

# الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Ibn Khaldoun –Tiaret-  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Nutrition et Technologie Agro-Alimentaire



## Thèse

En vue de l'obtention de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle LMD

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière: "Sciences Agronomiques"

Spécialité: "Valorisation de la flore dans la phytoprotection"

Présenté et soutenu publiquement le :

par

Mohammed Nassir Issam BENZIANE

## Phytochimie et propriétés biocides et émulsifiantes des extraits aqueux des graines de fenugrec (*Trigonella foenum graecum* L.)

Devant le jury de thèse composé de :

Président	Dr. Laredj HOCINE	Maître de conférences A Université de Tiaret
Directeur de thèse	Dr. Kamel ACEM	Maître de conférences A Université de Tiaret
Examineur	Pr. Farid BOUNACEUR	Professeur Centre Universitaire de Tissemsilt
Examineur	Dr. Wassim YEZLI	Maître de conférences A Université de Tiaret
Examineur	Dr. Mohamed ZIANE	Maître de conférences A Centre Universitaire de Ain Temouchent

Année universitaire: 2019–2020

## **REMERCIEMENTS**

Tout d'abord, je remercie "Allah", mon créateur. "Allah" qui m'a prêté l'esprit du travail et m'a éclairé le chemin du savoir et de l'apprentissage.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Mr HOCINE Laredj, Maître de conférences à la Faculté des SNV, Université Ibn Khaldoun de Tiaret, pour avoir fait l'honneur de présider le jury de thèse. Je tiens à remercier Pr Bounaceur F et Dr Yezli W qui ont accepté d'évaluer et examiner ce travail, pour leurs remarques constructives et contributives.

Mes plus sincères remerciements vont à mon directeur de thèse Dr. ACEM Kamel, pour avoir proposé le sujet de cette recherche, pour ses orientations, son accompagnement et ses conseils. Je le remercie pour l'aide et les encouragements qu'il n'a cessé de prodiguer tout au long de ce travail.

Je remercie vivement notre maître Dr YEZLI Wassim pour sa participation dans le présent travail, pour ses explications scientifiques convaincantes, ses conseils qui ont apporté le plus pour le sujet.

Je tiens également à exprimer mes plus vives reconnaissances à Pr. HASSANI. Abdelkrim, le chef de formation en Doctorat et le responsable de la spécialité : Valorisation de la flore dans la phytoprotection, qui a bien suivi l'état d'avancement de cette étude et pour ses remarques objectives qui m'ont guidé vers la bonne voie.

Mes reconnaissances les plus sincères s'adressent également à tous les membres du CFD de Valorisation de la flore dans la phytoprotection pour son accompagnement et les efforts déployés tout au long du cursus, pour les différents concepts et notions fournis afin d'enrichir nos connaissances dans ce domaine.

Je tiens à remercier tout le personnel de département d'Agronomie, de Nutrition et Technologie Agro-alimentaire et de Biologie pour leur précieux soutien tout au long de mes études.

Je ne peux passer sous silence l'aimable et l'impressionnante orientation des responsables de laboratoire et l'ensemble des laborantins de notre faculté.

Sans oublier le laboratoire d'Hygiène et Pathologie Animale dirigé par notre Pr. AGGAD Hbib et l'ingénieur ABDALLI Mustapha pour leur aide, esprit scientifique et leur présence tout au long de ce travail.

Enfin, je présente mes remerciements à toute personne qui m'a offert de l'aide afin de réaliser ce travail.

الحلبة نبات لديه القدرة على مقاومة العديد من الاضرار البيئية وحتى الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض من خلال تركيب المواد التي تسمح لها بالدفاع عن نفسها ، وتسمى هذه المواد الكيميائية النباتية النواتج أو الأيضات الثانوية. تكمن أهمية هذه الدراسة في معرفة مميزات هذه النواتج الثانوية لمستخلصات بذور الحلبة التي تزرع في الجزائر من خلال مقارنة تركيبية الكيميائية النباتية ومضادات الأكسدة في المستخلص المائي المنحل والمسخن ودراسة نشاط المبيدات الحيوية. على سلالات من الميكروبات النباتية. قمنا بإجراء "فحص كيميائي نباتي" على نوعي المستخلصات من أجل تسليط الضوء على فئات مختلفة من الأيضات الثانوية ومن ثم لقياس البوليفينول الكلي بواسطة طريقة Follin-c ، الموجودة في هذه المستخلصات وتقدير قوة نشاطهم المضاد للأكسدة باستخدام تقنية FRAP. تم تعيين الجزينات الكيميائية النباتية للنوعين من المستخلصات بواسطة طريقة كروماتوجرافيا من نوع HPLC. تحديد خصائص الاستحلاب للمستخلصات المائية لبذور الحلبة من خلال البحث عن استقرارها ومؤشر كيرماتها مع مرور الوقت. دراسة النشاط المضاد للبكتيريا على سلالة *Erwinia carotovora* من خلال طريقة القرص على وسط أجار وتحديد النشاط المضاد للفطريات لهذه المستخلصات على سلالة *Fusarium* عن طريق تثبيط نمو الشعاعي. تم تحديد العديد من المجموعات الكيميائية النباتية في مستخلصات الحلبة: السابونوزيد ، الفلافونويد ، التربين مركبات النيتروجين. أظهرت النتائج أن المستخلص المائي المتميز يتميز بموضوعة  $pH = 6.45 \pm 0.2$  ، بكثافة  $1.005 \pm 0.002$  ، محتوى صلب يبلغ  $0.1 \pm 8\%$  ، محتوى  $0.08 \pm 4.68\%$  لمجموع السكريات و بالنسبة للبروتينات بقيمة  $10.56 \pm 0.32\%$  في حين أعاد المستخلص المسخن درجة حموضة  $5.98 \pm 0.2$  ، ومستوى المواد الصلبة القابلة للذوبان  $12 \pm 0.15\%$  ولزوجة  $6.65 \pm 0.19$  cp وعلى الجانب الآخر محتوى  $6.88 \pm 0.05\%$  من إجمالي السكريات ،  $15.87 \pm 0.13\%$  للبروتينات و  $0.01 \pm 0.96\%$  للرماد. أتاح التحليل الكروماتوجرافي للعينات من ناحية تحديد 4 جزينات كيميائية نباتية لمستخلص النقع المائي وهي: *Kämpferol* و *genistein* و *vanillin* و *myrecitin* ، ومن ناحية أخرى ، حددت 3 جزينات للمستخلص المائي المسخن وهي: روتين ، كومفيرول وفانيلين. تميز المستخلص المائي المسخن بمحتويات البوليفينول الكلية ( $31.7 \pm 0.031$  ملغ من  $EAG / 100$  جم من المستخلص) ، للألكلويدات الكلية ( $2.12 \pm 0.015\%$ ) والتي أكبر من تلك التي تم الحصول عليها في استخراج المتميز المائي ، وهي: البوليفينول الكلي ( $18.9 \pm 0.12$  ملغ من  $EAG / 100$  جم من المستخلص) ، الألكلويدات الكلية ( $1.71 \pm 0.02\%$ ) و  $8.69 \pm 0.02\%$  . لوحظ وجود اختلاف طفيف بالنسبة لنشاط مضادات الأكسدة الموجود في كلا النوعين من المستخلصات ( $56.90 \pm 0.013$  ملغ مستخلص المسخن  $EAA / 100g$  مقابل  $56.37 \pm 0.24$  ملغم مستخلص  $EAA / 100g$  . كان المستحلب الذي قدم أفضل ثبات بدلالة الوقت هو المستخلص المائي لبذور الحلبة المائي المنحل بمعدل  $71.96\%$  بعد 72 ساعة من الإعفاء من أي إثارة. مستخلص المسخن المائي في وجود المثبت يأتي في المرتبة الثانية بمعدل الثبات الذي كان  $65\%$  بعد 72 ساعة من الراحة. تظهر نتائج النشاط البيولوجي أن المستخلص المنحل من الحلبة بتركيز 20 ملغ / مل ، له النشاط المضاد للجراثيم الأكثر أهمية بقطر منطقة تثبيط يبلغ 16 ملم ، في حين أن مستخلص المسخن بذور الحلبة يعطي نشاط مضاد للجراثيم ضد نفس السلالة التي أعربت عن 12 ملم. من اللافت للنظر في النشاط المضاد للفطريات أن نتائج قطر النمو الشعاعي عند استخدام مستخلص المسخن مائي أعطت تأثير مبيد للفطريات من تركيز 2 ميلي غرام / مل. استنادًا إلى هذه النتائج الأولية ، يمكن أن تشكل الحلبة موردًا واعدًا في مجال حماية النباتات.

الكلمات الجوهرية: الحلبة ، مستخلص مائي، كروماتوجرافيا، النشاط المضادة للأكسدة، كيمياء النباتات، عامل الاستحلاب، مبيد بيولوجي.

## Résumé

Le fenugrec est une plante qui présente la capacité de résister aux multiples agressions de l'environnement, des bioagresseurs et même des microorganismes pathogènes grâce à la synthèse des substances lui permettant de se défendre, ces dernières sont appelées molécules phytochimiques ou métabolites secondaires. L'intérêt de cette étude est de faire la caractérisation de ces métabolites secondaires dans les extraits des graines de Fenugrec cultivées en Algérie en comparant ainsi le profil phytochimique et antioxydant de l'extrait aqueux de macération et de décoction et d'étudier leur activité biocide envers des espèces phytopathogènes. Nous avons effectué un « screening phytochimique » sur les deux types d'extraits afin de mettre en évidence les différentes classes de métabolites secondaires puis doser les polyphénols totaux par la méthode du Folin ciocalteu, les alcaloïdes totaux et les tanins contenus dans ces extraits aqueux et apprécier leur pouvoir antioxydant en utilisant la technique de FRAP. Une caractérisation des molécules phytochimiques des deux types d'extraits a été faite par méthode chromatographique de HPLC. Déterminer les propriétés émulsifiantes des extraits aqueux des graines du fenugrec par la recherche de leur stabilité et leur indice de crémage au cours du temps. Etudier l'activité antibactérienne sur l'espèce *Erwinea carotovora* par la méthode des disques sur milieu gélosé et de déterminer l'activité antifongique de ces extraits sur le *Fusarium oxysporum* par inhibition de la croissance radiale du mycélium. Plusieurs groupes phytochimiques ont été identifiés dans les extraits du fenugrec : les tanins, saponosides, flavonoïdes, terpènes et les composés azotés réducteurs. Les résultats ont montré que l'extrait aqueux macéré est caractérisé par un pH =  $6.45 \pm 0.2$ , une densité de  $1.005 \pm 0.002$ , un °Brix de  $8 \pm 0.1\%$ , une teneur de  $4.68 \pm 0.08\%$  pour les sucres totaux et pour les protéines une valeur de  $10.56 \pm 0.32\%$  tandis que l'extrait décocté s'est caractérisé par un pH légèrement acide  $5.98 \pm 0.2$ , un °Brix de  $12 \pm 0.15\%$  et une viscosité de  $6.65 \pm 0.19\text{cP}$  et d'autre part une teneur de  $6.88 \pm 0.05\%$  pour les sucres totaux, de  $15.87 \pm 0.13\%$  pour les protéines et de  $0.96 \pm 0.01\%$  pour les cendres. L'analyse chromatographique des échantillons a permis d'une part d'identifier 4 molécules phytochimiques pour l'extrait aqueux de macération à savoir : Kæmpferol, génistéine, vanilline et myrécitine et d'autre part d'identifier 3 molécules pour l'extrait aqueux de décoction qui sont : Rutine, kæmpferol et vanilline. L'extrait aqueux de décoction s'est caractérisé par des teneurs en polyphénols totaux ( $31.7 \pm 0.031 \text{ mg d'EAG/100 g d'extrait}$ ), alcaloïdes totaux ( $2.12 \pm 0.015\%$ ) et en tanins ( $9.75 \pm 0.06\%$ ) qui sont supérieures à celles obtenues dans l'extrait aqueux de macération à savoir : Polyphénols totaux ( $18.9 \pm 0.12 \text{ mg d'EAG/100g d'extrait}$ ), alcaloïdes totaux ( $1.71 \pm 0.02\%$ ) et  $8.69 \pm 0.02\%$  pour les tanins. Une différence a été marquée pour l'activité antioxydante trouvée dans les deux types d'extraits ( $56.90 \pm 0.013 \text{ mg d'EAA/100g d'extrait}$  de décoction contre  $56.37 \pm 0.24 \text{ mg d'EAA/100g d'extrait}$  de macération). L'émulsion qui a présenté la meilleure stabilité en fonction du temps était l'extrait aqueux des graines macérées de fenugrec sans stabilisant avec un taux de  $71,96\%$  après 72h de repos. L'extrait aqueux de décoction en présence de stabilisant vient en second lieu par son taux de stabilité qui était de  $65\%$  après 72h de repos. Les résultats de l'activité biologique montrent que l'extrait macéré (EAM) de fenugrec à concentration de  $20\text{mg/ml}$ , présente l'activité antibactérienne la plus importante avec un diamètre de zone d'inhibition de  $16 \text{ mm}$ , tandis que l'extrait de décoction des graines de fenugrec (EAD) donne une activité antibactérienne contre la même souche

exprimée par une lauréole de 12 mm. Il est remarquable pour l'activité antifongique que les résultats du diamètre de la croissance radiale du mycélium lors de l'utilisation de l'extrait aqueux de décoction ait fourni un effet fongicide à partir d'une concentration de 2mg/ml en revanche un effet fongistatique a été observé pour l'extrait aqueux des graines macérées. En se basant sur ces premiers résultats, le fenugrec peut constituer une ressource phytogénétique prometteuse dans la phytoprotection.

**Mots clés:** Fenugrec, extrait aqueux, chromatographie, activité antioxydante, phytochimie, émulsifiant, biocide, Erwinea, Fusarium.

## Abstract

Fenugreek is an herb that has the ability to resist multiple environmental insults, pests and diseases and even pathogens through the synthesis of substances allowing this plant protection, these substances are called Phytochemical compounds or secondary metabolites. The interest of this study is to characterize these secondary metabolites in the extracts of Fenugreek seeds grown in Algeria and compare the phytochemical profile and antioxidant activity of the aqueous extracts obtained by maceration and decoction. We carried out a "phytochemical screening" on both types of extracts in order to highlight the different classes of secondary metabolites and assaying total polyphenols by the method of Folin cio-calteu, total alkaloids and tannins contained in these aqueous extracts and appreciate their antioxidant activity using the FRAP technique. A characterization of phytochemical molecules of the two types of Fenugreek extracts was done by chromatographic method with HPLC. Determine the emulsifying properties of the aqueous extracts of fenugreek seeds by looking for their stability and their creaming index over time. Several phytochemical groups were identified in the extracts of Fenugreek: tannins, saponins, flavonoids, terpenes and reducing nitrogen compounds. The results showed that the macerated aqueous extract is characterized by a  $\text{pH} = 6.45 \pm 0.2$ , a density of  $1.005 \pm 0.002$ , a solids content of  $8 \pm 0.1\%$ , a content of  $4.68 \pm 0.08\%$  for total sugars and for the proteins a value of  $10.56 \pm 0.32\%$  while the decocted extract brought back a slightly acidic  $\text{pH} 5.98 \pm 0.2$ , a solids content of  $12 \pm 0.15\%$  and a viscosity of  $6.65 \pm 0.19\text{cP}$  and secondly a content of  $6.88 \pm 0.05\%$  for total sugars,  $15.87 \pm 0.13\%$  for proteins and  $0.96 \pm 0.01\%$  for ashes Chromatographic analysis of the samples show that 4 phytochemical molecules were identified in the aqueous maceration extract: kaempferol, genistein, vanillin and myrecitine and 3 molecules for the aqueous extract of decoction are: Rutin, kaempferol and vanillin. The aqueous extract of decoction was characterized by the total polyphenol content ( $31.7 \pm 0.031 \text{ mg GAE} / 100 \text{ g}$  of extract), total alkaloids ( $2.12 \pm 0.015\%$ ) and tannins ( $9.75 \pm 0.06\%$ ) that are higher than those obtained in the aqueous extract of maceration: total Polyphenols ( $18.9 \pm 0.12 \text{ mg GAE} / 100\text{g}$  of extract), total alkaloids ( $1.71 \pm 0.02\%$ ) and  $8.69 \pm 0.02\%$  for the tannins. A non-significant difference was marked for antioxidant activity found in both types of extracts ( $56.90 \pm 0.013 \text{ mg AAE} / 100\text{g}$  decoction extract against  $56.37 \pm 0.24 \text{ mg AAE} / 100\text{g}$  maceration extract). The emulsion which presented the best stability as a function of time was the aqueous extract of the macerated seeds of fenugreek without stabilizer with a rate of 71.96% after 72 hours of exemption from any agitation disorder. The aqueous decoction extract in the presence of stabilizer comes secondly by its stability rate which was 65% after 72 hours of rest. The results of the biological activity show that the macerated extract of fenugreek at the concentration of 20 mg / ml, has the most significant antibacterial activity with an inhibition zone diameter of 16 mm, while the decoction extract fenugreek seeds (EAD) gives antibacterial activity against the same strain expressed by a 12 mm laurels. It is remarkable for the antifungal activity that the results of the diameter of the radial growth of the mycelium when using the aqueous decoction extract provided a fungicidal effect from a concentration of 2 mg / ml on the other hand an effect fungistatic has been observed for the aqueous extract of macerated seeds. Based on these first results, fenugreek can constitute a promising phytochemical resource in phytoprotection.

**Keywords:** Fenugreek, aqueous extract, Chromatography, antioxidant activity, phytochemistry, emulsifier, biocidal, *Erwinea*, *Fusarium*.

## *Liste des abréviations*

<b>AAE:</b>	Equivalent d'acide ascorbique
<b>Abs:</b>	Absorbance
<b>as :</b>	Avec stabilisant
<b>CMI :</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CRSTRA:</b>	Centre de recherche scientifique et technologique des regions arides
<b>EAD:</b>	Extrait aqueux de décoction
<b>EAM:</b>	Extrait aqueux de maceration
<b>FRAP :</b>	Pouvoir antioxydant par reduction du fer
<b>GAE :</b>	Equivalent d'acide gallique
<b>H/E :</b>	Emulsion huile dans l'eau
<b>HO :</b>	Huile d'olive
<b>HPLC:</b>	Chrommatographie liquide à haute performance
<b>IC :</b>	Indice de crémage
<b>LCSCO:</b>	Laboratoire de Catalyse et de Synthèse en Chimie Organique
<b>R<sub>t</sub>:</b>	Temps de rétention
<b>ss :</b>	sans stabilisant



## *Liste des tableaux*

Numéro	Titre	Pages
1	Taxonomie du fenugrec.	5
2	Composition en éléments nutritifs des graines du fenugrec	6
3	Principaux usages du fenugrec	8
4	Composition des émulsions à base d'extraits aqueux	27
5	Composition des émulsions à base de l'eau potable	27
6	Préparation de la gamme d'étalonnage	33
7	Densité optique des différentes concentrations d'acide gallique à 760 nm	37
8	Densité optique des différentes concentrations de la Vit C à 700 nm.	42
9	Screening phytochimique des extraits aqueux des graines du fenugrec	53
10	Composés phytochimiques identifiés dans les extraits aqueux des graines de fenugrec détectés par HPLC	59
11	Concentrations des molécules phytochimiques des extraits aqueux des graines de fenugrec estimées par HPLC en mg/ml	59
12	Résultats de l'activité antibactérienne des extraits aqueux des graines de fenugrec testés sur <i>l'Erwinea carotovora</i>	70
13	Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux de macération des graines de fenugrec testé sur le <i>Fusarium oxysporum</i>	73
14	Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux de décoction des graines de fenugrec testé sur le <i>Fusarium oxysporum</i>	73
15	Attribution des variables statistiques (x, y, z) pour chaque échantillon	75

## *Liste des figures*

Numéro	Titre	Pages
<b>1</b>	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	4
<b>2</b>	Différents organes du fenugrec.	4
<b>3</b>	Structure de base des flavonoïdes.	11
<b>4</b>	Structure des flavonoïdes.	12
<b>5</b>	Champ de fenugrec à la station expérimentale El-Tawya-Biskra	25
<b>6</b>	Schéma du protocole expérimental	26
<b>7</b>	Principe du fonctionnement de l' HPLC	39
<b>8</b>	L'espèce fongique <i>Fusarium oxysporum</i>	45
<b>9</b>	Valeurs moyennes du rendement des extraits aqueux des graines du fenugrec	46
<b>10</b>	Valeurs moyennes du pH d'extraits aqueux des graines du fenugrec	<b>47</b>
<b>11</b>	Valeurs moyennes des conductivités électriques d'extraits aqueux des graines du fenugrec.	<b>47</b>
<b>12</b>	Valeurs moyennes de cendres d'extraits aqueux des graines du fenugrec	<b>48</b>
<b>13</b>	Valeurs moyennes de °B d'extraits aqueux des graines du fenugrec	<b>48</b>
<b>14</b>	Valeurs de l'indice de réfraction d'extraits aqueux des graines du fenugrec.	<b>49</b>
<b>15</b>	Valeurs moyenne de la densité d'extraits aqueux des graines du fenugrec	<b>49</b>
<b>16</b>	Valeurs moyenne de la viscosité d'extraits aqueux des graines du fenugrec.	<b>50</b>
<b>17</b>	Valeurs moyennes de sucres totaux d'extraits aqueux des graines du fenugrec.	<b>51</b>
<b>18</b>	Valeurs moyennes des protéines d'extraits aqueux des graines du fenugrec.	<b>52</b>
<b>19</b>	Valeurs moyennes des polyphénols totaux des extraits aqueux des graines du fenugrec	<b>55</b>
<b>20</b>	Valeurs moyennes des tanins des extraits aqueux des graines du fenugrec.	<b>56</b>
<b>21</b>	Valeurs moyennes des alcaloïdes totaux des extraits aqueux des graines du fenugrec.	<b>57</b>
<b>22</b>	Chromatogramme de l'extrait aqueux de macération des graines de fenugrec à 280nm et 340nm	<b>58</b>
<b>23</b>	Chromatogramme de l'extrait aqueux de macération des graines de fenugrec à 280nm et 340nm	<b>58</b>
<b>24</b>	Structures chimiques des molécules phytochimiques des extraits aqueux des graines du fenugrec identifiées par chromatographie	<b>60</b>

<b>25</b>	Cinétique de la stabilité des émulsions à base de l'extrait aqueux de macération	<b>62</b>
<b>26</b>	Cinétique de la stabilité des émulsions à base de l'extrait aqueux de décoction	<b>62</b>
<b>27</b>	Cinétique de l'index de stabilité des émulsions à base de l'extrait aqueux de macération	<b>64</b>
<b>28</b>	Cinétique de l'index de stabilité des émulsions à base de l'extrait aqueux de décoction	<b>64</b>
<b>29</b>	Cinétique de l'indice de crémage des émulsions à base de l'extrait aqueux de macération	<b>66</b>
<b>30</b>	Cinétique de l'indice de crémage des émulsions à base de l'extrait aqueux de décoction	<b>66</b>
<b>31</b>	Aspect macroscopique de l'indice de crémage des émulsions étudiées au cours du temps	<b>67</b>
<b>32</b>	: Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux des graines du fenugrec	<b>69</b>
<b>33</b>	Activité antibactérienne des extraits aqueux des graines de fenugrec sur <i>E. carotovora</i> . A 40mg/ml	<b>71</b>
<b>34</b>	Activité antifongique des extraits aqueux des graines de fenugrec testés contre le <i>Fusarium oxysporum</i>	<b>73</b>
<b>35</b>	Courbe présentant l'équation de la régression linéaire entre la concentration des polyphénols totaux et l'effet antibactérien	<b>76</b>
<b>36</b>	Courbe présentant l'équation de la régression linéaire entre la concentration des polyphénols totaux et l'activité antifongique des extraits de fenugrec	<b>77</b>

## *Liste des annexes*

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>
Annexe 1	Verreries et appareillages du laboratoire utilisés
Annexe 2	Produits utilisés
Annexe 3	Extraits aqueux de graines de fenugrec obtenus par macération (EAM) et décoction (EAD)
Annexe 4	Courbe d'étalonnage de glucose pour la détermination du taux des sucres totaux
Annexe 5	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la teneur des polyphénols
Annexe 6	Courbe d'étalonnage de la Vit C pour évaluer l'activité antioxydante (test de FRAP)
Annexe 7	Résultats des analyses physicochimiques des extraits aqueux des graines de fenugrec
Annexe 8	Résultats de la variation de la stabilité en fonction du temps
Annexe 9	Résultats des indices de crémage (IC%) des deux types d'extraits aqueux des graines de fenugrec durant trois jours
Annexe 10	Montage HPLC modèle YL-9100 (LCSCO, Tlemcen)

Remerciements	i
Résumés	iii
Liste des abréviations	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des annexes	xi

# Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

## Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I.1. Le fenugrec.....	3
I.1.1. Botanique et culture .....	3
I.1.2. Taxonomie de la plante .....	5
I.1.3. Pratique culturale .....	5
I.1.4. Composition .....	6
I.2. Propriétés et utilisation du fenugrec .....	7
I.2.1. Propriétés antioxydantes.....	7
I.2.2. Propriétés antimicrobiennes .....	7
I.2.3. Propriétés thérapeutiques.....	7
I.2.4. Propriétés nutritionnelles.....	8
I.2.5. Effets indésirables .....	9
I.3. Les métabolites phytochimiques .....	10
I.3.1. Biosynthèse .....	10
I.3.1.1. Voie shikimate .....	10
I.3.1.2. Voie d'acétate malonate .....	10
I.3.2. Classification .....	10
I.3.2.1. Composés phénoliques simples .....	11
I.3.2.2. Composés phénoliques condensés .....	12
I.3.3. Rôles physiologiques des composés phénoliques.....	13
I.3.4. Propriétés biologiques des molécules phytochimiques .....	13
I.3.4.1. Propriétés antimicrobienne .....	14
I.3.4.2. Propriétés antioxydantes.....	14

I.3.5. Stress oxydatif .....	14
I.3.6. Radicaux libres .....	15
I.3.6.1. Définition.....	15
I.3.6.2. Espèces réactives de l'oxygène.....	15
I.3.6.3. Production des radicaux libres .....	16
I.3.6.4. Cibles de radicaux libres .....	16
I.4. Micro-organismes phytopathogènes .....	17
I.4.1. Bactéries phytopathogènes .....	17
I.4.1.1. Principales bactéries phytopathogènes .....	17
I.4.1.2. Mode d'action des bactéries phytopathogènes.....	18
I.4.1.3. Stratégie parasitaire des bactéries phytopathogènes.....	19
I.4.2. Champignons phytopathogènes .....	20
I.4.2.1. Forme de parasitisme.....	20
I.4.2.2. Principaux champignons phytopathogènes.....	21
I.4.3. Virus.....	22
I.5. Méthodes de lutte.....	22
I.5.1. Traitement chimique .....	22
I.5.2. Traitement antibiotique .....	22
I.5.3. Lutte biologique.....	22
I.6. Prévention .....	23

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

II.1. Objectifs.....	24
II.2. Lieu d'expérimentation.....	24
II.3. Espèces phytopathogènes.....	24
II.4. Extrait aqueux .....	25
II.5. Matériel.....	25
II.5.1. Matériels du laboratoire .....	25
II.5.2. Matériel végétal .....	25
II.6. Méthodes.....	26
II.6.1. Protocole expérimental .....	26
II.6.2. Préparation des extraits aqueux .....	26
II.6.3. Préparation des émulsions .....	27
II.6.4. Analyses physiques .....	27

II.6.4.1. Calcul du rendement .....	27
II.6.4.2. pH .....	28
II.6.4.3. Conductivité électrique .....	28
II.6.4.4. Cendres .....	28
II.6.4.5. °Brix .....	29
II.6.4.6. Indice de réfraction.....	29
II.6.4.7. Densité .....	30
II.6.4.8. Viscosité.....	31
II.6.5. Analyses chimiques.....	32
II.6.5.1. Sucres totaux.....	32
II.6.5.2. Protéines .....	33
II.6.6. Analyses phytochimiques.....	34
II.6.6.1. Screening phytochimiques.....	34
II.6.6.1.1. Tanins .....	35
II.6.6.1.2. Saponosides .....	35
II.6.6.1.3. Glucosides cardiotoniques .....	35
II.6.6.1.4. Coumarines .....	35
II.6.6.1.5. Flavonoïdes.....	35
II.6.6.1.6. Stérols et polyterpènes.....	35
II.6.6.1.7. Anthra-quinones libres .....	36
II.6.6.1.8. Sucres réducteurs .....	36
II.6.6.1.9. Composés azotés .....	36
II.6.6.1.10. Caroténoïdes .....	36
II.6.6.2. Polyphénols totaux.....	36
II.6.6.3. Tanins .....	38
II.6.6.4. Alcaloïdes totaux .....	38
II.6.7. Analyse chromatographique.....	39
II.6.8. Analyse des propriétés émulsifiantes .....	40
II.6.8.1. Stabilité.....	41
II.6.8.2. Index de stabilité .....	41
II.6.8.3. Indice de crémage .....	41
II.6.9. Activité antioxydante .....	42
II.6.10. Propriétés biocides .....	43
II.6.10.1. Activité antibactérienne.....	43
II.6.10.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice .....	44

II.6.10.3. Activité antifongique.....	44
---------------------------------------	----

### **Chapitre III : Résultats et Discussions**

III.1. Analyses physiques .....	46
III.1.1. Rendement .....	46
III.1.2. pH.....	46
III.1.3. Conductivité électrique.....	47
III.1.4. Cendres .....	48
III.1.5. °Brix .....	48
III.1.6. Indice de réfraction.....	49
III.1.7. Densité.....	49
III.1.8. Viscosité .....	50
III.2. Analyses chimiques.....	51
III.2.1. Sucres totaux .....	51
III.2.2. Protéines .....	52
III.3. Analyses phytochimiques .....	53
III.3.1. Screening phytochimique.....	53
III.3.2. Polyphénols totaux .....	54
III.3.3. Tanins .....	55
III.3.4. Alcaloïdes totaux.....	56
III.4. Analyse chromatographique .....	57
III.5. Analyse des propriétés émulsifiantes .....	61
III.5.1. Stabilité et index de stabilité.....	61
III.5.2. Indice de crémage .....	65
III.6. Analyse de l'activité antioxydante .....	68
III.7. Analyse des propriétés biocides.....	69
III.7.1. Activité antibactérienne.....	69
III.7.2. Activité antifongique.....	72
III.8. Analyse statistique .....	75

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes



# Introduction

## **Introduction**

Le fenugrec « *Trigonella foenum graecum* L. », est une légumineuse de la famille des fabacées, cultivé depuis l'antiquité pour des fins culinaires et médicinales, répandu dans le bassin méditerranéen, en Afrique du nord, en Inde et en Chine (**Wichtl et Anton, 2003**). En dehors de ses propriétés thérapeutiques, le fenugrec présente d'autres caractéristiques tel que la capacité de résister aux multiples agressions de l'environnement, ravageurs et même les microorganismes pathogènes grâce à la synthèse des substances lui en permettant de se défendre, ces derniers sont appelés métabolites secondaires (**Benhamou et Rey, 2012**). Ces métabolites secondaires assurent l'effet antioxydant qui représente le mécanisme biologique responsable sur l'activité antibactérienne, antifongique et la lutte contre les différentes agressions de la plante (**Attou, 2011**). Les champignons sont la principale cause de maladies des cultures maraichère, les pertes économiques annuelles dues aux maladies fongiques dans l'agriculture mondiale étaient estimées à plus de 200 milliards d'euros et le cout annuel des traitements fongicides s'élève à plus de 600 millions de dollars (**Anouar, 2012**). A coté des champignons, les bactéries qui représentent des agents phytopathogènes susceptibles d'infecter les végétaux et d'y déclencher des maladies. Les pertes économiques de 12 à 14% de la production agricole mondiale sont dues à ces bactéries. A l'échelle nationale, ces maladies présentent également un problème majeur qui cause de sérieux dégâts dans la culture des plantes économiquement importantes et touchent environ 4000 hectares de surfaces cultivées menaçant la production nationale (**Zahir, 2016**).

