

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abou Bakr Belkaid– Tlemcen
Faculté des Sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers
Département de Biologie

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Option: Alimentation et nutrition

Thème

Contribution à l'étude phytochimique et de l'activité antioxydante des extraits de
Trigonellafoenum-graecum

Présenté par :

M^{lle} BOUGHRARA Amina

le 27 Juin 2016 devant le jury composé de

Présidente	M ^{me} LOUKIDI. B	MCA	Université de Tlemcen
Examineur	M. AZZI. R	MCA	Université de Tlemcen
Encadrant	M. RAHMOUN. M.N	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2015 /2016

Remerciements

J'exprime tout d'abord, mes profonds remerciement et louanges a DIEU tout puissant qui m'a guidé sur le droit chemin et m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à mon directeur de mémoire, **Mr RAHMOUN Mohammed Nadjib**, maitre de conférences A à l'université Abou Bekr Belkaied Tlemcen, pour sa patience, ces précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont j'ai pu bénéficier.*

*Je tiens à ma grande considération et mes sentiments de reconnaissance **M^{me} LOUKIDI N**, maitre de conférences A ou département de biologie Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen pour avoir accepté de présider le jury.*

*Monsieur **Azzi R.** maitre de conférence A au département de Biologie Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, de me vair l'honneur d'examiner ce travail*

*Je souhaite adresser un remerciement particulier à **M. FEROUANI TOUFIK** pour son aide à l'identification de la plante que nous avons étudié.*

*Je remercie également **M. Dahmani Abdelkader**, **M^{me} Amel Slimane**, **M^{lle} Lila** de nous avoir accueilli dans leur laboratoire pour leur esprit, et aussi pour leur aide précieuse.*

Mes sentiments de reconnaissance et de remerciements vont également à l'encontre de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail a mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encourage et leur soutien tout le long de mes études, que DIEU les bénisse.

A mes deux frères

A toute ma famille

A tous mes amis (es).

A tous ceux dont l'amitié sincère et agréable

A tous mes professeurs

A toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Résumé

Le présent travail a été réalisé dans le cadre d'évaluer l'activité antiradicalaire des graines de la plante *Trigonella foenum-graecum*.

Les tests phytochimiques réalisés lors de cette étude révèlent la présence de tanins, Térpénoïdes, et saponines avec l'absence des alcaloïdes et coumarines.

Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux et des tanins nous a permis de constater que les polyphénols et tanins sont présentes dans l'extrait méthanol/eau de *Trigonella foenum-graecum* à un taux le plus élevé 89,89 µg EAG/mg d'extrait et 165,47 µg EC/mg d'extrait respectivement. Alors pour les flavonoïdes totaux l'extrait de *Trigonella foenum-graecum* présente à une faible teneur dans le méthanol/eau 86,89 µg EC/mg d'extrait et une basse teneur dans l'extrait chloroforme 32 µg EC/mg d'extrait.

Le pouvoir antiradicalaire, a été mesuré à l'aide de la méthode de DPPH, et les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique à une valeur $CI_{50} = 0.012$ mg/ml Cette valeur plus basse que celle obtenue avec l'acide ascorbique $IC_{50} = 0,1$ mg/mL, alors que le chloroforme a une valeur $IC_{50} = 5,31$ mg/mL Cette valeur très élevée que celle obtenue avec l'acide ascorbique $IC_{50} = 0,1$ µg/mL.

Mots clé : *Trigonella foenum-graecum*, polyphénols, flavonoïdes, tanins, activité antiradicalaire, DPPH.

Abstract

The present work has been carried out in the framework to assess the activity antiradical of seeds of the Plant *Trigonella foenum-graecum*.

The phytochemical tests carried out during this study reveal the presence of tannins, Térpénoïdes, and saponins with the absence of the alkaloids and coumarins.

The dosage of polyphenols and flavonoids totals and tannins has allowed us to see that the polyphenols and tannins are present in the extract methanol/water of *Trigonella foenum-graecum* at a rate The higher 89,89 µg GAT/mg of extract and 165,47 µg EC/mg of extract respectively. Then for the total flavonoids the extract of *Trigonella foenum-graecum* present at a low content in the methanol/water 86,89 µg EC/mg of extract and a low content in the extract Chloroform 32 µg EC/mg of extract.

The antiradical power, has been measured using the method of DPPH and the results obtained show that the methanolic extract to a value $IC_{50} = 0.012$ mg/ml This value lower than that obtained with the ascorbic acid $IC_{50} = 0.1$ mg/mL, while chloroform has an IC_{50} value = 5.31 mg/mL this value very high than that obtained with the acid ascorbique $IC_{50} = 0.1$ mg/mL.

Key words: *Trigonella foenum-graecum*, polyphenols, flavonoids, tannins, ANTIRADICAL ACTIVITY, DPPH..

ملخص

يتم تنفيذ العمل في إطار تقييم النشاط المضاد للأكسدة لنبتة *Trigonella foenum-graecum*

كمية الفينولات , الفلافونويد , والتانا تم اظهارها عن طريق طريق فولين-Ciocalteu وثلاثي كلوريد الألومنيوم.النشاط المضاد للأكسدة تمت دراسته بواسطة تثبيط الجدر الحر DPPH.

من خلال التجارب الكيمائية النباتية تمكنا من اثبات وجود التانا , سبونين, تربانويدات ,مع غياب,الكلويد و الكوماغين

تم تحديد الفينولات الكلية و الفلافونويد و التانا فأثبتنا ان مستخلص *Trigonella foenum-graecum* تحتوي على نسبة كبيرة من الفينولات و الطانا و التي تقدر ب 89,89 ميكروغرام من معامل حمض الغاليك /غ) و 165,47 (ميكروغرام من معامل حمض الكاتيشين /غ) على الترتيب , اما الفلافونيدات فتوجد بكمية قليلة (32ميكروغرام من معامل حمض الكاتيشين /غ .)

في ما يخص النشاط المضادة للأكسدة لمستخلص *الميثانوليك قد سجلنا* قيمة تقدر بنسبة 0.012 ميلي غرام /ملل و هي قيمة صغيرة مقارنة مع حمض الاسكوربيك و الذي يقدر بنسبة (0.1 ميلي غرام /ملل), اما مستخلص الكلورفورم قد سجلنا قيمة تقدر بنسبة (5,31 ميلي غرام /ملل) قيمة كبيرة جدا مقارنة مع حمض الاسكوربيك و الذي يقدر بنسبة (0.1 ميلي غرام /ملل).

الكلمات المفتاحية : دراسة فيتوكيمائية , الفلافونويدات , تانا, الكلويد, سبونين, تربانويدات , النشاط المضاد للاكسدة

Liste des abréviations

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

Eq : équivalent

Rdt : rendement

ERO : espèces radicalaires oxygénées

OMS : organisation mondiale de la santé

IPP: Isopentenyl Pyrophosphate

DMAPP: Diméthylallyl Pyrophosphate

BHA : butylhydroxyanisole

CAT : capacité antioxydante totale

ABTS : piégeage du radical hydroxyle

PT : Polyphénols totaux

Liste des figures

Figure 01 : structure de quelques composés phénoliques	6
Figure 02 : structure de quelques alcaloïdes	7
Figure 03 : Structure des isoprénoïdes (Terpénoïdes)	7
Figure 04 : Déséquilibre de la balance entre les oxydants et les antioxydants.....	8
Figure 05 : régulation des ERO par les antioxydants	11
Figure 06 : Forme libre et réduite du DPPH.....	20
Figure 07 : Rendements des extraits chloroformique et méthanol/eau.....	22
Figure 1 : Courbe d'étalonnage l'acide gallique.....	24
Figure 09 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	25
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.....	26
Figure 11 : réduction du DPPH par l'acide ascorbique	28
Figure 12 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH● en fonction des différentes concentrations utilisées de l'extrait méthanol/eau de l'espèce <i>Trigonella foenum-graecum</i>	28
Figure 13 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH● en fonction des différentes concentrations utilisées de l'extrait chloroforme de l'espèce <i>Trigonella foenum-graecum</i>	29

Liste des tableaux

Tableau 01: Les principales classes de composés phénoliques.....	5
Tableau 02 : caractéristiques physiques et nutritionnelles moyenne pour 100g de graines de fenugrec.....	15
Tableau03 : Caractéristiques des extraits du fenugrec	22
Tableau 04 : Screening phytochimique des extraits <i>Trigonellafoenum-graecum</i>	23
Tableau 05 : Teneurs en composés phénoliques dans les deux extraits.....	27

Table de matière

Introduction

Partie bibliographique

CHAPITRE 1 : plantes médicinales et métabolites secondaires

1. Plantes médicinales	3
2. Les métabolites secondaires	3
2.1 Les composés phénoliques.....	4
2.2 Les alcaloïdes: (les composés azotés).....	6
2.3 Les isoprénoïdes : (stéroïdes, terpénoïdes)	7

CHAPITRE 2 : les oxydants et les antioxydants

1. Les radicaux libres ou espèces réactives oxygénées.....	9
2. Oxydants.....	9
3. Antioxydant.....	9
4. Les sources d'antioxydants.....	10
4.1. Les antioxydants synthétiques.....	10
4.2. Les antioxydants naturels.....	10
4.3. La vitamine E ou tocophérol.....	10
4.4. La vitamine C ou acide ascorbique.....	10
4.5. Les caroténoïdes	10
5. Les composés phénoliques.....	10
6. Systèmes de défenses antioxydants.....	11

CHAPITRE 3 : plantes et antioxydants

CHAPITRE 4 : Plante étudié

1. Taxonomie	13
2. Description botanique.....	13
3. Phytochime.....	14
4. Pharmacologie.....	14
5. Nutrition.....	15

Matériel et Méthode

1. Matériel

1.1 Matériel végétal.....	16
---------------------------	----

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits du <i>Trigonellafoenum-graecum</i>	16
2.2. Tests phytochimiques.....	16
2.2.1. Les alcaloïdes	17
2.2.2. Les composés polyphénoliques.....	17
▪ Tanins.....	17
▪ Flavonoïdes.....	17
▪ Coumarines.....	17
▪ Trapénoïdes.....	17
▪ Saponosides.....	18
2.3. Dosage des composés phénoliques.....	18
a. Polyphénols totaux.....	18
b. Flavonoïdes totaux.....	19
c. Tanins condensés.....	19

2 .4. Piégeage du radical DPPH'	20
<i>Résultat et interprétation</i>	
1. Rendements en extraits	22
2. Tests phytochimiques	23
3. Teneurs en composés phénoliques	24
3. 1. Le dosage de polyphénol	24
3. 2. Dosage des flavonoïdes	24
3. 3. Dosage des tanins	25
Evaluation de l'activité antiradicalaire : Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)	27
Discussion	30
Conclusion	33
Références bibliographiques	34
Annexe	35

Introduction

Introduction

L'être humain a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs datant du XIX^{ème} siècle, en améliorant la connaissance des structures, a fait permis progressivement le remplacement de la phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue. Cette thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi de végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à une molécule type (**Bahorun, 1997**).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie...etc. Parmi ces composés nous retrouvons dans une grande mesure des molécules bioactives qui sont surtout utilisées en thérapeutique. Dernièrement, l'industrie pharmaceutique utilise une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche expérimentale travail toujours sur de nouvelles molécules bioactives pour être utilisées telles qu'elles ou destinées pour la semi-synthèse (**Bahorun, 1997**).

Les végétaux supérieurs ont la capacité de synthétiser, par des voies métaboliques complexes des métabolites dits secondaires. Ces composés sont utilisés par les plantes pour diverses fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir (**Thomas, 2011**).

Ces métabolites sont divisés en trois classes, les polyphénols, les alcaloïdes et les trapénoïdes. De nombreuses études ont prouvé la bioactivité de ces molécules, citant les activités antitumorale, antivirale, antimicrobienne, antioxydant, anti-inflammatoire.....etc. Ces diverses bioactivités font d'eux des molécules capables d'être utilisées dans diverses domaines thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires (**Thomas, 2011 ; Rispaïl et al., 2005**).

