

Lutte biologique *in vitro* contre certaines bactéries phytopathogènes et contre le *Rhizobium* par les extraits tanniques des galles de *Quercus lusitania* var. *infectoria*

Redwane A.^{1,2}, Benjama A.³, Lazrek H.B.¹ et Amarouch H.²

¹ Laboratoire de Chimie Bio-organique, Département de Chimie, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc

² Laboratoire de Microbiologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences Aïn Chock, Casa-I, Maroc

³ Laboratoire de Microbiologie et de Phytobactériologie, Centre Régional du Haouz Pré-Sahara, BP. 533, INRA, Marrakech, 4000-Maroc

Résumé

Dans le but de la valorisation des galles de *Quercus lusitania* var. *infectoria* (Oliv.) comme agents à pouvoir antibactérien, des extraits tanniques et de gallate de méthyle ont été testés sur les bactéries pathogènes des plantes qui sont à gram positif et à gram négatif.

Les résultats obtenus ont montré que la croissance des bactéries *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* a été significativement inhibée.

Mots clés : Galles *Quercus lusitania* var. *infectoria*, extraits tanniques, gallate de méthyle, bactéries, pathogènes, *Rhizobium*

Abstract : Biological control against some phytopathogens bacteria and *Rhizobium* by tannic extracts of *Quercus lusitania* var. *infectoria* galls

In the aim to valorize *Quercus lusitania* var. *infectoria* galls as agents with antimicrobial activity, the tannic extracts and methyl gallate were tested against gram + and gram- pathogenic bacteria and no pathogenic of plant. The results obtained shown that growth of many bacteria *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* was significatly inhibited.

Key words : *Quercus lusitania* var. *infectoria* galls, tannics extracts, methyl gallate, bacteria, pathogens, *Rhizobium*

ملخص : استعمال عصارة العفصة " *Galles de Quercus lusitania var. infectoria* " لمحاربة البكتيريا المضرة بالنبات

رضوان أ.¹، بنجامع ع.³، الازرق ح.ب.¹ و أمروش ح.²

1 كلية العلوم السملاية، مراكش، المغرب

2 كلية العلوم عين الشق، الدار البيضاء 1، المغرب

3 المركز الجهوي للبحث الزراعي، مراكش، المغرب

في إطار تقييم مدى فعالية العفصة كمادة فعالة ضد البكتيريا، قمنا باختبار عصارة هذه النبتة وكذا مستخرجاتها خاصة مادة كالات المتيل " Gallate de méthyle " ضد عدد من البكتيريا المضرة بالنبات ك *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Agrobacterium* وكذلك ضد *Rhizobium*. لقد أسفرت النتائج المحصل عليها على أن المواد المستخرجة من عصارة العفصة تمنع نمو هذه البكتيريا.

الكلمات المفتاحية : العفصة، عصارة، متيل الكالات، البكتيريا

Introduction

Il est connu que *Agrobacterium* provoque deux maladies : la galle du collet (Crown-gall) et la galle chevelue (Hairy-root). Les trois espèces d'*Agrobacterium* (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* et *A. rubi*) provoquent le crown-gall si elles portent le plasmide Ti (Tumor inducing) alors que seulement les premières espèces donneraient le Hairy-root si elles portent le plasmide Ri (Kerr et Brisbane (1983).

La galle du collet ou Crown-gall des rosacées fruitières sévit au Maroc. La région de Meknès est la plus touchée avec plus de 50% de la production arboricole nationale. Les pépinières sont les principaux foyers de la maladie où le nombre de plants atteints de tumeurs provoquées par *Agrobacterium* peut atteindre 90% (Benjama et Daoud, 1989 ; Benjama et al., 1996 c).

Alors que *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* est un agent pathogène qui provoque la tuberculose de l'olivier.

Les *Bacillus* sont des contaminants de produits supposés stériles à cause de la thermorésistance de leur spore. Leur contrôle dans les procédés de préparation alimentaire et la fabrication de tous les produits stériles (eau, produits congelés, etc...) représente un intérêt économique considérable.

Les extraits et les fractions des galles de *Q. infectoria* ont montré une activité très prometteuse sur plusieurs bactéries pathogènes pour l'homme (Redwane et al., 1996).

