

**ETUDE DE L'EFFICACITE DE L'EXTRAIT
ETHANOLIQUE D'ECORCES DE *PUNICA
GRANATUM LINN* SUR DEUX SOUCHES
PHYTOPATHOGENES :*ASCOCYHTA RABIEI*
(PASS.) *LABR. ET FUSARIUM OXYSPORUM*
*F.SP.RADICIS –LYCOPERSICI***

Khedoudja Kanoun

Bouziane Abbouni

Mohamed Lamine Bénine

Fatima –Zohra Benmahdi

Bakhta Marouf

Laboratoire de Synthèse de l'Information Environnementale, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Djillali Liabés de Sidi –Bel –Abbés, Algérie

Abstract

The aim of this study is the evaluation of the antifungal activity of *Punica granatum* peel towards two phytopathogenic agents, which are: the *Ascochyta rabiei* (pass.) Labr and *Fusarium oxysporum f.sp. radicles-lycopersici* (FORL). To test the effectiveness of the ethanol extract of pomegranate peel (EPPP), three parameters were studied: the mycelial growth, inhibition rate and sporulation. It is thus that the strain of *Fusarium oxysporum lycopersici f.sp.Radialis* was more resistant to 5% EPPP with mycelial growth of 9 mm and an inhibition rate of 75.67%, compared to those of *Ascochyta rabiei* (pass). Labr with mycelial growth of 7 mm and an inhibition rate of 79.41% after 7 days of incubation. This difference is mainly due to the sensitivity and the natural resistance of the strains tested.

Keywords: *Punica granatum*, *ascochyta rabiei* (Pass), Labr - *Fusarium oxysporum lycopersici-f.sp.Radialis* - ethanolic extract, mycelial growth

Résumé

Le contexte de cette étude s'inscrit sur l'évaluation de l'activité antifongique des écorces de *Punica granatum* vis-à-vis de deux agents

phytopathogènes qui sont : L'*Ascochyta rabiei* (pass .) Labr et le *Fusarium oxysporum f.sp.Radicis -lycopersici* (FORL) .Pour tester l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorces de grenade (EEEG), trois paramètres ont été étudiés à savoir : la croissance mycélienne, le taux d'inhibition ainsi que la sporulation, c'est ainsi que la souche *Fusarium oxysporum f.sp.Radicis – lycopersici* était la plus résistante à 5% d'EEEG avec une croissance mycélienne de 9 mm et un taux d'inhibition de 75,67% comparés à ceux d'*Ascochyta rabiei* (pass .) Labr avec une croissance mycélienne de 7 mm et un taux d'inhibition de 79,41 % après 7 jours d'incubation. Cette différence de susceptibilité s'explique principalement par la sensibilité et la résistance naturelle des souches testées.

Mots-Clés: *Punica granatum*, *Ascochyta rabiei* (pass) Labr, *Fusarium oxysporum f.sp.Radicis –lycopersici* ,Extrait éthanolique, croissance mycélienne

Introduction

La tomate est exposée à plusieurs maladies dont la pourriture des racines et du collet (*Fusarium crown and root rot*) causée par le *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* (Katan et al. ,1997). Cette maladie peut occasionner des dégâts pouvant atteindre 90 % des plantes dans certaines serres .Si la lutte chimique par le bénomyl ou le captafol a donné des résultats encourageants dans la lutte contre ce pathogène (Marios et Mitchell ,1981), l'utilisation répétée des produits de synthèse entraîne souvent la pollution de l'environnement avec une apparition de souches résistantes et augmente la quantité des résidus sur les fruits (Ozbay et Newman ,2004) .

Le pois chiche (*Cicer arietinum L.*) est une légumineuse importante sur le plan économique dans le monde après l'haricot (Gan et al ., 2006).Un des plus grands stress biotique réduisant les rendements potentiels du pois chiche est l'antracnose causée par l'*Ascochyta rabiei* Pass.(Labr.) (téléomorphe, *Didymella rabiei* v. Arx. syn. *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski) (Ahmed et al.,2005) .En Algérie, les données de plusieurs années d'observation ont montré la présence et l'extension de la brûlure ascochytiq ue avec des chutes de production pouvant aller jusqu'à 100% (Bouznad et al.,1996).

Par ailleurs en Algérie comme dans les autres pays du Maghreb, l'ascochytose reste la principale contrainte du développement du pois chiche ; les fongicides employés à l'heure actuelle sont des composants essentiels de la lutte contre les maladies fongiques des plantes(Mabsoute et al.,1996), pour éviter l'apparition fréquente de souches résistantes lors de ces traitements fongicides par l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux dus à leur application répétitive, il est

indispensable de valoriser et exploiter les plantes médicinales ;l'usage thérapeutique de ces dernières est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement ,en raison de l'absence d'un système médical moderne (Tabuti et al.,2003) .Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (plantes, animaux, bactéries et champignons) (Boldi ,2004) .La capacité d'un remède (à base de plantes) à exercer des effets inhibiteurs de développement microbiens est due à ses différents composants. Il s'agit pour la plupart du temps des produits du métabolisme de la plante qui d'un point de vue chimique peuvent appartenir aux groupes de substances très variées : composés phénoliques, tanins, anthocyanines, coumarines, alcaloïdes et les flavonoïdes.(Bruneton,1999 ;Gilly ,2005 ;Iserin ,2007;Koth,2007).