La lutte chimique contre les maladies qui touchent les cultures maraichères et les denrées stockées atteint son impact significatif sur l'environnement surtout avec l'apparition de résistance par certains agents pathogène et ravageurs aux fongicides et insecticides, les pesticides ont un effet néfaste direct sur les plantes à savoir le développement médiocre du chevelu racinaire et le jaunissement des jeunes pousses et agissent sur la fixation de l'azote qui est nécessaire à la croissance des végétaux par l'atteinte des nodosités racinaires ce qui diminue le rendement de production lors de la récolte, chaque année une dépense mondiale d'environ 10 milliards de dollars pour couvrir les besoins en engrais azotés, cette méthode a un impact négatif sur la santé humaine et l'environnement (**Debbab, 2014**). Effectivement, l'organisation mondiale de la santé a estimé qu'il y a chaque année dans le monde un million de graves empoisonnements par les pesticides surtout chez les enfants par apparition des tumeurs cérébrales, des leucémies sont plus fréquemment associées à une exposition chronique aux pesticides (**Debbab, 2014**). A l'échelle environnementale, les pesticides ont été mis en évidence dans

l'air, les sols et les eaux de rivières, ces molécules peuvent perturber l'équilibre des écosystèmes dans les zones d'application (**Errami, 2012**). De ce fait, le monde s'est mobilisé pour chercher d'autres moyens pour la protection des cultures sans avoir des effets nuisible à la santé ni à l'environnement d'où la nécessité d'explorer des solutions alternatives comme l'utilisation des substances d'origine végétale en tant que biopesticide riche en métabolites secondaires capables de procurer un effet protecteur grâce à leur pouvoir antioxydant et propriétés biocides contre les agents phytopathogènes (**Toumnou et al., 2012**). Les molécules phytochimiques sont des métabolites secondaires présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines). Elles peuvent être définies comme des molécules essentielles à la vie des plantes, sont nécessaires dans l'interaction de la plante avec son environnement en jouant le rôle de médiateurs de reconnaissance entre les plantes, ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés et jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (**Macheix et al., 2005**).

Des études ont été faites par **Madhava-Naidou et al (2011)** sur la composition phytochimique de la poudre des graines de fenugrec qui ont démontré leurs activités biologiques y compris l'effet antioxydant, cette composition phytochimique varie en fonction de l'origine géographique de la plante, le climat, les pratiques culturales et la technique d'extraction (**Rodolfo et al., 2006**).

Dans ce contexte, le sujet est subdivisé en deux grandes parties ; une synthèse bibliographique résumant les principales notions et données présentées dans la littérature concernant le fenugrec et les métabolites phytochimiques, la deuxième partie est réservée au volet expérimental dans lequel nous avons réalisé les objectifs de notre étude qui sont axés sur la caractérisation physique et chimique d'extraits aqueux des graines de fenugrec (*Trigonella foenum graecum* L.), étude de leur phytochimie et de leur analyse chromatographique par HPLC, évaluation de leur activité antioxydante et émulsifiante et ainsi de leur propriétés biocides (activité antibactérienne et antifongique).

# Chapitre I

## Synthèse bibliographique

## I.1. Le fenugrec

À l'âge de nos ancêtres néolithiques les hommes utilisaient le fenugrec comme épice, mais aussi comme herbe médicinale polyvalente car c'était l'une des plus anciennes plantes médicinales et culinaires connues dans l'histoire, originaire d'Asie du Sud, de l'Inde et de Chine, cette plante a été introduite et répandue entre autres dans la région méditerranéenne ainsi qu'en Russie et dans l'ensemble des Balkans (**Christian et Ursula, 2001**).

Les plantes du genre *Trigonella* et en particulier de l'espèce cultivée *T. foenum-graecum* L. (fenugrec) sont connus et utilisées à des fins différentes dans les temps anciens, surtout en Grèce et en Egypt (**Rouk et Mangesha, 1963**). En Afrique du nord, elle a été cultivée autour des oasis sahariennes depuis très longtemps (**Duke, 1986**).

Le fenugrec a été introduit en Europe centrale au début du neuvième siècle (**Schayenberg et Apris, 1990**), selon **Fazli et Hardman (1968)** Charlemagne a encouragé la culture dans ce domaine. **Rosengarten (1969)** rapporte que les Romains ont obtenu la plante de la part des Grecs. En 1550 avant Jésus-Christ, cette plante apparut en Egypte pour soigner les brûlures, 10 siècle plus tard, Hippocrate le mentionna comme remède apaisant, qui en plus de ses propriétés digestives, soulageait les inflammations et les douleurs rhumatismales (**Schayenberg et Apris, 1990**).

### I.1.1. Botanique et culture

Le fenugrec est une herbe annuelle multipliée par semis en rangées, elle atteint 30 cm à 50 cm de hauteur, pour bien pousser, elle a besoin de se trouver dans un endroit ensoleillé, ses exigences par rapport au sol sont plutôt modestes, il préfère un sol plutôt maigre et bien perméable (**Christian et al., 2001**).

Ses feuilles évoquant le trèfle possèdent trois folioles ovales, les fleurs sont de couleur crème et séparées ou bien encore se dressent par paires dans les axes des feuilles (figure 1), la période de floraison s'étend d'avril jusqu'en juin, elle produit des gousses longues et minces qui renferment jusqu'à deux dizaines de minuscules graines (**Christian et al., 2001**). Selon **Volpé et al (2009)**, le fenugrec se caractérise par :

- Plante annuelle, pouvant atteindre 60 cm de hauteur ;
- Feuilles composées de trois folioles ovales (proches de celles du trèfle) ;
- Fleurs de couleur blanc jaunâtre ;

- Fruits sous forme de gousses renfermant 10 à 20 graines.
- Graines de forme anguleuse, couleur brun clair, à forte odeur caractéristique (en Mycologie, « odeur du fenugrec » pour qualifier les composants aromatiques de certains champignons).



**Figure 1 :** *Trigonella foenum-graecum* L. (Volpé et al., 2009) .

Les graines de fenugrec sont en forme d'un disque, constituées d'un embryon jaune central entouré d'une couche cornée et relativement importante d'endosperme semi transparent contenant de la gomme de galactomannane. Une enveloppe tenace et brune foncée entoure l'endosperme. La couleur de la fraction de la gomme dépend de la quantité de l'enveloppe (couleur marron) et cotylédons (couleur jaune) présents (Madhava-Naidou et al., 2011) (figure 2), la plante toute entière dégage une odeur épicée caractéristique.



**Fleur**

**Feuilles**

**Graines**

**Figure 2 :** Différents organes du fenugrec (Madhava-Naidou et al., 2011).

### I.1.2. Taxonomie de la plante

Selon les données de « Natural Resources Conservation Service » du département d'agriculture aux Etats Unis le fenugrec est classé comme suit (tableau 1) :

**Tableau 1 : Taxonomie du fenugrec (Crete, 1965).**

<b>Nom français</b>	Trigonelle, Sénégrain, Foin grec
<b>Nom anglais</b>	Fenugreek, Amberfenugreek
<b>Nom vernaculaire arabe</b>	Halba
<b>Nom scientifique</b>	<i>Trigonella foenum-gracum</i> L.
<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous règne</b>	Tracheobionta
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédone
<b>Sous classe</b>	Rosidae
<b>Ordre</b>	Fabales
<b>Sous famille</b>	Papilionacées
<b>Tribu</b>	Trifoliées
<b>Genre</b>	Trigonella
<b>Espèce</b>	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.

### I.1.3. Pratique culturale

La préparation du sol se fait par un labour moyen de 30 à 40 cm doit être effectué avant la culture, il sera suivi d'un disquage pour aplanir le sol, la dose de semis recommandée à l'hectare est de 30 à 40 Kg, Le semis s'effectue le mois d'octobre à décembre, un désherbage s'effectue dans les 15 jours suivants associé à une irrigation durant la période hivernale (tous les 15jours) et tous les 4 à 5 jours durant la période chaude. La récolte des graines se fait 6 mois après le semis en donnant un rendement moyen de 24 quintaux / hectare (**Mokkedem, 2004**).

### I.1.4. Composition

La graine du fenugrec est dotée d'une grande qualité nutritive, elle renferme un taux élevé de protéines riche en lysine, de lipides composés essentiellement d'acide gras oméga-6 et oméga-3 et des glucides surtout mucilagineux (**Bidri et choay ,2013**). Ces graines renferment aussi les alcaloïdes (trigonelline, gentianine, choline), salicylés, des polyphenols (flavonoïdes) (**Ahmadiani et al., 2001**), fibres mucilagineuses (jusqu'à 40 %), saponines, protéines (jusqu'à 30%), vitamines A, B1, C, minéraux et oligo-éléments (calcium, magnésium, phosphore, fer, soufre), polysaccharides comme les galactomannanes (**Volpé et al., 2009**), les huiles essentielles, l'acide nicotinique et des acides aminés libres dont un acide aminé particulier, la 4-hydroxyisoleucine qui a une activité hypoglycémiant (**Kumar et al., 2013**). Le tableau 2 indique la composition en nutriments des graines du fenugrec.

**Tableau 2 :** Composition en éléments nutritifs des graines du fenugrec (quantité en g / 100 g) (**Moorthy et al., 2010**).

Humidité	13 à 14 g
Glucides	7 à 8g
Sucres Totaux	2,5 à 3 g
Protéines	28 à 32 g
Lipides	7 à 8 g
Lipides saturés	1,2 à 1,6 g
Fibres	23,5 à 25,5 g
Cholestérol	3,8 à 4,3 mg
Calcium	140 à 160 mg
Sodium	28 à 32 mg
Vitamine A	22 à 26 µg
Cendres	2,9 à 3,3 g
Fer	9 à 12 mg



## **I.2. Propriétés et utilisation du fenugrec**

Les propriétés du fenugrec et ses utilisations sont nombreuses et diversifiées :

### **I.2.1. Propriétés antioxydantes**

Le fenugrec contient des composés phénoliques et les flavonoïdes qui aident à améliorer sa capacité antioxydante, cette propriété pourrait être utile en empêchant ou en ralentissant le progrès des certaines maladies menaçant la plante elle-même en raison de l'effet antioxydant (**Priya et al ., 2011**).

### **I.2.2. Propriétés antimicrobiennes**

Les graines de fenugrec ont des propriétés antimicrobiennes avec un large spectre d'action. Elles agissent contre les bactéries phytopathogènes, elles produisent des huiles à propriétés toxiques qui empêchent la croissance de ces bactéries, des tests non-cliniques suggèrent que le fenugrec pourrait aussi avoir des effets antiviraux et antifongiques (**Thomas et al., 2006**).

### **I.2.3. Propriétés thérapeutiques**

L'hypocholestérolémie est une carence de cholestérol dans le sang, les graines de fenugrec réduisent le cholestérol sérique, les triglycérides et les lipoprotéines, la consommation de fenugrec dans le régime alimentaire réduit l'accumulation de triglycérides dans le foie (**Kumar et al., 2013**).

Le fenugrec contribue à stabiliser la glycémie en manifestant une action inhibitrice sur les enzymes qui génèrent le glucose au niveau du foie, notamment chez les diabétiques modérés, en outre, les graines de fenugrec améliorent l'utilisation du glucose périphérique, ce qui contribue à l'amélioration de la tolérance au glucose et exerce son effet hypoglycémiant en agissant au niveau des récepteurs de l'insuline ainsi qu'au niveau gastro-intestinal (**Kumar et al., 2013**).

Le fenugrec s'est avéré efficace contre le développement de cellules tumorales chez des rats, ainsi, Le prétraitement avec un extrait de fenugrec a montré qu'il pourrait améliorer la numération des cellules macrophages chez les rats, lorsque ces rats ont ensuite été inoculées avec des cellules tumorales, la croissance de ces cellules tumorales a été significativement inhibée (**Snehlata et Payal, 2012**). Le fenugrec a présenté des capacités modificatrices de l'apoptose induite par le cyclophosphamide et la peroxydation lipidique (**Meghwal et Goswami, 2012**), cette propriété du fenugrec en fait une plante médicinale prometteuse pour la thérapie complémentaire chez les patients cancéreux.

Le fenugrec est nutritif et anabolique, c'est une source de protéines, de vitamines et de minéraux. Ses vertus nutritives encouragent aussi la repousse des cheveux. Quant à son action anabolique, il aide à gagner en musculature tout en se débarrassant du gras excédentaire, notamment grâce à son contenu élevé en fibres (**Meghwal et Goswami, 2012**). Le fenugrec est un apéritif et digestif : sa saveur amère et son potentiel légèrement réchauffant font du fenugrec un apéritif et un tonique digestif apprécié. Son contenu en huiles essentielles inhibe par ailleurs la formation de gaz intestinaux lors de la digestion (**Madhava-Naidou et al., 2011**).

#### I.2.4. Propriétés nutritionnelles

Le fenugrec se trouve dans l'alimentation sous forme de poudre, entrant dans la composition de certains mélanges d'épices : curry, ras el hanout ou graines rôties ou grillées, plats de légumes mijotés, épinards, pommes de terre, poissons, les feuilles de fenugrec sont consommées en salade ou sous forme cuite (**Volpé et al., 2009**).

Le fenugrec est un galactogène, il enrichit et accroît la production de lait maternel tout en lui ajoutant des huiles essentielles, ce qui réduit les risques de coliques chez le nourrisson, cet usage est très répandu et son efficacité est attestée par de nombreuses femmes l'ayant expérimenté. Le tableau 3 donne les principaux usages du fenugrec.

**Tableau 3** : Principaux usages alimentaires du fenugrec (**Volpé et al., 2009**).

Organes	Effets
<b>Graines (épice)</b>	Traditionnellement utilisées pour stimuler l'appétit et pour favoriser la production du lait maternel.
<b>Graines et feuilles (ingrédient)</b>	La fabrication de mélange d'épices aromatiques sous différents noms vernaculaires comme ras el hanout maghrébin.
<b>Extraits de graines.</b>	Fortifier les convalescents des personnes anémiques ou déprimés.
	Réduction du taux de cholestérol et des triglycérides.
	Cataplasme traite les blessures, les ulcères de jambe les douleurs musculaires.
	Cancer du sein.

**I.2.5. Effets indésirables**

La consommation de grandes quantités de graines de fenugrec peut causer des troubles gastro-intestinaux (diarrhée, ballonnements), généralement passagers, à cause de leur haute teneur en fibres (**Ghedira et al., 2010**).

### I.3. Les métabolites phytochimiques

Les molécules phytochimiques sont des métabolites secondaires des végétaux, ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires), par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, les métabolites secondaires sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle de signaux de reconnaissance entre les plantes (allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes, ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés et jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (**Macheix et al., 2005**).

Ces composés sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide, ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines) (**Boizot et Charpentier, 2006**). D'après **Macheix et al (2005)**, la structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés).

#### I.3.1. Biosynthèse

Les polyphénols sont synthétisés à partir des métabolites primaires via deux voies : la voie de l'acide shikimique et la voie de polyacétates (**Guignard et Dupont, 2004**).

##### I.3.1.1. Voie shikimate

C'est la voie de biosynthèse des composés aromatiques, selon **Richter (1993)**, cette voie conduit aux carbohydrates ou acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine) dont la désamination conduit aux acides cinnamiques et à leurs dérivés (acide benzoïque et coumarines).

##### I.3.1.2. Voie d'acétate malonate

Les systèmes aromatiques sont aussi formés par condensation répétée d'unités acétate, cette dénomination rappelle que c'est le malonyl CoA qui formait par décarboxylation les unités en C2 pour allonger le complexe acyle CoA (**Richter, 1993**).

#### I.3.2. Classification

Selon **Sarni-Manchado et Cheynier (2006)**, la complexité et le degré de modification du squelette de base font que les composés phénoliques sont classés :

### I.3.2.1. Composés phénoliques simples

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C<sub>6</sub> (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

➤ **Acides hydroxybenzoïques**

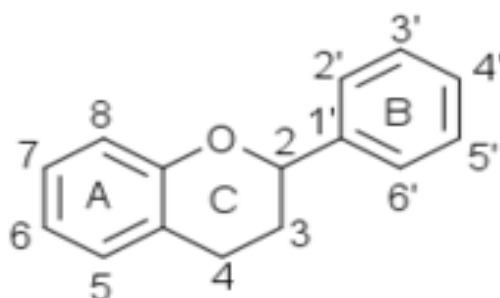
Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), ils existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides, les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont l'acide vanillique, l'acide gentisique, l'acide salicylique et l'acide gallique (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

➤ **Acides hydroxycinnamiques (phénylpropanoïdes)**

Ils dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, les acides hydroxycinnamiques sont l'acide caféique, l'acide sinapique, l'acide coumarique...etc (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

➤ **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques dont beaucoup sont des pigments responsables de la coloration de nombreux fruits et fleurs (**Bruneton, 1987**). Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, composés de deux cycles benzéniques (A et B) en C<sub>6</sub> reliés par une chaîne en C<sub>3</sub> (figure 3). Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone, La distinction des sous-classes se fait sur la conformation de cette structure centrale (C).



**Figure 3:** Structure de base des flavonoïdes (**Richter, 1993**)

Selon le degré d'oxydation du squelette de base, les flavonoïdes sont ainsi divisés en différents sous-groupe (**Richter, 1993**):

### a- Flavanols

Les flavanols sont caractérisés par la présence de deux groupements hydroxyles en C3-C3', d'où le nom de dihydroflavanols. Dans la plupart du temps, ils sont présents sous forme d'glycosides comme la quercétine, la myricétine, l'isorhamnétine.

### b- Flavanones

Ces composés se caractérisent par l'absence de la double liaison entre C2-C3, ils sont sous forme de traces dans les plantes.

### c- Flavones

Les flavones se présentent sous forme de composés libres, ils entrent dans la composition de la substance farineuse produite par les primevères.

### d- Anthocyanidines

Ce sont des dérivés du 2-phénylbenzopyrylium qui possèdent des fonctions phénols libres, éthers ou glycoside (figure 4).

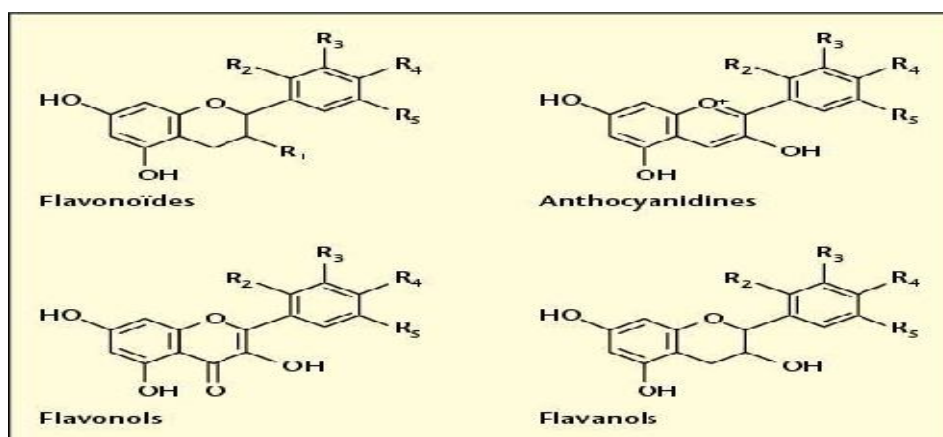


Figure 4: Structures des flavonoïdes (Milane, 2004).

### I.3.2.2. Composés phénoliques condensés

Ces composés résultent généralement de la condensation de certaines formes simples de cycles benzeniques, selon la nature des constituants impliqués et selon le type de condensation, ces composés plus au moins complexes (Sarni-Manchado et cheynier, 2006).

#### ➤ Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques, ils sont hydrosolubles ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da, ils contiennent un nombre suffisant de groupes hydroxyphénoliques permettant des combinaisons stables avec les protéines, les polysaccharides, acides nucléiques et stéroïdes (Hedqvist, 2004). Les tanins sont classés en deux catégories : les tanins hydrolysables ou gallotanins, et les tanins condensés ou catéchines (Sergeant et al., 2001).

**a- Tanins hydrolysables**

Ce sont des polyesters de glucides et acides phénoliques, ils sont facilement scindés par les acides ou les enzymes (tannases) en oses et en acides phénoliques, selon la nature de celui-ci, on distingue les tanins galliques et les tanins ellagiques (**Paris et Hurabeille, 1980**).

**b- Tanins condensés**

Ces composés résultent de la polymérisation de molécules élémentaires de flavanes (catéchines ou leucoanthocyanidines) et résistent à l'hydrolyse (**Ribereau-Gayon, 1968**). Leur structure est voisine de celle des flavonoïdes, et ne possèdent pas de sucre dans leur molécule (**Paris et Hurabeille, 1981**).

**c- Lignines**

Ce sont des polymères d'unités phényle propane (C6-C3), les plus abondants après la cellulose, et responsables dans la rigidité de la plante en raison de leur caractère hydrophobe (**Sarni-Manchado et cheynier, 2006**).

**I.3.3. Rôles physiologiques des composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont associés à de nombreux processus physiologiques des végétaux: croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, ce sont les éléments de base des lignines, l'un des constituants majeurs de la paroi des cellules végétales (**Nitsch et Nitsch, 1961**), les phénols sont antiseptiques, on suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. En effet, les polyphénols sont impliqués dans les interactions plantes microorganismes: dans les pathogénèses comme dans les symbioses (**Bruneton, 1987**). Les flavonoïdes agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponse à certains stress tels que les radiations ultraviolettes, ce sont également des agents chélateurs des métaux nocifs aux plantes et des inhibiteurs d'enzymes, ils sont impliqués dans la photosensibilisation, les transferts d'énergie, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes (**Di Carlo et al., 1999**). Les anthocyanes jouent un rôle protecteur dans l'épiderme, agissant comme un filtre pour réduire les niveaux d'irradiation néfastes, en plus elles attirent les insectes pollinisateurs (**Burns et al., 2003**).

**I.3.4. Propriétés biologiques des molécules phytochimiques**

Les métabolites secondaires possèdent plusieurs propriétés :

#### **I.3.4.1. Propriétés antimicrobiennes**

Les cellules végétales résistent aux infections par la synthèse des composés phénoliques, l'accumulation rapide de ces derniers dans le site de l'infection d'où leur intérêt en infectiologie qui représente la première étape de défense (**Fleuriet et Macheix, 1977; Rees et Harborne, 1985**). Les composés phénoliques sont de forts agents antimicrobiens, ils agissent à des concentrations de l'ordre de microgrammes par millilitre, l'action des composés phénoliques sur les souches bactériennes peut être bactériostatique ou bactéricide, ces composés peuvent agir directement sur les microorganismes en attaquant des cibles privilégiées et ils peuvent inhiber leurs systèmes de résistance aux antibiotiques (**Van Vuuren, 2008 ; Hemaiswarya et al., 2008**).

#### **I.3.4.2. Propriétés antioxydantes**

Les composés phénoliques possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par l'organisme ou formés en réponse à des agressions de l'environnement (polluant, infection) (**Lahouel et al., 2004**). Les polyphénols sont des substances bioactives les plus puissantes en thérapeutique, une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leurs implication probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant, les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Un antioxydant est toute substance capable de retarder ou de prévenir l'oxydation des substrats, les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, certains antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres telles que les vitamines et les polyphénols sont apportés par des végétaux (**Pincemail et Defraigne, 2004**).

#### **I.3.5. Stress oxydatif**

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de la capacité de la cellule à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs, il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire, induite soit par production excessive de radicaux libres ; soit par diminution de la capacité de défense antioxydante (**Favier, 2003**).

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides, le stress oxydant cause plusieurs dégâts au niveau cellulaire : la nécrose, sclérose, fibrose tissulaire et vieillissement accéléré (**Favier, 2003**).



### I.3.6. Radicaux libres

#### I.3.6.1. Définition

Un radical libre (RL) est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un ou plusieurs électrons non appariés. La présence d'un électron célibataire leur confère une grande réactivité et donc une demi-vie très courte (**Halliwell et Whiteman, 2004**). En effet, ce radical libre aura toujours tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité.

#### I.3.6.2. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) incluent les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, radical peroxy... etc) mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires (oxygène singulet, peroxyde d'hydrogène, hydroperoxyde) (**Bartosz, 2003 ;Halliwell et Whiteman, 2004**).