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits a été réalisée sur 18 souches de bactéries appartenant à trois familles : Rhizobiacées, Pseudomonadacées et Bacillacées, afin de contribuer à la recherche d'un moyen de lutte efficace, moins cher et biodégradable.

Matériel et Méthodes

Matériel végétal

Quercus lusitania var. *infectoria* est un arbre du bassin méditerranéen. Les galles sont des tumeurs des bourgeons provoquées par la piqûre de la femelle d'un insecte (*Cynips gallae tinctoria*). Les galles sont très riches en tanins (60 à 70 %) (Paris et Hurabielle, 1981).

Méthode d'extraction des tanins

Les galles poudre ont subi trois méthodes d'extraction :

- Extraction aqueuse : Les galles sont extraites à l'eau distillée bouillante sous agitation pendant 24 h. La solution aqueuse est filtrée puis évaporée sous vide jusqu'à l'obtention d'un résidu sec (extrait aqueux).
- Extraction par des solvants organiques : La poudre précédemment préparée (100 g) a été soumise à une extraction au Soxhlet en continu par le méthanol (750 ml) pendant 48 h. L'extrait alcoolique obtenu est concentré sous pression réduite donnant naissance à un résidu méthanolique. Ce dernier a subi des épauvements successifs par l'hexane, dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol (Netien et Lebreton, 1964).
- Extraction des gallotannins : Cette méthode consiste à extraire les galles poudre (40 g) deux fois avec l'acétone (200 ml) à température ambiante pendant 12 h. Après évaporation du solvant, le résidu est dissout dans l'eau distillée (200 ml) ensuite épuisé à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques combinées sont filtrées et séchées sous Na_2SO_4 et évaporées pour donner un mélange des gallotannins (Nishizawa et al., 1983 ; Nonaka, 1991).

Méthode de purification de l'extrait d'acétate d'éthyle

L'extrait d'acétate d'éthyle (10 g) est séparé par chromatographie sur colonne de gel de silice. L'élution est réalisée par un mélange Hexane/Acétate d'éthyle. Quatre fractions ont été obtenues, la première fraction est un produit pur caractérisé et identifié par les techniques spectroscopiques usuelles de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 (R.M.N ^1H et ^{13}C), Spectrométrie de masse, Ultraviolet (UV) et Infrarouge (IR) comme étant le galate de méthyle.

Extraits utilisés

- Extrait aqueux (E.A) (200 µg/disque)
- Extrait méthanolique (E.M) (200 µg/disque)
- Extrait d'acétate d'éthyle (E.Ae.) (200 µg/disque)
- Extrait acétonique (E.Ac.) (200 µg/disque)
- Gallotanins (Gallo.) (200 µg/disque)
- Gallate de méthyle (G.M) (200 µg/disque)

Méthode de diffusion

La méthode de diffusion en milieu solide est utilisée (Autore et *al.*, 1984) afin de tester la sensibilité des différentes souches vis-à-vis des extraits et produit.

Des disques de papier Whatman N°1 de 5 mm de diamètre sont imbibés d'extraits et produit à tester (200 µg/disque) puis stérilisés par filtration sur papier millipore (0.45 µm) et séchés. Des disques imprégnés d'eau distillée stérile sont utilisés pour vérifier l'effet du solvant seul, de même, des disques de papier Whatman imbibés d'eau distillée stérile sont utilisés comme témoins.

Les disques sont déposés à la surface de la gélose ensemencée par les suspensions bactériennes. Après le dépôt des disques, les boîtes de Pétri sont laissées 30 min à la température du laboratoire pour permettre une diffusion complète du produit. Ensuite, elles sont incubées à 27°C pendant 24 h. Après cette période, on mesure les diamètres d'inhibition.

Matériel bactérien utilisé

Origine

Quatre genres différents *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium* originaires de la collection du laboratoire de Phytobactériologie de l'INRA-Marrakech, sont utilisés pour cette expérimentation (Tableau 1) :

Les deux premières familles sont pathogènes respectivement pour les rosacées fruitières provoquant le Crown-gall (*Agrobacterium tumefaciens*), et pour l'olivier provoquant la tuberculose (*Ps. savastanoi*). Les *Bacillus* sont des bactéries contaminants les vitroplants de palmier dattier alors que le *Rhizobium* est responsable de la fixation d'azote par les plantes qui l'emmagasine dans les nodosités des légumineuses alimentaires.

Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 24 h, on prélève une anse de la culture bactérienne qu'on dépose dans 1 ml d'eau distillée stérile. On réalise des dilutions de cette suspension jusqu'à avoir une dilution contenant 10⁶ bactéries / ml suivant une échelle d'opacité de Mc Farland. L'ensemencement des boîtes de Pétri contenant le milieu (Yeast Manitol Agar) se fait par inondation à partir de l'inoculum.

Milieu de culture utilisé

Le milieu YMA_n (Yeast 0.05 %, Manitol 1 %, Agar noble 1.8 %) est le milieu adéquat qui permet une meilleure diffusion des extraits et du produit des galles de *Q. infectoria*.

Estimation de la concentration minimale inhibitrice (C.M.I)

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits et du produit par cette méthode a été réalisée sur 18 souches bactériennes appartenant à trois familles : Rhizobiacées, Pseudomonadacées et Bacillacées (Tableau 1).

Tableau 1. Origine des souches bactériennes

Famille	Bactéries	N° souches	Plante hôte	Lieu et date d'isolement
Rhizobiacées	<i>Agt. tumefaciens</i>	121-19	Amandier	Meknès 1986
	<i>Agt. rubi</i>	rubi / 26	Vigne	Allemagne 1992
	<i>Rhizobium</i>	AH	Légumineuse alimentaire	Meknès 1991
		F48		"
		L726		"
Pseudomonadacées	<i>Ps. fluorescens</i>	456F	Racines d'amandier	Régions de Marrakech 1996
	"	459-2F	Sol	INRA Marrakech 1997
	<i>Ps. savastanoi</i>	T12-4	Olivier	INRA Angers 1988
		T51-1	"	"
	"	T37-7	"	"
	"	T12-10	"	"
Bacillacées	<i>Bacillus</i> *	VP5	Palmier dattier	INRA Marrakech 1987
	"	VP7	Vitroplant du P*.D*	"
	"	161-1	"	"
	"	317-2	"	Meknès 1992
	"	314-1	"	"
	"	459-1	Sol	INRA Marrakech 1997

* (Benjama, 1994 ; Benjama et Charkaoui, 1996 a ; Benjama et al., 1996 b)

** Palmier dattier

Principe de la méthode (Mitscher et al., 1972)

Cette méthode est utilisée pour l'estimation des C.M.I (la concentration la plus faible de l'extrait ou du produit pour laquelle il n'y a pas de croissance visible des bactéries). Cette technique consiste à incorporer directement au milieu gélosé l'extrait ou le produit à tester à différentes concentrations (de 128 µg/ml à 0.25 µg/ml). On mélange un volume de 2 ml du produit déjà solubilisé dans l'eau distillée stérile avec 18 ml du milieu YMA_n. Après stérili-

sation à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min, le mélange est versé dans les boîtes de Pétri vides stériles. Après solidification le mélange est séché pendant 15 min à 37 °C.

Une boîte de Pétri vierge contenant uniquement le mélange 18 ml du milieu YMA avec 2 ml d'eau distillée stérile a été utilisée pour vérifier l'effet du solvant.

Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 24 h, on prélève 1 à 2 anses de la culture bactérienne dans 5 ml d'E.D.S. On obtient une suspension légèrement trouble qui correspond à $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml. Cette suspension est diluée au $1/10^{\text{ème}}$ (1 ml de la suspension + 9 ml E.D.S) donnent $5 \cdot 10^7$ bactéries/ml puis une dilution au $1/50^{\text{ème}}$ (0.1 ml de la dernière suspension + 4.9 ml E.D.S).

Ensemencement sur milieu de culture YMA

L'ensemencement est réalisé par le multiinoculateur. Cet appareil permet l'ensemencement simultané de 21 souches.

Ce procédé permet un travail plus rapide, reproductible et évite la manipulation fastidieuse de l'ensemencement manuel. Le volume délivré varie de 1 à 3 microlitres et les spots obtenus sont d'environ 2 millimètres. Il y a 10^4 germes ensemencés par spot à partir de la suspension $5 \cdot 10^7$ bactéries/ml diluée au $1/50^{\text{ème}}$.

