone d'inhibition la plus petite, et donc elle a un pouvoir bactéricide faible.

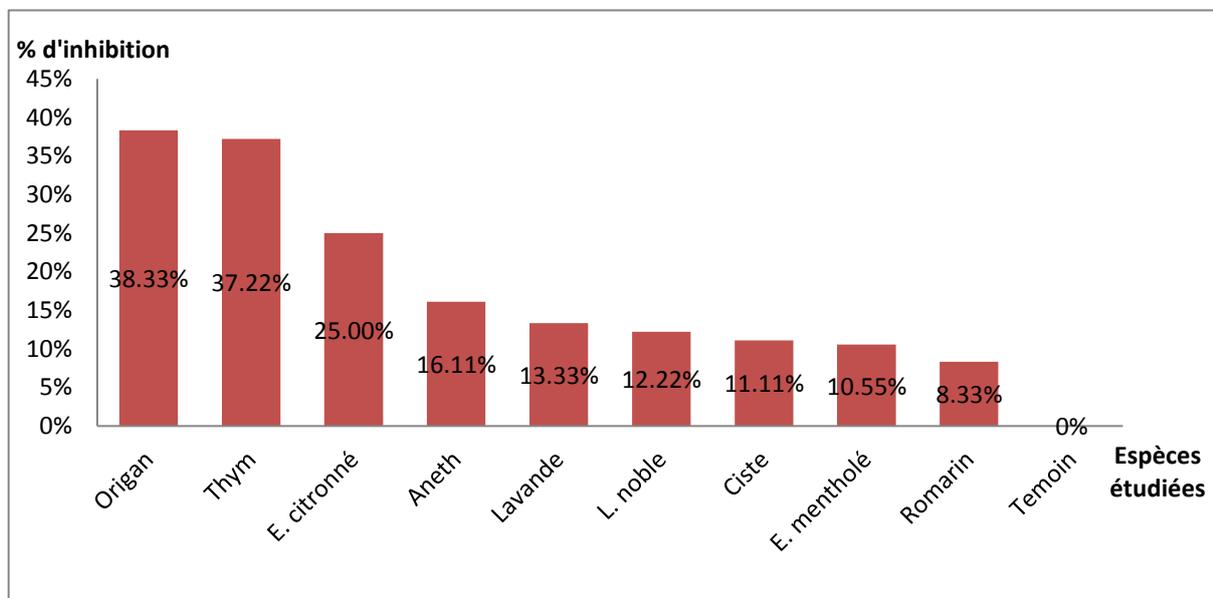


**FIGURE 21** : Inhibition de la croissance d'*A.vitis* par les huiles essentielles.

**A** : *Origanum elangatum*. **B** : *Anethum graveolens*. **C** : *Rosmarinus officinalis*.

**D** : *Lavandula angustifolia*. **E** : *Corymbia citriodora*. **F** : *Eucalyptus dives*. **G** : *Thymus zygis*.

**H** : *Cistus ladaniferus*. **I** : *Laurus nobilis*. **J** : Témoin négatif (EDS).



**FIGURE 22 :** Pourcentage d'inhibition des différentes HE testées sur *A.vitis*.

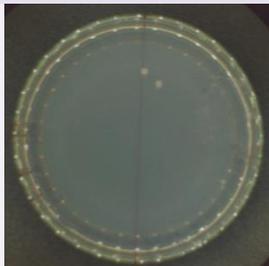
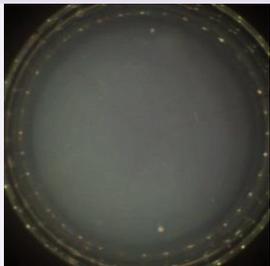
### 3.2.Détermination de la CMI et la CMB

Les résultats de la CMI obtenus pour les huiles essentielles des deux plantes retenues ayant le meilleur pouvoir bactéricide contre *A.vitis* sont présentés dans la figure 23.

Le comportement de la souche S4 utilisée dans cette étude varie vis-à-vis des HE testées, sa croissance est inhibée à partir de la concentration 0,04% pour l'origan, alors que la croissance de la même souche est inhibée à la concentration 0,05% pour l'HE du thym.

Concernant la CMB des HE testées, 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 4). Il s'est avéré ainsi que l'huile essentielle d'origan et de thym sont très actives puisqu'elles ont provoqué le maximum d'inhibition de la croissance d'*A. vitis*.

L'activité antimicrobienne de ces HE est probablement due à leur profil chimique. Le thymol est le composé majoritaire chez le thym et l'origan, ce composé phénolique est en effet connu pour sa propriété antibactérienne (Ettayebi *et al.*, 1999).

	Origan	Thym
<b>CMI</b>	0,04%	0,05%
<b>CMB</b>	 0,05%	 0,06%

**FIGURE 23 :** Résultats de la CMI et la CMB des huiles essentielles étudiées.

## Conclusion générale

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une mine riche de potentialités thérapeutiques. Plus particulièrement, les huiles essentielles extraites de plantes révèlent des activités biologiques importantes qui s'avèrent aujourd'hui nécessaires d'exploiter.