Les principales espèces réactives d'oxygène :

##### a- Anion superoxyde $O_2^-$

L'anion superoxyde  $O_2^-$  est un dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réaction conduisant à la production de molécule très nocives, en présence d'une quantité d'énergie suffisante avec la molécule d'oxygène, il peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde, ce dernier intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions (**Gardés-Albert et al., 2003**).

##### b- Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

Le radical peroxyde est considéré comme une espèce réactive dérivée d'oxygène (ERO), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est le résultat d'une réaction entre deux anions super oxyde (**Gardés-Albert et al., 2003**).

##### c- Radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ )

C'est le produit de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec les ions métalliques (exemple :  $Fe^{+2}$ ), les radicaux hydroxyles jouent un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique (**Milane, 2004**) et attaquent tous les matériaux biologiques (ADN, protéines, lipides...etc).

##### d- Oxygène singulet ( $O^1$ )

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée, c'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules, il est formé à partir de l'ion superoxyde (**Jungbluth, 2008**).

### I.3.6.3. Production des radicaux libres

Les formes radicalaires sont les intermédiaires dans la transition au cours de la chaîne respiratoire, les espèces réactionnelles de l'O<sub>2</sub> ne sont pas indépendantes les unes des autres, elles agissent en cascade. (**Goudable et Favier, 1997**).

Il existe plusieurs sources exogènes de radicaux libres : la pollution, le tabac, l'ozone, les métaux lourds, les polluants alimentaires, l'excès d'alcool...etc, les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres, soit en incident la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou Y, soit en activant des molécules photo-sensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont par ce mécanisme produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet.

### I.3.6.4. Cibles de radicaux libres

Les ERO exercent leurs actions délétères sur des molécules biologiques (ADN, les protéines, les lipides).

#### a. ADN

L'ADN soit la mémoire de la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux libres et ces derniers induisent des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN (**Saison et al., 2012**).

#### b. Protéines

Les acides aminés des protéines sont la principale cible des ERO, cette action se situe essentiellement soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydation soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne (**Saison et al., 2012**).

#### c. Lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (**Saison et al., 2012**).

## I.4. Les micro-organismes phytopathogènes

### I.4.1. Bactéries phytopathogènes

Les bactéries phytopathogènes sont des bactéries responsables de maladies bactériennes ou bactérioses chez les végétaux, vivant en parasites sur les plantes sauvages ou cultivées, les bactéries provoquent, entre autres, chancres et pourriture molles, alors que chez l'Homme et les animaux, les bactéries sont la principale cause de maladies, le nombre d'espèces de bactéries phytopathogènes est estimé à une centaine et reste très secondaire comparé à celui des espèces de champignons et pseudo champignons phytopathogènes qui serait supérieur à 10000, néanmoins l'impact économique des maladies bactériennes peut être très important pour certaines cultures, telles que le chancre bactérien des agrumes dû à *Xanthomonas citri subsp. citri* qui a entraîné la perte de millions d'arbres aux États-Unis et au Brésil, ou la maladie de Pierce due à *Xylella fastidiosa* qui entrave la culture de la vigne dans certaines régions des États-Unis (Sarah et al., 2014).

La plupart des bactéries phytopathogènes appartiennent aux genres suivants : Acidovorax, Agrobacterium, Burkholderia, Clavibacter, Erwinia, Pantoea, Pectobacterium, Pseudomonas, Ralstonia, Streptomyces, Xanthomonas, Xylella, Phytoplasma et Spiroplasma (Cooper, 2006).

Les maladies bactériennes chez les végétaux sont décrites depuis l'Antiquité : pourritures, nécroses, jaunissement, dépérissement, chancres, mais ce n'est que depuis l'avènement du microscope que la description de ces agents infectieux a pu se faire.

#### I.4.1.1. Principales bactéries phytopathogènes

Selon Mansfield (2012), les principales bactéries phytopathogènes sont :

1. *Pseudomonas syringae*, les nombreux pathovars de cette espèce provoquent des maladies de grande importance économique et ont joué un grand rôle dans l'appréhension scientifique de la pathogénicité bactérienne ;
2. *Ralstonia solanacearum*, agent de bactérioses vasculaires dans diverses cultures de grande importance économique (bananier, tabac, pomme de terre, etc.) ;
3. *Agrobacterium tumefaciens*, doit sa place dans ce classement principalement à son importance scientifique ;
4. *Xanthomonas oryzae*, agent d'une des plus graves maladies du riz ;

5. pathovars de *Xanthomonas campestris*, responsables de nombreuses maladies des plantes cultivées dans le monde ;
6. *Xanthomonas axonopodis* , agent de la bactériose vasculaire du manioc ;
7. *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien des arbres fruitiers ;
8. *Erwinea carotovora*, responsable de nombreuses maladies de cultures maraichères de grande importance économique, c'est aussi la première bactérie phytopathogène dont le génome a été séquencé ;
9. *Dickeya* (*D. dadantii* et *D. solani*), agents de maladies de la pomme de terre ;
10. *Pectobacterium atrosepticum*, agents de maladies (pourritures molles chez diverses cultures, notamment la betterave et la pomme de terre.

#### **I.4.1.2. Mode d'action des bactéries phytopathogènes**

##### **a- Phase de conservation**

Certaines bactéries sont capables de former des structures de protection : les spores, elles sont résistantes à des températures de 70 à 80 °C, aux rayons UV et X, aux antiseptiques, à la dessiccation, placées en conditions favorables, elles « germent » pour redevenir des cellules actives (**Lepoivre, 2005**).

Les bactéries parasites sont souvent naturellement présentes à la surface des organes aériens des plantes, on dit qu'elles vivent en épiphyte, cette phase épiphyte est favorisée par un degré d'humidité important, à cet égard, la présence de la capsule et des exopolysaccharides joue un rôle important dans leur capacité à résister à la dessiccation (**Lepoivre, 2005**).

##### **b- Phase d'infection**

L'infection se fait le plus souvent de façon aléatoire, par les ouvertures naturelles, stomates, lenticelles, ou des blessures, les plaies peuvent être causées de plusieurs façons, notamment par des insectes phytophages, le sol et la rhizosphère (la zone proche des racines).

Les phytoplasmes et spiropasmes qui sont des bactéries parasites obligatoires des tissus conducteurs des végétaux ne peuvent pas vivre de façon saprophyte. Entre deux cultures, ces agents se conservent dans les plantes pérennes, bisannuelles ou bien dans les insectes vecteurs, à l'image des phytovirus, certaines bactéries peuvent être transportées par des insectes qui ingèrent les bactéries qui se développent dans l'insecte avant de pouvoir être

à nouveau transmises lors d'une nouvelle piqûre, une fois à l'intérieur de la plante, les bactéries croissent rapidement, elles produisent plusieurs composés : des enzymes protéases (qui hydrolysent les protéines), pectinases (qui hydrolysent la pectine, un composant essentiel de la paroi végétale), les amylases et lipases (qui hydrolysent l'amidon et les lipides).

Le développement de certaines bactéries dans les tissus conducteurs, empêche la circulation normale des sèves provoquant des trachéobactérioses d'autres bactéries du genre *Agrobacterium* pratiquent la colonisation génétique provoquant des proliférations cellulaires et des tumeurs chez la plante (**Lepoivre, 2005**).

### c- Phase de dispersion

La pluie joue un rôle très efficace dans la dispersion de bactéries présentes sur les feuilles ou sur le sol, les exsudations bactériennes muqueuses peuvent sécher et se transmettre par le vent, les insectes pollinisateurs peuvent transmettre les bactéries quand celles-ci attaquent les fleurs (cas du feu bactérien chez les poiriers communs), les insectes piqueurs jouent le rôle de vecteurs des bactéries qui vivent dans les tissus conducteurs, Les machines agricoles peuvent également transmettre les bactéries en remuant le sol (**Lepoivre, 2005**).

#### I.4.1.3. Stratégie parasitaire des bactéries phytopathogènes

La tendance évolutive dans les stratégies de parasitisme est marquée par un passage progressif d'un parasitisme de faiblesse facultatif, la bactérie pouvant attaquer une large gamme d'hôtes, à un parasitisme obligatoire, la bactérie est en relation étroite avec certains hôtes, toutes ces stratégies se retrouvent chez les bactéries phytopathogènes, les types de parasitismes les plus évolués impliquent des mécanismes de reconnaissance poussés entre la bactérie et la plante hôte.

La bactérie du genre *Agrobacterium* pratique la colonisation génétique, elle intègre son plasmide au génome des plantes qu'elle infecte, grâce aux gènes plasmidiaux, la plante synthétise deux nouvelles molécules: d'une part, l'opine qui est un composé dont se nourrit la bactérie, d'autre part, l'auxine qui est une hormone de croissance, cette hormone provoque la multiplication cellulaire aboutissant à une tumeur ou à une prolifération anormale de racines, ce processus est détourné par l'homme pour la création de plantes génétiquement modifiées : le gène tumoral virulent est alors remplacé par un gène d'intérêt agronomique (**Lepoivre, 2005**).

## I.4.2. Champignons phytopathogènes

Les champignons sont la principale cause de maladies chez les plantes et sont responsables d'environ 70 % des maladies des plantes cultivées (**Acero et al., 2014**). On estime entre dix mille et quinze mille espèces le nombre d'organismes du type champignons ou pseudo-champignons susceptibles d'infecter les plantes (contre une cinquantaine susceptibles d'infecter l'homme), les pertes économiques annuelles dues aux maladies fongiques dans l'agriculture mondiale, avant et après la récolte, étaient estimées en 2003 à plus de 200 milliards d'euros, et le coût annuel des traitements fongicides s'élève pour les seuls États-Unis à plus de 600 millions de dollars (**Dillip, 2003**).

Les champignons phytopathogènes sont capables d'infecter n'importe quel tissu à n'importe quel stade de croissance de la plante, en suivant un cycle biologique complexe qui peut comporter des stades de reproduction sexuée ou asexuée (**Charles et al., 2012**), ils provoquent des maladies cryptogamiques chez les plantes, ces champignons appartiennent aux différents groupes du règne des ou « champignons vrais » : ascomycètes, basidiomycètes, chytridiomycètes, zygomycètes et deutéromycètes (champignons imparfaits).

Les agents pathogènes responsables de maladies cryptogamiques comprennent aussi des protistes : plasmodiophoramycètes, dont les genres les plus importants sont plasmodiophora et spongospora, et oomycètes, qui comprennent notamment la famille des peronosporaceae (agents des mildious).

L'infection des plantes par un champignon phytopathogène se déroule selon un processus, appelé « cycle de la maladie », dont la complexité varie selon les espèces, mais qui comprend toujours un certain nombre d'étapes obligatoires (inoculation, adhérence, germination, pénétration et invasion) (**Acero et al., 2014**).

### I.4.2.1. Forme de parasitisme

La colonisation de l'hôte par les champignons phytopathogènes (ou par d'autres agents pathogènes) peut se faire selon deux modes principaux : biotrophe, lorsque l'agent pathogène colonise des tissus vivants, ou nécrotrophe lorsqu'il tue les cellules végétales, à l'aide de toxines, avant de les coloniser une catégorie intermédiaire est celle des hémibiotrophes qui commencent par une phase biotrophe avant de devenir nécrotrophes (**Hermann et Day., 2001**).

Les champignons nécrotrophes admettent généralement une vaste gamme de plantes hôtes tandis que les espèces biotrophes montrent une grande spécialisation souvent à l'égard

d'une seule espèce végétale, la plupart des espèces biotrophes sont des parasites obligatoires, avec une phase de survie saprophyte limitée, il est généralement impossible de les cultiver artificiellement, à quelques exceptions près comme *Podosphaera fusca* ou *Blumeria graminis*.

Les deux groupes les plus importants de champignons phytopathogènes biotrophes sont ceux qui provoquent les rouilles (*Basidiomycètes*) et les oïdiums (*Ascomycètes*) (Hermann et Day., 2001).

#### I.4.2.2. Principaux champignons phytopathogènes

Selon une enquête internationale menée en 2012 auprès de mycologues par la revue *Molecular Plant Pathology*, les dix espèces ou genres de champignons phytopathogènes les plus importants, en tenant compte tant des aspects scientifiques qu'économiques, ces organismes pathogènes, dont six sur dix attaquent plus spécifiquement les cultures maraichères et les denrées stockées seraient les suivants (Dean, 2012) :

- *Magnaporthe oryzae*, agent de la pyriculariose du riz ;
- *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise ;
- *Puccinia spp.*, agents de rouilles affectant notamment les Poaceae (dont les céréales et plus particulièrement le blé) ;
- *Fusarium graminearum*, agent de la fusariose du maïs et de la fusariose ou gale du blé ;
- *Fusarium oxysporum*, agent de la fusariose vasculaire qui affecte de nombreuses plantes ;
- *Blumeria graminis*, agent de l'oïdium des céréales ;
- *Mycosphaerella graminicola*, agent de la septoriose du blé ;
- *Colletotrichum spp.*, agents des anthracoses affectant de nombreuses plantes, notamment arbres fruitiers, plantes maraichères et ornementales, et causant des pertes post-récolte importantes chez les fruits et légumes entreposés ;
- *Ustilago maydis*, agent du charbon du maïs et organisme modèle pour la recherche en phytopathologie et en génétique des plantes ;
- *Melampsora lini*, agent de la rouille du lin, qui trouve sa place dans le classement pour son rôle de « système modèle » pour l'étude de l'immunité chez les plantes.

### **I.4.3. Virus**

La plupart des plantes potagères peuvent être touchées par des phytovirus (tomates, pommes de terre, haricots, choux-fleurs, courgettes, betteraves, tabacs, tulipes, cyclamens, chrysanthèmes, dahlias, orchidées...). Les phytovirus peuvent infecter toutes les parties d'une plante. Les symptômes sont très variables voire, parfois, invisibles à l'œil nu, ce qui complique l'identification de la maladie, les plus caractéristiques sont (**Wichtl et Anton., 2003**) :

- Les mosaïques, marbrures ou panachures du feuillage ou des fleurs par altération voire destruction des pigments ou, à l'inverse, la concentration anormale de ceux-ci, délimite des plages diversement colorées sur le limbe, les pétales ou les sépales des plantes ;
- Les nécroses, des taches nécrotiques peuvent apparaître après les décolorations, à la mort des tissus. Lorsque la maladie évolue, les taches nécrotiques se transforment en larges zones desséchées ou s'étendent le long des nervures des feuilles.

### **I.5. Méthodes de lutte**

Bien que la culture de variétés résistantes aux maladies soit l'un des meilleurs moyens de combattre les phytopathogènes bactériens, elle n'est pas infaillible, ces petites créatures dont la capacité d'adaptation est très élevée mutent pour attaquer même les variétés les plus résistantes (**Hermann et Day., 2001**).

#### **I.5.1. Traitement chimique**

- Produits cupriques : sulfate de cuivre ammoniacal- oxychlorure de cuivre.
- Sodium orthophénylphénate - Foséthyl-aluminium.

#### **I.5.2. Traitement antibiotique**

Les traitements antibiotiques sont interdits dans la plupart des pays pour des raisons sanitaires (sauf dans certains cas, feu bactérien en Belgique par exemple) ;

- Streptomycine, Terramycine, Agrimycine, Kasugamycine

#### **I.5.3. Lutte biologique**

L'organisation internationale de lutte biologique définit cette pratique comme étant l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les ravageurs



et agents phytopathogènes. Cette définition est sujette à discussion, des divergences existant sur la place ou non de la résistance génétique dans cette catégorie (**Dillip, 2003**).

Les pesticides biologiques sont des dérivés de matériels naturels tels que les végétaux, animaux, microorganismes et certains minéraux. L'agence Américaine de la protection environnementale (EPA) classe les biopesticides dans trois catégories (**Dillip, 2003**) :

-*Les pesticides microbiens*: dont l'ingrédient actif est un microorganisme (bactérie, virus, champignon, protozoaire...)

- *Les pesticides d'origine végétale*: molécules produites par les plantes (molécules phytochimiques, extraits à base végétaux).

- *Les pesticides biochimiques*: qui interfèrent avec la croissance ou la reproduction du ravageur

Un agent de lutte biologique entre en jeu avec l'organisme pathogène lorsqu'ils consomment simultanément le même composé. L'agent doit utiliser rapidement les éléments nutritifs qui sont sur les organes de la plante, de sorte à couper l'alimentation du pathogène ou d'empêcher son installation, la concurrence peut se produire lorsque l'agent de lutte biologique diminue la disponibilité d'une substance particulière limitant ainsi la croissance de l'agent pathogène. Par exemple, la concurrence du fer dans les sols alcalins peut être un facteur limitant pour la croissance microbienne dans ces types de sols, on a également une compétition pour l'oxygène et l'espace (**Hermann et Day., 2001**).

## **I.6. Prévention**

Éviter l'excès d'humidité avec l'organisation du drainage et le contrôle de l'irrigation, éliminer les plantes malades, les débris pour ne pas endommager les tissus végétaux sains, pratiquer la rotation culturale suivi d'un système d'alternance en utilisant des variétés résistantes.

Désinfecter les semences avec hypochlorite de Na/Ca, formaldéhyde, oxychlorure de cuivre, traitement à la chaleur, nettoyer le matériel d'irrigation avec l'hypochlorite de Na/Ca, détergents, formol et désinfecter le sol par traitement vapeur – solarisation (**Dillip, 2003**).

Chapitre II

**Matériel**

**&**

**Méthodes**

## II.1. Objectifs

Les objectifs de notre thèse sont énumérés comme suit :

- Caractérisation physique et chimique des extraits aqueux des graines du fenugrec (pH, conductivité électrique, teneur en matière sèche, densité, viscosité, teneur en cendres, glucides totaux, teneur en protéines) .,
- Evaluation des propriétés émulsifiantes des extraits aqueux des graines de fenugrec en étudiant la stabilité, l'index de stabilité et leur indice de crémage .,
- Caractérisation qualitative (screening phytochimique) et quantitative des métabolites phytochimiques présents dans les extraits aqueux des graines du fenugrec .,
- Analyse chromatographique par HPLC des extraits aqueux des graines du fenugrec .,
- Evaluation des propriétés biocides des extraits aqueux des graines du fenugrec en examinant leur activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis des espèces phytopathogènes (*Erwinea carotovora* et *Fusarium oxysporum*).

## II.2. Lieu d'expérimentation

Notre étude expérimentale a été effectuée dans les laboratoires :

-Laboratoires de pédagogie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun, Tiaret à savoir : “Technologie Alimentaire, Biochimie Alimentaire, de microbiologie et Physiologie Végétale” .,

- Laboratoire de recherche d'Hygiène et Pathologie Animale- Institut des Sciences Vétérinaires, Université Ibn Khaldoun, Tiaret .,

-Laboratoire de recherche de Catalyse et de Synthèse en chimie Organique- au niveau de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Aboubaker Belkaide, Telemcen.

## II.3. Espèces phytopathogènes

Les espèces microbiennes utilisées pour évaluer les pouvoirs “antibactérien” et “antifongiques” des extraits aqueux des graines du fenugrec sont respectivement :

- *Erwinea carotovora* : fournie du laboratoire de Protection des Végétaux, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Université Saad Dahleb de Blida ;
- *Fusarium oxysporum* : fournie du laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

#### II.4. Extraits aqueux

Les extraits aqueux ont été préparés par macération et décoction selon les modes opératoires exprimés dans la partie méthodes d'analyse.

#### II.5. Matériel

##### II.5.1. Matériel du laboratoire

Les annexes (1 et 2) donnent respectivement les appareillages, les verreries, les produits chimiques et ainsi les milieux de culture employés durant notre étude expérimentale.

##### II.5.2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour réaliser l'extraction aqueuse est représenté par les graines du fenugrec (*Trigonella foenum graecum* L.) cultivées dans la région de Biskra, station El-Tawya -Algérie (figure 5) et identifiées par le laboratoire du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides (CRSTRA)-Biskra.



**Figure 5** : Champ de fenugrec à la station expérimentale El-Tawya- Biskra (Carnet du CRSTRA).

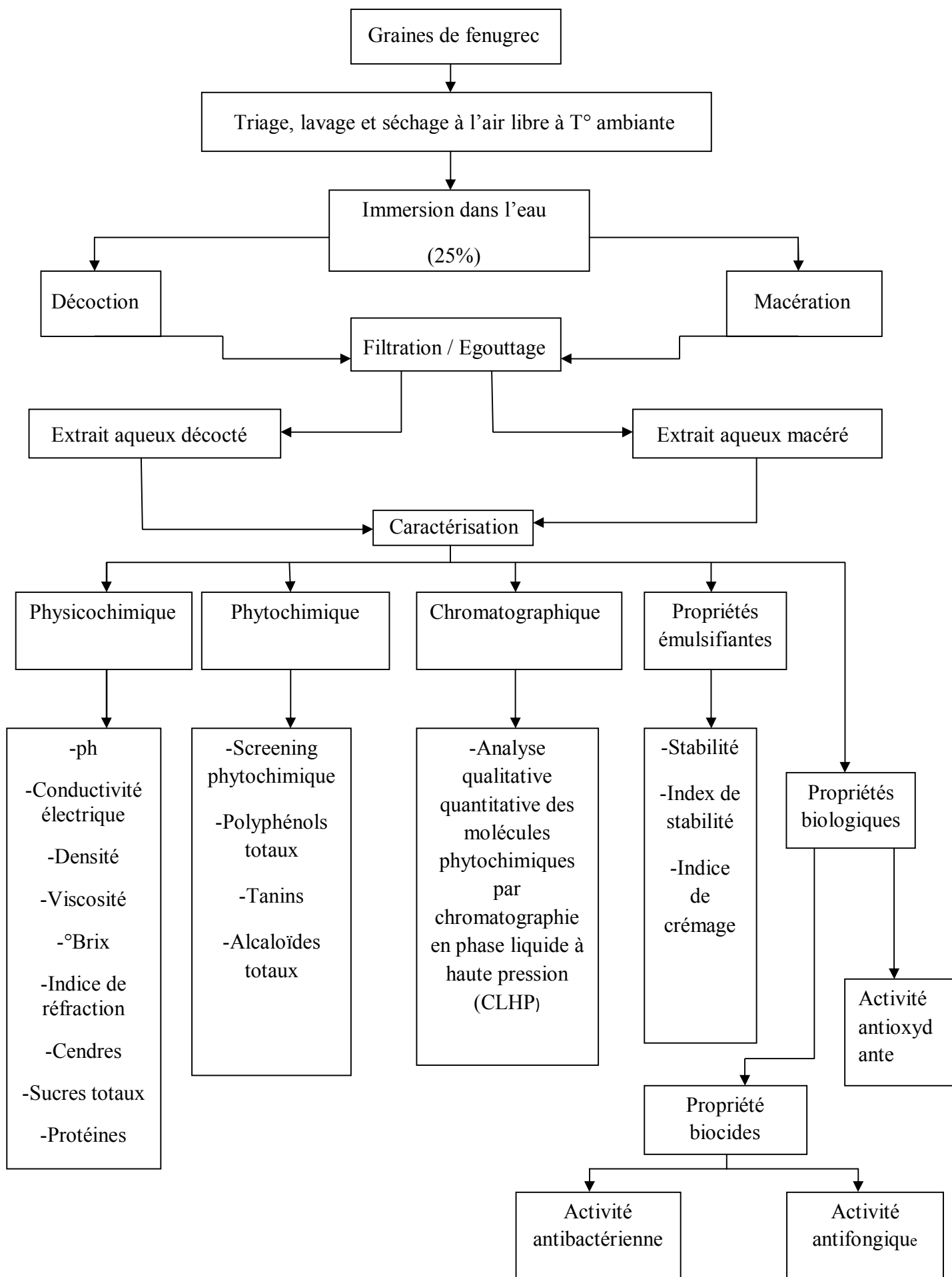
## **II.6. Méthodes**

### **II.6.1. Protocole expérimental**

Le protocole expérimental qui résume les différentes étapes de notre étude est présenté dans la figure 6.

### **II.6.2. Préparation des extraits aqueux**

Nous avons préparé deux types d'extraits aqueux à partir des graines du fenugrec et de l'eau potable à 25%. L'extrait aqueux de macération (EAM) est obtenu par immersion des graines dans l'eau potable et laisser se reposer pendant 24 h, pour l'extrait aqueux de décoction (EAD) est préparé durant 5 min comptées dès l'ébullition puis conserver à 4°C (**Harchane et al., 2012**).



**Figure 6 :** Schéma du protocole expérimental

### II.6.3. Préparation des émulsions

La composition des émulsions étudiées est donnée selon les tableaux 4 et 5 (Acem, 2001).

**Tableau 4 :** Composition des émulsions à base d'extraits aqueux.

Composants (%)	H/EAM ss	H/EAM as	H/EAD ss	H/EAD as
Huile d'olive vierge	5	4.5	5	4.5
Extrait aqueux	95	95	95	95
Stabilisant	0	0.5	0	0.5

**Tableau 5 :** Composition des émulsions à base d'eau potable.

Composants (%)	H/E T <sub>20</sub> ss	H/E T <sub>20</sub> as	H/E T <sub>80</sub> ss	H/E T <sub>80</sub> as
Huile d'olive vierge	4.5	4.5	4.5	4.5
Eau potable	95	95	95	95
Stabilisant	0	0.25	0	0.25
Tween 20	0.5	0.25	0	0
Tween 80	0	0	0.5	0.25

La caséinate de sodium est utilisé comme stabilisant au cours de la préparation des émulsions, chaque émulsion est homogénéisée à 20°C pendant 30 min, l'homogénéisation est réalisée par un agitateur ultra- turrax (Kikalab T25- basic) avec une vitesse 8000 tours / min, les émulsions obtenues sont emballées par du papier aluminium et conservées à 25°C.

### II.6.4. Analyses physiques

#### II.6.4.1. Calcul du rendement

Les rendements d'extraction ont été calculés par la formule suivante :

$$R = (M / M_0) \times 100$$

Où :

R : Rendement exprimé en % ;

M : Masse en gramme de l'extrait résultant (g) ;

M<sub>0</sub> : Masse en gramme de la matière végétale totale (g).

#### **II.6.4.2. pH**

##### a. Principe

Le pH est mesuré par un pH-mètre dont sa valeur est en fonction de la concentration des ions hydronium présents dans la solution (**Geoffrey, 2011**).

##### b. Mode opératoire

100 ml d'eau distillée ont été ajoutés à 10 ml d'échantillon, le tout a été agité pendant 5 minutes, la mesure a été réalisée en plongeant l'électrode du pH mètre dans la solution (**AOAC ,2002**).

##### c. Expression des résultats

Pour déterminer la valeur du pH, plusieurs lectures ont été réalisées (le pH obtenu est la moyenne des 3 répétitions faites dans les mêmes conditions).

#### **II.6.4.3. Conductivité électrique**

##### a. Principe

La conductivité électrique exprime l'aptitude de la solution aqueuse électrique à conduire un courant électrique, elle est en corrélation avec la teneur en sels solubles (**Rodier ,1997**).

##### b. Expression des résultats

La lecture de la conductivité a été faite directement sur l'afficheur du conductimètre (**AOAC, 1990**).

#### **II.6.4.4. Cendres**

##### a. Principe

L'échantillon est incinéré dans un four à moufle à haute température (600°C) jusqu'à l'obtention de cendres blanchâtres à poids constant (**Nielsen, 2010**).



b. Mode opératoire

Dans des capsules en porcelaine, 10 g d'échantillon ont été pesés et placés dans un four à moufle à 600°C pendant 5 heures jusqu'à l'obtention d'une couleur grise, claire ou blanchâtre, les capsules ont été retirées du four, placées dans un dessiccateur puis pesées (AOAC, 2000).

c. Expression des résultats

Le taux de cendres est calculé par la différence de poids avant et après incinération par la formule suivante (AOAC, 2000) :

$$TC = [P_2 - P_1 / P_0] \times 100$$

Où :

TC : Taux de cendre (%);

P<sub>0</sub> : Poids de la prise d'essai (g);

P<sub>1</sub> : Poids des creusets vide (g);

P<sub>2</sub> : Poids des échantillons + creuset après incinération (g).