Si des études de valorisation des écorces de fruits ont été réalisées pour traiter différentes infections microbiennes sur les populations humaines, par contre il existe peu de littérature sur l'activité antifongique de l'extrait éthanolique d'écorces de ce fruit sur les deux agents phytopatogènes testés dans nos travaux.

La *Punica granatum* est beaucoup cultivée dans le bassin méditerranéen (Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Marocetc) (Langley ,2000) d'où son nom vernaculaire Roumana, djoulanar , thar'mant , aremane .Le grenadier a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753 (Spichiger et al.,2004).Dans le but de rechercher l'activité antifongique des extraits de la grenade vis-à-vis des agents phytopathogènes (*Ascochyta rabiei* (pass.) Labr et *Fusarium oxysporum f.sp.Radiciis -lycopersici*) ; la présente étude a donc eu pour objectif de tester l'activité antifongique d'extrait éthanolique d'écorces de *Punica grantum* sur les deux souches objet de notre travail qui nous ont été fournis par le laboratoire d'agronomie de l'université de Mostaganem (Algérie).

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le fruit de grenade a été récolté ,durant le mois de novembre 2008 dans la localité de Sidi –Ali –Benyoub distante de 25 km au sud de la ville de Sidi –Bel-Abbés ,450 Km à l'ouest d'Alger et 80 Km au sud d'Oran ; les fruits, les feuilles et les écorces ont été photographiés pour authentification, le spécimen de référence de la plante a été envoyé pour identification et confirmation au laboratoire de taxonomie végétale par le professeur Benhassaini .H au département de l'environnement de la faculté des sciences

de la nature et de la vie de l'université Djillali Liabés de Sidi-Bel-Abbès (Algérie) ,où l'échantillon a été déposé et codé sous le N° PG2008 .

Méthodes

Préparation de l'extrait

Le fruit a été lavé avec de l'eau de robinet, les écorces ont été séchées à l'ombre pendant un (01) mois sur une plaque en bois, à l'abri de l'humidité et de la lumière et à température ambiante. Après séchage, les écorces ont été concassées dans un mortier traditionnel ensuite pulvérisées au broyeur manuel ,la poudre obtenue a été conservée dans des récipients hermétiquement fermés jusqu'à leur extraction , cette dernière a été réalisée avec 300 g de poudre puis mise à macérer dans 700 ml d'éthanol à 96° sous agitateur magnétique à l'abri de la lumière et à température ambiante .Après 48 heures ,l'extrait a été filtré à l'aide d'un papier Whatman (N°3), suivi d'une deuxième extraction réalisée sur le marc obtenu (400 ml :900 ml) (v :v) dans les mêmes conditions opératoires de départ , les filtrats obtenus sont concentrés à l'aide du rotavapor de type Laborota 4000 sous vide à la température de 70 °C et avec une rotation de 120 rpm ,l'extrait obtenu est conservé à +6°C avant de le tester sur les deux souches fongiques sélectionnées. Le rendement en g d'extrait par rapport à la masse du matériel végétal à traiter est calculé selon la formule suivante:

$R = \frac{m}{m_0} \cdot 100$; R: Rendement de l'extrait brut en pourcentage (%), m : la masse de l'extrait brut obtenu après extraction(g), m_0 : la masse du matériel végétal (g) (Caree ,1953).

Test d'activité antifongique

L'extrait végétal est dilué avec le D.M.S.O (diméthyle sulfoxyde) jusqu'à l'obtention des concentrations désirées (0%, 1%, 2%, 3% et 5%). Une quantité de 1ml de chaque concentration est rajoutée dans chaque boîte de Pétri contenant le milieu de culture CDA (Chickepea Seed –meal Dextrose Agar) en surfusion à raison de 15 ml par boîte (Jamil et al. ,2002 ; Pande et al.,2011) . Après solidification du milieu, l'ensemencement a été réalisé avec des explants de 5 mm de diamètre prélevés d'une culture âgée de 7 jours, à l'aide d'un emporte pièce stérile, la suspension fongique de départ est ajustée à 9×10^5 spores /ml. Ces explants sont déposés dans des puits creusés préalablement avec une pipette Pasteur stérile au centre des boîtes de Pétri contenant des doses croissantes de l'extrait, trois répétitions sont retenues pour chaque concentration (Kolai et al.,2012) .