L'extraction des huiles essentielles des neuf PAM a donné des rendements variables selon l'espèce d'origine

Le test de l'activité antibactérienne des neuf plantes testées : *Origanum elangatum*, *Anethum graveolens*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Corymbia citriodora*, *Eucalyptus dives*, *Thymus zygis*, *Cistus ladaniferus*, *Laurus nobilis*, a mis en évidence une grande efficacité bactéricide de ces huiles essentielles contre *A.vitis*, notamment celle de l'origan et du thym. Cette activité est probablement due à un ou plusieurs constituants de l'huile testée

Ces résultats sont encourageants et peuvent contribuer au développement dans l'avenir proche de biopesticides pour le contrôle de la galle du collet. Dans ce but, plusieurs perspectives de ce travail peuvent être envisagées à savoir :

- ❖ 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 au champ.
- ❖ Identifier et purifier le principe actif et/ou les molécules responsables de l'activité biologique.

## Références bibliographiques

- Achbani et al., 2016.** La galle du collet de la vigne au Maroc (Région de Fès-Meknès), Agriculture du Maghreb N°99, P : 101-103.
- Baratta, 1998.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander essential oils, J.Essent. Oil Res., 10, pp. 618-627.
- Benabid, 2000.** Flore et écosystèmes du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité. Ibis Press Ed., Paris, 159-161.
- Bourkhiss et al., 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 et al., 2008.** Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*, J. Soc. Chim. Tunis., 10, 119-125.
- Burt, 2004.** Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods a review. In J Food Microbiol. 2004 ; 94(3) : 223-253.
- Burt et Reinders, 2003.** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157 : H7 Letters in Applied Microbiology 36-3 : 162-167.
- Cheng et al., 2009.** Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *eucalyptus species*, Bioresour. Technol., 100, 452-456.
- Clevenger, 1928.** Apparatus for the determination of volatile oil. Pharm. Assoc., 17 : 336-341.
- Delaquis PJ et al., 2002.** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. Int. J. Food Microbiol. 74: 101-109.
- Dermane, 1985.** L v géranium rosat. Parfms, Cosmétiques et Aromes, n°62.
- El Haib, 2011.** Valorisation des terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytiques.

- El idrissi, 2017.** Valorisation de *Thymus zygis* du Moyen Atlas Marocain : Extraction, identification et caractérisation. Thèse de troisième cycle, Université My Ismail. Meknès, p75.
- Erler et al., 2006.** Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*, *Fitoterapia*, 77, 491-494.
- Ettayebi et al., 1999.** Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activity in *listeria monocytogenes* and *bacillus subtilis*. *Fems microbiology letters* 183 : 191, 195.
- Franchomme et al., 1990.** Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges.1 :1-69.
- Fauchère et Avril, 2002.** Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. 15: 252-253.
- Galet, 1991.** Précis d'ampélographie pratique, Montpellier - France. 256 p.
- Gary et al., 2003.** Modélisation d'une espèce ligneuse pérenne à fruits charnus: la Vigne. Séminaire STICS, Arles: 36-37.
- Guinoiseau, 2010.** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Life Sciences. Université de Corse, French.149pp.
- Hammer, Carson et al., 2003.** Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol* 95-4 : 853–860.
- Hmammouchi, 2001.** Les plantes aromatiques et médicinales marocaines. Utilisations, traditionnelles, Marché, biologique, écologique, chimie, pharmacologie, toxicologie, lexique. 2<sup>ème</sup> édition, P : 289.
- Id Taleb, 2003.** Contribution au développement de la culture biologique de quelques espèces aromatiques et médicinales dans la région de Biougra. Mémoire de troisième cycle. IAV Hassan II, Rabat, Maroc, 174p.
- Jazet Dongmo et al., 2009.** Essential oils of *Citrus aurantifolia* from Cameroon and their antifungal activity against *Phaeoramularia angolensis*, *African Journal of Agricultural Research*, 4(4), 354-358.
- Kunle et al., 2003.** Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *J Phytomedicine*. 2003; 10: 59 – 61.

**Lucchesi, 2005.** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Doctorat en science de l'université de la Réunion. Discipline : chimie, P : 146.

**Marie-Cécile PIBIRI, 2005.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. THESE N°3311.

**Mayer, 2012.** Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite. P : 268.

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

**Moussavi et al 2014, 2015.** Phylogeny of the Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen.nov. Syst Appl Microbiol 37(3): 208-215.

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

**Perry et al., 2002.** Microbiologie. Cours et question de révision. Dunod: 159-160.

**Rodolfo et al., 2006.** Quality of geranium oils : case studies in southern and eastern Africa. Journal of essential oil research. Sept-Oct 2006.

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

**Skiredj et al., 2007.** LA VIGNE (*Vitis vinifera*).

**Tang et al., 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.

**Tolba et Soliman, 2013.** 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.

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