#### II.6.4.5. ° Brix

a. Principe

Le taux de solide solubles (TSS) exprimé en degré Brix est déterminé à l'aide d'un réfractomètre (AOAC, 2000).

b. Mode opératoire

Une quantité de notre échantillon a été mise sur la plaque du réfractomètre préalablement nettoyé et séché avec l'eau distillée (AOAC, 2000).

c. Expression des résultats

Le degré Brix a été lu directement sur l'échelle à l'intersection de la limite entre la frange claire et la frange foncée (AOAC, 2000).

#### II.6.4.6. Indice de réfraction

a. Principe

D'après Velsseyre (1979) ; l'indice de réfraction c'est la mesure du pouvoir réfringent au moyen d'un réfractomètre par rapport à la raie de sodium, il permet de connaître le degré

de la pureté d'un liquide ou de connaître la dose de solide dissout dans une solution, il est mesuré à l'aide d'un réfractomètre muni d'un thermomètre.

Le degré Brix (%) exprime le pourcentage de la concentration des solides solubles contenus dans un échantillon (l'échelle de Brix sert à mesurer le pourcentage de la matière sèche soluble), le contenu des solides solubles représente le total de tous les solides dissous dans l'eau, incluant des sucres, sels, protéines, acides, etc. (**Cendres, 2011**).

#### b. Mode opératoire

Selon la méthode d'AFNOR « **NF-60.22, (1984)**, les mesures sont prises comme suit :

- ✓ Laver les prismes de réfractomètre par l'acétone et les essuyer avec un papier absorbant ;
- ✓ Etalonner l'appareil à l'aide de l'eau distillée  $n_D^{20}=1.333$  à 20°C ;
- ✓ Verser entre les prismes 2 à 3 gouttes de l'échantillon et étaler ;
- ✓ Déplacer alors la lunette de viser pour que la ligne de séparation de la plage claire et la plage sombre se situe à la croisée des fils de réticule.

#### c. Expression des résultats

Le degré Brix et l'indice de réfraction ont été notés directement sur les deux échelles à l'intersection de la limite entre la frange claire et la frange foncée (**AOAC, 2000**).

### II.6.4.7. Densité

#### a. Principe

D'après **Boubezari (2010)**, la densité d'une solution est le rapport des masses d'un même volume de cette solution et de l'eau à 20°C.

#### b. Mode opératoire

La densité est calculée à 20°C selon les étapes suivantes :

- ✓ Peser le pycnomètre vide et parfaitement sec (P<sub>0</sub>) ;
- ✓ Peser le pycnomètre rempli d'eau distillée (P<sub>1</sub>) ;
- ✓ Vider le pycnomètre, le sécher ;
- ✓ Peser le pycnomètre rempli de l'échantillon (P<sub>2</sub>).

## c. Mode de calcul

La densité donnée par la formule suivante :

$$D = (P_2 - P_0) / (P_1 - P_0)$$

**II.6.4.8. Viscosité**

## a. Principe

La viscosité résulte du frottement des molécules, elle se traduit par la résistance plus ou moins grande des liquides à l'écoulement, la viscosité absolue  $\eta$  s'exprime usuellement en centipoise, la viscosité absolue se mesure par le calcul du temps de chute d'une petite boule dans une colonne (viscosimètre d'Hoeppler) fondée sur la loi de Poiseuille (**Boubezari, 2010**).

## b. Mode opératoire

- ✓ Remplir le tube avec l'échantillon ;
- ✓ Fixer la température à 20°C ;
- ✓ Lorsque l'équilibre de température est atteint, choisir une bille pour laquelle son écoulement à travers l'échantillon dans le tube viscosimètre, doit être aussi lent que possible ;
- ✓ Laisser ensuite la bille s'écouler librement et lorsqu'elle atteint le repère de la partie supérieure, mettre le chronomètre en marche ;
- ✓ Lorsque la bille atteint le repère situé à la partie inférieure du tube viscosimétrique, noter le temps de chute de la bille.

## c. Mode de calcul

Le calcul de la viscosité se fait selon la formule suivante :

$$\eta = t (D_0 - D_1) .K$$

$\eta$  : Viscosité en centipoise (cP) ;

t : Temps de chute de la bille en seconde ;

$D_1$  : Densité de l'échantillon ;

$D_0$  : Densité de la bille ;

$K$  : La constante d'étalonnage par la gravité du tube égale à 0,10277.

## II.6.5. Analyses chimiques

### II.6.5.1. Sucres totaux

#### a. Principe

La méthode du phénol sulfurique donnée par **Dubois et al., (1956)** permet de doser les sucres totaux en utilisant le phénol et l'acide sulfurique concentré, en présence de ces deux réactifs, les oses donnent une couleur jaune-orange dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides, les résultats sont exprimés par rapport à une gamme étalon de glucose à une densité optique de 490 nm (**Dubois et al., 1956**).

#### b. Mode opératoire

##### ➤ Préparation de la solution à analyser

L'extraction des sucres a été faite à partir de 0.1g de l'échantillon par l'ajout de 30 ml d'éthanol (80%). Le mélange a été laissé 48 heures à température ambiante, au moment du dosage, les tubes ont été placés dans l'étuve à 80°C afin d'évaporer l'alcool, par la suite 20 ml d'eau distillée ont été ajoutées à l'extrait (solution à analyser).

##### ➤ Dosage

Dans un tube à essai, 1ml de phénol (5%) et 5 ml d'acide sulfurique concentré (96%) ont été ajoutés à 1ml de la solution à analyser, après 10 minutes, le mélange a été placé dans un bain marie pendant 20 minutes à 25-30°C.

La lecture de l'absorbance a été faite à 490 nm et la concentration en sucres totaux a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue par l'utilisation de glucose comme solution standard d'étalonnage (**Dubois et al., 1956**).

##### ➤ Préparation de la gamme d'étalonnage

La solution mère a été préparée à partir de 0.1 g de glucose qui a été dissoute dans 100 ml d'eau distillée ; les dilutions sont réalisées comme suit : 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml .....10 ml de la solution mère ont été prélevés et le volume a été complété jusqu'à 10 ml par l'eau distillée, les concentrations sont représentées dans le tableau 7, la lecture des absorbances a été faite à 490 nm (**Dubois et al., 1956**).

**Tableau 6:** Préparation de la gamme d'étalonnage.

Tube	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Solution mère (ml)</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Eau distillée (ml)</b>	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
<b>Concentration (mg/ml)</b>	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1

➤ *Traçage de la courbe d'étalonnage de glucose*

Dans des tubes à essai, 1 ml de chaque dilution a été prélevé puis 1 ml de phénol (5%) et 5 ml d'acide sulfurique concentré (96%) ont été ajoutés, après 10 minutes de repos, l'incubation a été réalisée dans un bain marie de 25 à 30°C pendant 20 minutes, l'absorbance a été mesurée à 490 nm (**Dubois et al., 1956**).

c. Expression des résultats

La quantité des sucres totaux est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage par la formule suivante (**Dubois et al., 1956**):

$$ST = [(X.V.D)/P].100$$

Où :

ST : Taux de sucres totaux (%);

X : Quantité de sucres calculée à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml) (voir annexe 4);

D : Facteur de dilution ;

V : Volume de la solution analysée (ml);

P : Poids de la prise d'essai (g).

### II.6.5.2. Protéines

a. Principe

Nous avons adapté la méthode de *Biuret* (**Gornall, 1949**), en milieu alcalin (NaOH), à froid, les ions cuivrique (Cu<sup>++</sup>) forment avec les liaisons peptidiques un complexe de coordination coloré en rose, qui ajouté à la teinte bleue du réactif donne finalement une coloration pourpre (bleu- violet), cette réaction est positive dès que la molécule possède 3 à 4 liaisons peptidiques, elle est donc utilisable pour les protéines et polypeptides.

La mesure de l'absorbance se fait à 540 nm après avoir laissé la coloration se développer durant 30 min, la technique tire son nom de la molécule de biuret NH<sub>2</sub>-CO-NH-CO-NH<sub>2</sub>

obtenue par condensation de 2 molécules d'urée  $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$  qui donne une coloration violette.

b. Mode opératoire

- ✓ Dans une fiole de 50 ml, on met 1 g d'échantillon et on complète le volume en ajoutant l'eau distillée jusqu'au trait de jauge, ramener à pH=8 avec NaOH (0,3N).,
- ✓ Centrifuger pendant 30 min à 4000 tours/min.,
- ✓ Récupérer le surnageant.,
- ✓ Préparer 4 tubes à essais.,
- ✓ Mettre successivement dans une série de tubes à essai les volumes suivants (0, 2, 4,6ml) de solution d'échantillon.,
- ✓ Diluer chaque tube avec de l'eau distillée en ajoutant respectivement les volumes suivant (6, 4, 2,0 ml) .,
- ✓ Prendre de chaque tube 2 ml, puis ajouter 3 ml de réactif de biuret.,
- ✓ Homogénéiser et placer les tubes 30 min à l'obscurité pour développer la coloration.,
- ✓ Mesurer l'absorbance à 540 nm en remplissant la cuve de l'échantillon et la placer dans le spectrophotomètre.,
- ✓ Noter les valeurs obtenues pour tracer la courbe.,
- ✓ Les résultats sont extrapolés à partir d'un courbe étalon.

c. Expression des résultats

Le calcul de la concentration de protéines est donné par la formule suivante :

$$\text{Protéines (g /l)} = \text{A.D/P}$$

A : Absorbance d'échantillon ;

D : Facteur de dilution ;

P : Pente de la droite d'étalonnage.

## II.6.6. Analyses phytochimiques

### II.6.6.1. Screening phytochimique

La phytochimie qualitative consiste à la mise en évidence des différentes familles de composés par la réalisation de réactions chimiques caractéristiques (**Harbonne, 1998**).

#### II.6.6.1.1. Tanins

À 2 ml de chaque extrait sont ajoutés de 2 à 3 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  à 2%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité (laisser reposer quelques minutes) (**Bruneton, 1999**).

#### II.6.6.1.2. Saponosides

5 ml d'extrait sont bien mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min, la formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides (**Benmehdi, 2000**).

#### II.6.6.1.3. Glucosides cardiotoniques

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani., 1 ml de chaque extrait ajouté de 5 ml d'acide acétique contenant des traces de  $\text{FeCl}_3$  à 2% et 5 ml d'acide sulfurique (98%) contenant des traces de  $\text{FeCl}_3$ , la présence des glucosides cardiotoniques est confirmée par la formation de deux phases, l'une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) (**Edeoga et al., 2005**).

#### II.6.6.1.4. Coumarines

Placer 1g d'échantillon dans un tube à essai, couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH de 0.1N et le placer dans un bain marie à 80°C pendant quelques minutes, ajouter 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10%), mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière, la fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**Benmehdi, 2000**).

#### II.6.6.1.5. Flavonoïdes

5 ml de chaque extrait avec quelques gouttes de HCl concentré sont ajoutés avec une quantité de tournures de magnésium et laisser agir pendant quelques minutes, la présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange (**Benmehdi, 2000**).

#### II.6.6.1.6. Stérols et polyterpènes

Ces composés sont détectés par la réaction des *Liebermann*, 5ml de chaque extrait ont été évaporés à l'étuve, le résidu est dissout à chaud dans 1ml d'anhydride acétique, puis un volume de 0.5ml d'acide sulfurique à 96% a été ajouté au triturât, l'apparition d'un anneau pourpre au violet qui vire au bleu indique une réaction positive.

#### II.6.6.1.7. Anthra-quinones libres

Leur mise en évidence se fait par l'ajout de 5ml de l'extrait à 2.5ml d'hydroxyde d'ammonium à 20% puis agiter le mélange, une coloration rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

#### II.6.6.1.8. Sucres réducteurs

Dans un tube à essai, ajouter 5ml de liqueur de *Fehling* à 5ml de l'extrait à analyser et incubé l'ensemble pendant 8 minutes dans un bain marie à 70°C, la formation d'un précipité rouge brique indique une réaction positive.

#### II.6.6.1.9. Composés azotés

Leur mise en évidence a été faite par la réaction du *Biuret*, 1ml de chaque extrait avec 2ml d'hydroxyde de sodium aqueux à 20% dans un tube à essai sont ajoutés avec 2 à 3 gouttes d'une solution aqueuse de sulfate de cuivre à 2%, une réaction positive est indiquée si apparition d'une coloration violette.

#### II.6.6.1.10. Caroténoïdes

Après évaporation jusqu'à sec de 5 ml d'extrait aqueux, on ajoute 2 à 3 gouttes de trichlorure d'antimoine dans le chloroforme 99%, il se développe en présence de caroténoïdes une coloration bleue devenant rouge par la suite.

### II.6.6.2. Polyphénols totaux

#### a. Principe

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode décrite par **Singleton et Rossi (1965)** en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu, le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption est mesurée à 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait végétal (**Ribereau-Gayon, 1968**).

L'acide gallique est utilisé comme standard et les résultats sont exprimés par rapport à courbe d'étalonnage de l'acide gallique

#### b. Mode opératoire

##### ➤ *Extraction des polyphénols*



Plusieurs solvants organiques peuvent être utilisés pour l'extraction des composés phénoliques (**Bruneton, 2009**).

L'extraction des polyphénols a été faite à partir de 10 g de l'échantillon additionné à 50 ml du méthanol (96%). Après agitation pendant deux heures à l'obscurité, une filtration a été réalisée sur papier filtre et le filtrat a été récupéré (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

➤ *Dosage*

Dans un tube à essai, 2.5ml de Folin Ciocalteu (dilué dix fois) a été ajouté à 0.5 ml de l'extrait, après 3 minutes, 1ml de carbonate de sodium (20%) a été ajouté ; le mélange a été incubé pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité (**Singleton et Rossi, 1965**).

➤ *Préparation de la gamme d'étalonnage*

La solution mère a été préparée à partir de 0.1 g d'acide gallique additionné à 100 ml d'eau distillée ; les dilutions ont été réalisées comme suit : 5ml de la solution mère a été ajouté à 5ml d'eau distillée (dilution S/2) par la suite 5ml de la solution S/2 a été ajouté à 5 ml d'eau distillée (dilution S/4) et la même procédure a été refaite pour les autres dilutions (tableau 7).

**Tableau 7** : Densité optique des différentes concentrations d'acide gallique à 760 nm.

<b>Acide gallique (mg/ml)</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>0,015</b>	<b>0,007</b>	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>
<b>Absorbance (760 nm)</b>	2,278	1,407	0,779	0,502	0,263	0,184	0,123	0,145

➤ *Traçage de la courbe d'étalonnage d'acide gallique*

Dans des tubes à essais, 0.5 ml de chaque dilution a été prélevé et 2.5 ml de réactif Folin Ciocalteu ont été ajoutés, après 3min, 1ml de carbonate de sodium (20%) a été ajouté par la suite les tubes ont été incubés pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité.

La lecture des absorbances a été faite à 760 nm. La concentration en composés phénoliques totaux a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage (**Singleton et Rossi, 1965**).

## c. Expression des résultats

La teneur en composés phénoliques a été exprimée en mg d'acide gallique équivalent (GAE)/100g d'extrait, selon la formule suivante (Singleton et Rossi, 1965) :

$$T = [(C \times V \times D) / P]$$

Où :

T : Teneur en poly phénols totaux (mg GAE /100g d'extrait) ;

C : Concentration des polyphénols en équivalent d'acide gallique déduite de la courbe (voir annexe 5);

D : Facteur de dilution ;

P : Poids de l'échantillon (g).

### II.6.6.3. Tanins

#### a. Mode opératoire

30 g de l'échantillon ont été ajoutés de 100 ml d'éther de pétrole et laisser agir pendant 24 h après filtration, le marc récupéré est repris par 50 ml d'éther di-éthylique ensuite il sera filtré pour éliminer les phénols et les catéchines, le marc est repris une deuxième fois par 100ml de méthanol 60°, il est filtré dans un ballon préalablement pesé, le filtrat méthanolique sera évaporé pour obtenir un résidu sec à poids constant (Sowounmi et al., 2000).

#### b. Expression des résultats

La teneur en tanins (T) est calculée par la formule suivante (Sowounmi et al., 2000) :

$$T = [(P - P_0) / P_e] \cdot 100$$

P : Poids de la capsule plus tanins en g ;

P<sub>0</sub> : Poids de la capsule vide en g ;

P<sub>e</sub> : Poids de la prise d'essai en g.

### II.6.6.4. Alcaloïdes totaux

#### a. Mode opératoire

Mettre en agitation 3 g de l'échantillon, 25 ml d'acide sulfurique à 10% et 5ml d'eau distillée, compléter à 50 ml avec l'eau distillée après filtration on ajoute l'hydroxyde d'ammonium à 20% jusqu'à pH= 8-9 puis faire une extraction avec 50 ml de chloroforme, le filtrat est évaporé au bain-marie dans une capsule pesée, la capsule est encore pesée avec le résidu sec.

## b. Expression des résultats

La teneur en alcaloïdes (A) est calculée par la formule suivante:

$$A = [(P - P_0) / P_e] \cdot 100$$

P : Poids de la capsule plus alcaloïdes totaux en g ;

P<sub>0</sub> : Poids de la capsule vide en g ;

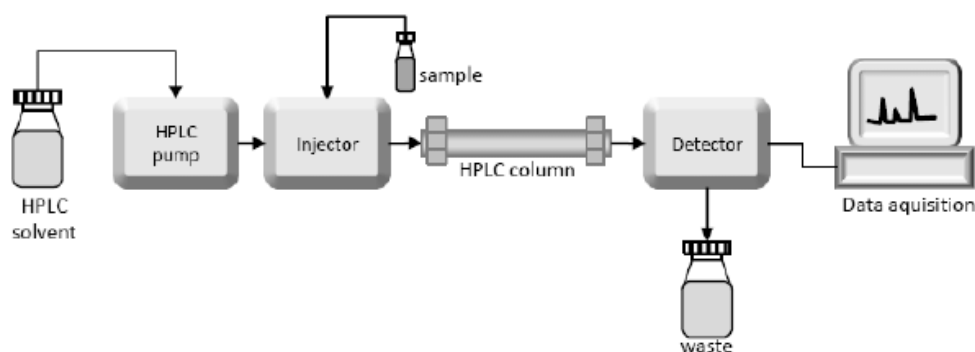
P<sub>e</sub> : Poids de la prise d'essai en g.

## II.6.7. Analyse chromatographique

## a. Principe

Le principe de la technique CLHP repose sur le coefficient de répartition des composés de l'échantillon dans les deux phases (phase mobile et phase stationnaire). Le fluide appelé phase mobile qui parcourt un tube appelé colonne recouverte à l'intérieur d'un film. Au début, l'échantillon à analyser est injecté dans la colonne (phase stationnaire), les analytes du mélange sont retenus par la phase mobile (éluant) lors de la traversée de la colonne (figure7). Par ce mécanisme d'éluion une vitesse de séparation varie d'un soluté à un autre, un détecteur est retrouvé en aval de la colonne relié à un enregistreur de signal lors de la séparation de chaque constituant qui apparaît sous forme de pic.

Le temps au cours duquel un constituant est retenu (temps de rétention) le caractérise qualitativement par un pic (identification), ce dernier délimite une aire utilisée pour le calcul de la concentration de la substance séparée du mélange injecté.



**Figure 7** : Principe du fonctionnement de l' HPLC (*Lab LCSCO, 2019*).

## b. Mode opératoire

La méthode analytique utilisée est la chromatographie en phase liquide à haute performance (CHLP), qui permet d'identifier et quantifier les substances selon leur polarité

dans les solvants, le modèle de l'HPLC utilisé pour le contrôle analytique était : YL 9100-South Korea, ce système est muni d'une pompe de type PERKIN-ELMER mise en mode gradient de concentration, une vanne d'injection à 20  $\mu$ l, une colonne en silice greffé C18 : 125mm  $\times$  4mm, un double détecteur UV et un intégrateur informatique pour synthèse des graphes.

Les conditions opératoires sont les suivantes : - Phase mobile à gradient binaire : acide acétique 2% et acétonitrile pur -un débit d'injection de 1ml/min - Température de 38°C – Détection à 280nm (*Channel 1*) et à 340 nm (*Channel 2*).

#### c. montage

Réservoir de l'éluant : plusieurs solvants constituent la phase mobile qui sont présents en quantité suffisante, la polarité varie d'un solvant à un autre (**Johnson et al., 2011**).

Pompe : elle permet d'introduire le solvant selon le mode d'élution désiré (gradient de concentration ou isocratique) avec un débit constant.

Injecteur : une vanne d'injection de 20  $\mu$ l est un système qui permet d'avoir un volume d'échantillon constant.

Colonne : un tube en verre, inerte aux produits chimiques contient une phase inverse de silice greffée qui est apolaire ce qui permet d'éluer les constituants polaire plus rapidement.

Phase mobile : constituée de solvants nécessaires pour assurer l'élution, elle traverse la colonne et en fonction de sa polarité avec de la phase stationnaire la séparation s'effectue.

Détecteur : le type utilisé est celui de l'UV- visible, la détection se fait à la sortie de la colonne, le constituant à analyser absorbe la lumière à une longueur d'onde réglée par l'opérateur (**Johnson et al., 2011**).

#### d. Expression des résultats

Le profil chromatographique obtenu est comparé à des étalons (standards des molécules phytochimiques pures) injectés dans les mêmes conditions opératoires que celle de l'échantillon. Le temps de rétention  $R_t$  de chaque constituant est déterminé par l'intégrateur qui donne un pic sur le chromatogramme (**AFNOR, 1996**).

### II.6.8. Analyse des propriétés émulsifiantes

Le pouvoir émulsifiant de l'extrait aqueux repose sur la mesure spectrale de l'absorbance à 500nm, l'échantillon homogénéisé est dilué en double ( $1/20^{\text{ème}}$  et  $1/5^{\text{ème}}$ ). La caractérisation des différentes émulsions a été faite durant 72 h à heures fixes (**Acem, 2001**).

### II.6.8.1. Stabilité

On exprime la stabilité (S) en pourcentage selon la formule suivante :

$$S(\%) = (A_t / A_{t_0}) \cdot 100$$

Où :

$A_{t_0}$  : Absorbance à temps  $t_0$ .

$A_t$  : Absorbance à  $t$ .

### II.6.8.2. Index de stabilité

L'index de stabilité égale au nombre d'heures nécessaire pour la déstabilisation totale de l'émulsion, c'est à dire pour trouver  $A_t \approx 0$  ; exprimé en heures et donné par la formule suivante :

$$IS \text{ (heures)} = [A_{t_0} / (A_{t_0} - A_t)] (t - t_0)$$

Où :

IS : Index de stabilité (h) ;

$A_{t_0}$  : Absorbance à temps  $t_0$  ;

$A_t$  : Absorbance à temps  $t$ .

### II.6.8.3. Indice de crémage

C'est la capacité de la remontée de la phase huileuse (la partie la moins dense de l'émulsion) en fonction du nombre, du diamètre et de distribution des gouttelettes. L'indice de crémage est calculé selon la formule suivante:

$$IC (\%) = [(H_e - H_a) / H_e] \cdot 100$$

Où :

IC: Indice de crémage (%) ;

$H_e$  : Hauteur de l'émulsion (mm) ;

$H_a$  : Hauteur de la phase aqueuse dans l'émulsion (mm).

### II.6.9. Activité antioxydante

#### a. Principe

La méthode est basée sur la réaction de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en  $\text{Fe}^{2+}$ , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en couleur bleu vert du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), l'intensité de cette coloration est mesurée par la spectrophotométrie à 700 nm (**Yildirim et al ., 2001**).

#### b. Mode opératoire

##### ➤ Préparation de la solution à analyser

Le protocole expérimental utilisé est celui de **Yildirim et al., (2001)** où : 0.5 ml de l'échantillon des différentes dilutions, est mélangé avec 1.25 ml d'une solution tampon phosphate à 0.2 M (pH= 6.6) et 1.25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] à 1%, le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 tours pendant 10 min.

##### ➤ Dosage

1.25 ml du surnageant sont ajoutés à 1.25 ml d'eau distillée et 250  $\mu\text{l}$  d'une solution de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 0.1%, la lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Yildirim et al ., 2001**).

##### ➤ Préparation de la gamme d'étalonnage

La droite d'étalonnage est établie à partir des absorbances lues pour la gamme de solutions d'acide ascorbique utilisée comme composé de référence (Tableau 8).

**Tableau 8** : Densité optique des différentes concentrations de la Vit C à 700 nm

<b>Absorbance à (700 nm)</b>	0.002	0.046	0.086	0.094	0.12
<b>[Vit C] (mg/ml)</b>	0	0.005	0.0075	0.01	0.0125

#### c. Expression des résultats

L'activité antioxydante de l'échantillon est exprimée en mg d'acide ascorbique par g de matière sèche en utilisant la formule suivante (**Rezaire, 2012**):

<b>Activité antioxydante (mg AAE/g d'échantillon)</b> =	Concentration en mg d'AAE
	----- Concentration de l'extrait en g

La concentration en mg AAE (équivalent acide ascorbique) est calculée à partir de l'équation correspondante à la droite étalon:

$$\text{Concentration en mg d'AAE} = (\text{Abs} - \text{b}) / \text{a}$$

Où:

-Abs: Absorbance de l'échantillon à 700nm (voir annexe 6);

-a: Pente;

-b: Ordonnées à l'origine du droit étalon.

### II.6.10. Propriétés biocides

Les agents antimicrobiens sont des substances utilisées pour lutter contre les micro-organismes et inhiber leur croissance y compris les agents antifongiques et antibactériens, le mécanisme d'action de ces agents sur les bactéries, peuvent être : Bactériostatique, lorsque la substance inhibe la multiplication des bactéries ou bactéricides : lorsque la substance détruit complètement la cellule bactérienne, tandis que les substances antifongiques comprennent les fongicides qui tuent les champignons et les fongistatiques responsable de l'inhibition de la croissance mycélienne (**Van Vuuren, 2008**).

Les deux types d'extrait aqueux des graines de fenugrec ont été testés sur deux espèces phytopathogènes : la bactérie Gram négatif (*Erwinea carotovora*) fournie par le laboratoire de protection des végétaux de la faculté SNV, Université de Blida et le champignon (*Fusarium oxysporum*) fourni du laboratoire de microbiologie de la faculté SNV, Université de Tiaret.

#### II.6.10.1. Activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion sur milieu gélosé (méthode de *Vincent*) implique l'utilisation de concentrations constantes de l'inoculum

bactérien, pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits, des repiquages ont été effectués pour la souche bactérienne cible conservée en milieu liquide, le milieu de Mueller Hinton est utilisé pour l'antibiogramme dont l'incubation a été faite à 37°C pendant 24h, les suspensions bactériennes ont été préparées à partir de l'espèce standardisée correspondante en utilisant une longueur d'onde de 625 nm permettant d'avoir une opacité équivalente à une absorbance comprise entre 0,8 et 1,3 qui est relative au nombre de  $10^6$  à  $10^8$  UFC/ml selon l'échelle de Mac Farland (Gulluce et al., 2007).

L'ensemencement des suspensions bactérienne préalablement préparées est effectué par la méthode d'écouvillonnage à la surface de boîtes de Pétri dans lesquelles 20 ml de la gélose Mueller Hinton ont été coulées, avec une pince stérile des disques en papier wattman (n° 40) de 6 mm de diamètre ont été implantés à la surface de l'agar Mueller Hinton, chaque disque a reçu 50 µl de chaque extrait à tester avec une gamme de concentrations croissantes de 1.25, 2.5, 5, 10, 20 et 40 mg/ml, après 24 h d'incubation des boîtes Pétri à 37°C, des zones d'inhibition apparaissent autour des disques sont mesurées en millimètres (diamètre des lauréoles) pour voir la sensibilité de la souche envers l'extrait testé, afin de confirmer l'activité antibactérienne des deux types d'extraits aqueux ce dernier, a été remplacé par l'eau distillée qui représente le contrôle négatif (témoin négatif) (Gulluce et al., 2007).