L'évaluation de la croissance mycélienne est déterminée par la technique de Rapilly (Rapilly,1968) qui consiste à mesurer le diamètre du mycélium durant sept jours, en utilisant la formule suivante :

$$L = D-d / 2$$

L: croissance mycélienne

D: diamètre de la colonie

d: diamètre de l'explant

Les moyennes de croissance mycélienne sont calculées par la formule suivante:

$$V \text{ (mm/jour)} = (L_n - L_{n-1}) / n$$

V : Moyenne de croissance mycélienne

L_n, L_{n-1}, \dots : sont les croissances mycéliennes le jour n, n-1, n-2...

n : Nombre de jours (Benzohra et al.,2011).

Evaluation du taux d'inhibition de la croissance mycélienne

Les résultats obtenus à partir de l'estimation de la croissance mycélienne sont aussi exprimés en pourcentage (%) par rapport à la croissance mycélienne du témoin selon la formule décrite par Leroux et Credet (Leroux et Credet ,1978).

$$T (\%) = (L-I / L) \times 100$$

T : taux d'inhibition.

L : croissance mycélienne du témoin exprimée en cm.

I : croissance mycélienne des champignons subissant le traitement exprimés en cm.

Test de sporulation

L'évaluation de la sporulation est effectuée selon le principe de la méthode utilisée par Maslouhy (Maslouhy ,1989). Ce test a été réalisé par un lavage avec 10 ml d'eau distillée stérile de la boîte de Pétri entière contenant du mycète, afin de libérer toutes les spores, par la suite la suspension obtenue est récupérée dans une fiole remplie d'eau distillée stérile à 50 ml, le nombre de spores pour chaque échantillon est comptée par la cellule de Mallassez sous le microscope optique.

Résultats

Après évaporation sous rotavapor, l'extrait obtenu est de couleur marron foncé avec une odeur forte caractéristique de la plante, le rendement a été de 37% par rapport au poids initial de la poudre végétale. L'extrait testé a réagit positivement sur les deux souches étudiées, cet effet antifongique s'est traduit par le taux d'inhibition de la croissance mycélienne variable d'une souche à l'autre, les résultats de ce paramètre testé avec différentes concentrations de l'EEEG sont présentés dans les tableaux 1 et 2 dont les résultats qui y sont contenus ont été tirés à partir des lectures relevées sur des boîtes de Pétri cultivées (Figure 1 et 2).

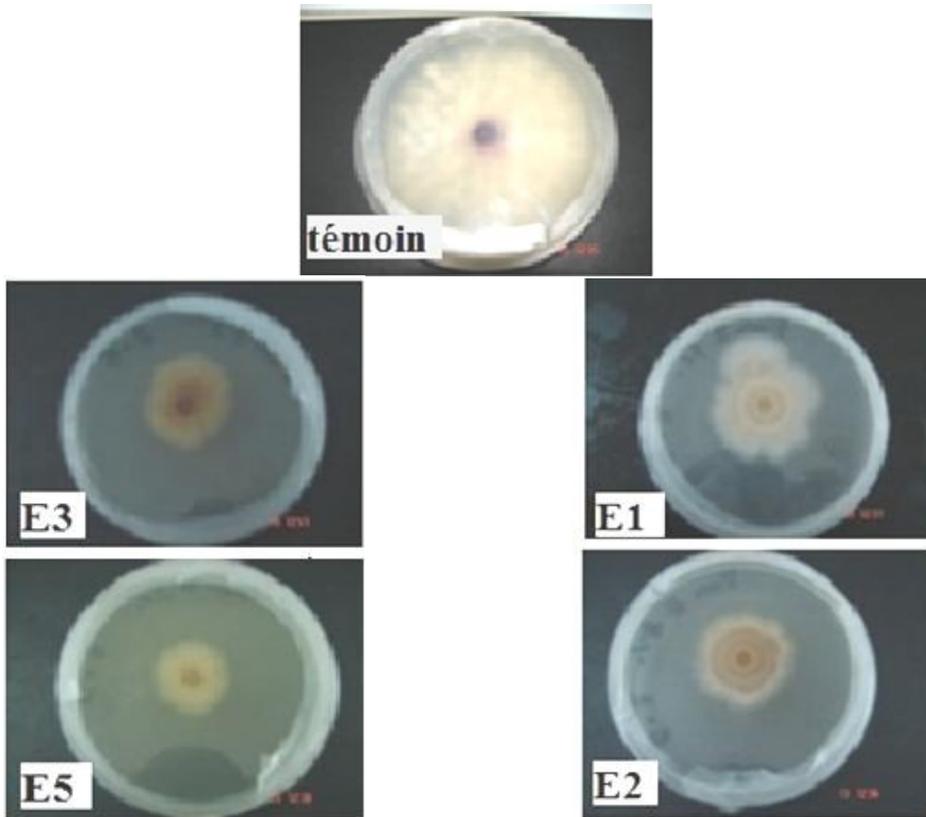


Figure 1 :Photos de *Fusarium oxysporum lycopersici* sur boîte de Pétri au septième jour d'incubation en fonction de la concentration d'extrait éthanolique d'écorces de *Punica granatum* (témoin , E1 , E2 ,E3,E5 : EEGE respectivement à 0% , 1% ,2% ,3%,5%)

Les effets d'EEEG sur la croissance mycélienne des agents phytopathogènes des plantes étaient différents selon la dose (effet dose).La croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum lycopersici* à 5% d'EEEG au septième jour d'incubation a été fortement inhibée par rapport au témoin (0 % d'extrait) avec des valeurs de croissance mycélienne respectivement de 9 mm et 37 mm ,cette inhibition est moins importante à 1% ou à 2% d'extrait dont le diamètre du mycélium était respectivement de 13 mm et de 15 mm (Tableau 1).