En Algérie, l'industrie pharmaceutique, également les biologistes et les chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi les principes actifs sont étudiés depuis une vingtaine d'années (**Djebaili, 1984, Bouattoura, 1988, Maizak et al., 1993**).

Le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum L.*) est une espèce annuelle appartenant de la famille des fabacées. Il se trouve partout dans le monde, mais il est d'origine méditerranéen. Cette

Introduction

plante est connue par ses propriétés médicinales, thérapeutiques et nutritionnelles très importantes vu les utilisations traditionnelles et les activités pharmacologiques des composés phytochimiques présents dans les extraits des graines de cette plante. Ceci nous a poussés à rechercher la composition chimique en composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antiradicalaire du fenugrec Algérien

Partie bibliographique

Chapitre 1 : plantes médicinales et métabolites secondaires

1- Plantes médicinales

L'appellation plantes médicinales, se dit des nombreuses espèces végétales qui sont réputées pour être utilisées comme curatives sous différentes formes : poudre, extraits, teintures, infusion ou décoctions. Les plantes médicinales contiennent une infinité de principes actifs dont la nature et les propriétés sont mieux connues. Les plantes médicinales sont parfois récoltées à l'état sauvage mais beaucoup d'entre elles sont cultivées à grande échelle (Digitale, Pavot, Chanvre, etc.) pour répondre à la consommation. Les méthodes de sélection ou de manipulation génétiques sont également utilisées pour augmenter leur teneur en principes actifs. Certaines familles sont particulièrement riches en principes actifs (Papavéracées, Apocynacées, Liliacées, Rubiacées, Solanacées, Lamiacées). Certaines plantes sont inoffensives telles que la Camomille, la Menthe, etc. D'autres, très nombreuses, sont toxiques et ne doivent être utilisées que sous forme pharmaceutique, telle que la Digitale, la Belladone, le Colchique, etc. L'emploi inconsidéré de plantes cueillies dans les champs peut aboutir à des intoxications graves, voire mortelles (**Marouf et Reynaud, 2007**).

Il est aujourd'hui largement reconnu que le monde végétal avec ses 350000 espèces répertoriées représente un réservoir unique de molécules aux vertus thérapeutiques. Les plantes forment une source inépuisable de substances biochimiques qui procurent des propriétés curatives appréciables et qu'aucune chimie ne peut nous offrir. Ainsi, plus de 252 médicaments considérés comme essentiels par l'OMS, 11% sont exclusivement produits à partir des plantes médicinales. Malgré le développement de la médecine moderne, les plantes médicinales trouvent encore leurs indications thérapeutiques dans le traitement d'une multitude d'affections. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) en 2008, plus de 80% de la population mondiale dépend de la médecine traditionnelle pour leurs besoins en matière de soins et de santé primaires (**Eddouks et al., 2007; Boulanouar et al., 2013**).

2. Les métabolites secondaires :

Kossel, en 1891 est le premier à employer le terme de 'métabolite secondaire' qu'il définit alors en ses termes: « alors que les métabolites primaires existent dans toutes les cellules végétales capables de se diviser, les métabolites secondaires ne sont présents que de façon 'accidentelle' et ne sont pas essentiels à la vie de la plante ». Kossel a par la suite établi une distinction entre ces deux types de métabolites, toujours valable aujourd'hui. Les métabolites primaires sont des composés de faible poids moléculaire, communs à toutes les

plantes. Il en existe quelques centaines; tels les acides aminés ou les acides nucléiques. En revanche plusieurs dizaines de milliers de métabolites secondaires ont pu être identifiés, et s'avèrent spécifiques d'une famille, voire d'une espèce de plante

Les métabolites secondaires sont donc des composés biosynthétisés naturellement par les végétaux, mais qui ne participent pas directement au métabolisme végétal. Ils peuvent être spécifiques aux ordres, aux familles, aux espèces, et parfois même aux taxa (**Laitinen et al., 2000**).

Les métabolites secondaires dépassant actuellement 200000 substances identifiées et appartiennent à 3 classes principales : les composés phénoliques, les alcaloïdes (ou composés azotés) et les terpènes (**Vermerris et Nicholson, 2006**)

2.1 Les composés phénoliques :

Les polyphénols (**Figure 01**) constituent un groupe largement distribué des substances dans le règne des végétaux. Avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante, ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales, la voie de shikimate et d'acétate (**Hopkins, 2003**)

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées). Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) (**Herbert, 1989; Macheix et al., 2005; Beta et al., 2005**).

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant de simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches. (**Tableau 01**)

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques. Ils interviennent dans la qualité alimentaire et sont impliqués lorsque la plante est soumise à des agressions mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Bahorun, 1997**).

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (**Babar et al, 2007**), anti-allergènes, vasodilatateurs (**Falleh et al, 2008**) et antioxydants (**Gomez et al, 2006**).

Partie bibliographique

Tableau 01: Les principales classes de composés phénoliques (**Harborne, 1980**)

Squelette carboné	Classe	exemple	origine
C6	Phénols simples	Catéchol	
C6 - C1	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C6 - C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique, Scopolétine, esculétine	Citrus Citrus
C6 – C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6 –C2 – C6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C6 –C3 – C6	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Déidzéine	Fruits,légumes, fleurs Fleure, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C6 – C3)2	Lingnanes	Pinorésinol	Pin
(C6 – C3) n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C15) n	Tannins		Raisin rouge, Kaki

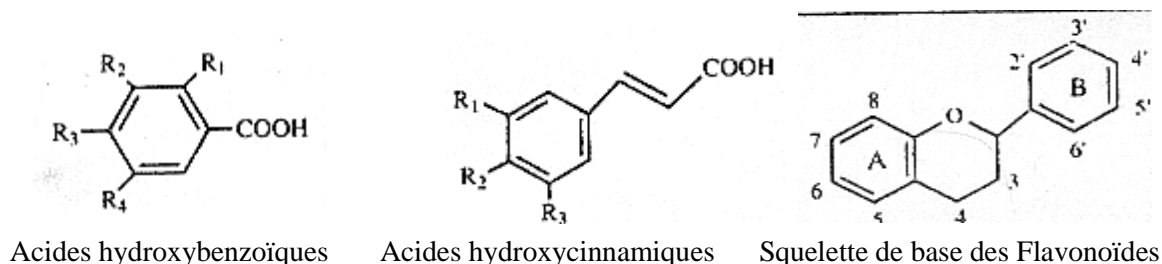


Figure 01 : structure de quelques composés phénoliques

2.2 Les alcaloïdes: (les composés azotés)

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Depuis l'identification du premier alcaloïde - à savoir la morphine - à partir de l'opium en 1806 (**Harborne *et al.*, 1995**), plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés des plantes (**Hesse, 2002**) . .

Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce de la plante, ils s'accumulent uniquement dans les écorces, dans les racines, dans les feuilles ou dans les fruits provoquent chez l'homme diverses réponses physiologiques par ce qu'ils interfèrent avec les neurotransmetteurs. A fortes dose la plupart des alcaloïdes sont très toxique par contre à faible dose ils peuvent avoir une valeur thérapeutique. De la préhistoire jusqu'à nos jours, les alcaloïdes ou des extraits qui en renferment ont été utilisés comme médicaments relaxants musculaires, analgésique et tranquillisants (**Hopkins, 2003**)

Chez les plantes, les alcaloïdes assurent la protection contre les agressions extérieures (Parasites, lumière et prédateurs) alors que chez les animaux nous les retrouvons surtout sous forme de phéromones, composés défensifs (insectes), poison (arachnides) ou des molécules de communication (mammifères). L'homme les utilisent sous forme de poisons (chasse, euthanasie, meurtre), drogues (morphine, cocaïne, caféine, ...) ou remèdes médicinaux (médecines traditionnelles).

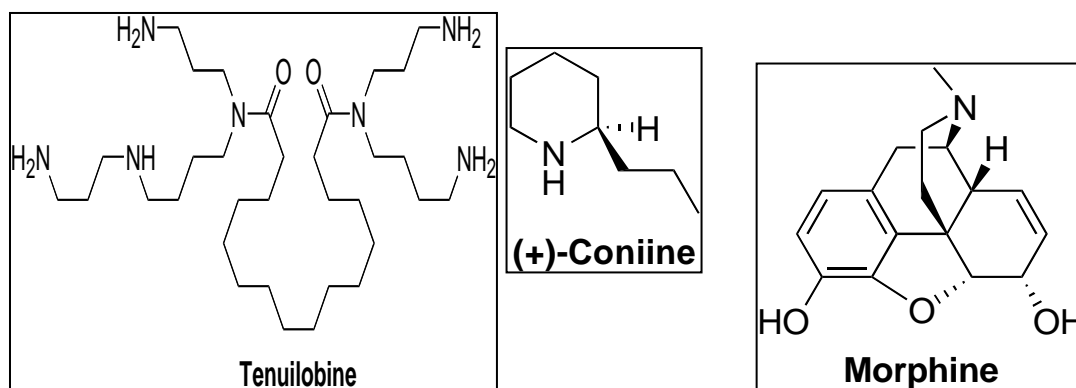


Figure 02: structure de quelques alcaloïdes

2.3 Les isoprénoïdes : (stéroïdes, térapénoïdes) :

Les terpènes (figure 03) sont classés en fonction du nombre d'unités d'isoprènes à cinq atomes de carbone dont ils sont issus (**Harborne, 1998**)

Ils sont présents dans tous les organismes vivants et sont spécialement abondants et divers chez les plantes avec plus de 30 000 composés rapportés aujourd'hui (**Chappell, 1995, 2002 ; McGarvey et Croteau, 1995 ; Sacchetti et Poulter, 1997 ; Croteau et al., 2000**). Les isoprénoïdes forment un groupe de métabolites variés du point de vue fonctionnel et structural. Malgré leur diversité, tous les isoprénoïdes dérivent d'une unité à 5 carbones l'isopentényl diphosphate (IPP) (ou unité isoprène) et de son isomère, le diméthylallyl diphosphate (DMAPP). Cette grande famille est divisée en différents groupes de molécules

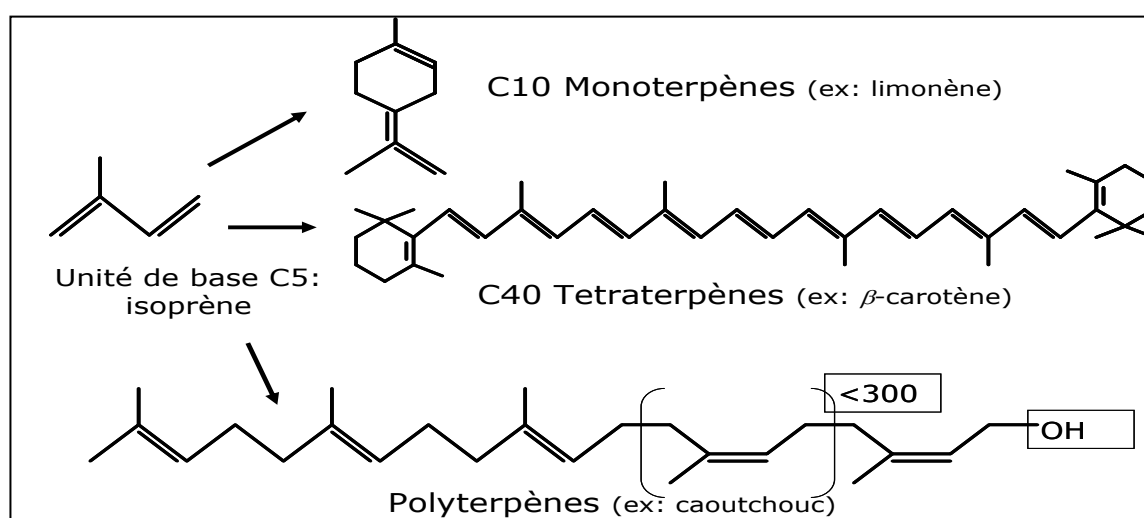


Figure 03: Structure des isoprénoïdes (Terpénoïdes)

Chapitre 2 : les oxydants et les antioxydants

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants (**Pincemail *et al.*, 1999**) en faveur des premiers et impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)(**Sies, 1991 ; Pelletier *et al.*, 2004**).