Résultats

Analyse des résultats pour la méthode de diffusion

Les résultats des diamètres de la croissance bactérienne sont représentés dans le tableau 2 et explicités sous forme d'histogramme (figure 1).

Tableau 2. Résultats de l'activité antibactérienne du gallate de méthyle et des extraits des galles de *Quercus lusitania* var. *infectoria* (méthode des disques)

Souches Extraits	Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
	<i>Bacillus</i> (459-1)	<i>Bacillus</i> (326)	<i>Bacillus</i> (VP5)	<i>Ps. fluorescens</i> (456)	<i>Ps. fluorescens</i> (459-2)
Aqueux (E.A)	25	25	15	13	18
Méthanolique (E.M)	23	20	18	14	15
Acétate d'éthyle (E.Ae.)	23	21	18	13	17
Acétonique (E.Ac.)	25	21	15	15	18
Gallotanins (Gallo.)	23	21	12	13	16
Gallate de méthyle(F1)(G.M) 6		5	10	5	5
Azoture de sodium (Az.Na.)20		11	0	12	16
Témoin blanc	0	0	0	0	0

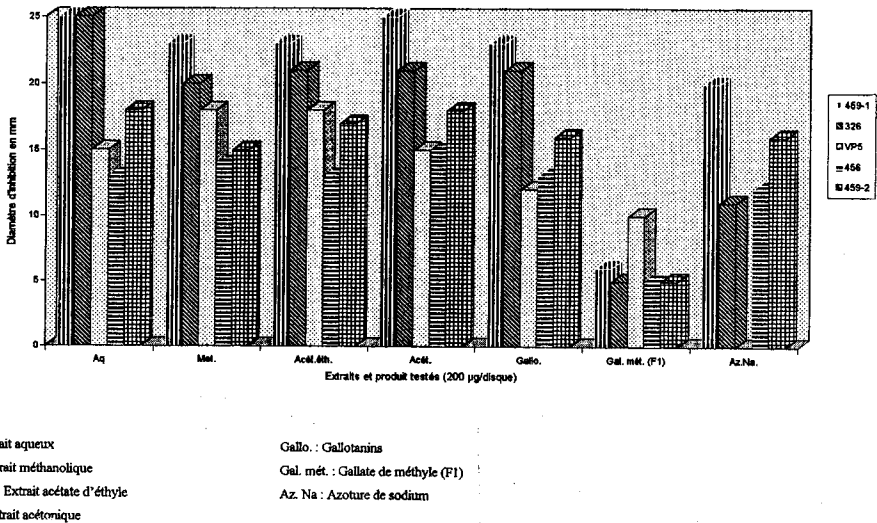


Figure 1. Distribution des diamètres des zones d'inhibition de la croissance chez les *Bacillus* et les *Pseudomonas*

Le produit gallate de méthyle n'a montré aucune activité antibactérienne intéressante à une dose de 200 µg/disque, sauf sur la souche *Pseudomonas fluorescens* (456) avec un diamètre d'inhibition moyen de 10 mm. Cette valeur est la même que celle trouvée par Chung *et al.* (1995).

Les souches 459-1 et 459 F apparaissent les plus sensibles à tous les extraits par rapport aux autres souches testées. Les diamètres d'inhibition sont compris entre 23 et 25 mm.

Les deux souches de *Bacillus* sont sensibles à tous les extraits. La souche VP7 est plus sensible que la souche 326.

Pour les deux souches de *Pseudomonas fluorescens*, on remarque qu'elles sont également sensibles à tous les extraits avec des diamètres d'inhibition supérieurs à 12 mm.

Les résultats intéressants obtenus par la méthode de diffusion, nous ont permis de tester ces extraits sur un nombre plus important de souches bactériennes à savoir *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium*, en utilisant la méthode d'incorporation directe en milieu solide afin d'estimer la C.M.I pour chaque extrait.

Analyse des résultats par la méthode de dilution en milieu solide

D'après les résultats obtenus au tableau 3, l'extrait d'acétate d'éthyle présente les C.M.I les plus faibles, celles-ci sont de 2 µg/ml vis-à-vis d'*Agrobacterium rubi*, *Pseudomonas fluorescens* (sauf la souche 459), *Pseudomonas savastanoi*, *Bacillus* et la souche 459-1.