Tableau1: Croissance mycélienne (mm) de *Fusarium oxysporum lycopersici* en fonction du temps et de la concentration d'extrait éthanolique d'écorces de *Punica granatum*

concentration de l'extrait	Jours d'incubation							
	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
	La croissance mycélienne (mm)							
Témoin (0%)	0	1.5	9	15	20	27	32	37
1%	0	1	3	6	12	13	13	13
2%	0	1	3	5	12	14	15	15
3%	0	0	2	4	10	12	12	12
5%	0	0	1.5	4	5	9	9	9

Pour *Ascochyta rabiei* le diamètre de son mycélium au septième jour d'incubation à 5% d'EEEG était de 7 mm par rapport au témoin qui était de 34 mm (Tableau 2). Ces résultats montrent aussi que l'inhibition qui se manifeste par la diminution de la croissance mycélienne d'*Ascochyta rabiei* est lente à différents jours d'incubation par rapport à *Fusarium oxysporum lycopersici* ; c'est ainsi qu'il a été observé qu'au troisième jour d'incubation et à une concentration de 1% d'EEEG, le diamètre du mycélium était respectivement de 4 mm et de 6 mm. Par ailleurs, du cinquième jour au septième jour d'incubation et à des concentrations de 3% et à 5% le diamètre du mycélium de *Fusarium oxysporum lycopersici* est resté constant.

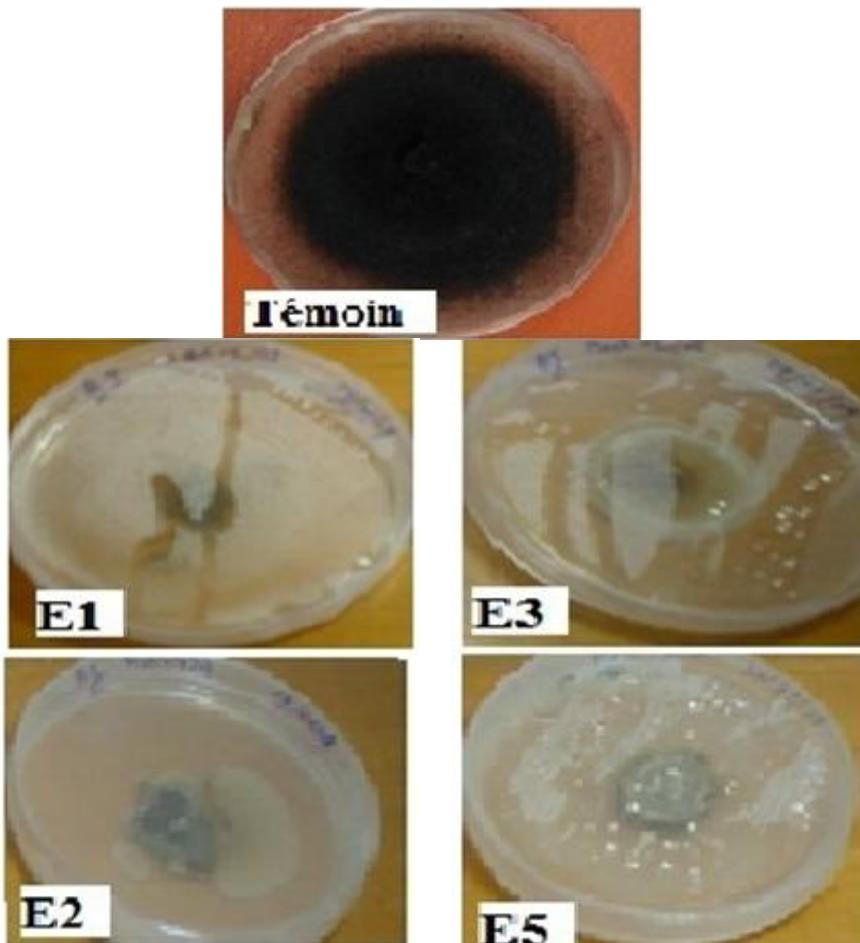


Figure 2 :Photos d'*Ascochyta rabiei* sur boîte Pétri au septième jour d'incubation en fonction de la concentration d'extrait éthanolique d'écorces de *Punica granatum* (témoin , E1 , E2 ,E3,E5 :EEEE respectivement à 0% , 1% ,2% ,3%,5%)