La formation incontrôlée d'espèces réactives de l'oxygène comme l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle (OH°) aura la conséquence souvent lourde pour l'organisme. La formation d'espèces réactives n'est pas toujours synonyme de toxicité. En effet, certaines sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux. Ce n'est que lorsque les systèmes de défense sont dépassés et ne suffisent plus à neutraliser la surproduction de ces espèces que la toxicité apparaît.

Un stress oxydatif pourra être induit lors de la surproduction d'espèces réactives et /ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement, soit par défaut de synthèse. Parmi les espèces réactives de l'oxygène, le radical hydroxyle, présenté comme le plus toxique malgré sa faible diffusion, peut attaquer tous les types de constituants cellulaires et engendrer diverses altérations (dégradation protéique, inactivation enzymatique, lipoperoxydation, adduits à l'ADN, etc...). Il résulte de la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène (**Pelletier *et al.*, 2004**)

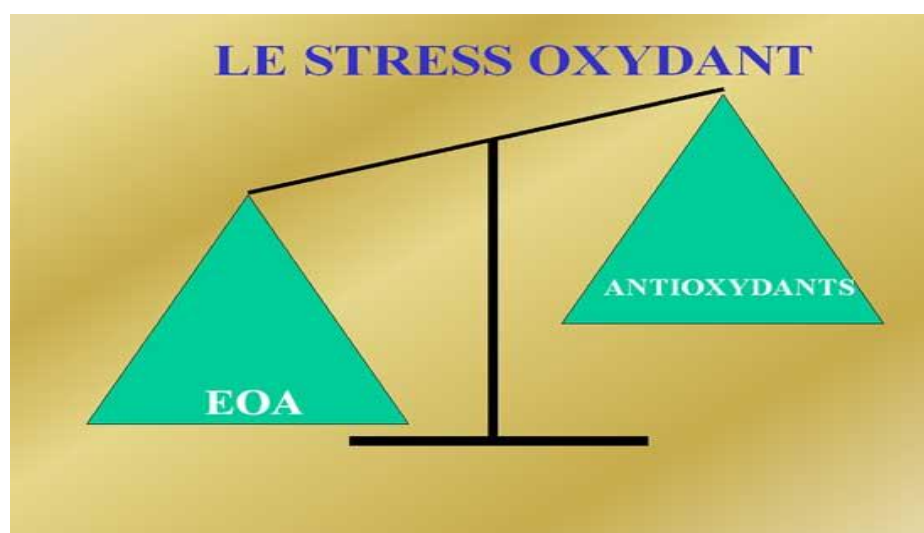


Figure 4 : Déséquilibre de la balance entre les oxydants et les antioxydants

Partie bibliographique

1. Les radicaux libres ou espèces réactives oxygénées :

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres qui interviennent ont une propriété caractéristique commune, celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ceci lui confère la dénomination de radicaux libres «centrés» sur l'oxygène, les oxyradicaux ou espèces radicalaire dérivées de l'oxygène peuvent avoir différentes structures (**Delattre et al, 2005**).

C'est au cours de la combustion des aliments absorbés par l'organisme que sont produit un certain type de déchets d'oxygène les radicaux libres. Ceux-ci sont donc parfaitement naturels. Ils participent d'ailleurs à la réponse immunitaire de l'organisme en aidant à tuer les bactéries pathogènes, les virus et les cellules défailantes ou vieillissantes. Mais ils peuvent également être nocifs. En effet, l'organisme en vieillissant, les radicaux libres entraînent un stress oxydatif caractérisé par des électrons célibataires très réactifs. De plus, à ce phénomène interne s'ajoutent des facteurs extérieurs aggravants, comme la pollution, la fumée de cigarettes et les UV (**Loin, 2008**).

2. Oxydants

L'appellation «dérivés réactifs de l'oxygène» n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), radical hydroxyl ($\bullet OH$), monoxyde d'azote ($NO\bullet$), etc, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est moins importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$) (**Novelli, 1997**). Un radical libre est une entité chimique contenant un électron non apparié. Ce radical n'est que transitoire et est comblé, soit par l'acceptation d'un électron, soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule.

3. Antioxydants

Un antioxydant est définis comme toute substance qui à faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat (**Pastre et Priymenko, 2007**).

Les antioxydants piègent les radicaux libres en inhibant les réactions à l'intérieur des cellules provoquées par les molécules de dioxygène et de peroxyde, aussi appelées espèces radicalaires oxygénées (ERO) et espèces azotées radicalaires (**Brook, 2005**).

Les antioxydants sont largement présents dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire (**Tanguy et al., 2009**).

4. Les sources d'antioxydants

4.1. Les antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (**Lisu et al., 2003**). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (**Yu et al, 2000**). En effet, le butylhydroxyanisole(BHA) convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques (**Barlow, 1990**).

4.2. Les antioxydants naturels :

Ils sont présents dans l'alimentation tels que les vitamines A, C, E et les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes.

a. La vitamine E ou tocophérol :

Prévient la peroxydation des lipides membranaires in vivo en capturant les radicaux peroxydes. Elle est présente dans les huiles végétales, les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes (**Ahamet, 2003**)

b. La vitamine C ou acide ascorbique :

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E. Il est présent dans les légumes, le chou, le poivron, les agrumes. (**Colette, 2003**).

c. Les caroténoïdes :

Ce sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules notamment le lycopène et le bêta-carotène, précurseurs de la vitamine A. Ils sont présents dans les carottes, les fruits rouge et jaunes, les légumes verts et les tomates (**Marc et al, 2004**). Le rôle biologique des caroténoïdes est, entre autre, complémentaire de celui de la vitamine E, elle-même régénérée par la vitamine C, d'où l'intérêt de consommer une alimentation équilibrée, riche en fruits et légumes variés pour bénéficier des nombreux effets de synergie entre micronutriments (**Miller et al, 1996**).

5. Les composées phénoliques

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydants et ainsi leur implication probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant. Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication

dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardio-vasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires (Rock, 2003).

6. Systèmes de défenses Antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (Figure 05). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997)

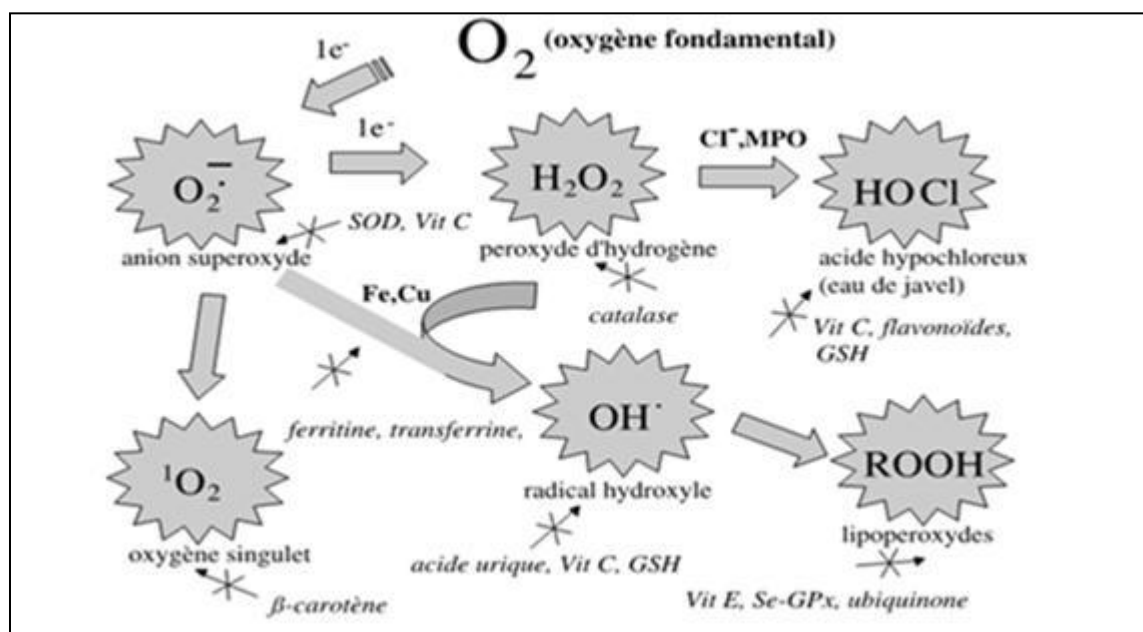


Figure 05 : régulation des ERO par les antioxydants (pincemail *et al.*, 2002)

Chapitre 3 : plantes et antioxydants

Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faibles concentrations par rapport aux substrats oxydables, retardent ou stoppent le processus d'oxydation. La capacité antioxydante de molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante, *in vitro*, des extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux.

Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs, par transfert d'atome d'hydrogène ou par transfert d'électron. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physico-chimiques des molécules, il est recommandé d'utiliser plusieurs tests pour confirmer une activité antioxydante (**Prior et al., 2005**).

De nombreuses plantes aromatiques ou médicinales, renferment ces substances antioxydantes (**Bravo, 1998 ; Anderson et al., 2001**). Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices qui ont une capacité antioxydante non négligeable, parfois même plus élevée que celle de certains fruits et légumes et qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant (**Mata et al., 2007**). Plusieurs plantes sont connues pour leur richesse en antioxydants comme *Myrtus communis* (**Gardeli et al., 2008**), *Cinnamomum Cassia* (**Mancini-filho et al., 1998**), *Nigella sativa* (**Burits et Bucar, 2000**), *Berberis vulgaris* (**Zovko Cončić et al., 2010**).

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer l'activité antioxydante dont nous citons : la capacité antioxydante totale (CAT), le pouvoir réducteur du fer, le piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]), le piégeage du radical l'acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS^{•+}), le piégeage du radical hydroxyle (•OH), le piégeage de l'anion superoxyde (•O₂⁻), le piégeage d'oxygène singulet (¹O₂), le blanchiment du β-carotène et le pouvoir chélateur des ions ferriques

Chapitre 4 : Plante d'étude

Le fenugrec compte parmi les plus anciennes plantes médicinales et culinaires. C'est une plante annuelle, herbacée, de la famille des Fabaceae. Cette famille a été la deuxième grande famille des plantes fleurissantes avec 650 genres et 18000 espèces (Singh et al, 2008). Le fenugrec, du nom arabe l'helba [1] porte le nom botanique *Trigonella foenum-graecum*. Elle est aussi appelée Trigonelle, sénégrain, trigonelle fenugrec, etc. Le fenugrec est distribué dans la plupart des régions du monde Europe, Afrique du nord, Asie, Argentine, Canada, Amérique, Australie (Ionescu et Roman., 2013). Il a une activité antioxydant, antibactérienne, et est connu par les affects hypoglycémiant, hypocholestérolémie, et anti-inflammatoire (Moradi Kor et al, 2013). Son usage est très recommandé, généralement en cas de manque d'appétit (Harchane et al, 2012) et dans les préparations des aliments. La graine de Fenugrec concentre d'importants composants essentiels pour la santé. En effet, elle est une source inestimable d'alcaloïdes dont la trigonelline. Elle contient également des saponines, des diosgénines et des flavonoïdes.

1. Taxonomie (inpn, 2015)

Règne : Plantae

Sous-Règne : Trachiobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Trigonilla*

Espèce : *Trigonella foenum graecum L.*

2. Description botanique:

C'est une plante herbacée annuelle de 40 à 60 cm de haut, à feuille aromatiques longuement pétiolées comportant trois folioles. Ses fleurs groupées en petites boules, sont de couleur blanc crème. Ses fruits sont contenus dans de longues et minces gousses arquées renfermant 10 à 20 graines très dures, anguleuses et de couleur brun-clair.