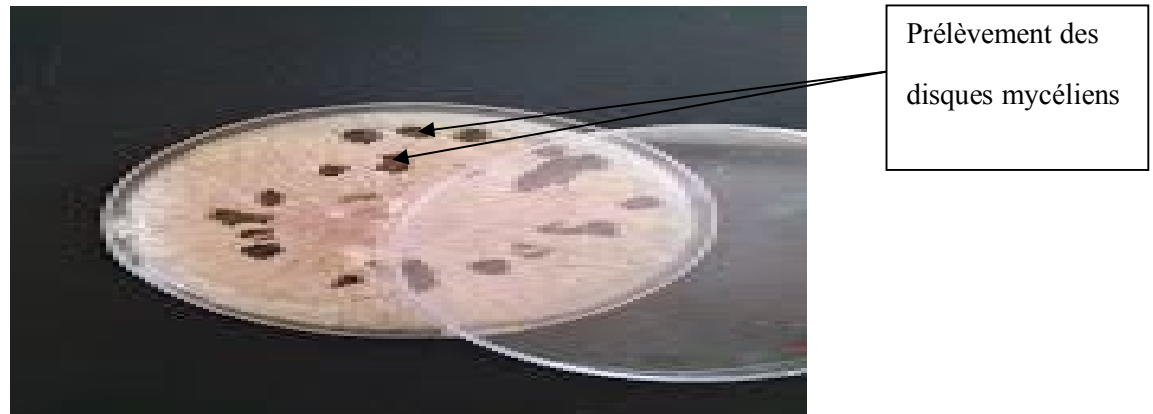
#### **II.6.10.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Selon Eloff (1998), la CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Sa détermination sur milieu solide a été faite par la première boîte Pétri de la gamme (boîte contenant la plus petite concentration) qui montre l'absence de colonies du germe étudié.

#### **II.6.10.3. Activité antifongique**

Les dilutions des extraits à tester sont préparées de telle façon à avoir une gamme de concentrations : 0.5, 1, 2, 4, 8mg/ml. 1ml de chaque dilution de l'échantillon à tester a été ajouté à 19ml du milieu de culture Saboraud, les disques mycéliens, prélevés aseptiquement à partir d'une culture jeune de moisissure du genre *Fusarium* (figure 8), sont inoculés dans le centre de la boîte Pétri, la boîte de contrôle est préparée de la même façon par l'ajout de 1ml d'eau distillée stérile et implanter dans les mêmes conditions sur le milieu savoraud, les boîtes sont incubées à 28 °C, la lecture est réalisée à partir du 7<sup>ème</sup> jour (Oxenham et al., 2005).





**Figure 8** : L'espèce fongique *Fusarium oxysporum* (original, 2018)

L'efficacité de l'activité antifongique de chaque dilution du produit à tester a été déterminée par la mesure de la croissance radiale mycélienne, cette croissance mycélienne est mesurée dans les deux directions en prenant la totalité du rayon, le résultat de deux mesures est pris en considération pour calculer la moyenne, le taux d'inhibition de la croissance mycélienne de chaque dilution est exprimé par rapport à la taille des colonies de contrôle, il est calculé par la formule suivante (Hmouni *et al.*,1996):

$$\text{Pourcentage d'inhibition mycélienne(\%)} = [(dc - dt) / dc]. 100$$

Où:

dc : diamètre de la colonie de contrôle en mm ;

dt : diamètre de la colonie traitée en mm.

# Chapitre III

# Résultats

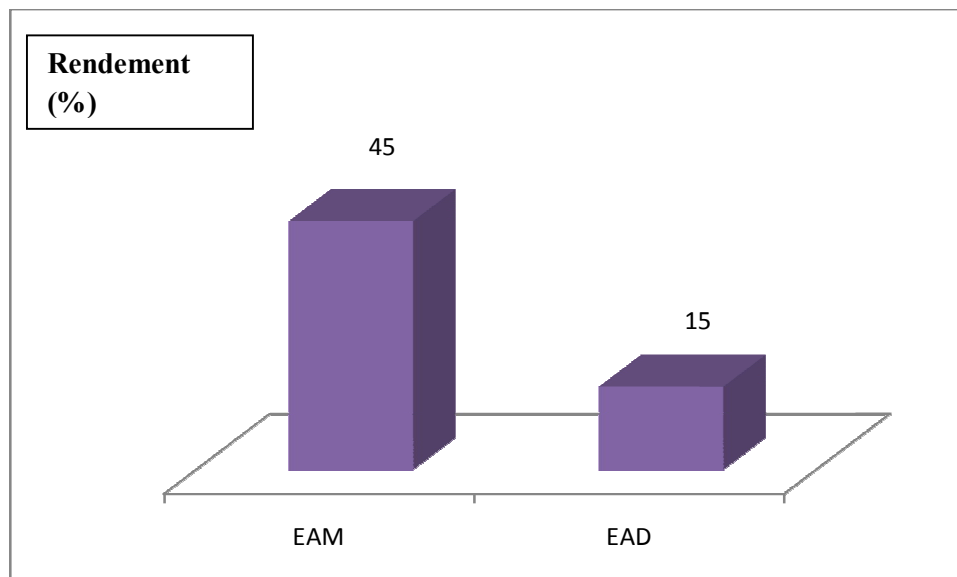
&

# Discussions

### III.1. Analyses physiques

#### III.1.1. Rendement

Les résultats des valeurs moyennes du rendement obtenus pour les extraits aqueux des graines du fenugrec sont cités dans la figure 9.



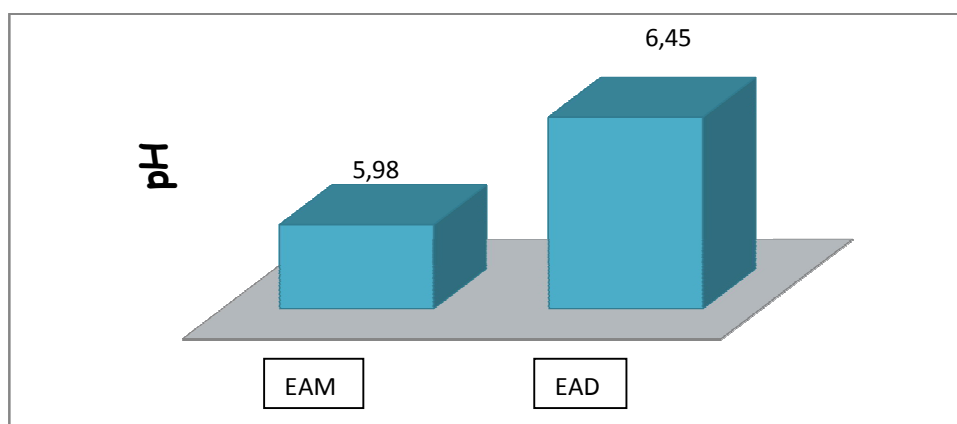
**Figure 9:** Valeurs moyennes du rendement d'extraits aqueux des graines du fenugrec.

Ces résultats montrent que le rendement d'extraction par macération est trois fois supérieur à celui obtenu par décoction des graines du fenugrec, cette différence dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (**Harchane et al., 2012**).

L'extraction à température ambiante permet de prévenir la dénaturation et la modification des composés de l'extrait dû aux températures élevées, en contre partie la décoction est une méthode d'extraction efficace et rapide permettant d'avoir le maximum de composés par l'augmentation de leur solubilité dans le solvant (**Harchane et al., 2012**).

#### III.1.1. pH

Les valeurs moyennes du pH trouvées pour les extraits aqueux des graines du fenugrec à 20°C sont mentionnées dans la figure 10.

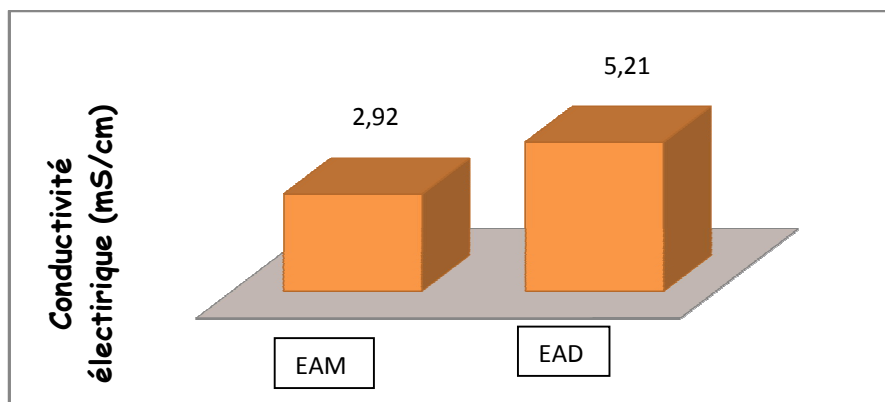


**Figure 10:** Valeurs moyennes du pH d'extraits aqueux des graines du fenugrec.

La valeur du pH de l'extrait aqueux de décoction issu des graines du fenugrec est supérieure à celle de l'extrait aqueux de macération, la variation du pH revient à la concentration des ions  $H^+$  dans la solution.

### III.1.2. Conductivité électrique

Les résultats de la conductivité électrique des deux types d'extraits aqueux des graines du fenugrec à 20 °C sont cités dans la figure 11.

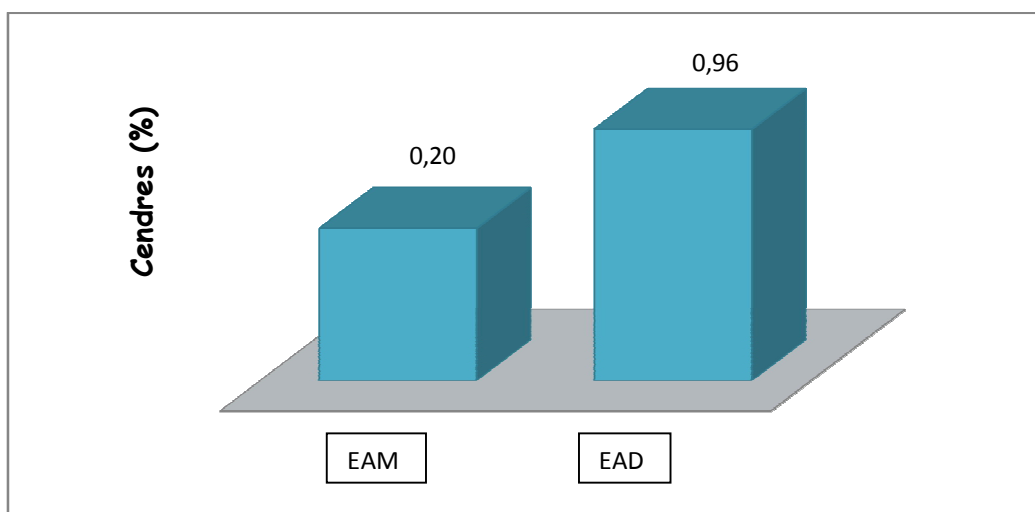


**Figure 11:** Valeurs moyennes de la conductivité électrique d'extraits aqueux des graines du fenugrec.

La conductivité électrique de l'extrait aqueux de décoction est supérieure à celle de l'extrait aqueux de macération, cette variation est due à l'effet de la température sur la mobilité des électrolytes. La conductivité électrique exprime la capacité de conduire un courant électrique par une solution aqueuse (Amella, 2008).

### III.1.3. Cendres

Les valeurs moyennes de cendres trouvées pour les extraits aqueux des graines du fenugrec à 20°C sont mentionnées par la figure 12.

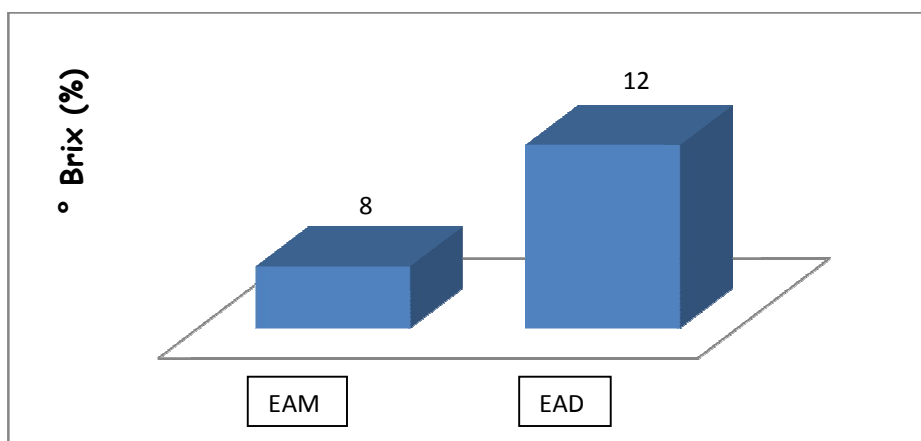


**Figure 12 :** Valeurs moyennes de cendres d'extraits aqueux des graines du fenugrec.

Nous remarquons que la teneur en cendres est supérieure dans l'extrait aqueux décocté celle notée pour l'extrait aqueux macéré.

### III.1.4. °Brix

Les valeurs moyennes du degré Brix trouvées pour les extraits aqueux des graines du fenugrec à 20°C sont mentionnées par la figure 13.

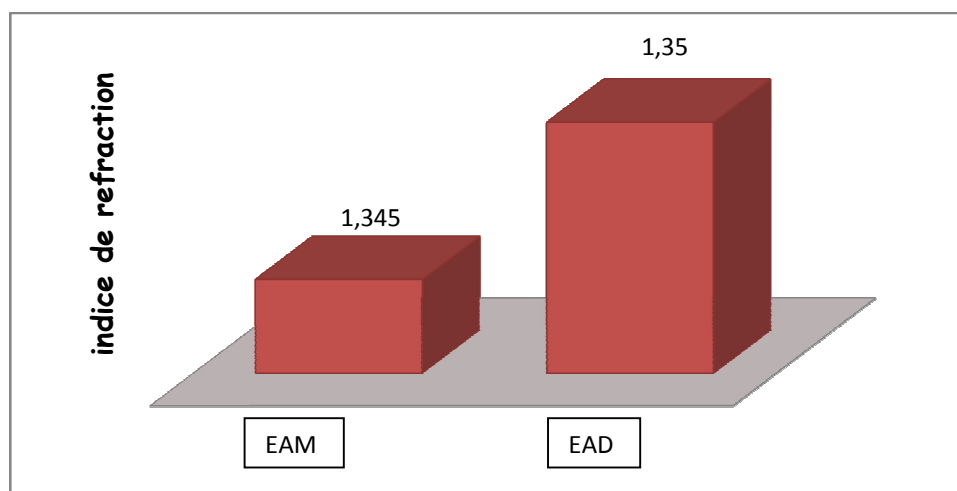


**Figure 13 :** Valeurs moyennes de °B d'extraits aqueux des graines du fenugrec.

Nous remarquons que la teneur de la matière sèche de l'extrait aqueux décocté est supérieure à celle trouvée dans l'extrait aqueux macérée, cela est dû au degré de la solubilité des molécules organiques et inorganiques stimulées par le solvant utilisé (eau potable).

### III.1.5. Indice de réfraction

Les valeurs moyennes de l'indice de réfraction des extraits aqueux des graines du fenugrec à 20°C sont montrées dans la figure 14.

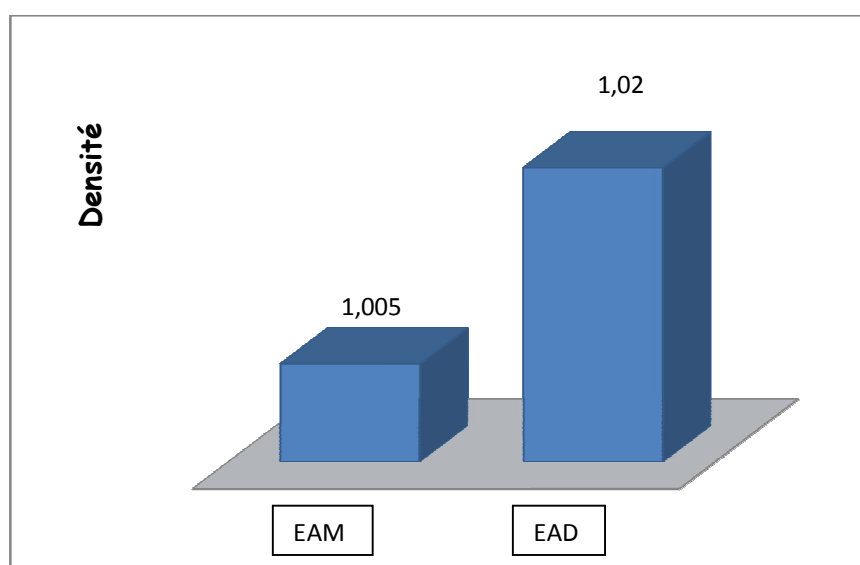


**Figure 14:** Valeurs moyennes de l'indice de réfraction d'extraits aqueux des graines du fenugrec.

L'indice de réfraction à 20°C de l'extrait aqueux de macération est presque égale à celui de la décoction, selon **Adrian et al .,(1981)**, l'indice de réfraction dépend de l'effet combiné de la matière sèche de l'échantillon analysé et de sa température.

### III.1.6. Densité

Les résultats de la densité des extraits aqueux des graines du fenugrec à 20°C sont mentionnés dans la figure 15.



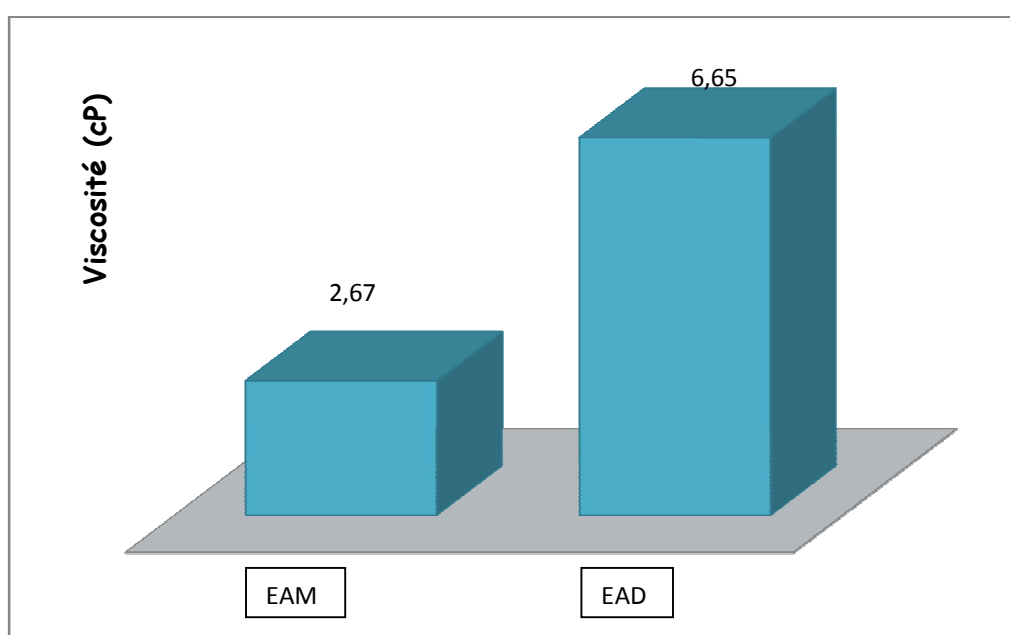
**Figure 15:** Valeurs moyenne de la densité d'extraits aqueux des graines du fenugrec.

Selon les résultats obtenus, la valeur moyenne de la densité d'extrait aqueux de décoction est supérieure à celle d'extrait aqueux des graines macérées, cette différence est expliquée par l'effet de la température sur la solubilité des molécules, minéraux et des gaz dissouts dans la phase aqueuse.

Selon **Boudier et Luquet (1989)**, la densité dépend du taux des solides solubles secs, type de macromolécules présentes dans la solution et la température du milieu.

### III.1.7. Viscosité

La figure 16 montre les résultats de la viscosité trouvée pour les extraits aqueux des graines du fenugrec à 20°C.



**Figure 16** : Valeurs moyenne de la viscosité des extraits aqueux des graines du fenugrec.

Nous remarquons que la valeur de la viscosité dans l'extrait aqueux macéré est nettement supérieure à celle trouvée dans l'extrait aqueux décocté, cette différence est due à la teneur en matière sèche des deux extraits c'est-à-dire plus la teneur en matière sèche augmente plus la viscosité augmente. Selon **Adrian et al., (1981)**, la viscosité de la solution dépend de sa composition et de sa température.

**Bouhenni et al (2019)**, ont trouvé un pH de 5,6 dans les graines du fenugrec qui était inférieur par rapport à nos résultats, les différences de pH peuvent être dues à la diversité de la variété, aux conditions de croissance, degré de maturation et du climat. La même recherche a

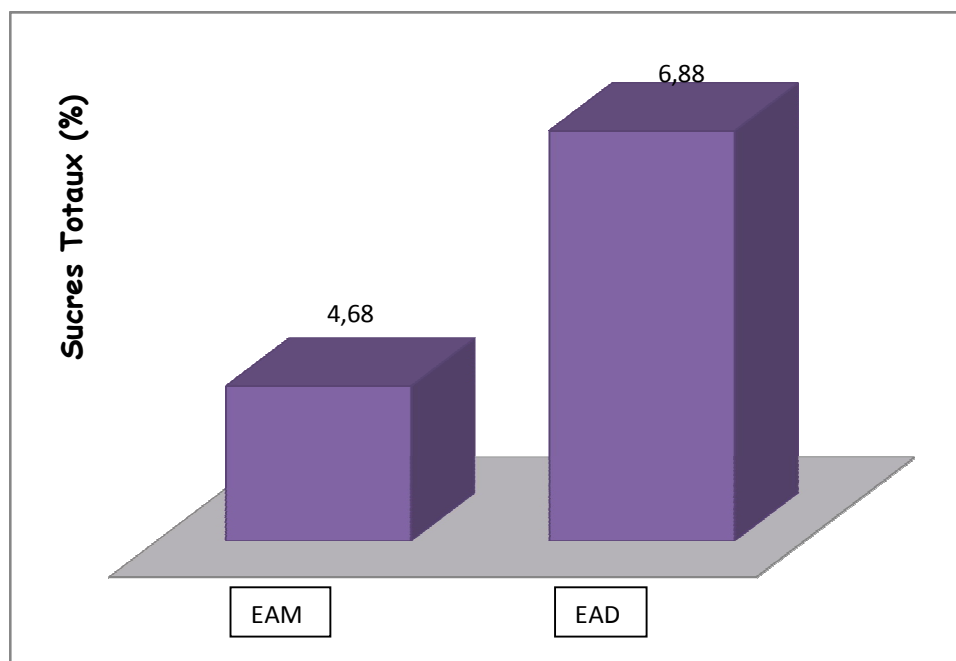
été faite sur la teneur en cendre et qui a montré une quantité de cendres de 3% qui était largement supérieure dans les graines du fenugrec par rapport à nos résultats.

Les travaux de **Bouhenni et al (2019)**, ont trouvé une viscosité de 2,8 cP dans l'extrait de poudre du fenugrec ce qui est similaire à celle enregistrée dans nos résultats tandis que les teneurs totales en solides solubles étaient supérieures 2,8°B.

### III.2. Analyses chimiques

#### III.2.1. Sucres totaux

Les valeurs moyennes de sucres totaux trouvées pour les extraits aqueux des graines du fenugrec sont mentionnées par la figure 17.



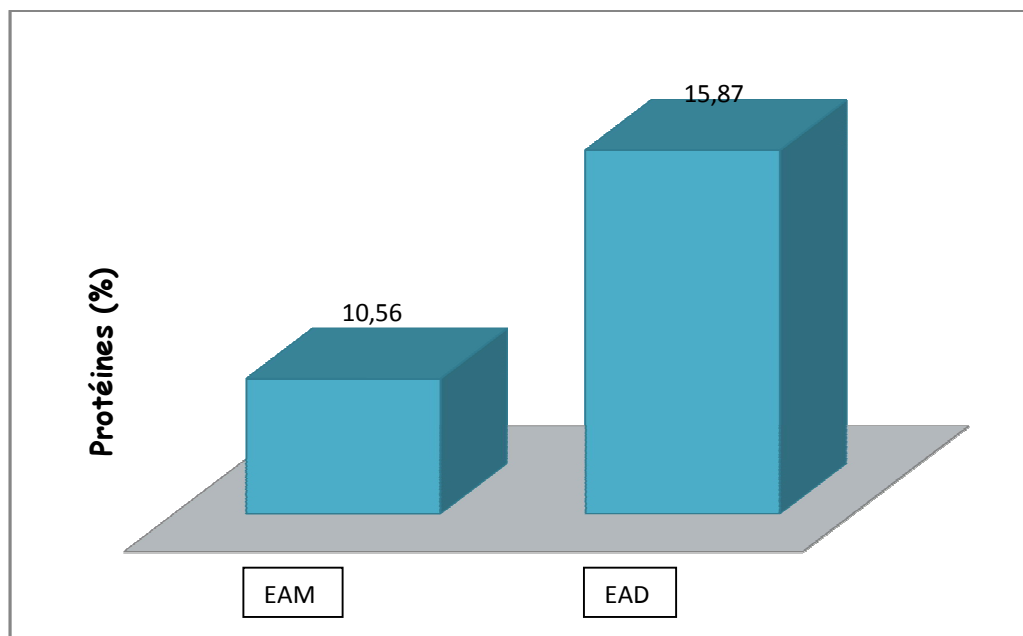
**Figure 17:** Valeurs moyennes des sucres totaux d'extraits aqueux des graines du fenugrec.

Nous remarquons que le taux de sucres totaux de l'extrait aqueux décocté est supérieur à celui noté dans l'extrait aqueux macéré, l'ensemble d'échantillons testés ont des taux sucres supérieurs à celui obtenu par **Paris et Hurabeille (1980)**, qui ont trouvé 2,5 à 3 g/100g dans les graines du fenugrec.



### III.2.2. Protéines

Les valeurs moyennes des protéines trouvées pour les extraits aqueux des graines du fenugrec sont mentionnées par la figure 18.



**Figure 18:** Valeurs moyennes des protéines d'extraits aqueux des graines du fenugrec.

Nous remarquons que la teneur en protéines marquée dans l'extrait aqueux décocté est supérieure à celle notée dans l'extrait aqueux macéré, ces valeurs sont inférieures par rapport aux résultats trouvés par **Paris et Hurabeille (1980)**, qui ont enregistré une valeur de 30% de protéines dans les graines du fenugrec.

Les protéines sont les constituants les plus importants dans la plante *Trigonella foenum-graecum* L. (**Maletic et Jevdjovic, 2007**).

### III.3. Analyses phytochimiques

#### III.3.1. Screening phytochimique

Le tableau 9 donne les résultats du screening phytochimique des extraits aqueux des graines du fenugrec.

**Tableau 9** : Screening phytochimique des extraits aqueux des graines du fenugrec.

Groupes chimiques	Médiateurs des réactions	Types d'extraits	
		Extrait aqueux de macération	Extrait aqueux de décoction
Stérols et poly-Terpènes	Anhydre acétique	++	+++
Saponosides	–	+++	+++
Tanins	FeCl <sub>3</sub>	+++	+++
Anthraquinones libres	NH <sub>4</sub> OH	++	+++
Coumarines	NaOH	–	–
Glucosides cardiotoniques	FeCl <sub>3</sub>	+	++
Composés azotés	Cu <sup>2++</sup>	+	++
Sucres réducteurs	Liqueur de Fehling	–	–
Caroténoïdes	–	–	–
Flavonoïdes	Mg <sup>2++</sup>	+++	+++

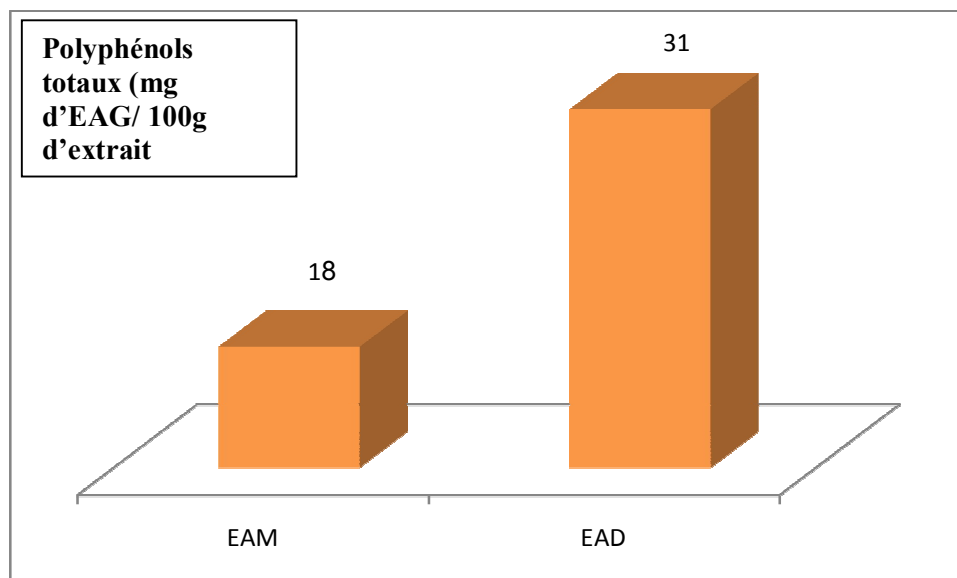
(-) : absence ; (+) : faiblement présent ; (++) : moyennement présent ; (+++) : fortement présent.