Tableau 2. Croissance mycélienne (mm) d'*Ascochyta rabiei* en fonction du temps et de la concentration d'extrait éthanolique d'écorces de *Punica granatum*

concentration de l'extrait	Jours d'incubation							
	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
	La croissance mycélienne (mm)							
Témoin (0%)	0	2	9	15	18	23	30	34
1%	0	0	2	4	15	18	20	22
2%	0	0	1	3	9	12	15	16
3%	0	0	0	3	7	9	10	12
5%	0	0	0	1	3	5	6	7

En ce qui concerne les taux d'inhibition, il est constaté que ces derniers sont plus importants chez *Ascochyta rabiei* avec un pourcentage de 73,33 % au troisième jour d'incubation à 1 % d'EEEG par rapport à celui de *Fusarium oxysporum lycopersici* qui était de 60% (Figures 3 et 4).

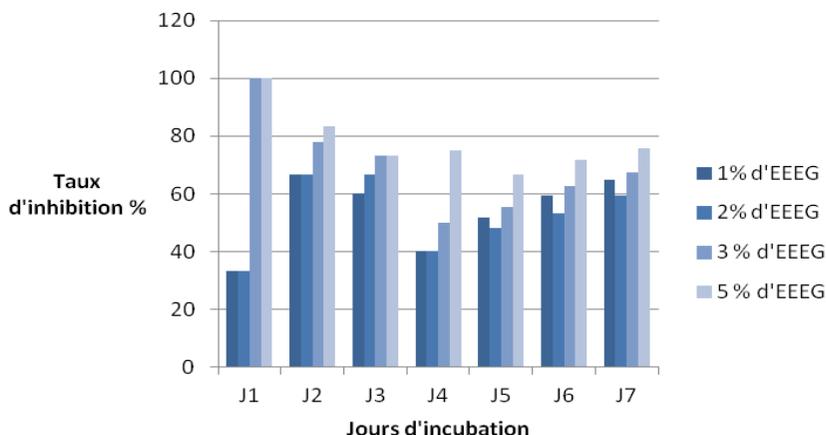


Figure 3: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (%) de *Fusarium oxysporum lycopersici* en fonction du temps et de la concentration d'EEEG

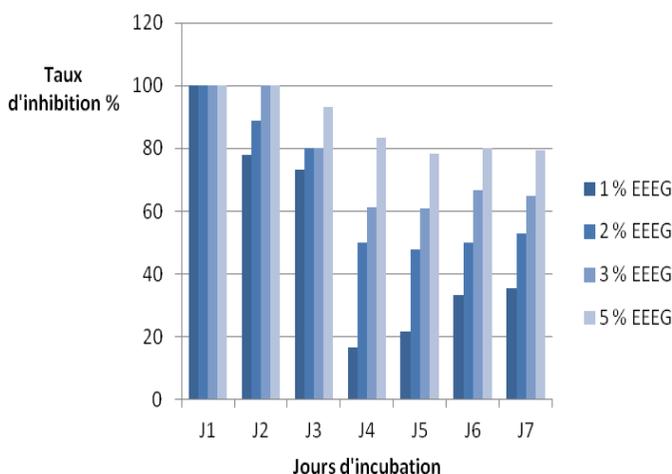


Figure 4: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (%) d'*Ascochyta rabiei* en fonction du temps et de la concentration d'EEEG

Pour la sporulation et d'après nos résultats ,l'effet d'EEEG à la même concentration et au même jour d'incubation était plus marqué sur la sporulation d'*Ascochyta rabiei* dont le nombre de spores est de $1,8 \times 10^5$ spores /ml au septième jour d'incubation à 5% d'EEEG comparé à celui de

Fusarium oxysporum lycopersici qui était de $5,32 \times 10^5$ spores /ml(Figure 5) .

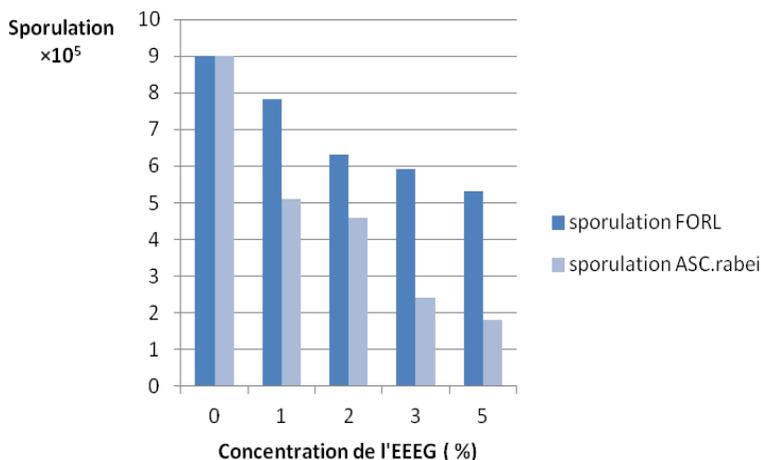


Figure 5 : Sporulation ($\times 10^5$) de *Fusarium oxysporum lycopersici* et d'*Ascochyta rabiei* au septième jour d'incubation en fonction de la concentration d'EEEG .