3. Phytochimie

Les données de la chimie ont montré que les graines contiennent des protides, une huile riche en acides gras insaturés et en phytostérols, des glucides, des saponosides stéroïdiques, des alcaloïdes dont la trigonelline, une huile essentielle responsable de l'odeur de la plante, du mucilage, des glucides, des vitamines (A, B1 et C), du phosphore, du chrome et du calcium. Les caractéristiques physiques et nutritionnelles moyenne pour 100 g de graines de fenugrec figurent dans le **tableau 2.**(**Billaud C et al., 2001 ; Skalli S, 2006**).

4. Pharmacologie

Les graines de fenugrec sont constituées de près de 50% de fibres dont 20% de mucilage. Un certain nombre d'études indiquent qu'elles diminuent la glycémie à jeun et postprandiale chez des patients diabétiques. Dans une étude en double aveugle conduite durant deux mois portant sur 25 sujets présentant un diabète de type II, la prise quotidienne de 1 g de graines de fenugrec a significativement amélioré certaines mesures de glycémie et la réponse à l'insuline . (**Gupta A, 2001; Maletić R et al ., 2007; Nutranews, 2004**).

Lors des études expérimentales et cliniques, les graines de fenugrec ont révélé des propriétés anticholestérolémiantes, hypoglycémiantes (**Ali L et al ., 1995; Baquer NZ et al ., 2011; Petit P et al., 1995; Xue WL et., al 2007**) , stimulante neuromusculaire (**Lejoly J, Université libre de Bruxelles**) et du métabolisme général, orexigène, tonifiante, stimulante de la digestion, favorisant la prise de poids (**Harchane H et al. 2012**) , apaisante en cas de fièvre, hypolipidémiantes (**Chevassus H et al ., 2007**), combattant l'anémie grâce au fer, combattant la frigidité et l'impuissance. Elles se sont également avérées efficaces pour stimuler l'appétit et la sécrétion d'insuline (**Brochard F 2013**).

Partie bibliographique

Tableau 02 : caractéristiques physiques et nutritionnelles moyenne pour 100g de graines de fenugrec (**la nutrition. Fr**)

Energie (kCal)	323 kCal
Protéines	23 g
Lipides	6.41 g
Glucides	58.35 g
Fibres	24.6 g
Eau	8.84 g
Alcool	0 g
Cendres	3.4 g

5. Nutrition

Souvent utilisé dans la cuisine orientale, le fénugrec entre dans la fabrication de mélange d'épices aromatiques, sous différents noms, comme le ras-el-hanout marocain. Le fenugrec peut aussi être incorporé au pain comme en Egypte et en Ethiopie. Dans des pays où la malnutrition est endémique, le fenugrec agit aussi en tant qu'inhibiteur de l'absorption du fer, pouvant entraîner des anémies alors que l'apport en fer est adéquat. La partie la plus utilisée est la graine. Quant aux jeunes feuilles, de saveur amère, elles sont mangées en salade.

Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Elle comporte deux parties :

Partie I : Extraction du matériel végétal à partir des graines de la plante et l'analyse phytochimique des extraits.

Partie II : évaluation de l'activité antiradicalaire des extraits par la méthode de DPPH

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Les graines de la plante de fenugrec (الحلبة) ont été récoltées à partir de la région d'Oulhaça, commune située à l'ouest de la wilaya d'Aïn-Témouchent (Algérie), au cours mois de Décembre 2015. Elles ont été séchées et conservées à température ambiante à l'abri de la lumière jusqu'au jour de leur utilisation.

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits du fenugrec (méthode de macération pendant 24heurs)

Les graines séchées ont été broyées finement le jour même de l'extraction. 25 g de la matière végétale a été mise en contact avec 100 ml de deux solvants différents : le chloroforme et le méthanol/eau à 70/ 30 (v/v).

Les extraits obtenus ont été filtrés (papier filtre wattman N° 3) puis évaporés à sec dans un rotavapor type HEIDOLPH. Les extraits bruts sont solubilisés dans le DMSO et conservés à 4°C. Le rendement est calculé par la formule suivante:

$$\text{rendement}\% = \frac{m_0}{m_1} \times 100$$

m_0 : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé ;

m_1 : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

2.2. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques qualitatifs permettent de détecter différentes familles chimiques présentes dans un extrait végétal par des réactions de coloration, de précipitation et d'observations sous lumière ultra-violette. Les techniques de caractérisation qualitatives,

utilisées au cours de cette étude sont celles décrites par **Trease et Evans, (1989) et Harborne (1998)**.

Les résultats obtenus ont été évalués comme suit :

+ : présence des composés; - : absence des composés.

2. 2. 1. Les alcaloïdes

Pour s'assurer de la fiabilité des résultats, deux types de réactifs de test d'alcaloïdes ont été utilisés en parallèle Mayer et Wagner. Pour le premier test, un volume de 0,5 mL du réactif de Mayer a été mis en contact avec 0,5 mL de chaque extrait. Pour le deuxième test un volume de 0,5 mL de chaque extrait a été mélangé avec 0.5 mL de réactif de Wagner.

La formation d'un précipité blanc ou brun, dans les deux essais, indique la présence des alcaloïdes. Ce test a été répété trois fois.

2. 2. 2. Les composés polyphénoliques

▪ **Tanins**

2 ml de chaque extrait a été ajouté à 0,5 ml de FeCl₃ (1 %). La présence des tanins a été dévoilée par l'apparition d'une coloration verdâtre ou bleu-noir après incubation pendant 15 min à température ambiante.

▪ **Flavonoïdes**

Dans un tube à essai, 1 ml d'HCl concentré a été mis en contact avec 1 mL de l'extrait, en suite 3 copeaux de Magnésium ont été ajouté à pour chaque tube. La présence de flavonoïdes a été révélée par l'apparition de coloration : rouge, orange ou rose.

▪ **Coumarines**

1mL de l'extrait a été gardé comme témoin et 1 mL a été mis en contact avec 0,1 mL de NH₄OH (10%). Ensuite a partir de chaque préparation une tache a été mise sur un papier filters et examinée sous la lumière UV. Leur présence est révélée par une fluorescence intense.

▪ **Téropénoïdes**

La présence des téropénoïdes a été réalisée par l'ajout de 0.4 mL du chloroforme et 0.6 mL d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 1 mL d'extrait. Le test positif est indiqué par l'apparition de deux phases et une couleur marron à l'interphase.

Matériel et méthodes

Test de Libermann-Burchard : 0,1 mL anhydre acétique et 0,1 mL de H₂SO₄ ont été ajoutés à 1 mL d'extrait. Après incubation de 15 min, leur présence est indiquée par la couleur mauve, verte ou violette.

▪ Saponosides

10 mL de chaque extrait a été agité pendant 15 secondes, puis laisser au repos pendant 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1cm indique la présence des saponosides.

- pas de mousse = test négatif
- mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- mousse de 1-2 cm = test positif
- mousse plus de 2 cm = test très positif

2.3. Dosage des composés phénoliques

a. Polyphénols totaux

Le réactif utilisé est le Folin-Ciocalteu, qui est un mélange de complexes de l'acides phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ceréactif. Elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleurbleu qui absorbe à 760 nm.

Le dosage de Polyphénols totaux (PT) a été effectué par la comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue (**Vermerris *et al.*, 2006**). Ce dosage a été réalisé selon la méthode décrite par Dewanto *et al.* (2002). Une prise de 125 µl d'extrait convenablement dilué a été mise dans un tube en présence de 500 µl d'eau distillée et de 125 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Ensuite 1250 µl d'une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7% ont été ajoutés et le mélange a été ajusté à 3 ml avec de l'eau distillée. Le tube a été placé au repos pendant 90 mn à température ambiante et à l'obscurité, ensuite l'absorbance a été mesurée à 760 nm.

La courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à des concentrations allant de 0 à 400 µg/ ml. Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (µg EAG/ g d'extrait).

b. Flavonoïdes totaux

Les réactifs utilisés sont les solutions incolores de nitrite de sodium (NaNO_2) et de chlorure d'aluminium (AlCl_3). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs. Elle entraîne la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510 nm.

La comparaison de l'absorbance observée par rapport à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes (Flv). La quantification des flavonoïdes a été faite selon une méthode spectrophotométrique décrite par **Dewanto *et al.*, (2002)**.

Une prise de 250 μl d'extrait diluée a été additionnée à 75 μl d'une solution de NaNO_2 à 7%. Après 6 mn d'incubation à température ambiante, 150 μl d'une solution d' AlCl_3 (10%) ont été ajoutés au mélange. Après 5 mn de repos, 500 μl de soude (1M) ont été apportés au mélange, le volume final a été ajusté à 2500 μl avec de l'eau distillée. L'absorbance de cette préparation a été mesurée à 510 nm.

La courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à des concentrations allant de 0 à 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait ($\mu\text{g EC}/\text{g d'extrait}$).

C. Tanins condensés

En présence d'acide sulfurique, les tanins condensés se dépolymérisent. par réaction avec la vanilline, les tanins dépolymérisés se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, mesurables par spectrophotométrie à 500 nm (**Sun et al., 1998**).

Une prise de 50 μl d'extrait convenablement dilué est ajoutée à 3 ml de vanilline à 4% et 1,5 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). Le mélange a été mis en incubation à température ambiante pendant 15 minutes. L'absorbance de cette préparation a été mesurée à 500 nm.

La courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à des concentrations de 0 à 400 allant de $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les teneurs en tanins condensés sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait ($\mu\text{g EC}/\text{g d'extrait}$).

2.4. Piégeage du radical DPPH

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH●) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydant en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. A température ambiante, le radical DPPH présente, en solution alcoolique, une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons. Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (Masuda *et al.*, 1999).

L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Benariba *et al.* (2013).

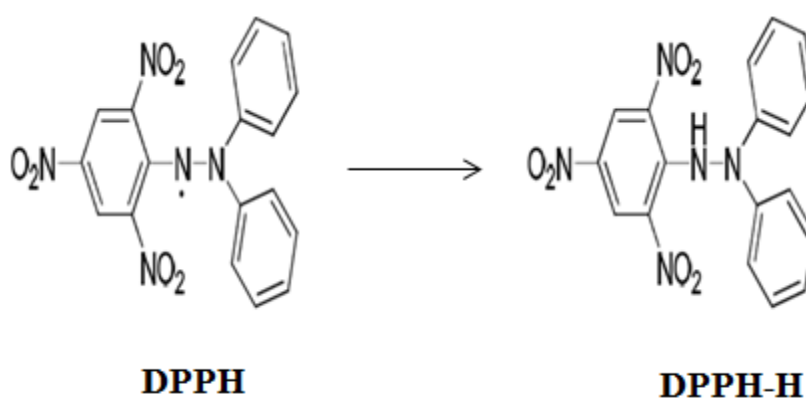


Figure 06: Forme libre et réduite du DPPH.

Mode opératoire :

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait a été ajouté à 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH (0,025 g/ L) fraîchement préparée. Le contrôle négatif, a été préparé en parallèle en utilisant 50 µl du méthanol avec 1950 µl au lieu de l'extrait. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances a été effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le calcul des pourcentages d'inhibition a été fait selon la formule suivante :

$$I \% = \left(\frac{Ac - At}{Ac} \right) \times 100$$

Matériel et méthodes

Ac : absorbance du contrôle ;

At : absorbance du test effectué

L'IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH• le calcul des IC50 a été réalisé graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

*Résultat et
interprétation*

Résultats et interprétation

L'extraction par macération est l'une des méthodes les plus utilisées pour la libération du contenu des plantes médicinales en métabolites secondaires. Pour cela, une fois finement broyée, la poudre des plantes collectées a subi la même extraction par deux solvants le méthanol/eau et le chloroforme. Les extraits obtenus, ont été utilisés pour le dosage des composés phénoliques ainsi que pour l'évaluation des activités antioxydants selon le protocole expérimental.

1. Rendements en extraits

Les préparations des extraits de la plante étudiée ont été réalisées en utilisant la méthode de macération à froid. Les différents rendements obtenus sont représentés dans la **figure N°7**. Le meilleur rendement est attribué à l'extrait méthanol/eau (9,8%) suivit par l'extrait chloroforme (6,596%).