L'extrait aqueux inhibe la croissance d'*Agrobacterium rubi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas savastanoi* et *Bacillus* à une C.M.I de 16 µg/ml. Il est aussi actif contre les deux souches de *Rhizobium* (AH et F48) avec une C.M.I très faible de 2 µg/ml et contre la souche

459-1 avec une C.M.I de 4 µg/ml alors qu'il est moins actif vis-à-vis d'*Agrobacterium tumefaciens* et une souche de *Rhizobium* (L726) avec une C.M.I de 128 µg/ml.

L'extrait méthanolique présente un effet antibactérien vis-à-vis de toutes les souches testées à des C.M.I comprises entre 16 et 64 µg/ml.

L'extrait acétonique et les gallotanins apparaissent les plus actifs que l'extrait aqueux et méthanolique sur les souches testées avec des C.M.I comprises entre 2 et 16 µg/ml excepté la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* qui est résistante à ces deux extraits avec des C.M.I > 128 µg/ml.

Le gallate de méthyle présente une activité antibactérienne modérée avec des C.M.I comprises entre 32 et 64 µg/ml.

Les résultats obtenus avec cette méthode concordent bien avec ceux obtenus par la méthode des disques.

Discussion

Lors de cette étude de l'activité antibactérienne, nous avons fait appel à deux méthodes :

La méthode des disques est très utilisée pour détecter la présence de principe actif dans les extraits et permet d'obtenir des renseignements rapides sur la sensibilité des germes (Paris et Moysse, 1965). C'est une méthode facile à réaliser, néanmoins il faut tenir compte, lors de l'interprétation des résultats :

- de la quantité du produit absorbé par le papier,
- du coefficient de diffusion du produit car le diamètre des zones d'inhibition dépend largement de la diffusion du produit à travers la gélose,
- de la densité de l'inoculum et de l'épaisseur de la couche de la gélose.

La méthode d'incorporation directe quant à elle, permet de résoudre les problèmes de diffusion et de la concentration de l'extrait ou du produit. Cependant, le type du milieu de culture peut régir les valeurs de C.M.I. En effet, les valeurs du pH et la nature du milieu sont en relation étroite avec les valeurs des C.M.I (Marris, 1987).

D'après les résultats obtenus par les deux méthodes, nous constatons que les extraits et le gallate de méthyle inhibent aussi bien les bactéries gram négatif que les bactéries gram positif de façon très significative.

La méthode de diffusion (disques) a été utilisée, du fait de sa rapidité pour sélectionner les germes les plus sensibles à une dose de 200 µg/disque. Par cette méthode, nous avons testé la sensibilité de 2 souches de *Pseudomonas fluorescens* et 3 souches de *Bacillus* vis-à-vis de nos extraits. Les résultats obtenus par cette méthode sont très intéressants pour tous les extraits testés avec des diamètres d'inhibition de 12 mm (Tableau 2 et fig.1).

Parmi toutes les souches bactériennes testées, nous remarquons que les deux souches 459-1 (*Bacillus*) et 459-2 (*Ps. fluorescens*), qui ont été isolé du sol de l'INRA de Marrakech, sont les plus sensibles.

La séparation de l'extrait d'acétate d'éthyle aboutit à un produit pur qui est le gallate de méthyle et d'autres fractions qui sont un mélange de plusieurs produits. Le gallate de méthyle (F1) a été également testé sur les souches bactériennes afin d'évaluer son activité. Sauf que ce produit a été considéré moins actif par la méthode des disques car le diamètre d'inhibition était faible. Ceci pourrait être dû à sa faible diffusion dans le milieu.

Suite aux résultats intéressants obtenus par la méthode de diffusion (disques). Nous avons testé par la méthode de dilution en milieu solide un nombre important (18 souches) des bactéries pathogènes des plantes appartenant à trois familles Rhizobiacées, Pseudomonadacées et Bacillacées.

Les valeurs des C.M.I obtenues par cette méthode (Tableau 3) montrent une sensibilité remarquable de toutes les bactéries à tous les extraits et produit testés. A l'exception d'*Agrobacterium tumefaciens* qui est résistant à l'extrait acétonique et aux gallotanins avec une CMI > 128 µg/ml.