Discussion

Les résultats d'inhibition de la croissance de *Fusarium oxysporum lycopersici* dans notre étude s'accordent avec ceux trouvés par Al-Askar (Al-Askar ,2012) ,où les écorces de grenade réduisent de façon significative la croissance de *F. oxysporum* à différentes concentrations graduelles. Certaines études de Gil et ses collaborateurs (Gil et al.,2000) montrent que parmi les principaux composés bioactifs ayant une activité antifongique dans les écorces de grenade sont les ellagitanines et les punicalagines.(Glazer et al .,2012) ont constaté que le niveau de punicalagine corrèle de manière significative avec l'inhibition de la croissance des trois champignons testés *Alternaria alternata*, *Fusarium spp*, et *Stemphylium botryosum* .

Nous avons remarqué dans notre étude que l'inhibition de la croissance mycélienne démarre après le deuxième jour avec la souche d'*A. rabiei* pour les concentrations 1% et 2% , et le troisième jour pour les concentrations 3% et 5% ; par contre pour la FORL elle débute le premier jour lorsqu'elle est testé avec des concentrations de 1% et de 2% et le deuxième jour pour les concentrations 3% et 5% .Cette différence de sensibilité observée aux différents paramètres testés (inhibition de la croissance mycélienne, taux d'inhibition et le test de sporulation) est due principalement , à la diversité structurelle des agents pathogènes, c'est dans ce contexte que (Chang et al., 2007) ont recueilli 66 isolats d'une spore d'*Ascochyta rabiei* qu'ils ont cultivés sur un milieu de croissance contenant du chlorothalonil, du mancozèbe ou de la pyraclostrobine, parmi eux quarante-neuf soit 74 % des isolats étaient insensibles à un ou à plusieurs

fongicides, la susceptibilité des souches testées dans cette étude peut être due à des propriétés de sélectivité des substances chimiques dans l'extrait testé et au mécanisme d'action sur les souches testées comme dans le cas des fongicides de synthèse. Nos travaux ont démontré que la stabilité des valeurs de l'inhibition de la croissance mycélienne de FORL à compter du sixième jour d'incubation pour toutes les concentrations d'EEEG testées, peut être expliqué par le phénomène de saturation des sites d'inhibitions où l'effet n'augmente pas.

Nos résultats des taux d'inhibitions concordent avec ceux trouvés par (Onaran et Yılar ,2012) ,où l'extrait aqueux des feuilles de *Trachystemon orientalis .L* à une concentration de 1% a diminué significativement la croissance mycélienne d' *A. rabiei* à un taux de 66,84% par rapport au contrôle, toutes les autres doses (3%, 5%,7%, 10% et 20%) l'ont complètement inhibé.

Ces observations sont aussi similaires à celles trouvées par (Kolai et al.,2012) qui ont travaillé sur *Artemisia herba alba*, où la croissance mycélienne des deux formes spéciales (F1 et F2) du *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici* testées avec les différentes concentrations d'huile essentielle extraite de cette plante démarre après le deuxième jour pour la concentration de 0,1% et après le troisième jour pour la concentration de 0.5%, par contre pour la concentration de 1% elle démarre après le cinquième jour, au-delà de cette concentration, les chercheurs n'ont observé aucune croissance.

Nos constatations ont montré que la diminution du nombre de spores des deux souches testées correspond à la diminution de la croissance mycélienne sous l'effet d'EEEG, nos résultats concordent avec ceux trouvés par (Serghat et al.,2004), où la croissance mycélienne et la sporulation de *Pyricularia grisea* sont inhibées par le tricyclazole .

L'activité antifongique des extraits de plantes est attribuée à leur composition chimique fondée sur des analyses spectrales ; tels que les composés extraits d'écorces de grenade qui présentent une forte activité antifongique, précédemment identifiés comme punicalagine, ce dernier possède une forte activité contre *Candida* spp. (Endo et al.,2010) , et présente des propriétés antibactériennes, anti-oxydantes, anticancéreuses et anti-inflammatoires (Miguel et al.,2010).