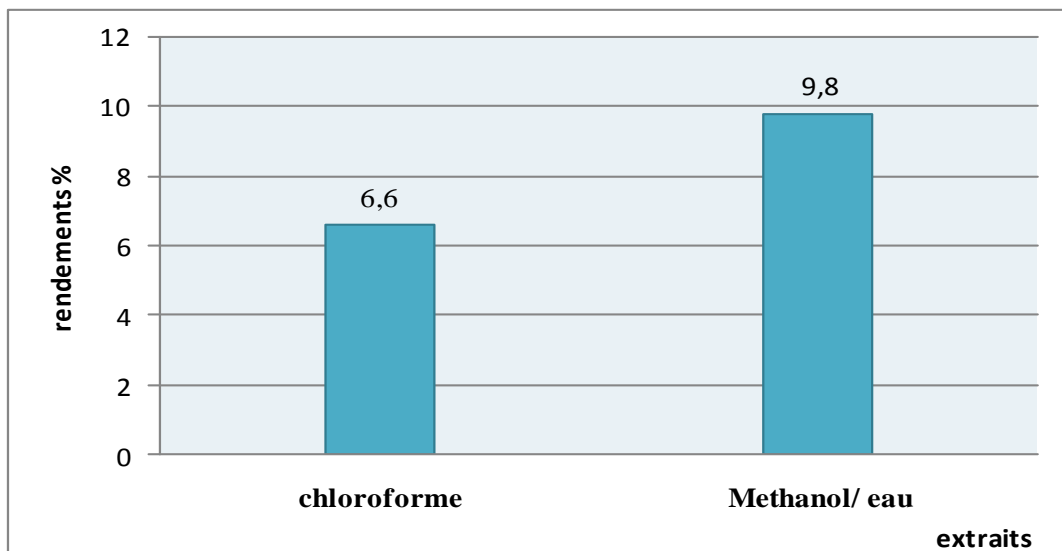


Figure 07 : Rendements des extraits chloroformique et méthanol/eau

Le tableau 03 résume les caractéristiques de chaque extrait. Après évaporation, nous constatons que l'aspect des extraits obtenus était une poudre jaune, soluble dans le DMSO pour l'extrait chloroformique et dans le pour l'extrait méthanol/ eau.

Tableau03 : Caractéristiques des extraits du fenugrec

Extrait	Aspect	couleur	Solubilité
chloroforme	Poudre	jaune	DMSO
Méthanol/eau	Poudre	Jaune foncé	DMSO

Résultats et interprétation

2. Tests phytochimiques

Les résultats du screening phytochimique réalisé dans les différents extraits de fenugrec sont représentés dans le tableau n°4:

Selon les résultats mentionnés dans ce tableau nous remarquons que les tanins et les terpénoïdes sont présents dans les deux extraits par contre les flavonoïdes sont présents seulement dans l'extrait de chloroforme. De même, les saponines ne sont présentes que dans l'extrait méthanol/eau.

Nous constatons aussi l'absence des coumarines et des alcaloïdes dans les deux extraits. Les saponines sont absentes dans l'extrait de chloroforme, alors que les flavonoïdes sont absents aussi dans le méthanol/eau.

Tableau n° 04 : Screening phytochimique des extraits fenugrec

		Extrait chloroforme	Méthanol /eau
Tanins		+	++
Flavonoïdes		+	-
Coumarines		-	-
Alcaloïdes	Mayer	-	-
	Wagner	-	-
Saponines		-	++
Terpénoïdes		++	+
(++) : Test positif. (+) : Test faiblement positif. (-) : Test négatif			

Résultats et interprétation

3. Teneurs en composés phénoliques

3. 1. Le dosage de polyphénol

Le dosage des polyphénols, a été effectué une méthode spectrophotométrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Nous avons l'acide gallique comme référence pour tracer la courbe d'étalonnage (Figure n°8). La formule de la régression linéaire obtenu pour cette courbe est de $y = 0,005x + 0,211$ avec un coefficient de corrélation R^2 égal à 0,89.

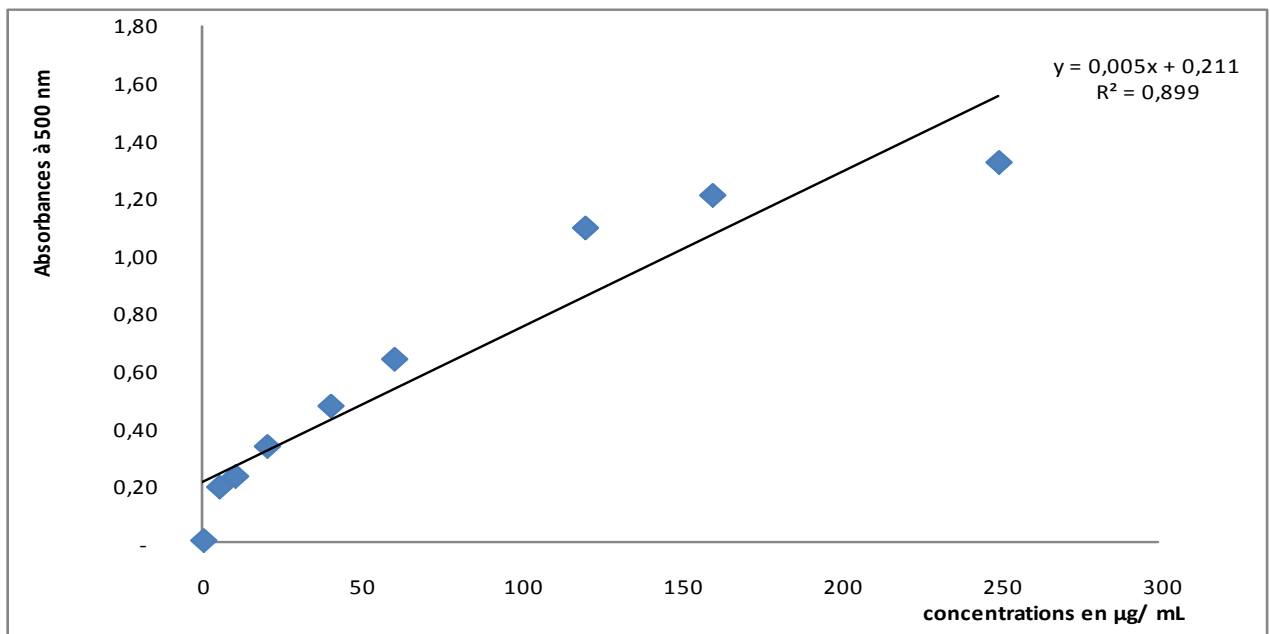


Figure 8: courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage de phénols totaux.

Le calcul des teneurs en phénols totaux en utilisant l'équation de régression linéaire montre que l'extrait méthanol/eau des graines de fenugrec est riche en phénols totaux. Cette teneur est de l'ordre de 89,89 µg EAG/ mg d'extrait. L'extrait chloroformique a montré une basse teneur de l'ordre 50,89 µg EAG/ mg d'extrait.

3.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des polyphénols, a été effectué une méthode spectrophotométrique utilisant le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Nous avons la catéchine comme référence pour tracer la courbe d'étalonnage (Figure n°9). La formule de la régression linéaire obtenu pour cette courbe est de $y = 0,005x$ avec un coefficient de corrélation R^2 égal à 0,951.

Résultats et interprétation

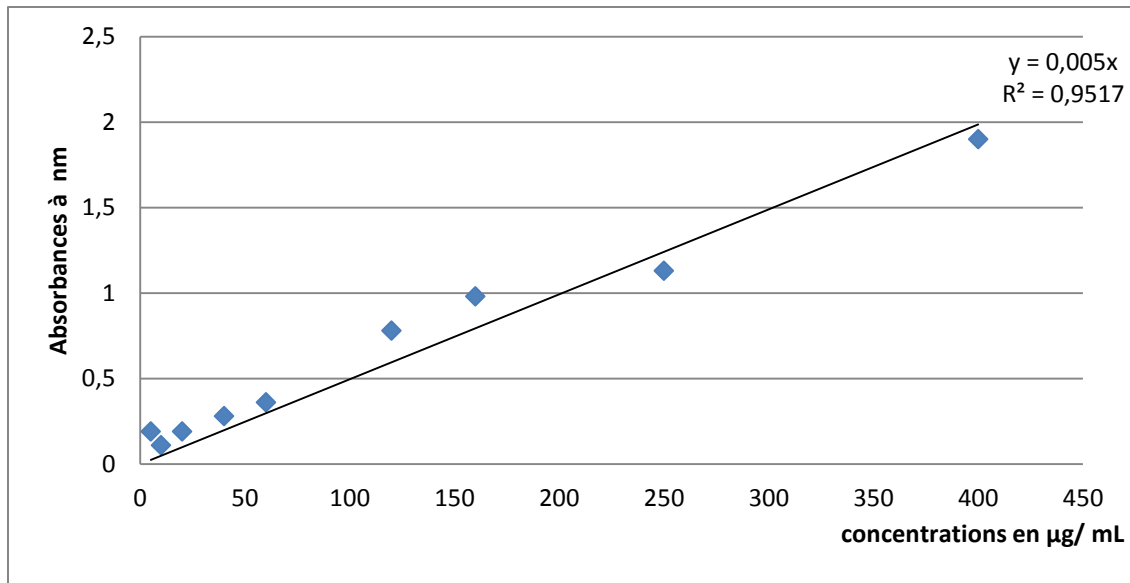


Figure 09 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux

Le calcul des teneurs en flavonoïdes en utilisant l'équation de régression linéaire montre que l'extrait méthanol/eau des graines de fenugrec est faible en flavonoïdes. Cette teneur est de l'ordre de 86 $\mu\text{g EC/ mg}$ d'extrait. L'extrait chloroformique a montré une basse teneur de l'ordre 32 $\mu\text{g EC/ mg}$ d'extrait.

3.3.Dosage des tanins

Le dosage des polyphénols, a été effectué une méthode spectrophotométrique utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Nous avons la catéchine comme référence pour tracer la courbe d'étalonnage (Figure n°10). La formule de la régression linéaire obtenu pour cette courbe est de $y = 0,0035x + 0,217$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9538$

Résultats et interprétation

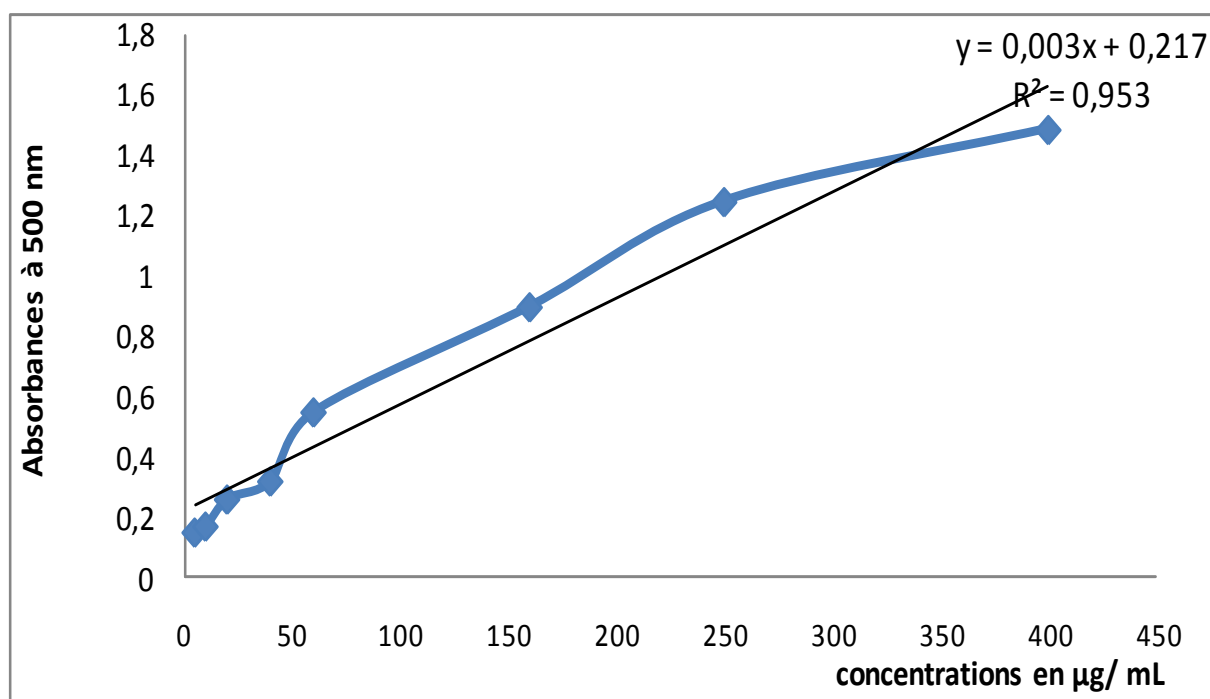


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

Le calcul des teneurs en tanins en utilisant l'équation de régression linéaire montre que l'extrait méthanol/eau des graines est riche en tanins. Cette teneur est de l'ordre de 165, 47µg EC/mg d'extrait. L'extrait chloroformique a montré une basse teneur de l'ordre de 85,47 µg EC/mg d'extrait.