Les analyses qualitatives des groupes chimiques des deux échantillons (tableau 9) ont montré d'une part l'absence des coumarines, sucres réducteurs et caroténoïdes pour les deux types d'extraits, et d'autre part la présence des tanins, des saponosides, des flavonoïdes, stérols, anthraquinones libres, glucosides cardiotoniques et les composés azotés.

Selon les travaux de **Rodolfo et al (2006)** qui ont été réalisés sur la même espèce, le screening phytochimique a montré la présence des flavonoïdes, composés azotés, caroténoïdes et les saponines avec absence des tanins. Alors que d'autres recherches qui ont été faites sur la poudre des graines du fenugrec par **Rahmani et al (2015)**, ces auteurs ont trouvé la présence des saponosides, stéroïdes, des alcaloïdes et des mucilages. Les fluctuations et les variations constatées dans la composition phytochimique peuvent être attribuées non seulement à la technique d'extraction mais également à l'imbrication d'une multitude de facteurs, les plus importants sont les pratiques culturales telles que le désherbage qui a un effet positif sur l'augmentation du rendement en molécules phytochimiques, plusieurs études ont confirmé cette tendance (**Rodolfo et al., 2006**), le temps de séchage peut intervenir aussi dans la variabilité de la qualité de l'extraction ceci a été confirmé par les travaux de **Gomes et al., (2011)** où ils ont décrit que les plantes sèches et le feuillage jaune donnent les meilleurs extraits sur le plan quantitative et qualitative. La composition phytochimiques des extraits obtenus varie en fonction des conditions climatiques, de l'origine géographique des graines et les pratiques culturales, il est donc d'autant plus complexe de garantir une qualité constante des extraits. D'autres études avaient montré d'une part l'influence de la technique d'extraction et d'autre part l'influence du cycle végétatif sur le rendement et la qualité de l'extrait (**Demrane, 1985**). Dans le cas de notre étude, deux techniques d'extraction ont été utilisées, la macération dont le contact des graines de fenugrec avec l'eau est maintenu à température ambiante pendant 24 h et la décoction qui nécessite une température d'ébullition du solvant pendant 5 min afin de solubiliser une teneur importante en composés phénoliques.

### III.3.2. Polyphénols totaux

La figure 19 représente la teneur moyenne des polyphénols totaux des extraits aqueux des graines du fenugrec.



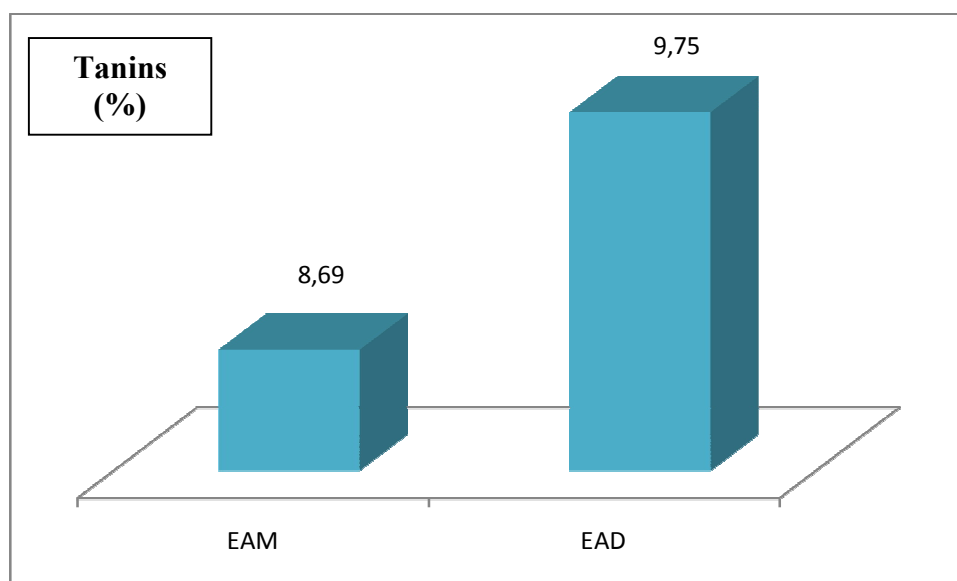
**Figure 19:** Valeurs moyennes des polyphénols totaux des extraits aqueux des graines du fenugrec.

La teneur en polyphénols totaux obtenus dans l'extrait aqueux de décoction est estimée à  $31 \pm 0.031$  mg d'EAG/100g d'extrait, cette valeur est supérieure à celle trouvée dans l'extrait aqueux de macération à savoir  $18.9 \pm 0.12$  mg d'EAG/100g d'extrait.

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans les plantes aromatiques et médicinales (**Darchivo et al., 2007**), ils possèdent un potentiel antioxydants in-vitro, et que cette activité antioxydante leur permettent d'agir comme agents réducteurs extincteurs d'oxygène (**Kahkoen et al., 1999**).

### III.3.3. Tanins

La figure 20 donne la teneur moyenne en tanins des extraits aqueux des graines du fenugrec.

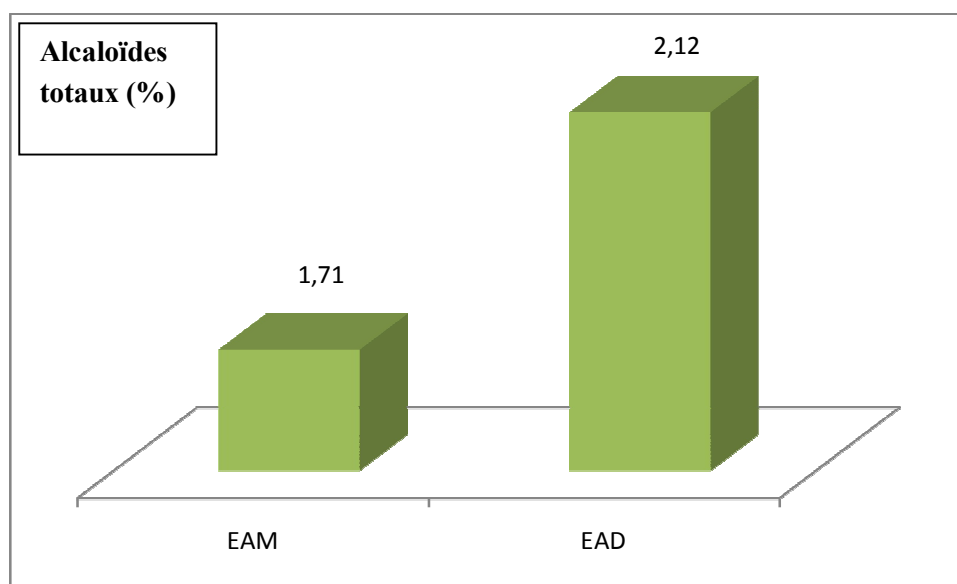


**Figure 20:** Valeurs moyennes des tanins des extraits aqueux des graines du fenugrec.

Nous notons une légère élévation de la teneur en tanins pour l'extrait aqueux de décoction par rapport à l'extrait aqueux macéré :  $9.75 \pm 0.06\%$  contre  $8.69 \pm 0.02\%$ . La teneur en tanins enregistrée pour les extraits aqueux des graines de fenugrec était supérieure par rapport à celle enregistrée dans les travaux d'**El Maamari et al (2016)** pour la même espèce qui ont trouvé une teneur en tanins de  $0.78\%$ , cette différence est probablement due à la composition du sol. Les tanins sont des substances d'origine organique que l'on trouve dans tous les végétaux et dans toutes leurs parties écorces, racines, feuilles, les fruits et graines (**Hermingway, 2012**), ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres produits au cours de la peroxydation ce qui va aboutir à l'arrêt de la réaction d'auto-oxydation (**Cavin, 1999**). Ils ont la propriété de précipiter les protéines fongiques et les métaux lourds et entrent dans la régénération tissulaire de la plante (**Kansole, 2009**).

#### III.3.4. Alcaloïdes totaux

Les valeurs moyennes des alcaloïdes totaux sont indiquées par la figure 21.



**Figure 21:** Valeurs moyennes des alcaloïdes totaux des extraits aqueux des graines du fenugrec.

Les résultats de la teneur en alcaloïdes obtenus pour les deux échantillons étaient de  $1.71 \pm 0.02\%$  pour l'extrait aqueux de macération et  $2.12 \pm 0.015\%$  pour celui de décoction.

Les alcaloïdes totaux enregistrés dans les deux types d'extraits des graines de fenugrec sont caractérisés par des teneurs inférieures par rapport à celles obtenues par **Khiredline (2013)** qui a trouvé un taux de 25.98% dans la poudre fine des graines de fenugrec. Les alcaloïdes sont extraits généralement soit par un solvant apolaire dans un milieu alcalin ou par un solvant polaire en milieu acide (**Debray et al., 1971**). Ce sont des substances douées d'une grande activité biologique, même à faible dose, Les alcaloïdes interviennent dans les mécanismes de défense des plantes contre les herbivores et agissent comme des défenseurs naturels, en effet elles sont toxiques pour les insectes (**Bouchelta et al, 2005**).

#### III.4. Analyse chromatographique

La séparation moléculaire des extraits aqueux des graines de fenugrec par HPLC a été faite dans deux longueurs d'onde différentes 280nm et 340nm, les résultats obtenus sont représentés dans des chromatogrammes montrant des pics et des temps de rétention de chaque molécule (figure. 22, 23).

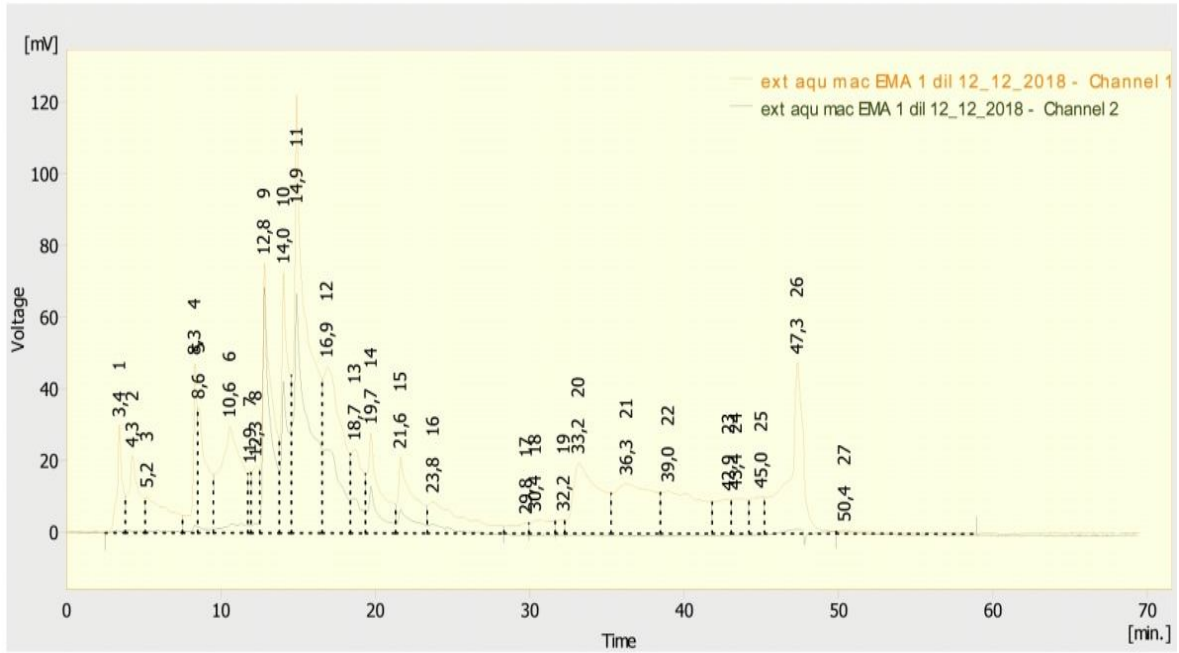


Figure 22 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de macération des graines de fenugrec à 280nm et 340nm.

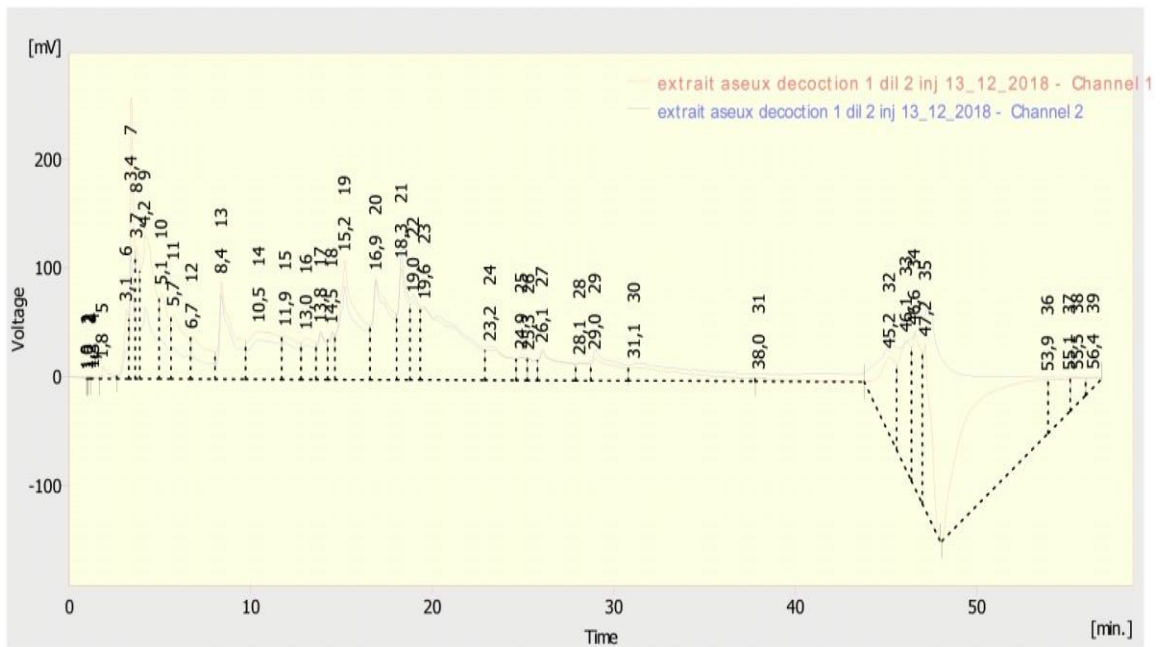


Figure 23 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de décoction des graines de fenugrec à 280nm et 340nm.

Les résultats de l'HPLC ont révélé la présence de 23 constituants pour l'extrait aqueux de macération (figure 22) et 39 constituants pour celui de la décoction (figure 23), l'identification des molécules contenues dans les échantillons est basée sur la comparaison de leur temps de retentions ( $R_t$ ) avec ceux des étalons purs dans les mêmes conditions expérimentales, les composés identifiés et leurs concentrations dans les extraits aqueux des graines de fenugrec sont mentionnés respectivement dans les tableau 10 et 11.

**Tableau 10 :** Composés phytochimiques identifiés dans les extraits aqueux des graines de fenugrec détectés par HPLC.

Temps de rétention (min)	EAM	EAD
3.4	/	Rutine
4.3	Kæmpferol	Kæmpferol
5.2	Génistéine	/
14.6	Vanilline	Vanilline
19.5	Myrécitine	/

/ : Non déterminer

**Tableau 11 :** Concentrations des molécules phytochimiques des extraits aqueux des graines de fenugrec estimées par HPLC en mg/ml.

Constituants (mg/ml)	EAM	EAD
Kaempferol	$7,8 \cdot 10^{-3}$	$8,2 \cdot 10^{-3}$
Rutine	/	$5,1 \cdot 10^{-3}$
Génistéine	$0,3 \cdot 10^{-3}$	/
Vanilline	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$
Myrécitine	$4,3 \cdot 10^{-3}$	/

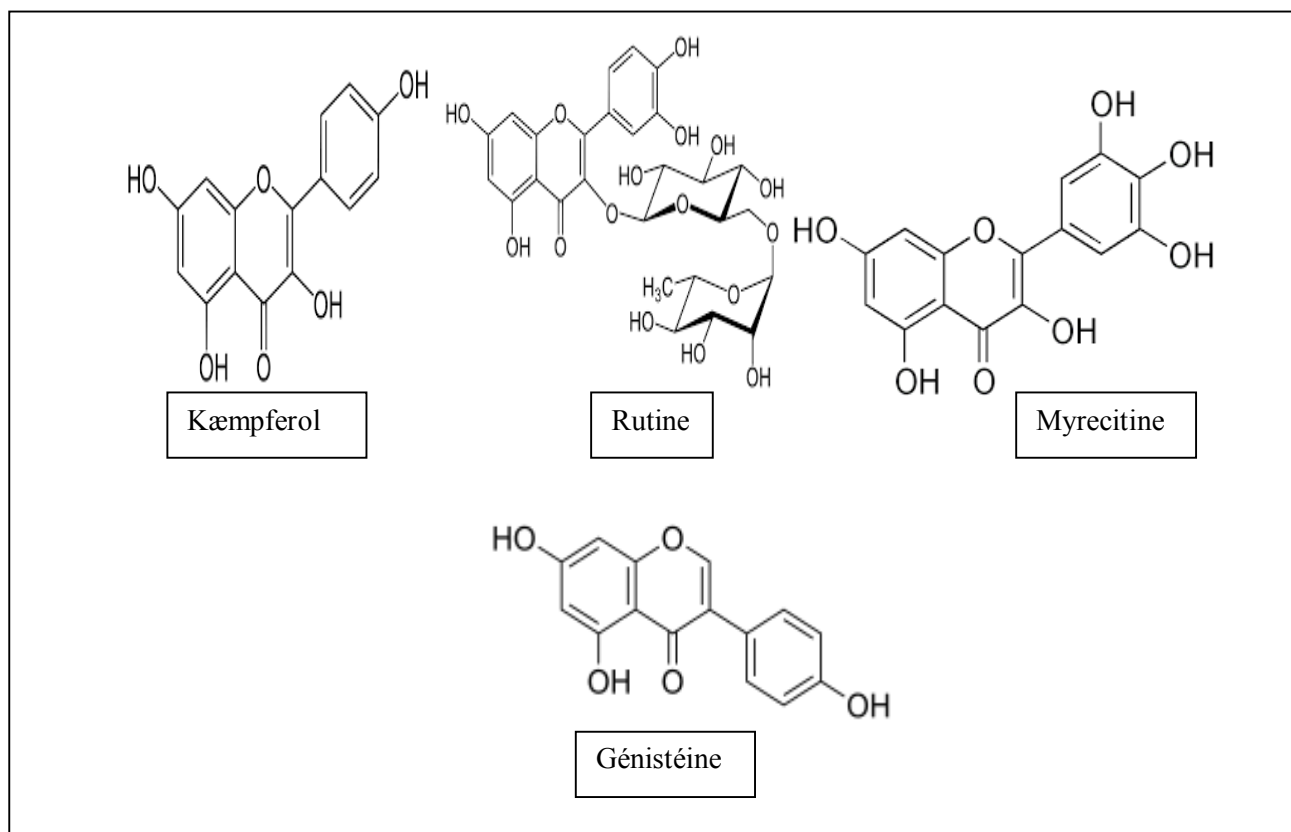
/ : Non déterminer

L'analyse chromatographique des échantillons a permis d'identifier et de quantifier 4 molécules phytochimiques pour l'extrait aqueux de macération (EAM) à savoir : Kæmpferol ( $7,8\mu\text{g/ml}$ ), génistéine ( $0,3\mu\text{g/ml}$ ), vanilline ( $1,4\mu\text{g/ml}$ ) et myrécitine ( $4,3\mu\text{g/ml}$ ) et d'identifier 3 molécules pour l'extrait aqueux de décoction (EAD) qui sont : Rutine ( $5,1\mu\text{g/ml}$ ), kæmpferol ( $8,2\mu\text{g/ml}$ ) et vanilline ( $1,8\mu\text{g/ml}$ ).

Le profil chromatographique a fourni des données précieuses sur les métabolites secondaires des extraits aqueux des graines de fenugrec cultivées en zones arides d'Algérie, les résultats ont montré la richesse des échantillons en composés phénoliques connus par leurs



activités biologiques. L'analyse chromatographique des échantillons a permis d'une part d'identifier 4 molécules phytochimiques pour l'extrait aqueux de macération (EAM) à savoir : Kæmpferol, génistéine, vanilline et myrécitine et d'autre part d'identifier 3 molécules pour l'extrait aqueux de décoction (EAD) qui sont : Rutine, kæmpferol et vanilline, la structure chimique de ces molécules est présentée par la figure 24.



**Figure 24** : Structures chimiques des molécules phytochimiques des extraits aqueux des graines du fenugrec identifiées par chromatographie (Tabart et al., 2009).

Le kæmpferol est un pigment qui appartient à la famille des flavonols synthétisé par hydrolyse des hétérosides trouvés dans l'épiderme des plantes leurs permettant de se protéger contre les méfaits des rayonnements, la myrécitine est un hétéroside de la famille des flavonols présente dans de nombreux végétaux et constitue un antioxydant naturel. La rutine est un diglycoside capable de piéger les radicaux libres, plusieurs études ont montré que la rutine a un pouvoir antioxydant moindre que celui de la myrécitine et supérieur à celui du kæmpferol (Tabart et al., 2009), d'autres études ont été faites sur la composition phytochimique de l'extrait méthanolique de la poudre des graines de fenugrec par méthode chromatographique où les résultats ont révélé la présence de plusieurs composés phénoliques

appartenant à la classe des flavonoïdes glycosides dont le constituant majeur était le kæmpferol avec un temps de rétention de 53 min (**Benayad et al., 2014**). Les résultats de la caractérisation par l' HPLC varient en fonction du pouvoir séparateur de la colonne, la vitesse de l'écoulement et la composition de la phase mobile et la température de la colonne (**Johnson et al., 2011**).

### **III.5. Analyse des propriétés émulsifiantes**

#### **III.5.1. Stabilité et index de stabilité**

L'annexe 8 montre la cinétique de la stabilité de différentes émulsions à base des extraits aqueux des graines de fenugrec et des Tween en fonction du temps.

Selon les figures 25 et 26, on remarque que la stabilité des différentes émulsions étudiées diminue au cours du temps.

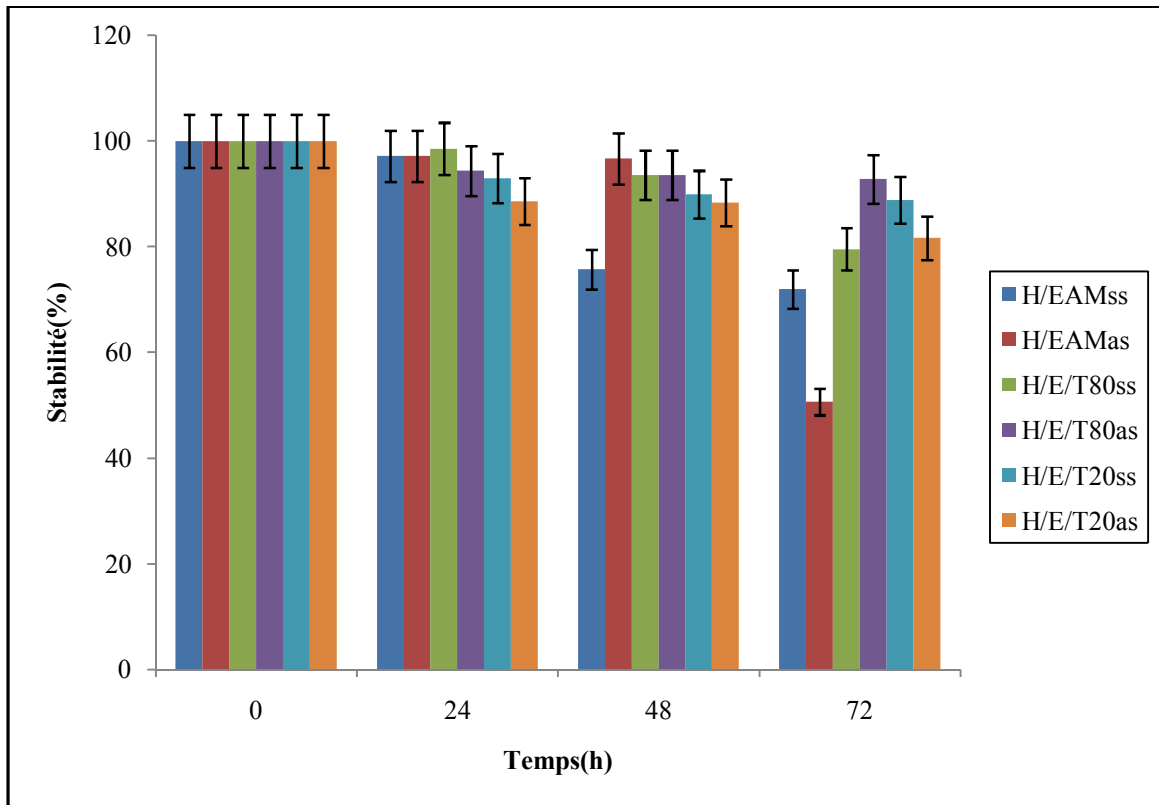


Figure 25 : Cinétique de la stabilité des émulsions à base de l'extrait aqueux de macération

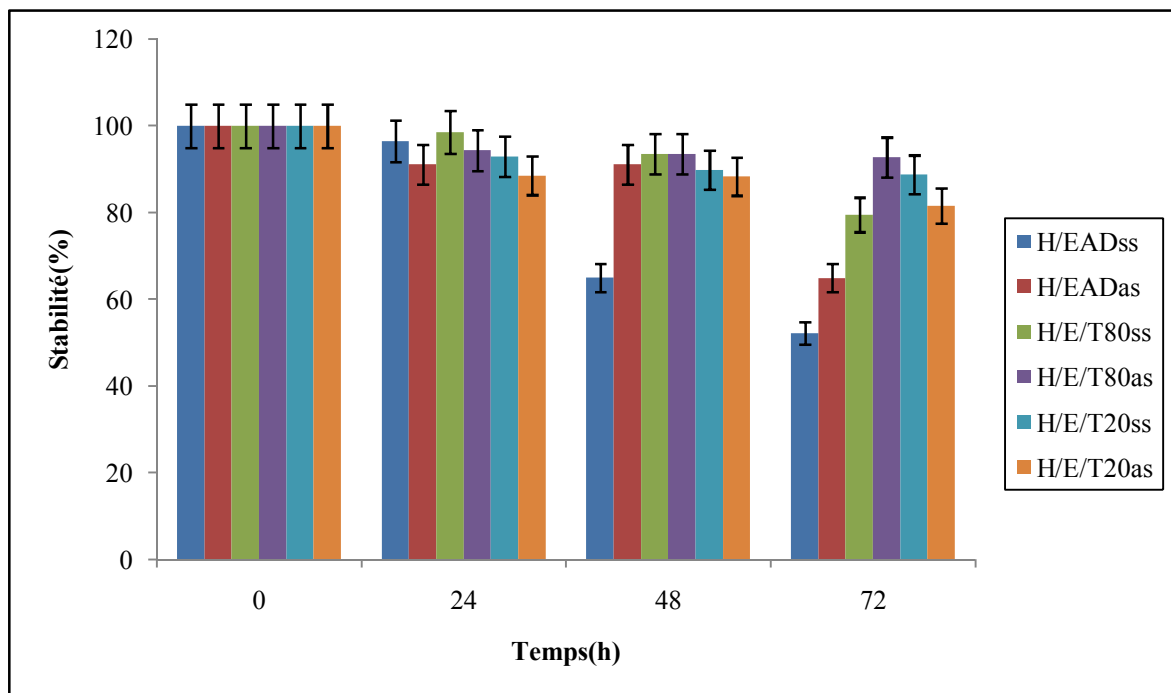


Figure 26 : Cinétique de la stabilité des émulsions à base de l'extrait aqueux de décoction

L'émulsion qui a présenté la meilleure stabilité en fonction du temps était l'extrait aqueux des graines macérées de fenugrec sans stabilisant avec un taux de 71,96% après 72h. L'extrait aqueux de décoction en présence de stabilisant vient en second lieu par son taux de stabilité qui était de 65% après 72h de repos à 25°C, la plus faible stabilité des différents échantillons étudiés revient à l'extrait aqueux de décoction des graines de fenugrec en absence de stabilisant avec un taux de 52,29%.