L'activité antimicrobienne peut être le signe de la présence de métabolites toxiques ou des composés à large spectre d'activité , le screening phytochimique de l'extrait éthanolique de *Punica granatum* a révélé la présence de stérols , flavonoïdes, triterpènes, phénols et de 25 % de tannins (Scalbert ,1991) .D'autre part, l'analyse d'HPLC réalisée par (Singh et al.,2002) a montré que l'extrait éthanolique des écorces de grenade contient des composés mineurs mais principalement des composés phénoliques

majeurs que sont l'acide gallique, l'acide ellagique et les ellagitanines ,ces derniers sont représentés essentiellement par les punicalagines. Notre extrait est préparé dans un solvant qui permet d'extraire les composés bioactifs parmi les polyphénols qui sont des substances phytochimiques hydrophiles et les solvants d'extraction hydrophiles sont de meilleurs solvants pour leur récupération à partir de plantes (Negi et Jayaprakasha ,2003 ; Alzoreky , Nakahara ,2003).Le mécanisme responsable de la toxicité des composés phénoliques vis-à-vis les microorganismes a été liée à une réaction avec les groupements sulfhydryles des protéines suivie d'une indisponibilité de substrats aux micro-organismes (Machado et al.,2003. ; Naz et al.,2007) ,les sites et le nombre des groupements hydroxyles sur les composants phénoliques peuvent augmenter la toxicité contre les micro-organismes (Cowan , 1999). (Ahn et al. ,1998) ont remarqué que l'acide gallique possède une activité antibactérienne contre certaines bactéries intestinales. L'acide ellagique et la punicalagine ont été signalés comme possédant une activité antimicrobienne sur les pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires (Taguri et al.,2004).

Conclusion

Parmi les différentes parties de la grenade , seule l'écorce a été sélectionnée dans ce travail pour son effet antifongique, son extrait éthanolique possède un effet inhibiteur contre certains agents phytopathogènes ,l'EEEG a montré une activité antifongique sur les deux souches en fonction de la relation dose- effet , c'est ainsi que la croissance mycélienne diminue avec l'augmentation de la concentration d'EEEG, ce dernier possède un effet inhibiteur plus important sur *Ascochyta rabiei* (*pass.*) *Labr* que sur *Fusarium oxysporum f.sp.Radicis –lycopersici* démontré par le test de sporulation et évaluation du taux d'inhibition.

En perspective il est prévu d'une part de tester *in- vivo* notre extrait d'écorces sur la culture de pois-chiche et de la tomate ,d'autre part , la poursuite de ce travail préliminaire est envisagée par l'étude de comportement *in –vitro* et éventuellement *in- vivo* des extraits de feuilles , de fleurs et de fruits sur différents agents phytopathogènes pour repérer les meilleurs afin de développer une alternative par rapport à l'utilisation des fongicides d'origine synthétique dans le but de minimiser l'application des antifongiques chimiques et les remplacer par des traitements biologiques à base d'extraits de plantes.

References:

Ahmed H .U., Chang K.F., Hwang S.F .et Howard R.J . Surveillance of *Ascochyta blight* of chickpea in southern Alberta in 2004 .Canadian Journal of Plant Pathology, 27, 145 (abstr) ,2005.

- Ahn Y.J ., Lee C.O., Kweon J.H., Ahn J .W. et Park J.H. Growth-inhibitory effects of Galla Rhois-derived tannins on intestinal bacteria. *Journal of Applied Microbiology* ,84 ,439–443, 1998.
- Al-Askar Abdul Aziz A . In vitro antifungal activity of three saudi plant extracts against some phytopathogenic fungi. *Journal of Plant Protection Research* ,52 ,458 –462 ,2012.
- Alzoreky N .et Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology* ,80 , 223–230,2003.
- Benzohra I .E., Bendahmane B .S., Labdi M. et Youcef Bnekada M. *In vitro* Biocontrol using the Antagonist *Trichoderma harzianum* against the Algerian isolates of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the agent of *Ascochyta* Blight in Chickpea (*Cicer arietinum L.*). *International Journal of Microbiological Research* , 2 ,124-128, 2011.
- Boldi ,A.M. *Libraries* from natural product-like scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology* ,8, 281 – 286 ,2004.
- Bouzad Z., Maatougui M.E.H et Labdi M. Importance et distribution géographique des maladies fongiques des légumineuses alimentaires en Algérie. In: *Proceeding du symposium régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires*, 11-14Novembre 1996, Rabat (Maroc), *Projet Mghrébin PNUD/RAB/91/007* ,1996.
- Bruneton J. *Pharmacognosie et Phytochimie des Plantes médicinales*. Editions Tec et Doc Lavoisier ,1120 p ,1999.
- Caree P . *Précis de technologie et de chimie industrielle*. Ed Ballière JB et fils, 238 p ,1953.
- Chang K .F., Ahmed H.U., Hwang S.F. , Gossen B.D., Strelkov S.E, Blade S.F. et Turnbull G.D .Sensitivity of field populations of *Ascochyta rabiei* tochlorothalonil, mancozeb and pyraclostrobin fungicides and effect of strobilurin fungicides on the progress of *Ascochyta blight* of chickpea .*Can J Plant Sci* ,87, 937–944 ,2007.
- Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* ,12 , 564–582,1999.
- Endo E.H., Cortez D.A., Ueda-Nakamura T., Nakamura C.V., Dias Filho B.P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans* . *Res Microbiol* , 161 , 534–540 ,2010.
- Gan Y.T., Siddique K.H.M., Mcleod W.J.et Jayakumar P. Management options for minimizing the damage by *Ascochyta blight* (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Field Crops Research* ,97, 121-134,2006.
- Gil M.I., Tomas-Barberan F.A, Hess-Pierce B. ,Holcroft D.M., Kader A.A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 48:4581–4589,2000.