L'extraction avec des solvants à polarité croissante, utilisée dans ce travail, permet de séparer les composés d'une plante selon leur degré de solubilité. La plupart des effets pharmacologiques des plantes sont attribués à leur richesse en polyphénols. Les taux de polyphénols totaux enregistrés dans les extraits méthanol/eau

Selon les résultats du dosage des polyphénols, flavonoïdes et tanins, nous remarquons que la teneur d'extrait de chloroforme est faible par rapport de méthanol/eau pour l'ensemble des composés. D'après ces résultats, nous constatons clairement que le taux de polyphénols, flavonoïdes et tanins estimés varie proportionnellement en fonction de la polarité des solvants d'extraction. Plus la polarité du solvant utilisé pour l'extraction augmente plus nous avons de composés phénolique dans l'extrait.

Résultats et interprétation

Tableau 05 : Teneurs en composés phénoliques dans les deux extraits

	chloroforme	Méthanol/eau
Flavonoïdes totaux (μg Eq catéchine/ mg d'extrait)	32	86
Polyphénols (μg Eq acide gallique/mg d'extrait)	50,89	86,89
Tanins (μg Eq catéchine/ mg d'extrait)	85,47	165,47

4. Evaluation de l'activité antiradicalaire : Piégeage du radical libre DPPH \cdot (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (Petit P *et al.*, 1995, Xue WL *et al.*, 2007) Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH \cdot reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH \cdot . La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH \cdot , mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydant d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le Trolox (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. nous avons choisit de travailler avec l'acide ascorbique comme référence avec le quel nous comparons les résultats de deux extraits.

L'activité de piégeage de radical DPPH \cdot de l'extrait des feuilles de l'espèce *Trigonella foenum-graecum* sont présentées dans les figure 11, 12, 13. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle qui finissent par une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH \cdot en sa forme non radicalaire. A partir de ces courbes nous avons déterminé les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction

Résultats et interprétation

des concentrations utilisées ainsi la valeur d'CI₅₀. Cette dernière représente la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH•.

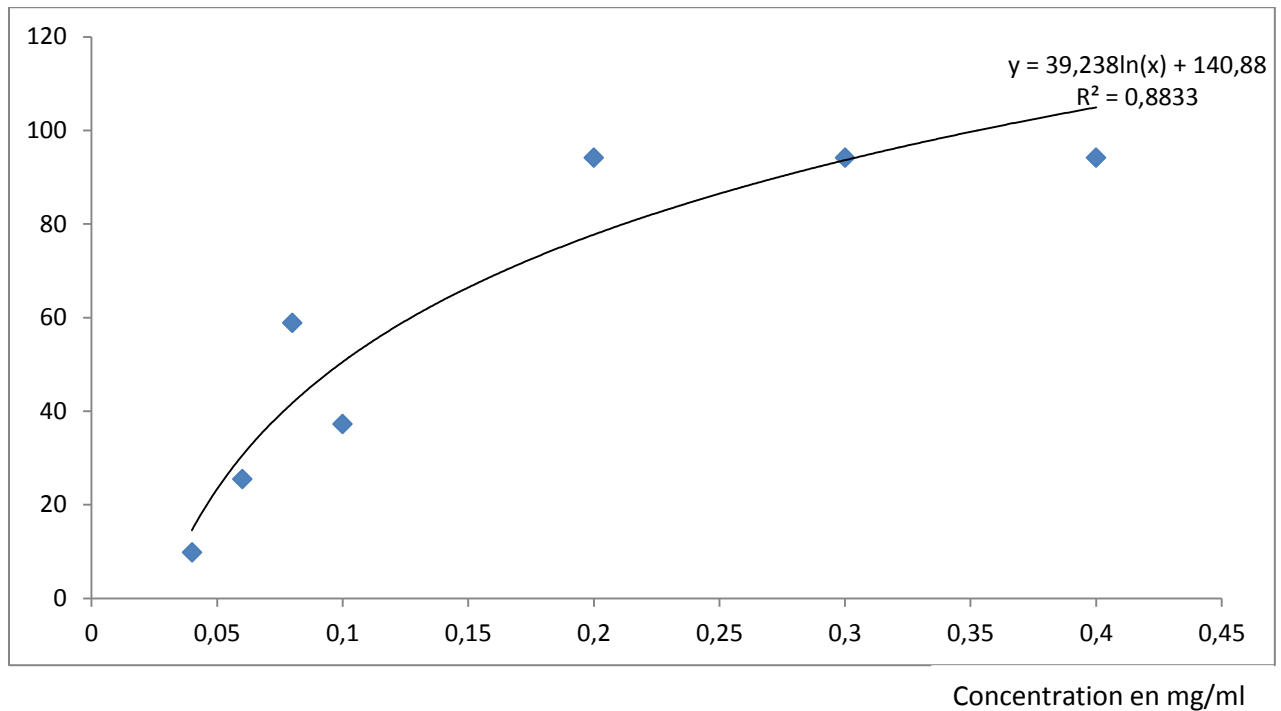


Figure 11: réduction du DPPH par l'acide ascorbique

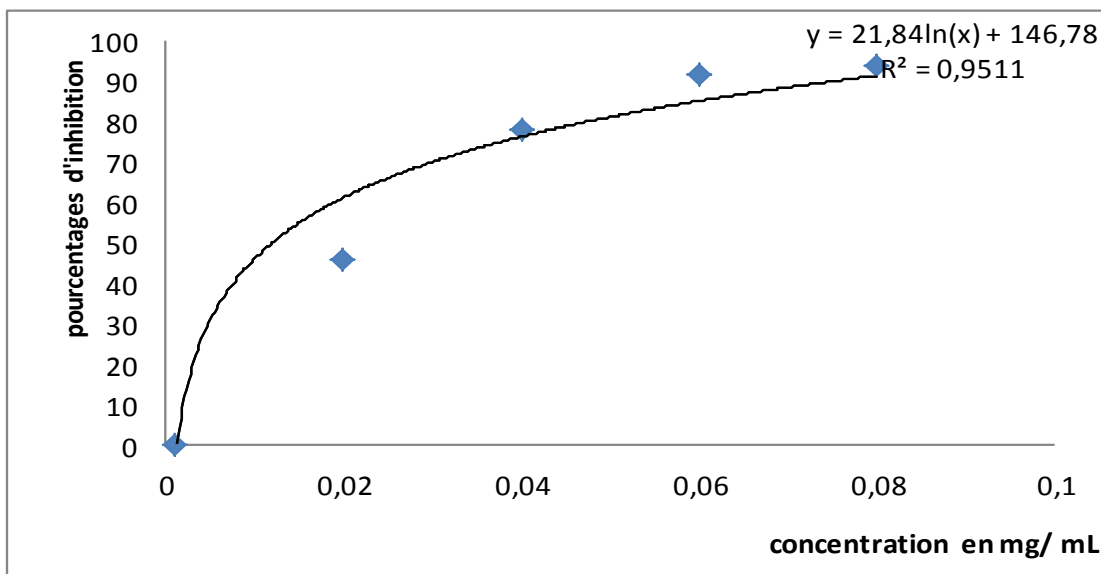


Figure12 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées de l'extrait méthanol/eau de l'espèce *Trigonella foenum-graecum*

Résultats et interprétation

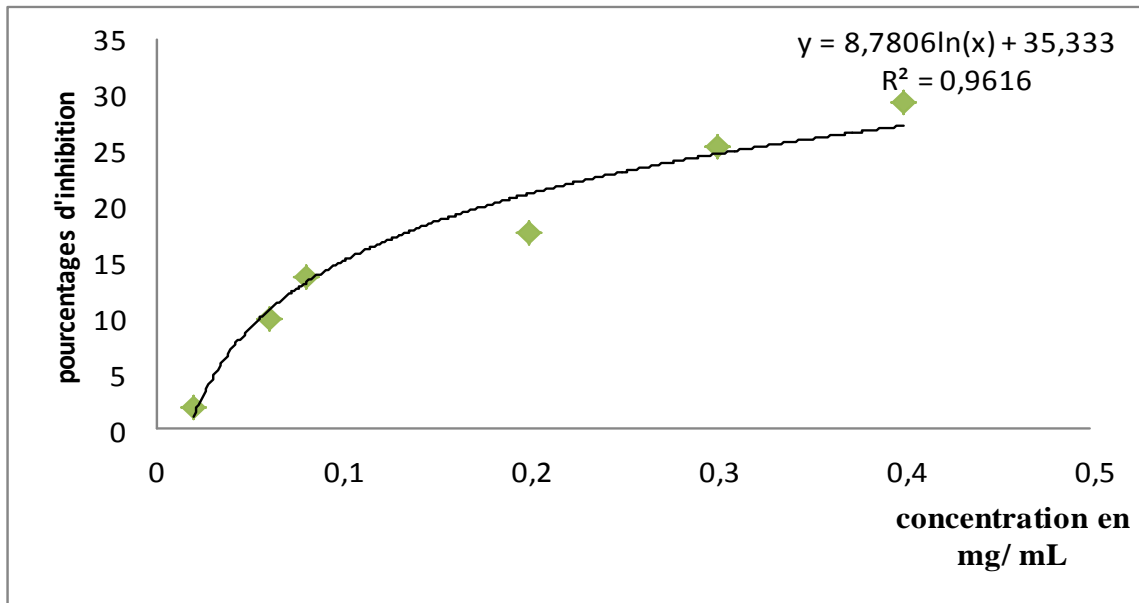


Figure 13 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] en fonction des différentes concentrations utilisées de l'extrait chloroforme de l'espèce *Trigonella foenum-graecum*

L' CI_{50} pour l'acide ascorbique est égale à 0,1 mg/mL. Celle de l'extrait chloroformique et méthanol/eau sont respectivement 5,31 mg/mL et 0,012 mg/mL.

Ainsi, en comparant les CI_{50} des deux extraits testés par rapport à celle de l'acide ascorbique, nous constatons que l'extrait méthanol/eau a montré une activité de piégeage de radical DPPH la plus élevée (la plus basse CI_{50}). L'extrait chloroforme a montré l'activité de piégeage de radical DPPH la basse (la plus grande CI_{50}). Ceci nous fait penser que l'origine l'activité de piégeage de radical DPPH dans la fenugrec est sa richesse en polyphénols et tanins, sachant qu'au cours de notre analyse l'extrait Méthanol/eau a montré un taux en polyphénols et tanins intéressant (mg EC/mg d'extrait).

Discussion

Discussion

Les plantes médicinales sont la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore inexploitées dans le domaine thérapeutique. Dans l'industrie pharmaceutique le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à jour surtout que les antioxydants participent de manière direct ou indirect à la prévention des certaines maladies.