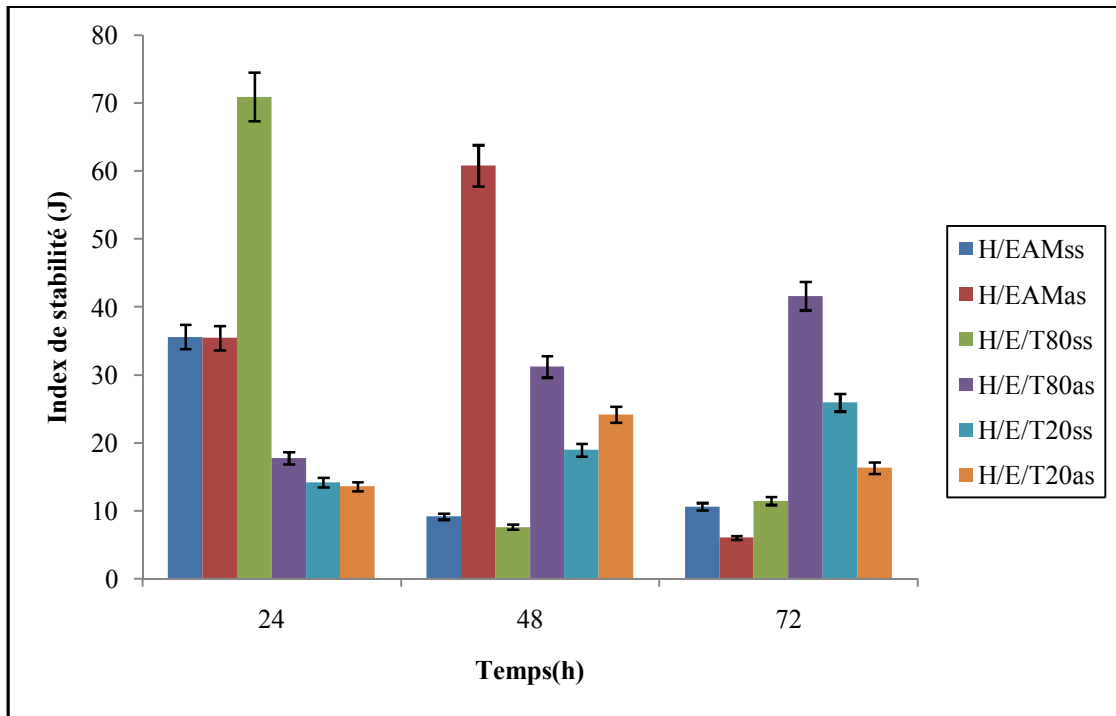
L'efficacité de la caséinate de sodium a été observée seulement durant les 48h dans la stabilité de toutes les émulsions dont l'extrait aqueux de macération des graines de fenugrec a apporté un taux de stabilité de 97,18% après 24h.

Les Tween 20 et 80 sont des agents tensioactifs synthétiques qui ont été utilisés comme témoins dans l'étude des variations de la stabilité des émulsions, ces derniers sont des produits qui gardent une structure stable à long terme. L'étude de la stabilité des émulsions à base de Tween (20 et 80) a montré qu'elles ont des allures stables au cours du temps par rapport aux autres types d'émulsions étudiées dont la meilleure émulsion qui a conservé sa stabilité est celle formée de Tween 80 avec stabilisant (caseinate de sodium) : du 100% à temps  $t = 0$  h au 92,8% à temps  $t = 72$  h. Cette différence significative est due au caractère amphiphile des molécules qui rentrent dans la constitution des Tween (**Vollak et al., 1983**).

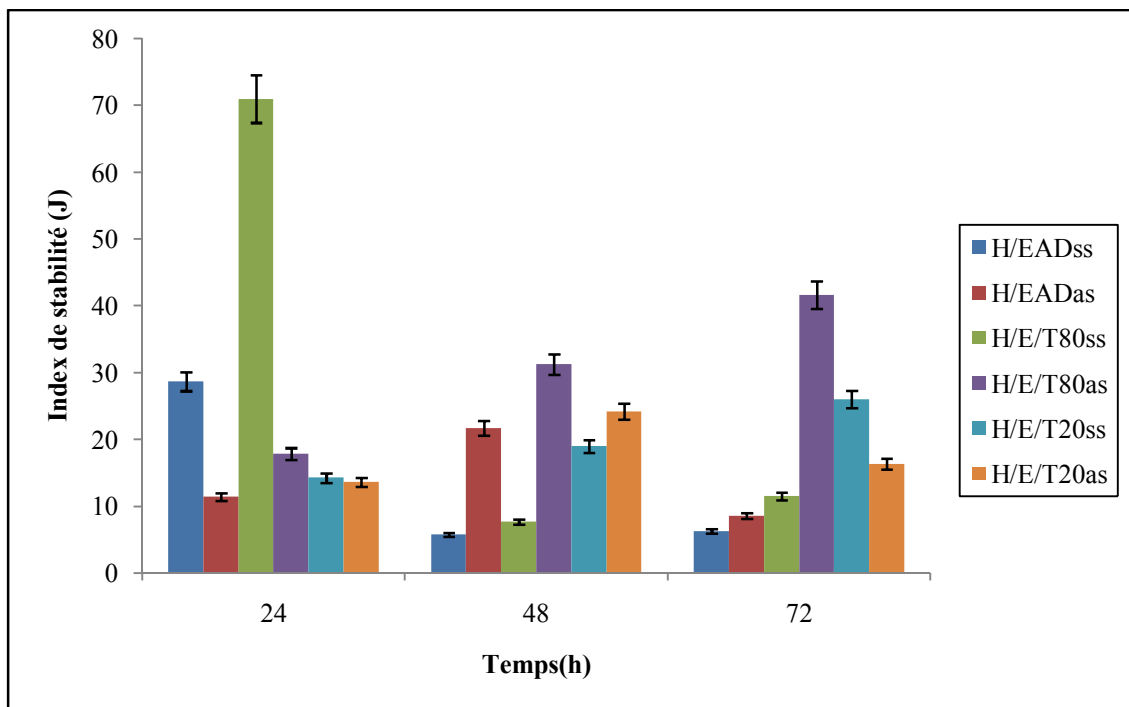
Le criblage phytochimique des extraits aqueux des graines de fenugrec a reflété la forte présence des saponosides, ces molécules phytochimique sont des glycosides stéroïdiques ayant la capacité de rendre une phase huileuse miscible dans la phase aqueuse car elles peuvent réduire la tension superficielle de l'eau et par conséquent constituer d'excellents émulsifiants (**Vollak et al., 1983**). Les protéines peuvent aussi être considérées comme émulsifiants et stabilisants en même temps, en effet, certaines protéines sont des composés amphiphiles qui ont un caractère hydrophobe et hydrophile leurs permettant de s'adsorber aux interfaces situées entre la phase huileuse et aqueuse (**Sredzinski, 2010**).

La stabilité d'une émulsion dépend de multiples facteurs à savoir: la nature de l'agent émulsifiant, température et densité de la solution, viscosité des gouttelettes d'huile, épaisseur du film interfacial (**Mangino, 1994**).

Les figures 27 et 28 montrent la cinétique de l'index de stabilité de différentes émulsions en fonction du temps.



**Figure 27** : Cinétique de l'index de stabilité des émulsions à base de l'extrait aqueux de macération



**Figure 28** : Cinétique de l'index de stabilité des émulsions à base de l'extrait aqueux de décoction

Selon les résultats enregistrés dans les figures 27 et 28 on constate que la durée de stabilité de chaque émulsion varie en fonction de sa composition qui se traduit par l'absence ou la présence de stabilisant et du type d'extrait (macération ou décoction), on note également que le meilleur index de stabilité revient à l'extrait aqueux de macération des graines de fenugrec pour une durée de 60 jours après 48h de repos, les autres émulsions ont des index de stabilité qui changent au cours du temps :

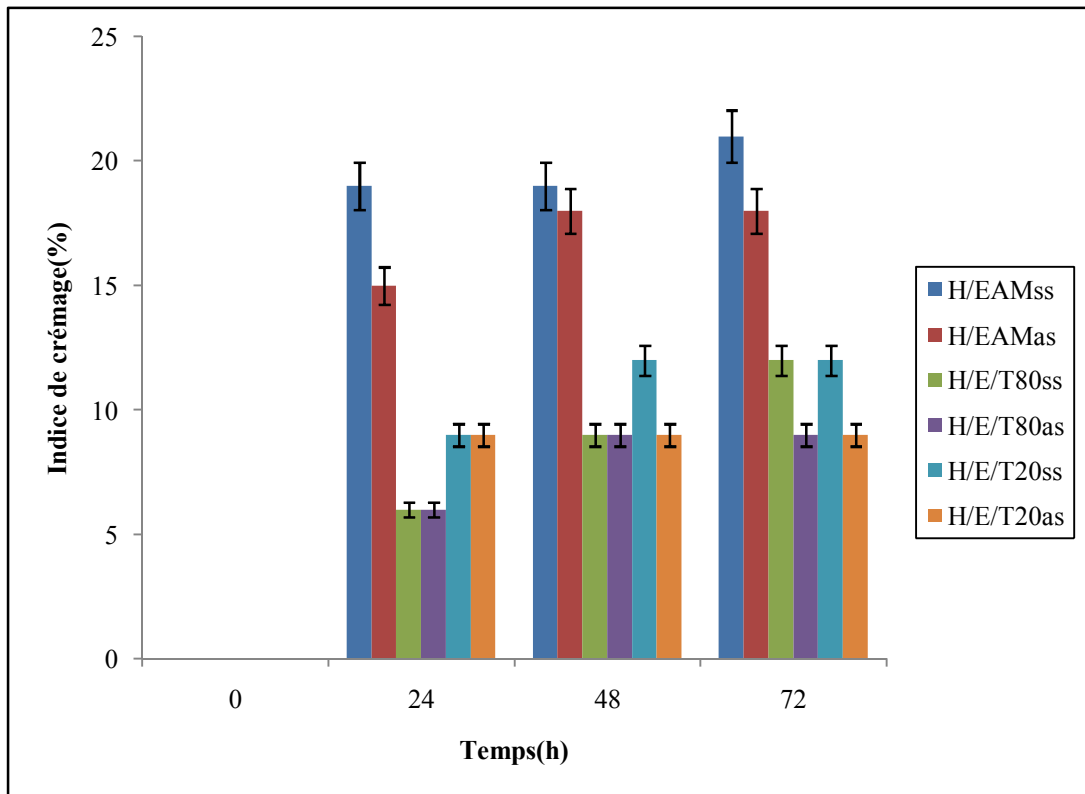
- L'extrait aqueux de macération (H/EAM ss) avec l'index de stabilité qui est égale à 36j après 24h ;
- L'extrait aqueux de décoction (H/EAD as) avec l'index de stabilité qui est égale à 23j après 48h ;
- L'extrait aqueux de décoction (H/EAD ss) avec l'index de stabilité égale à 28j après 24h.

La perte de stabilité des solutions est due à un déséquilibre entre les forces attractives intermoléculaires et les différents paramètres du milieu (pH, force ionique et température) (Mathieu, 1998).

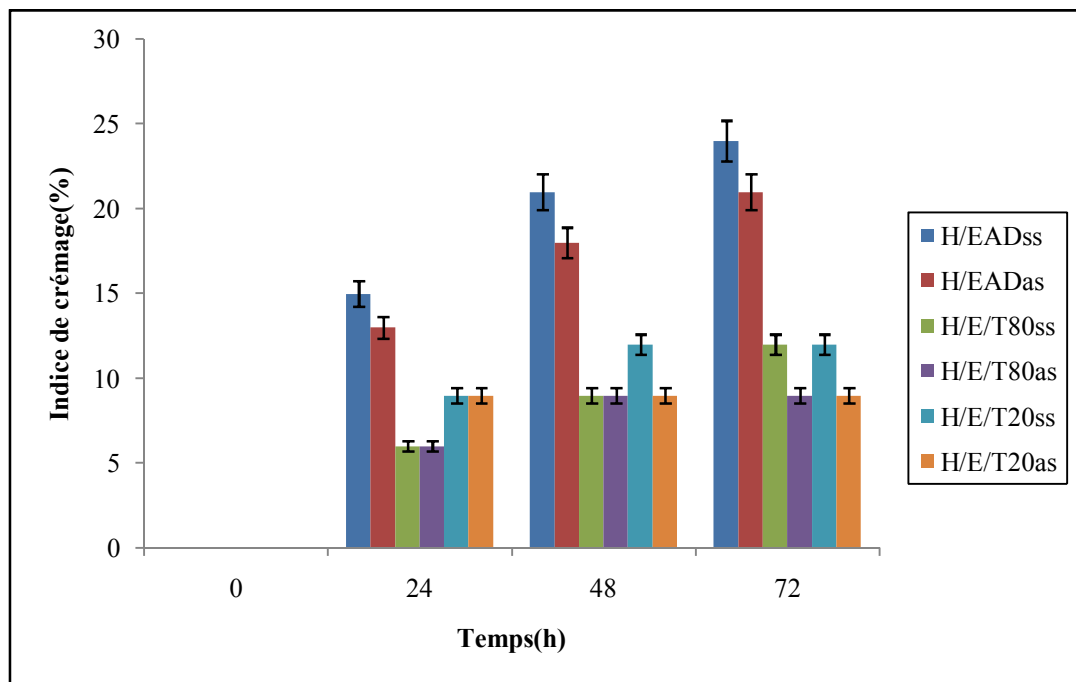
### III.5.2. Indice de crémage

La cinétique de l'indice de crémage des émulsions étudiées est illustrée par les figures 29 et 30.

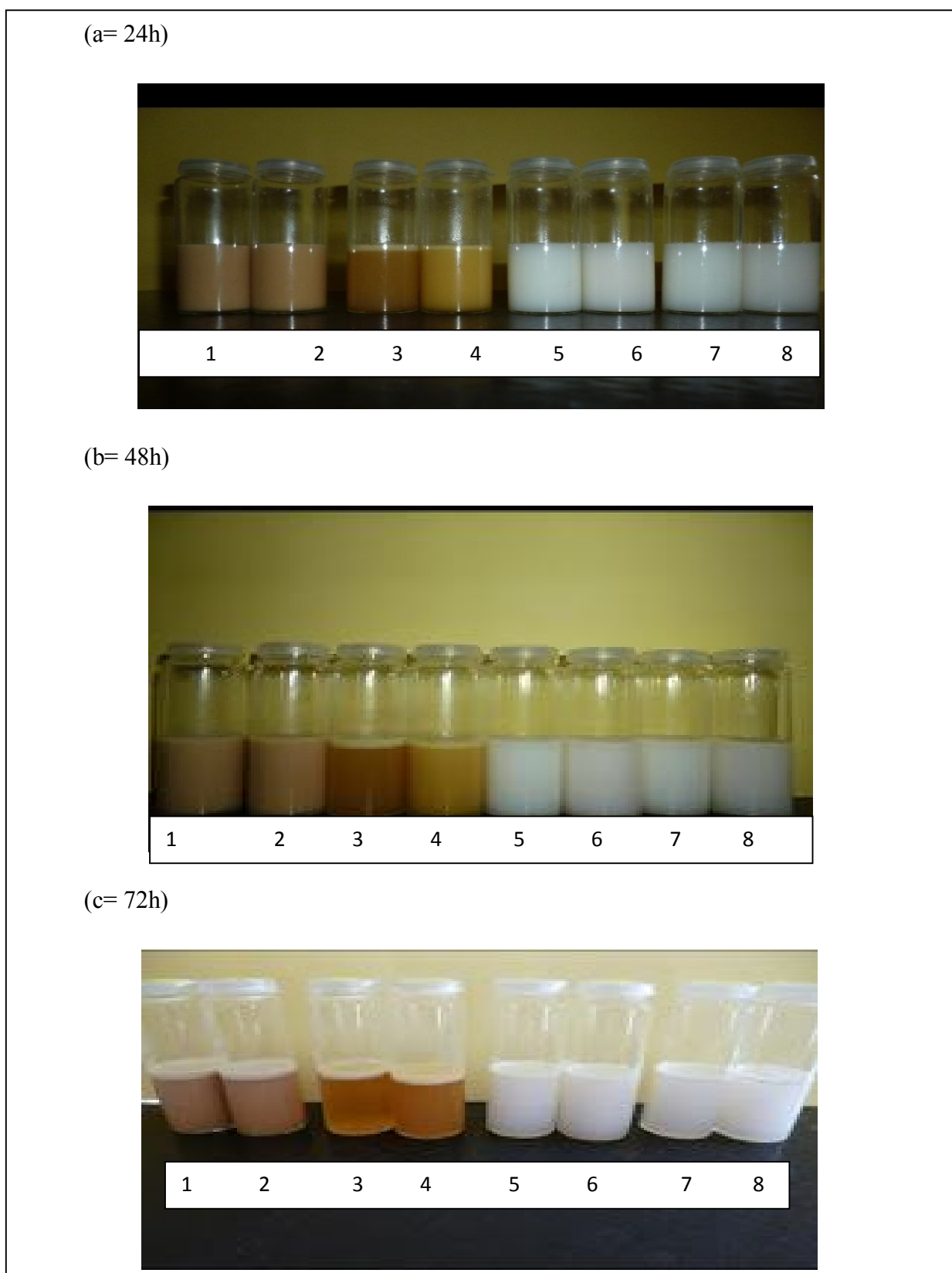
D'après les figures 29 et 30, nous constatons que les allures de l'indice de crémage des émulsions étudiées ont des tendances croissantes au cours du temps, sauf ceux obtenues dans les émulsions H/E T20 as et H/EAM as qui sont caractérisés par une stabilité dans le temps. L'aspect macroscopique de l'indice de crémage des émulsions étudiées est illustré par la figure 31.



**Figure 29** : Cinétique de l'indice de crémage des émulsions à base de l'extrait aqueux de macération



**Figure 30** : Cinétique de l'indice de crémage des émulsions à base de l'extrait aqueux de décoction



**Figure 31** : Aspect macroscopique de l'indice de crémage des émulsions étudiées au cours du temps (a, b et c) dont :



(1 : EADss ; 2 : EADas ; 3: EAMss ; 4: EAMas ; 5 : Tween 20ss ; 6: Tween 20as ; 7: Tween 80ss ; 8: Tween 80as).

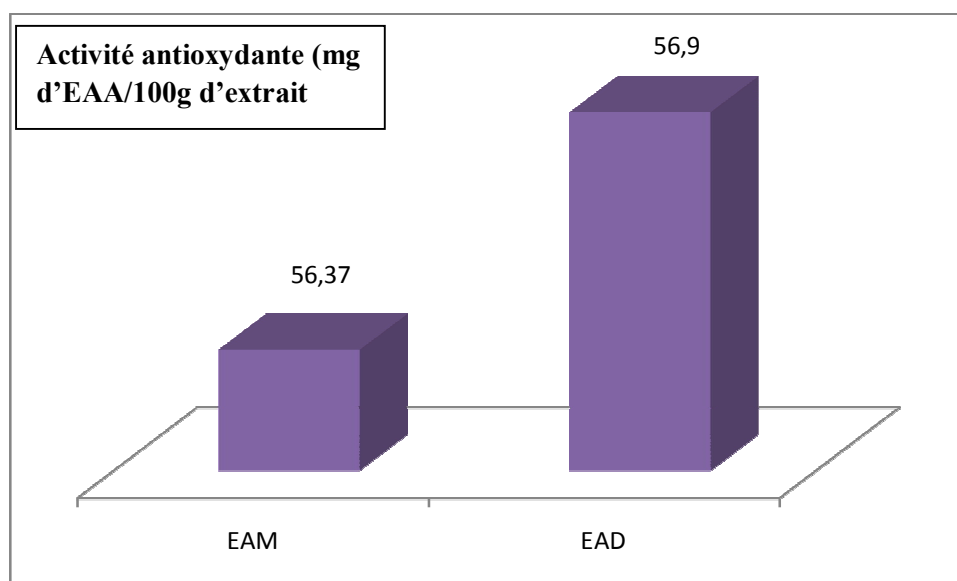
La variation dans les résultats de l'indice de crémage pour les émulsions H/E revient à la viscosité de la phase dispersante, la température du mélange et la concentration de l'agent stabilisant (**Sean et al., 2004**).

Le phénomène de crémage ou sédimentation dans une phase H/E est du à la migration des gouttelettes de la phase dispersée vers le haut tandis que la phase dispersante se sédimente vers le bas, ce mécanisme peut être expliqué par la différence de densité entre les deux phases ainsi que de la pesanteur (**Sean et al., 2004**).

Des recherches ont affirmé que l'indice de crémage est un paramètre qui permet l'étude de l'évolution de la stabilité des émulsions à analyser (relation inversement proportionnelle entre l'indice de crémage et la stabilité de l'émulsion), cet indice diminue à l'ajout des caséines car l'enrichissement des émulsions H/E avec des protéines d'origine animale mène à la formation de microfilmes stables à l'interface huile/eau, la protéine adsorbée à la surface des micelles s'organisent de telle façon que la partie hydrophobe est étalées à proximité de la surface, alors que la partie hydrophile est saillante vers la solution environnante pour former une monocouche de quelques millimètres d'épaisseur, l'analyse de l'influence de la concentration de la caséine sur la stabilité de l'émulsion a montré que la valeur minimale pour la l'indice de crémage correspondent à la stabilité maximale (**Sturza, 2015**).

### III.6. Analyse de l'activité antioxydante

La figure 32 montre l'évaluation de l'activité antioxydante exprimée en mg d'équivalent d'acide ascorbique par 100g de chaque extrait.



**Figure 32:** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux des graines du fenugrec.

Nous remarquons que les valeurs de l'activité antioxydante pour les deux extraits se rapprochent à savoir  $56.37 \pm 0.24$  mg d'EAA/100g pour l'extrait de macération et  $56.90 \pm 0.013$  mg d'EAA/100g pour l'extrait de décoction.

Les résultats enregistrés sur l'activité antioxydante à 700nm sont supérieurs à ceux trouvés par **Chourfa (2015)** dans l'extrait hydro alcoolique du fenugrec à savoir  $39.77 \pm 0.04$  mg d'EAA/100g d'extrait. L'action antioxydante des biomolécules ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation des enzymes oxydantes et par la chélation des traces des ions métalliques responsables de la production des espèces réactives à l'oxygène (**Cotelle, 2000**). Les composés phénoliques et les métabolites secondaires présents dans la plante sont de bons antioxydants naturels (**Wangcharoen et al., 2007**) qui interviennent d'une façon naturelle dans la protection des végétaux contre les différents prédateurs : insectes, herbivores (**Bouchelta et al, 2005**), elles ont la capacité de dégrader les protéines de certains champignons phytopathogènes (**Kansole, 2009**).

### III.7. Analyse des propriétés biocides

#### III.7.1. Activité antibactérienne

Les résultats consignés dans le tableau 12 montrent que les extraits des graines de fenugrec ont une bonne activité inhibitrice aux différentes concentrations testées sur l'espèce bactérienne étudiée. Plusieurs études ont montré que l'activité antibactérienne des extraits de

plante est attribuée à leurs composés phénoliques (Cowan,1999). L'effet inhibiteur des composés phénoliques sur la croissance des bactéries peut être expliqué par plusieurs raisons, parmi les hypothèses avancées, on peut citer la chélation des métaux tel que le fer qui est nécessaire à la croissance microbienne, l'action sur les membranes des micro-organismes conduisant à la perte de son intégrité structurale (Akiyama et al., 2001), l'effet endommageant de la bicouche lipidique (Funatogawa et al., 2004), et enfin, l'action sur les métabolismes bactériens (Scalbert, 1991). Xiao et ses collaborateurs (2014) ont montré que les flavonoïdes sont parmi les plus communs des produits naturels qui présentent un large spectre d'activité antibactérienne. Un nombre considérable de plantes médicinales contiennent des flavonoïdes, qui ont été rapportés par de nombreux auteurs comme ayant des propriétés antibactériennes (Malesev et al., 2007).

**Tableau 12 :** Résultats de l'activité antibactérienne des extraits aqueux des graines de fenugrec testés sur *l'Erwinea carotovora*

Concentration de l'extrait aqueux(mg/ml)	1,25	2,5	5	10	20	40
Diamètre des lauréoles EAM (mm)	/	11±0,2	12±0,7	15±1,1	16±0,0	16±0,2
Diamètre des lauréoles EAD (mm)	/	/	7,5±0,0	9,5±0,6	11±1,6	12±0,0

/ : Non déterminer

D'après le tableau 12, les résultats de l'activité antibactérienne des deux extraits aqueux des graines de fenugrec, testés sur *l'Erwinea carotovora* à six concentrations différentes (1,25, 2,5, 5, 10, 20 et 40 mg/ml), montrent que l'extrait macéré de fenugrec à la concentration de 20mg/ml, présente l'activité antibactérienne la plus importante avec un diamètre de zone d'inhibition de 16 mm, tandis que l'extrait de décoction des graines de fenugrec (EAD) donne une activité antibactérienne contre la même espèce exprimée par une lauréoles de 12 mm de diamètre pour une concentration de 40mg/ml. Selon les résultats enregistrés dans le tableau 12 on remarque que le diamètre de la zone d'inhibition varie proportionnellement avec la concentration des deux extraits utilisés. On observe également que l'extrait aqueux de macération (EAM) des graines de fenugrec est plus actif sur *l'Erwinia carotovora* par rapport à celui de la décoction (EAD) car les diamètres de zone d'inhibition les plus importants sont attribués à l'EAM avec les mêmes concentrations (figure 33). Les

résultats de l'activité antibactérienne contre *l'Erwinia carotovora* ont été comparés avec ceux d'un antibiotique synthétique de type Streptomycine dans les mêmes conditions expérimentales avec une concentration de 62,5 mg/ml dont le diamètre de la zone d'inhibition obtenu était 20 mm, ce qui permet de constater que l'effet antibactérien de la streptomycine est supérieur par rapport à celui des extraits testés.



**Figure 33 :** Activité antibacterienne des extraits aqueux des graines de fenugrec sur *l'E. carotovora*. A 40mg/ml : (a) EAM et (b) EAD.

D'après le tableau 12, nous constatons que l'extrait aqueux macéré des graines de fenugrec est le plus actif sur l'espèce cible avec une valeur de CMI de 2.5 mg/ml tandis que l'extrait aqueux de décoction a fourni une CMI de 5 mg/ml envers la même espèce bactérienne.

La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et les tubercules récoltés sont exposés à de nombreuses attaques bactériennes, il s'agit de bactéries appartenant aux genres *Pectobacterium*, les bactéries du genre *Pectobacterium* sont responsables des pertes considérables dans la culture maraîchère et même durant le stockage après récolte des tubercules de pomme de terre dont l'espèce bactérienne incriminée et responsable sur ces dégâts nécessite des facteurs environnementaux, en particulier de l'humidité et de la température, ainsi que la charge bactérienne contaminant le sol (Priou et Jouan, 1996).