- Gilly G. Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse. Botanique-Culture-Chimie- Production. Ed Harmattan, 418 p,2005.
- Glazer I., Masaphy S., Marciano P., Bar-Ilan I., Holland D., Kerem Z. et Amir R. Partial Identification of Antifungal Compounds from *Punica granatum* Peel Extracts. J Agric Food Chem ,60,4841–4848 ,2012.
- Iserin P. Larousse des plantes médicinales, identification, préparation et soins. Editeur Larousse, 335 p,2007.
- Jamil F.F., Haq I., Sarwar N., Alam S.S., Khan J.A., Hanif M., Khan I.A., Sarwar M. et Haq M. A. Screening of ten advanced chickpea lines for blight and wilt resistance. The Nucleus, 39, 95-100,2002.
- Katan T., Shlevin E., et Katan J. Sporulation of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculum .Phytopathology, 87, 712–719,1997.
- Kolai N., Saiah F., Boudia A.Effet inhibiteur *in vitro* de l’huile essentielle d’*Artimesia herba alba* sur deux souches de *Fusarium oxysporum f. sp. radidis-lycopersici*. Algerian journal of arid environment ,2 ,71-76 ,2012.
- Koth H. W. 1000 Plantes aromatiques et médicinales. Ed Terre, 335 p,2007.
- Langley P . Why a pomegranate?. Br Med J , 321,1153-1154 ,2000.
- Leroux P .et Credet A. Document sur l’étude de l’activité des fongicide. INRA. Versailles France, 12 p,1978.
- Mabsoute L., Meskine M., Bouznad Z .et Kharrat M. Résultats des surveillances sur maladies cryptogamiques des principales légumineuses alimentaires dans le Maghreb. pp : 43-50. In: Proceeding du symposium régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires, 11-14 Novembre 1996, Rabat (Maroc). Projet Mghrébin PNUD/RAB/91/007,1996.
- Machado T.B ., Pinto A.V ., Pinto M.C.F.R ., Leal I . C. R , Silva M .G. , Amaral A.C.F, Kuster R .M. et Netto-dos Santos K.R . In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occur-ring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *S. aureus* .Int J Antimicrob Agents , 21 ,279–284 ,2003 .
- Marios J.J. et Mitchell D.J. Effect of fumigations and fungal antagonists on the relationships of inoculum density to infection incidence and disease severity in *Fusarium* crown rot of tomato. Phytopathology, 71,167–170 ,1981.
- Maslouhy.Contribution à l’étude *in vitro* et *in situ* des antagonistes de *Fusarium oxysporum* agent causal du bayoud ,Thèse doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des Marrakech, 98 p,1989 .
- Miguel M .G., Neves M .A., Antunes M.D. Pomegranate (*Punica granatum L.*) A medicinal plant with myriad biological properties – a short review. J Medic Plants Res 4 ,2836–2847,2010.

- Naz S., Siddiqi R., Ahmad S., Rasool S., Sayeed S. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum* .Journal of Food Sciences ,72, 341–345 ,2007.
- Negi P.S.et Jayaprakasha G.K . Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts .Journal of Food Sciences , 68 , 1473–147,2003.
- Onaran A. et Yılar M. Antifungal activity of *Trachystemon orientalis* L. aqueous extracts against plant pathogens. Food Agriculture and Environment, 10 ,287-291,2012.
- Ozbay N.et Newman S.E. *Fusarium* crown and root rot of tomato and control methods. Plant Pathol J , 3, 9–18 ,2004.
- Pande S .,Sharma M ., Gaur P.M., Tripathi S. , Kaur L., Basandrai A., Khan T., Gowda C.L.L. et Siddique K.H.M . Development of screening techniques and identification of new sources of resistance to *Ascochyta* blight disease of chickpea. Australasian Plant Pathol , 40, 149-156 ,2011.
- Rapilly F. Les techniques de mycologie en pathologie végétale .Ed Ann Epiphyt , 101 p,1968.
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry ,30 ,3875–3883 ,1991 .
- Serghat S ., Mouria A., Ouazzani Touhami A., Badoc A. et Douira A . effet de quelques fongicides sur le développement *in-vitro* de *Pyricularia grisea* et *Helminthosporium oryzae* .Bull Soc Pharm Bordeaux , 143 ,7-18 ,2004.
- Spichiger R.E., Savolainen V .et al. Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Ed Presses polytechniques et universitaires romandes, 413 p ,2004.
- Tabuti J.R.S., Lye K.A. et Dhillion. S.S. Traditional herbal drugs of Bulamogi,Uganda:plants, use and administration.J Ethnopharmacology ,88, 19-44 ,2003 .
- Taguri T., Tanaka T.et Kouno I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease.Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27 , 1965–1969 ,2004.