Notre étude a porté sur l'espèce *Trigonella foenum-graecum* qui est utilisée en médecine traditionnelle pour diverses propriétés : analgésiques, contre l'anorexie, la production du lait maternel ...etc. Les graines du fenugrec sont employées comme remède traditionnel pour le traitement du diabète (**Miraldi et Mostaghimi, 2001 ; Basch, et al., 2003**).

Au cours de notre étude, les résultats obtenus montrent que le rendement de l'extraction par le solvant polaire, notamment le méthanol/eau, est plus important par rapport au solvant moins polaire, le chloroforme. Ceci est en accord avec les travaux de **Nathiya, (2014)** où l'extrait méthanol avait le meilleur rendement. Selon les travaux de **Petit et al, 1995 et Uemura et al, 2011**, les rendements de l'extrait méthanol /eau de *Trigonella foenum graecum* était 19%, qui est largement supérieur par rapport au rendement obtenu par nos extraits (9,8 %).

Les tests phytochimiques ont été entrepris pour vérifier la présence ou l'absence de certains composés chimiques. Les tanins, les terpénoïdes et les saponines sont les familles dominantes dans l'espèce *Trigonella foenum-graecum*. Les flavonoïdes sont présents mais en quantités faibles contrairement aux autres composés chimiques, alcaloïdes et coumarines qui sont carrément sont absentes.

Selon certaines études, l'espèce *Trigonellafoenum-graecum* est riche en composés phénoliques. La phytochimie des graines de *Trigonella foenum graecum* a montré la présence de l'acide tannique, les alcaloïdes (trigonelline), les saponines stéroïdiens (digitonine, tigogénine) (**Khan et al, 2012**).

Nous avons procéder par la suite à la détermination des taux des polyphénols, des flavonoïdes totaux et des tanins. Les résultats ont permis de démonter la richesse de ces extraits en ces composés. L'extrait méthanol/eau est le plus riche en composés phénoliques avec un taux de tanin égale à 165,47 ($\mu\text{g EC/ mg d'extract}$) suivi par les polyphénols avec un taux de 86,89 ($\mu\text{g EAG/mg d'extract}$) puis les flavonoïdes avec un taux de 86 ($\mu\text{g EC/mg}$

Discussion

d'extrait). Selon étude de **Bukhari et al., (2008)** sur l'extrait de *Trigonella foenum graecum* montre une teneur de 22 µg EAG/mg d'extrait en polyphénols. Et autre l'étude faite par **Bukhari et al, (2008)** sur la *Trigonella foenum graecum*, la teneur en flavonoïdes a été estimée à 16,6 µg EAG/mg d'extrait.

De ce fait, nous constatons que nos extraits renferment des teneurs non négligeables en composés phénoliques. Cette différence est principalement liée à la composition chimique de la plante qui est influencée par des facteurs écologiques (sol, climat, humidité, période de la récolte...) et par les conditions expérimentales au laboratoire, particulièrement les méthodes d'extraction (macération, décoction, infusion...) et les solvants organiques utilisés (eau, méthanol, acétones...).

La richesse d'une plante par les composés phénoliques suggère que cette plante possède une activité antioxydant remarquable. Ceci nous a poussés à tester activité antioxydant de nos extraits. L'activité antioxydant d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydant par piégeage de radicaux libres telles que : la méthode de FRAP, ORAC, et la méthode utilisant le radical DPPH (**Sharma et al., 2009**).

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et direct de l'activité antioxydant en raison de sa forme radicale stable et la simplicité de l'analyse (**Bozin et al., 2008**). Le DPPH est un radical libre stable qui a un maximum d'absorption à 517 nm (**Yokozawa et al, 1998; Wang et al, 1999; Kumar et al, 2002**) et qui accepte un électron ou un atome d'hydrogène pour devenir une molécule diamagnétique stable. Nous avons étudié la capacité de l'extrait de neutraliser les radicaux libres tels que le DPPH. En présence de l'extrait capable de céder un atome d'hydrogène la nature des radicaux libres est perdue d'où la réduction du radical DPPH sera déterminée par la diminution de son absorbance à 517 nm. Il est très pratique de suivre les réactions du DPPH et il a souvent été utilisé pour estimer l'activité antiradicalaire des produits naturels. La diminution de l'absorption DPPH en présence de concentrations variables d'extrait a été surveillée. Les résultats relatifs aux propriétés antiradicalaires des échantillons analysés dans cette étude sont comparés à celui de l'acide ascorbique, molécule de référence.

Concernant les valeurs CI_{50} obtenus, nous constatons que l' CI_{50} de l'extrait méthanol/eau est 0,012 mg/ml, suivi par l'extrait chloroforme 5,31mg/ml. En comparant les CI_{50} des deux extraits testés par rapport à celle de l'acide ascorbique, nous constatons que

Discussion

l'extrait méthanol/eau a montré une activité de piégeage de radical DPPH la plus élevée (la plus basse CI₅₀). Par contre L'extrait chloroforme a montré l'activité de piégeage de radical DPPH la basse (la plus grande CI 50). Ceci nous fait penser que l'origine l'activité de piégeage de radical DPPH du fenugrec est sa richesse en polyphénols et tanins, sachant qu'au cours de notre analyse l'extrait Méthanol/eau a montré un taux en polyphénols et tanins intéressant (mg EC/mg d'extrait). **Kaviarasan et al**, ont trouvé aussi que l'extrait méthanol 80% des graines à des concentrations élevées a montré une diminution significative de l'absorbance du radical DPPH. La valeur de la CI₅₀ était 350 µg / ml.

L'activité antioxydant semble être directement corrélée à la teneur en polyphénols des fractions de fenugrec. L'influence de la supplémentation des graines de fenugrec en poudre au régime alimentaire sur la peroxydation lipidique et le statut antioxydant a été étudiée chez le rat in vivo (**Anuradha et ravikumar, 2001**). Les activités antioxydants des enzymes catalase, la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase, ainsi que les dommages oxydatifs ont été examinés dans les tissus de rats traités avec le fenugrec (**Genet et al., 2002**). Plusieurs attributs bénéfiques pour la santé du fenugrec ont été expérimentalement mis en évidence au cours des dernières décennies, ce qui démontre le potentiel des applications thérapeutiques possibles de fenugrec.

Conclusion

Conclusion

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude phytochimique et l'évaluation du pouvoir antiradicalaire de deux extraits des graines de la plante *Trigonella foenum-graecum*

Les résultats obtenus de cette étude nous ont permis de conclure que:

- ✓ Les graines de notre plant sont riches en tanins, Térépnoïdes, saponines. Les flavonoïdes sont présents en quantité faible,
- ✓ Le rendement le plus élevé est celui de la l'extrait méthanol/ eau est de l'ordre de 9,8 %.
- ✓ Les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins d'extrait de chloroforme sont faibles par rapport à l'extrait méthanol/eau,
- ✓ L'étude d'activité de piégeage de radical a montré que l'extrait méthanol/eau possède la meilleure capacité anti radicalaire de l'ordre de 0,012 mg/mL.

Pour conclure nous pouvons dire que les plantes médicinales sont considérées comme une source de matières première essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. C'est pour cette raison que le patrimoine végétal doit être absolument préservé dans sa diversité et dans son étendue.

Perceptive

Cette étude préliminaire nécessite d'autres recherches qui peuvent être résumées dans les points suivants :

L'utilisation des autres méthodes d'extractions de fenugrec, et d'autres méthodes d'utilisation

Approfondir l'analyse phytochimique et chromatographique pour isoler et identifier les molécules actives de cette plante

L'évaluation de l'activité antioxydante par d'autres méthodes in vitro

Etude d'autres activités biologiques, comme antidiabétique ou antimicrobienne.

*Référence
bibliographique*

Références Bibliographique

1. Ajabnoor, M. A., & Tilmisany, A. K. (1988). Effect of *Trigonella foenum-graecum* on blood glucose levels in normal and alloxan diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 22, 45–49.
2. Ahamet, S. (2003). Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitaceae). Thèse Pharmacie, Bamako : 117.
3. Ali L, Azad Khan AK, Hassan Z, et al (1995) Characterization of the hypoglycemic effects of *Trigonella foenum-graecum* seed. *Planta Med* 61:358–60
4. Anderson K.J., Teuber S., Gobeille A., Cremin P., Waterhouse A.L., Steinberg F.M., (2001). Walnut polyphenolic inhibits in vitro human plasma and LDL oxidation. *Biochemical and molecular action of nutriment*, *J. Nutrition*; 131:2837-42
5. Anuradha C.V. et Ravikumar P., 2001. Restoration of tissue antioxidants by fenugreek seeds in alloxan-diabetic rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 45, pp. 408–420
6. Babar ali M, Hahn E.J., Paek K.Y., 2007- Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molécules*. 12: 607-621.
7. Bahorun, T. (1997). Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius , p 83-94
8. Baquer NZ, Kumar P, Taha A, et al (2011) Metabolic and molecular action of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) and trace metals in experimental diabetic tissues. *J Biosci* 36:383–96
9. Barlow, S.M. (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, *Food Antioxidants*: 253-307.
10. Basch, E., Ulbricht, C., Kuo, G., Szapary, P., & Smith, M. (2003). Therapeutic applications of fenugreek. *Alternative Medicinal Review*, 8(1), 20–27
11. Berger, M.M. (2006) Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20: 48-53
12. Billaud C, Adrian J (2001) Le fenugrec : composition, valeur nutritionnelle et physiologique. *Sci Alim* 21:3–26
13. Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* 1958, 181, 1199-1200.
14. Bouattoura, N. (1988). Les ressources phylogénétiques. Importance Préservation-Utilisation. *Annales, INA, El Harrach-Alger*, vol 12 (1), T 1: pp. 43-63.
15. Bozin B., Mimica-dukic N., Smojlik I., Goran A., Ijic R., (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., alliaceae, food chemistry, 111:925-929

Références Bibliographique

16. Bukhari S.B., Bhangar M.I., Memon S., (2008). Antioxidative activity of extracts from fenugreek seeds [*Trigonella foenum-graecum*]. *Pak J Anal Environ Chem.*; 2:78-83.
17. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 1995, 28, 25-30
18. Burits M., and Bucar F., (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res*, 14, pp. 323-328.
19. Bravo L., (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr. Rev.* ; 56:317-33.
20. Brochard F (2013) Thèse de doctorat en pharmacie. Les compléments alimentaires et les produits diététiques de l'effort commercialisés et utilisés dans la pratique du cyclisme 174 p, Université de Nantes (France)
21. Chappell J. (1995) Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46, 521-547.
22. Chevassus H, Molinier N, Galtier F, et al (2007) Un extrait de graines de fenugrec (fenugrene*) diminue sélectivement la prise de lipides chez l'adulte volontaire sain poster 462 *Endocrinologie - Diabète - Marseille 2007*
23. Colette, E. (2003). Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse Pharmacie Bamako : 147.
24. Djebaili, S ; (1984). Steppe algérienne. Phytosociologie et écologie. Ed. OPU, BenAknoun, Alger, p177
25. Eddouks M., Ouahidi M.L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., Lemhadri A., (2007), l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc, pharmacognosie, 5: 194-203.
26. Harborne, J.B. 1980. Secondary Plant Products. *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 8, Bell EA, Charlwood BV, eds, Springer-Verlag, Berlin, 1980, pp.329-402. In: Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Macheix, J.J., Fleriet, A., Christian, A. 2005. PPTUR Lausanne
27. Harborne, J. B., and Herbert B. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Bristol: Taylor & Francis. 1995.
28. Harchane H. El Addas H., Amsaguine S., El Amrani N., Radallah D., 2012 effet d'extrait aqueux des graines de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) sur amélioration de profil et la prise de poids chez les rat. *springer-verlag France* : pp 1-6.