Tableau 3. Résultat de l'activité antibactérienne du gallate de méthyle (F1) et des extraits des galles de *Quercus lusitania var. infectoria* sur certaines souches d'*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* et *Bacillus* (méthode de dilution en milieu solide)

Produit ou extrait		C.M.I en mg/ml						
Souche	Espèce	Aqueux	Méthanolique	Acétate d'éthyle	Acétone	Gallotanins	Gallate de méthyle	Témoin EDS
121-19	Agt. tumefaciens	128	64	64	>128	>128	64	-
Rubi/26	Agt.rubi	16	16	2	16	8	32	-
AH	Rhizobium	2	32	32	4	2	64	-
F48	"	2	32	32	4	2	64	-
L726	"	128	64	64	4	2	64	-
456	<i>Ps. fluorescens</i>	16	16	2	16	16	32	-
459-2	"	16	16	4	16	16	32	-
T12-4	<i>Ps. savastanoi</i>	16	16	2	8	8	32	-
T51-1	"	16	16	2	16	16	32	-
T37-7	"	16	16	2	16	16	32	-
T12-10	"	16	16	4	4	16	32	-
VP5	<i>Bacillus</i>	16	16	2	16	16	64	-
317-2	"	16	32	4	8	8	64	-
314-1	"	16	32	2	8	8	64	-
VP7	"	16	16	2	16	8	32	-
161-1	"	16	16	2	16	8	64	-
459-1	"	4	16	2	8	8	64	-

Pour ce qui est de l'extrait d'acétate d'éthyle, nous observons qu'il est particulièrement très actif sur les souches de *Bacillus*, *Pseudomonas savastanoi* avec des C.M.I allant de 4 à 2 µg/ml, malgré que *Pseudomonas* est connu pour sa résistance à la plupart des antimicrobiens commerciaux.

L'explication qu'on pourrait formuler est que l'extrait d'acétate d'éthyle renfermerait des produits polaires et des produits non polaires et qu'il peut s'agir d'une synergie entre ces deux types de produits.

Les galles de *Quercus infectoria* d'Iraq ont été déjà testé pour leurs activités antibactériennes par Nadir et Salih (1985). Ils ont montré que l'extrait éthanolique présente une activité significative sur *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*.

L'activité antibactérienne de tous nos extraits est due à la présence au niveau des galles de *Quercus lusitania* var. *infectoria* d'une quantité importante de tanins.

Par ailleurs, et d'après de nombreuses recherches réalisées sur les tanins isolés à l'état pur (Saxena et al., 1994), il apparaît que ces composés sont des agents antimicrobiens très efficaces (Laks et al., 1988 ; Wu-Yuan et al., 1988 ; Sakanaka et al., 1989).

Nous pouvons citer parmi ces substances l'acide gallique qui a montré une activité très importante contre *S. aureus*, *Sreptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Shigella dysenteriae* et *Salmonella senftenberg* (Beuchat et Henton, 1975). L'effet antimicrobien des tanins sur divers micro-organismes a été revu par Scalbert (1991).

Le gallate de méthyle isolé de l'extrait d'acétate d'éthyle n'a pas montré d'activité significative par la méthode de contre *Agrobacterium*, *Pseudomonas* et *Bacillus* diffusion, alors qu'il s'est avéré très actif sur toutes les souches testées par la méthode de dilution avec des C.M.I comprise entre 32 et 64 µg/ml. Ces résultats concordent avec ceux rapportés dans la littérature (Saxena et al., 1994 ; Chung et al., 1995) confirmant l'effet antibactérien du gallate de méthyle.

Conclusion

Le gallate de méthyle et les extraits des galles de *Quercus lusitania* var. *infectoria* possèdent un pouvoir antibactérien très important vis-à-vis des souches d'*Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Rhizobium*. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par les tests bactériologiques sur les bactéries pathogènes pour l'homme. Ce qui nous amène à penser que les galles de *Quercus lusitania* var. *infectoria* renferment des principes actifs pouvant être utilisées dans le traitement des infections causées par ces germes.

Agrobacterium et *Pseudomonas* pénètrent à travers les blessures causés sur le végétal et cause la maladie Crown-gall pour la première et la tuberculose pour la deuxième. Les extraits peuvent servir à protéger ces blessures contre les bactéries. En effet, 5 extraits sont efficaces contre *Pseudomonas* et seulement 3 extraits sont efficaces contre *Agrobacterium*.