Références Bibliographique

29. Harchane H, El Addas H, Amsaguine S, et al. (2012) Effets de l'extrait aqueux des graines du fenugrec (*Trigonella foenum graecum*) sur l'amélioration du profil lipidique et la prise de poids chez le rat. *Phytothérapie* 10:357–62
30. Hesse, M. Alkaloids – Nature's Curse or Blessing ?, VHCA, Zürich. 2002.
31. Hirasa, K; Takemasa, M; (1998). Spice science and technology. New York: Marcel Dekker.
33. Hopkins. William G., 2003 - Physiologie végétale de bock université 2^{ème} édition. p276.268
34. http://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/127561/tab/taxo
35. <http://www.conservation-nature.fr/statut-Foenugraecum%20officinale.html>
36. Gardeli C., Papageorgiou V., Mallouchos A., Theodosis K., Komaitis M., (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, *Food Chemistry*, 107, 1120-1130.
37. Genet S., Kale R.K., Baquer N.Z. (2002). Alteration in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek. *Molecular Cell Biochemistry*, 236, pp. 7–12
38. Gomez-Caravaca A.M, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A., 2006- Advances in the analysis of phenolic compounds in Products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.
39. Goto M., Ueda K Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T., Kanazaw K., (2008), A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine, *Free Radical Biology and Medicine*, 45: 1318-1325..
40. Gupta A (2001) Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type II diabetes mellitus: a double-blind, placebo controlled study. *J Assoc Phys India* 49:1057–61
41. Goudable, J ., Favier, A. (1997) Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 11: 115-20.
42. Ionescu A.M ., Roman G.V., 2013 : reseach on biology, productivity and yield qualiity of *Trigonella foenum-graecum* L. species (fenugreek) in the centrl part of the south Romanian plan. *Scientic papers erie A. agronomy*. LVI
43. S. Kaviarasan , G.H. Naik , R. Gangabhagirathi, C.V. Anuradha, K.I. Priyadarsini. (2007). In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds . *Food Chemistry* 103 31–37.

Références Bibliographique

44. Khan V, Najmi AK, Akhtar M, Aqil M, Mujeeb M, Pillai K.K., (2012). A pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *J Pharm Bioallied Sci.*;4(1):27e42.
45. Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., Carde J.P.,, 1994- Biogenèse des monoterpènes : la chaîne isoprenique, *bull. soc. Pharm. bordeaux*, 133, 79 – 99.
46. Laitinen M.L., Juikunen-Tiitto R., Rousi M. (2000). Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *Journal of Chemical Ecology*, 26 (7): 1609-1622
47. Lejoly J. Systématique des plantes à fleurs en relation avec les principales plantes médicinales. Volume II, Université libre de Bruxelles. Institut de pharmacie
48. Lisu, W., Jui-Hung, Y., Hsiao-Ling, L., Ming-Jiuan, W. (2003). Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gaertn), *Journal of food and drug analysis*, 11(1): 60-66.
49. Macheix, J.J., Fleuriet, A et Billot, J .1990. Fruit phenolics, CRC press, Boca Roton. In : les polyphénols en agroalimentaire Sarni-Manchado P, Cheynier V.2006., Tec et Doc Lavoisier-Paris.
50. Maizak, K ; Brac, De La Perriere et Hammiche, V. (1993). Pharmacopée traditionnelle: Sahara septentrional. Actes du 2e colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg, p 169-181.
51. Maletić R, Jevdžović R (2007) Sowing date –the factor of yield and quality of Fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum* L). *J Agricult Sci* 52 : 1-8
52. Mancini-filho J., Van-Koij A., Mancini D.A., Cozzolino F.F., and Torres R.P., (1998). Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*, Breyne) extracts, *Boll. Chim. Farm.* 137:443-447. PMID:10077878
53. Marouf A., Reynaud J., 2007. *La Botanique A-Z*. Ed. Dunod, Paris: 233p
54. Mata A.T., Proene C., Ferreira, A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Araujo M.E.M., (2007). Antioxidant and anti-acetyl cholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.*; 103:778-786
55. Miller, N-J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A.(1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, (384) 240-242.
56. Miraldi et Mostaghimi, 2001: Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran), *75(2-3):77-87*
57. Moradi Kor N. didarshetaban M.B saeid H .R et al ., 2013 : fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a valuable medicinal plant. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 1(8): 922-931

Références Bibliographique

58. Nathiya S, Durga M, Devasena T*. (2014). Therapeutic role of *Trigonella foenum-graecum* [Fenugreek] Review, 12: 74-80
59. Novelli GP, 1997. Role of free radicals in septic shock. *Journal of physiology and pharmacology*, 48(4): 517-527.
60. Nutranews. Science, Nutrition, Prévention et Santé, déc 2004
61. Pelletier E., Campbell P., Denizeau F., 2004. *Ecotoxicologie moléculaire*. Ed. Presses de l'université du Québec. Canada : 182p.
62. Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002) Physiological action of antioxidant defenses. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 16: 233-239.
63. Petit P, Sauvaire Y, Hillaire-Buys D, et al (1995) Steroid saponins from fenugreek seeds : extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids* 10:674-80
64. Petit P.R., Sauvaire Y.D., Hillaire-Buys D.M., Leconte O.M., Baissac Y.G., Ponsin G.R., et al., (1995). Steroid saponins from fenugreek seeds extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids*;60:674-80..
65. Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O., 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*. Vol 4(5) : 133-8. 64. Rashmi Y, Rahul K, Dipeeka G. The Health Benefits Of *Trigonella foenum-graecum*: A Review. *Internat J Engin Res Applic* 1:32-5
66. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydantes. ROBERT N. JODITH K., 2005- Secondary metabolite profiling pp341.348.
67. Rock, E. (2003). Stress oxydant, micronutriments et santé. Inra – CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments 63122 St Genès Champanelle. Université d'été denutrition – Clermont- Ferrand:37-42.
68. ROMDHANE M., 1993- Extraction solide liquide sous ultrasons, INPT, in thèse doctorat de l'université Toulouse oxydants (MILBURY et RICHER, 2008).
69. Rhodes M. J. C. (1994) : Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Mol. Biol.*, 24, 1-20.
70. Sharma O.M.P., Bhat T.K., (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4), 1202.
71. Skalli S (2006) Malformations associées à la prise de fenugrec au cours de la grossesse. Bulletin préparé par le Centre Marocain de Pharmacovigilance Vol 3, No 11

Références Bibliographique

72. Singh B., Kaur R., Singh K., 2008 : characterization of Rhizobium strain isolated from the roots of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek). *African journal of biotechnology* 7(20) :pp 3671-3676.
73. Université Kasdi merbah, Ouargla faculté des science de la nature et de la vie
département des science biologique
74. <http://www.lanutrition.fr/fraliment/fraliment/178-fenugrec-graines.html>
75. Xue WL, Li XS, Zhang J, et al (2007) Effect of *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) extract on blood glucose, blood lipid and hemorheological properties in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 16 Suppl 1:422–6
76. Yu, R., Mandlekar, S., Tony, Kong, A.N. (2000). "Molecular mechanisms of butylatedhydroxylanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c". *Molecular Pharmacology*, (58): 431- 437. EPHE.
77. Zovko Cončić M., Kremer D., Karlović K., Kosalec I., (2010). Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxicol.* ; 48 : 2176-2180.

Annexe

Annexe 1 : Réactifs de caractérisation

- Alcaloïdes

La caractérisation des alcaloïdes se fait par :

•**Réactif de Mayer** : la préparation de ce réactif s'effectue comme suit :

- Dissoudre 1,358 g de HgCl_2 dans 60 ml d'eau ;
- Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau ;
- Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité blanc

•**Réactif de Wagner** : ce réactif a été préparé comme suit :

- Dissoudre 2 g de KI et 1,27 de I_2 dans 75 ml d'eau ;
- Ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

ملخص

يتم تنفيذ العمل في اطار تقييم النشاط المضاد للأكسدة لبذرة الحلبة .

كمية الفينولات , الفلافونويد والتانان تم اظهارها عن طريق طريق فولين -سيوكلتو وثلاثي كلوريد الألومنيوم. النشاط المضاد للأكسدة تمت دراسته بواسطة تثبيط الجدر الحر DPPH . من خلال التجارب الكيميائية النباتية تمكنا من اثبات وجود التانان , سيونين, تريانويدات , مع غياب الكلويد و الكوماغين .

تم تحديد الفينولات الكلية و الفلافونويد و التانان فأثبتنا ان مستخلص *Trigonella foenum-graecum* تحتوي على نسبة كبيرة من الفينولات و التانان و التي تقدر ب 89,89 ميكروغرام من معامل حمض الغاليك /غ و 165,47 ميكروغرام من معامل حمض الكاتيشين /غ على الترتيب , اما الفلافونيدات فتوجد بكمية قليلة 32 ميكروغرام من معامل حمض الكاتيشين /غ.

في ما يخص النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص الميثانوليك قد سجلنا قيمة تقدر بنسبة 0.012 ميلي غرام /ملل و هي قيمة صغيرة مقارنة مع حمض الأسكوربيك و الذي يقدر قيمة كبيرة جدا مقارنة مع حمض الأسكوربيك و الذي يقدر بنسبة , اما مستخلص الكلورفورم قد سجلنا قيمة تقدر بنسبة 5, 31 ميلي غرام /ملل بنسبة 0.1 ميكروغرام /ملل (0.1). ميلي غرام /ملل

الكلمات المفتاحية : دراسة فيتوكيميائية , الفلافونويدات , تانان, الكلويد, سيونين, تريانويدات, النشاط المضاد للأكسدة

Résumé

Le présent travail a été réalisé dans le cadre d'évaluer l'activité antiradicalaire des graines de la plante *Trigonella foenum-graecum*.

Les tests phytochimiques réalisés lors de cette étude révèlent la présence de tanins, Térpénoïdes, et saponines avec l'absence des alcaloïdes et coumarines.

Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux et des tanins nous a permis de constater que les polyphénols et tanins sont présentes dans l'extrait méthanol/eau de *Trigonella foenum-graecum* à un taux le plus élevé 89,89 µg EAG/mg d'extrait et 165,47 µg EC/mg d'extrait respectivement. Alors pour les flavonoïdes totaux l'extrait de *Trigonella foenum-graecum* présente à une faible teneur dans le méthanol/eau 86,89 µg EC/mg d'extrait et une basse teneur dans l'extrait chloroforme 32 µg EC/mg d'extrait.

Le pouvoir antiradicalaire, a été mesuré à l'aide de la méthode de DPPH, et les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique à une valeur $IC_{50}=0.012$ mg/ml Cette valeur plus basse que celle obtenue avec l'acide ascorbique $IC_{50}=0,1$ mg/mL, alors que le chloroforme a une valeur $IC_{50}=5,31$ mg/mL Cette valeur très élevée que celle obtenue avec l'acide ascorbique $IC_{50}=0,1$ mg/mL.

Mots clé : *Trigonella foenum-graecum*, polyphénols, flavonoïdes, tanins, activité antiradicalaire, DPPH.

Abstract

The present work has been carried out in the framework to assess the activity antiradical of seeds of the Plant *Trigonella foenum-graecum*.

The phytochemical tests carried out during this study reveal the presence of tannins, Térpénoïdes, and saponins with the absence of the alkaloids and coumarins.

The dosage of polyphenols and flavonoids totals and tannins has allowed us to see that the polyphenols and tannins are present in the extract methanol/water of *Trigonella foenum-graecum* at a rate The higher 89.89 µg GAT/mg of extract and 165.47 µg EC/mg of extract respectively. Then for the total flavonoids the extract of *Trigonella foenum-graecum* present at a low content in the methanol/water 86.89 µg EC/mg of extract and a low content in the extract Chloroform 32 µg EC/mg of extract.

The antiradical power, has been measured using the method of DPPH and the results obtained show that the methanolic extract to a value $IC_{50}=0.012$ mg/ml This value lower than that obtained with the ascorbic acid $IC_{50}=0.1$ mg/mL, while chloroform has an IC_{50} value= 5.31 mg/mL this value very high than that obtained with the acid ascorbique $IC_{50}=0.1$ mg/mL.

Key words: *Trigonella foenum-graecum*, polyphenols, flavonoids, tannins, ANTIRADICAL ACTIVITY, DPPH..