Par ailleurs, ces extraits pourraient également être appliqués aux tissus des vitroplants contaminés par ces bactéries afin de confirmer les résultats trouvés *in vitro*.

Références bibliographiques

Autore G., Capasso F., De Fusco R., Fasulo M.P., Lembo M., Mascolo N. and Menghini A. (1984). Antipyretic and antibacterial action of *Teucrium polium*. Pharmacological research communications, 16 : p.21-29.

Benjama A., Daoud S. (1989). Caractérisation en biovars d'isolats marocains d'*Agrobacterium* issus de tumeurs racinaires des rosacées fruitières. Agronomie, 9 : 897-902.

Benjama A. (1994). Isolation of non pathogenic contaminants of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) and banana (*Musa* sp.) in Morocco. Al-Awamia, 85 : 89-96.

Benjama A. and Charkaoui B. (1996) a. Control of *Bacillus* contaminating date palm tissue in micropropagation using antibiotics. Second International Symposium on bacterial and bacteria-like contaminants of plants Tissue Cultures. Cork in Ireland. 3-6 september. Agricul Report, 27, 4, 28. P.O. Box 255, Shrub Oak, N.Y. 10588, USA.

Benjama A., Charkaoui B. et Samson R. (1996) b. Effets de certains antibiotiques et antiseptiques sur les *Bacillus* contaminant les cultures de tissu du palmier dattier in vitro. Al-Awamia, 93 : 53-61.

Benjama A., Alami N. et Saadaoui E.M. (1996) c. Etude sérologique des souches marocaines d'*Agrobacterium tumefaciens* agent de la galle du collet des rosacées fruitières. Agronomie, 16 : 517-522.

Beuchat L.R. and Henton E.K. (1975). Salmonella survival on pecans as influenced by processing and storage condition. Applied Microbiology, 29 : 795-801.

Chung K.T., Zhao G., Stevens E., J.R. and Simco B.A. (1995). Growth inhibition of selected aquatic bacteria by tannic acid and related compounds. Journal of Aquatic Animal Health, 7 : 46-49.

Kerr A. and Brisbane P.G. (1983). *Agrobacterium*. In : Plant bacterial Diseases : a diagnostic guide (FAHY & PERSLEY, Eds) Academic press : 27-43.

Laks P.E., Mc Kaig P.A. and Hemingway R.W. (1988). Flavonoid biocides wood preservatives based on condensed tannins. Holzforschung, 42 : 299-306.

Marris S. (1987). Etude de la concentration minimale inhibitrice des antiseptiques et désinfectants. Mise au point de méthode. Ann. Pharm., Fr., 45 (1) : 87-96.

Mitscher L.A., Lev R.P., Bathala M.S., Wu W.N. et Beal J.R. (1972). Antimicrobial agents from higher plants. I- Introduction rationale and Methodology. J. Nat. Prod., 35 : 157-165.

Nadir M.T. et Salih F.M. (1985). Evaluation of antibacterial activity in some of the Iraqi plants. JBSR, 16 (2) : 169-178.

Paris R.R. et Moysse H. (1965). Précis de matière médicale. Edition Masson et Cie, Paris, 416 pp.

Redwane A., Lazrek H.B., Amarouch H. et Jana M. (1996). Tannins des galles de *Quercus lusitania* var. *infectoria*. : Isolement et étude de quelques aspects pharmacologiques. Polyphenols Communications, Bordeaux (France), 1 : 141-142.

Sakanaka S., Kim M., Taniguchi M., Yamamoto T. (1988). Antibacterial substances in Japanese green extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. Agricultural and Biological Chemistry, 53 : 2307-2311.

Saxena G., Mc Cutcheon A.R., Farmer S., Towers G.H.N. and Hancock R.E.W. (1994). Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. Journal of Ethnopharmacology, 42 : 95-99.

Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry (Oxford), 30 : 3875-3883.

Wu-Yunn C.D., Chen C.Y. et Wu R.T. (1988). Gallotannins inhibit growth, water soluble glucan synthesis and aggregation of *Streptococcus mutans*. Journal of Dental Research, 67 : 51-55.