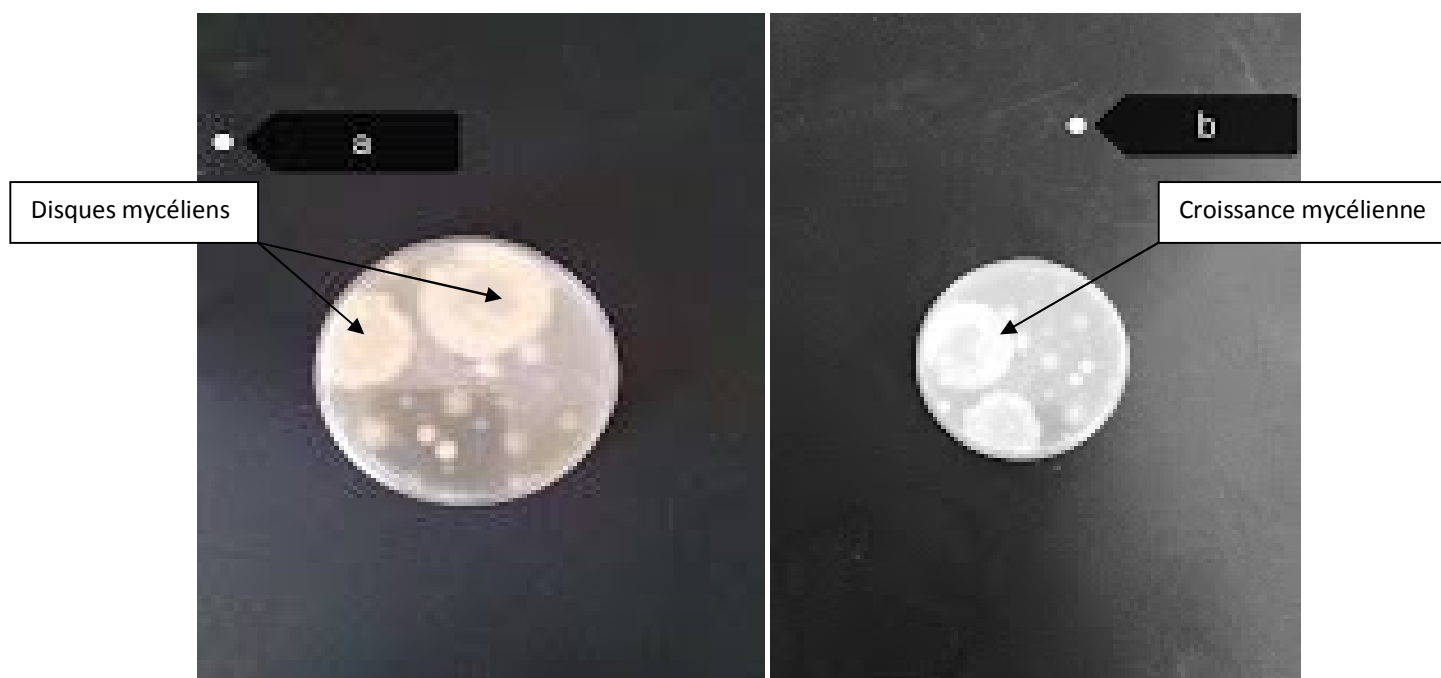
L'espèce *Pectobacterium carotovorum* (anciennement *E. carotovora* subsp. *carotovora*) provoquent des pertes au champ et lors de la conservation des tubercules (pourritures molles). En végétation, ces bactéries sont responsables d'atteintes précoces du tubercule mère inhibant la repousse (Priou et Jouan, 1996). Enfin, les tubercules contaminés, même celles qui sont asymptomatiques vont transmettre la maladie au reste du champ dans toutes les étapes de croissance de la plante, lorsque les conditions environnementales sont favorables, les bactéries pectinolytiques trouvées dans un état de latence à la surface des plantes qui renferment leur substrat elles s'activent par la blessure des parois et libération du suc de ces végétaux où la pénétration des *Pectobacter* dans les tubercules peut se faire également à travers orifices naturels comme les lenticelles (Pérombelon, 2002).

Après installation de l'*E. carotovora* à la surface des tubercules lésés un arsenal enzymatique est destiné à la fragmentation et la lyse de tous les constituants de la paroi cellulaire, il s'agit de cellulases, de protéases et de nombreuses enzymes pectinolytiques (pectine et pectate lyases, pectate hydrolases et pectine méthylestérases), aboutissant à des atteintes tissulaires d'évolution rapide (Smadja *et al.*, 2004).

### III.7.2. Activité Antifongique

Les tests antifongiques ont été appliqués sur une souche mycopathogène (*Fusarium oxysporum*) et nos résultats indiquent que les extraits aqueux des graines du fenugrec avaient un pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne de la souche testée (figure 34).

Les résultats du diamètre de la croissance radiale du mycélium en présence de différentes concentrations des deux types d'extraits aqueux des graines du fenugrec sont mentionnés dans les tableaux 13, 14, ils varient entre 0 et 21,5 mm (y compris le diamètre de disque), l'extrait aqueux de décoction ait fourni un effet fongicide à partir d'une concentration de 2mg/ml (aucun développement du disque mycélien) en revanche un effet fongistatique a été observé pour l'extrait aqueux des graines macérées car le développement mycélien persiste et varie inversement avec les différentes concentrations utilisées (un taux d'inhibition de 51,7% pour une concentration de 4mg/ml).



**Figure 34 :** Activité antifongique des extraits aqueux des graines de fenugrec testés contre le *Fusarium oxysporum* [(a) : EAM à 4mg/ml avec un taux d'inhibition de 51,7% et (b) : EAD à 1mg/ml avec un taux d'inhibition de 39,2%]

**Tableau 13 :** Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux de macération des graines de fenugrec testé sur le *Fusarium oxysporum*

Concentration de l'extrait aqueux(mg/ml)	4	2	1	0,5
Croissance mycélienne(mm)	13,5±0,4	15±0,1	16±0,5	21,5±0,8
Taux d'inhibition (%)	51,7±3,2	46,4±1,1	42,8±3,9	23,2±3,2

**Tableau 14 :** Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux de décoction des graines de fenugrec testé sur le *Fusarium oxysporum*

Concentration de l'extrait aqueux(mg/ml)	4	2	1	0,5
Croissance mycélienne(mm)	/	/	15,5±0,3	17±0,7
Taux d'inhibition (%)	100	100	39,2±2,9	32,2±4,1

/ : Aucune croissance mycélienne n'est détectée

D'après les données précédentes, on constate que le *Fusarium oxysporum* testé est beaucoup plus sensible pour l'extrait aqueux de décoction des graines de fenugrec par rapport à celui de la macération. L'analyse de l'effet biocide des graines du fenugrec varie selon le type d'extrait utilisé et en fonction de la concentration testée ce qui signifie que l'activité antifongique envers le *Fusarium* est dose dépendante.

Le criblage phytochimique et la caractérisation des biomolécules qui ont été faits sur les deux types d'extraits aqueux des graines de fenugrec ayant montré la présence des flavonoïdes, tannins et composés phénoliques, ces derniers constituent des substances biochimiques qui luttent contre les agents phytopathogènes y compris les champignons, cette activité antimicrobienne est liée au noyau aromatique des polyphénols leur permettant de former des liaisons entre leur groupement hydroxyle et les groupe -SH dans les sites actifs des enzymes de l'agent fongique et les rendent inactives (**Zango et al., 2011**). Ainsi, les molécules phytochimiques se fixent sur les protéines membranaires de la cellule fongique pour former un complexe hydroxylamine responsable d'une perte de la perméabilité membranaire et libération du contenu intracellulaire (**Lopez-Malo et al., 2005**).

L'étude de l'effet inhibiteur sur *Fusarium oxysporum* est due aux substances renfermées dans les extraits. La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières: la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote (**Kolai et al., 2012**) et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances (**Prasad et al., 2016**).

### III.8. Analyse statistique

Pour déterminer la relation entre deux variables (x, y), on peut porter sur un élément statistique quantitatif qui est le coefficient de corrélation « r », dans notre situation on va étudier le comportement statistique de l'activité antibactérienne et antifongique en fonction de la teneur en polyphénols totaux des extraits aqueux des graines de fenugrec.

*Présentation des données :*

**Tableau 15** : attribution des variables statistiques (x, y, z) pour chaque échantillon (n).

x	y	z
18,88	2	38,8
18,9	2,5	39,2
19,02	3	39
25,5	3,8	39
30,97	5,5	41,2
31	5	42
31,03	4,5	42,8

Dont :

X : concentration en polyphénols totaux de l'échantillon (mg d'EAG/g)

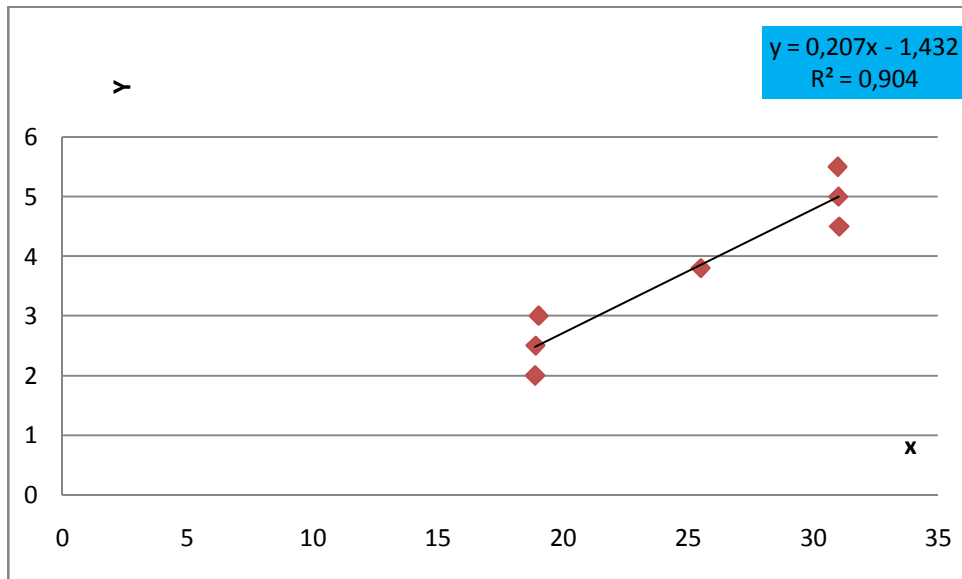
Y : concentration minimale inhibitrice de l'échantillon en mg/ml (activité antibactérienne)

Z : taux d'inhibition de la croissance radiale correspondante à chaque échantillon % (activité antifongique)

N : nombre total des échantillons à analyser pris aléatoirement = 7

1. Détermination de la droite de régression  $y=f(x)$  :





**Figure 35** : Courbe présentant l'équation de la régression linéaire entre la concentration des polyphénols totaux et l'effet antibactérien (Excel, 2010)

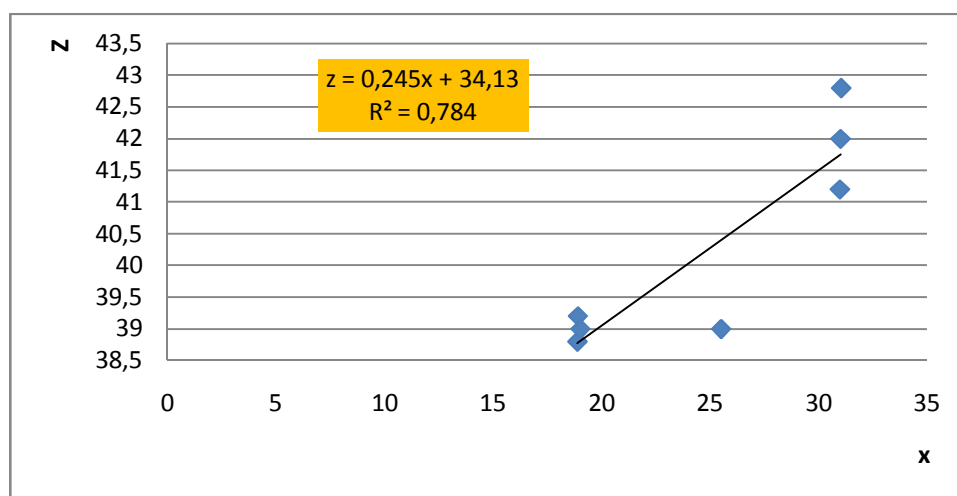
#### Calcul du coefficient de corrélation r

Le coefficient de corrélation  $r_{(x,y)}$  est calculé par la méthode de la moindre des carrés :

$$r = \frac{\sum(X - \bar{X}) \cdot (Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X - \bar{X})^2} \times \sqrt{\sum(Y - \bar{Y})^2}}$$

$$r = 0,95$$

La corrélation est positive et de meilleure qualité ( plus la concentration en polyphénols totaux est importante plus l'effet antibactérien sera meilleur), le coefficient de corrélation fournit des informations sur l'existence d'une relation linéaire entre les deux grandeurs considérées. La bonne corrélation obtenue (95%) entre la concentration des polyphénols et l'activité antibactérienne a permis de révéler une relation de cause à effet entre ces deux grandeurs ce qui a permis de confirmer l'efficacité de nos extraits sur la souche testée.

2. Détermination de la droite de régression  $z=f(x)$ 

**Figure 36 :** Courbe présentant l'équation de la régression linéaire entre la concentration des polyphénols totaux et l'activité antifongique des extraits de fenugrec (Excel, 2010)

Calcul du coefficient de corrélation  $r$  :

Le  $r_{(x, z)}$  est calculé de la même façon que celle de l'analyse précédente (méthode des moindres des carrés),  $r = 0,11$ .

L'étude de la relation entre la teneur en polyphénols dans les extraits aqueux des graines de fenugrec et leur effet biocide sur le *Fusarium oxysporum* a apporté les résultats suivants :

- Une droite de régression linéaire,  $z = 0,245x + 34,13$
- Un coefficient de corrélation de 11%, donc la corrélation est positive entre les deux variables statistiques, de mauvaise qualité ( $r$  est proche de zéro) ce qui permet de constater qu'il y a une très faible relation voire absente entre la teneur en polyphénols totaux dans les extraits aqueux des graines de fenugrec et l'activité antifongique de ces derniers.

# Conclusion

## CONCLUSION

À l'issue de cette thèse, des résultats intéressants et encourageants ont été soulignés après l'analyse de la phytochimie, des propriétés biocides et émulsifiantes des extraits aqueux des graines de fenugrec (*Trigonella foenum graecum* L.).

Les propriétés physiques et chimiques d'extraits aqueux (EAM et EAD) comparativement à la composition des graines du fenugrec sont caractérisées par une variabilité notamment la teneur en cendres, matière sèche, protéines et sucres totaux.

En ce qui concerne les propriétés émulsifiantes d'extraits aqueux (EAM et EAD) des graines du fenugrec (*Trigonella foenum-gracum*), les meilleures émulsions sont celles préparées à base d'huile d'olives vierge, d'extraits aqueux et en absence de caseinates du sodium, l'étude de la stabilité des émulsions à base de Tween (20 et 80) a montré qu'elles ont des allures stables au cours du temps par rapport aux autres types d'émulsions étudiées dont la meilleure émulsion qui a conservé sa stabilité est celle formée de Tween 80 avec stabilisant

Sur le plan phytochimique, le screening a révélé la présence de plusieurs métabolites secondaires pour les deux types d'extraits (les tanins, saponosides, flavonoïdes, terpènes et les composés azotés). En plus, l'analyse quantitative de quelques métabolites phytochimiques des extraits aqueux des graines du fenugrec a montré leur présence et avec des teneurs non négligeables à savoir : Polyphénols totaux ( $31.7 \pm 0.031$  mg d'EAG/100g d'extrait de décoction contre  $18.9 \pm 0.12$  mg d'EAG/100g d'extrait de macération), tanins ( $8.69 \pm 0.02\%$  dans l'extrait de macération contre  $9.75 \pm 0.06\%$  pour l'extrait de décoction) et  $1.71 \pm 0.02\%$  d'alcaloïdes totaux dans l'extrait de macération contre  $2.12 \pm 0.015\%$  pour l'extrait de décoction. Le profil antioxydant étudié par la méthode de réduction du fer a montré une activité importante estimée de  $56.90 \pm 0.013$  mg d'EAA/100g d'extrait aqueux de décoction qui est légèrement supérieure à celle de l'extrait aqueux de macération ( $56.37 \pm 0.24$  mg d'EAA/ 100g d'extrait). Les résultats de l'activité antimicrobienne des deux extraits aqueux des graines de fenugrec, testés sur *Erwinea carotovora* montrent que l'extrait macéré des graines du fenugrec présente l'activité antibactérienne la plus importante tandis que les résultats de l'activité antifongique ont démontré que le *Fusarium oxysporum* testé est beaucoup plus sensible pour l'extrait aqueux de décoction des graines du fenugrec par rapport à celui de la macération.

Des corrélations positives ont été validées par l'étude statistique entre la teneur en polyphénols totaux et les propriétés biocides des extraits aqueux des graines de fenugrec (*Trigonella foenum-gracum L.*).

En revanche, l'étude de la phytochimie et de l'activité biologique des extraits aqueux des graines du fenugrec (*Trigonella foenum graecum L.*) a montré que ces derniers peuvent constituer une matière active prometteuse dans la phytoprotection.

Comme complément à la présente étude, il serait intéressant de réaliser les travaux expérimentaux suivants :

- Application de l'effet biocide des extraits aqueux des graines de fenugrec sur champs et confirmer leur efficacité dans la protection des cultures contre les agents phytopathogènes afin d'attribuer le potentiel biopesticide pour ces deux types d'extraits.
- Faire des expérimentations sur l'effet antibactérien et antifongique du fenugrec sur plusieurs souches phytopathogènes.
- Identification des souches isolées en utilisant des techniques de la biologie moléculaire et de la cytogénétique.
- Comparaison sur le plan physicochimique et phytochimique entre les extraits obtenus de plusieurs variétés de fenugrec.
- Evaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes.
- Caractérisation des métabolites secondaires contenus dans les extraits des graines de fenugrec par des moyens d'exploration plus spécifiques et plus sensibles.
- Investiguer les autres propriétés biologiques pour ces extraits tels que l'effet insecticide et le pouvoir antiparasitaire.
- Analyser des propriétés biocides des émulsions préparées à base des extraits aqueux des graines de fenugrec (*Trigonella foenum graecum L.*).

Références

bibliographiques

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acem K. (2001).** Etude des propriétés émulsifiantes du lactosérum en vue de sa valorisation dans le domaine cosmétique, Thèse de Magister, Ag. ISA Tiaret, p 87.
- Acero F., Carbu M., Garrido C., Cantoral JM. (2014).** Proteomic advances in phytopathogenic fungi, *Current Proteomics*, 4(2): 79-88.
- Ahmadiani A., Javan M., Semnanian S., Barat E. and Kamalinejad M. (2001).** Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Trigonella foenum graecum* L leaves extract in the rat. *Journal of ethnopharmacology*, 75(3): 283-286.
- Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K. (2001).** Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicro Chemother*, 48(4): 487-491.
- Al-Maamari, I.T.; Khan, M.M.; Ali, A.; AL-Sadi, M.A.; Waly, M. I.; Al-Saady, N. A. (2016).** Diversity in phytochemical composition of Omani Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). accessions. *Pakistan Journal Agricultural Sciences*. 53:851-862.
- Amellal H. (2008)** .Aptitudes technologiques de quelques variétés communes de dattes ;Formation d'un yaourt naturellement , sucré et aromatisé. Thèse de doctorat. en Technologie alimentaire.Université M'hamed bougara .Boumerdes.127.
- Anouar L. (2008).** Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de doctorat : Université Mentouri-Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Algérie. 218p
- AOAC. (1995).** Official Methods of Analytics.16 th Ed .Gaithersburg,MD.
- AOAC. (2000).** Official Methods of Analytics.17 th Ed .Gaithersburg,USA.
- AOAC. (2002).** Official Methods of Analytics.17 th Ed .Gaithersburg,USA.
- Attou A. (2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalpensis* (*Fidjel*) de la région d'Ain Temouchent. Thèse de Magistère en biologie, Département de biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Aboubakr Belkaid de Tlemcen. 119.
- Bartosz G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. 9: 5-21.
- Bekro Y.A., Bekro J.A.M., Boua B.B., Tra B.F.H., Ehilé E.E. (2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia Benthiana* (Bail) (Caesalpinaceae). *Rev. Sci Nat*. 4: 217-225.

**Benayad Z., Gordoves C., Essafi N. (2014).** Characterization of flavonoids glycosides from Fenugreek crude seeds by HPLC-DAD, ESI/MS analysis. *International Journal Of Molecular Sciences*. 15: 20668-20685.

**Benhamou N., Rey P. (2012).** Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. *Phytoprotection*. Quebec. 92(1) : 24 – 35.

**Benmehdi, H. (2000).** Valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Mémoire de Magistère en chimie, Université Aboubaker Belkaid, Tlemcen. 153P.

**Bidri.M et Choay P. (2003).** Le fenugrec une légumineuse aux multiples usages, *Rev.journal Title*, n74, 15-22.

**Boizot N. et J.-P. Charpentier. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques*, 79-82.

**Boubezari E. (2010).** Contribution à l'évaluation des pratiques frauduleuses dans le lait à Gharb Chrarda bn hsen , Lot 230 n°6 MAGHRIB ARABI, Kenitra, 64.

**Bouchelta A., Boughdad A., Blenzar A. (2005).** Effets biocides des alcaloïdes, des Saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum Frutescens* L. (Solanaceae) sur *Bemisia Tabaci* (Gennadius) (Homoptera). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 9 : 259-269.

**Boudier J.F., Luquet F.M. (1989).** Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. N°21, *LABCODRA, FNSIA*, Douai, 1-113.

**Bouhenni H., Doukani K., Şekeroğlu N., Gezici S., Tabak S. (2019).** Comparative study on chemical composition and antibacterial activity of fenugreek (*Trigonella Foenum graecum* L.) and cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Ukrainian Food Journal*, 8(4): 755-767.

**Bruneton J (1987).** Eléments de phitochimie et de pharmacognosie. Technique et documentation-*Lavoisier*.

**Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. 4<sup>ème</sup> Ed. TEC et DOC. Éd. Médicales Internationales, Paris. 1288P.

**Bruneton J. (2013).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tec et Doc, Paris. 3<sup>ème</sup> Ed. 841-856.

**Burns J., Landrault W. Mullen M. Lean A. Crozier et Teissedre P. (2003).**



Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet sauvignon and hybrid grapes. *Bulletin de l'OIV-Office International de la Vigne et du Vin*, 76, 262-280.

**Cavin A. (1999).** Investigation Phytochimique de Trois Plantes Indonésiennes aux Propriétés Antioxydantes et Antiradicalaires: *Tinos Pozacispa* (Menispermacées) *Merremia Emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea Enneand*. Thèse de Doctorat, faculté des sciences. Lasanne, 241 P.

**Cendre A. (2011).** Procédé novateur d'extraction de jus de fruit par micro-onde : viabilité de fabrication et qualité nutritionnel des jus, Thèse doctorat, Spécialité : Biochimie, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, p137.

**Charles R., Kelvin P.B., Hughes J.D. (2012).** Fungal plant pathogens, *CAB International*, 307 p.

**Cheurfa.M. (2015).** Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé. thèse de doctorat. département des sciences biologiques. Faculté des sciences. Université Hassiba Ben BouAli – Chlef – Algérie, 80.

**Christian Fotsch et Ursula. (2001).** Connaissance des herbes série de Brigitte bacon (2001) EGK-santé Commander, Siège | Brislachstrasse 2 , 4242 Laufen.

**Cleriver A., El Modafar C. (1994).** Vascular Modification In *Platanus Acerifolia* Seedings Inoculated With *Creatocystis Fimbriata* fsp *Platani*. *Eur. J. For path.* 24: 1-10.

**Cooper J. (2006).** Bacterial plant pathogens and symptomology, *WSU*, 21(3): 49-57.

**Cotelle N. (2000).** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.* 1: 569-590.

**Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review.* 12(4): 564-582.

**Crete. (1965).** Précis de botanique, systématique des angiospermes, Tome II, Masson, Paris, 429 P.

**Cuiyand S W., Brummer Y. (2005).** Food Carbohydrate :Chemistry,Physical properties,and Application.CRC Press USA ,256 P.

**Darchivo M., Filesi C., Di Benedetto R. (2007).** Polyphenols, Dietary Sources And Bioavailability. *Annali de l'Instituto Superiore Di Sanita.* 43(3): 48-61.

**Dean R. (2012).** The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology, *Molecular Plant Pathology*, 13(4): 414-430.

**Debbab M. (2014).** Contribution à l'étude de résidus d'une formulation de cyperméthrine dans certains légumes et leurs effets sur l'activité antioxydante de ces denrées. Thèse de doctorat, Université Mohammed V, Faculté des Sciences Rabat, (Maroc). 140p

**Debray M., Jacquemin H., Razafindrombao R. (1971).** Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. *Travaux et Document de l'ORSTOM*. 8 :1-150.

**Demarne F.E. (1985).** Le geranium rosat, Parfums, Cosmétiques et Aromes. 62 : 85-92.

**Di Carlo G., N. Mascolo, A. A. Izzo et F. Capasso. (1999).** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65, 337-353.

**Dillip K. (2003).** Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental application, *CRC Press*, 700 p.

**Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A et SMITH F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3) :350-356.

**Duke. (1986).** Handbok of legume Of World Economic Importance, Plemus Press, New York and London.

**Edeoga H., Okwu D.E., Mbaebie B.E. (2005).** Phytochemical constituents of some Nigerian Medicinal Plants. *African Journal Of Biotechnology*. 4: 685-688.

**Eloff J.N. (1998).** A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 64(8):711-713.

**Errami M. (2012).** Devenir atmosphérique de bupirimate et transfert de ses métabolites dans l'atmosphère, sa dissipation dans les fruits de tomates et sa dégradation électrochimique. Thèse de doctorat : Université Ibn zhor, (Maroc), 201 p

**Favier A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.

**Fazli, F.R.Y. and Hardman, R. (1968).** The spice fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L). Its commercial varieties of seed as a source of diosgenin.

**Ferreira I.C.F.R., Barros L., Soares M.E., Bastors M.L., Pereiraj A. (2007).** Antioxidant Activity And Phenolic Contents Of *Olea Europaea* L. Leaves Sprayed With Different Copper Formulations. *Food and Chemistry*. 103 : 188-195.

**Fleuriet A. et Macheix J. (1977).** Effet des blessures sur les composés phénoliques

des fruits de tomates cerise (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*). *Physiol Veg*, 15, 239-250.

**Funatogawa K., Hayashi S., Shimomura H. (2004).** Antibacterial activity of hydrolysable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*, 48: 251-261.

**Gardés-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D. (2003).** Espèce réactives de l'oxygène. L'actualité chimique.

**Geoffrey ,C.P. (2011)** . Food Science and technology .Ed. John Wiley ans Son. USA 520P.

**Ghedira K., Goetz P., Lejeune R. (2010).** Fenugrec : *Trigonella foenum graecum* L. (Fabaceae ex. Leguminosae), *Phytotherapie*. 3 : 180-184.

**Gilbert. S. (1992).** Additifs et agents dépresseurs de l'activité de l'eau in additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires, 2ème édition, revue et augmentée, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, p 226-256.

**Gomes P.B., Mata V.G., Rodrigues A.E. (2011).** Characterization Of Portuguese Grower Geranium Oil (*Pelargonium* SP). *Essential oil Res.* 16:490-495.

**Gornall A G., Bardawill C. J., David M M. (1949).** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Bio. Chem*, 177: 751- 766.

**Goudable J. et Favier A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11, 115-120.

**Goussard S., P. Courvalin (1999).** **Gomes P.B., Mata V.G., Rodrigues A.E. (2011).** Characterization Of Portuguese Grower Geranium Oil (*Pelargonium* SP). *Essential oil Res.* 16:490-495.

**Guignard J.L., F. Dupont (2004).** Botanique: systématique moléculaire. Masson.

**Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H. 2007.** Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*; 103: 1449–1456.

**Halliwell B., M. Whiteman (2004).** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean, *British journal of pharmacology*, 142, 231-255.

**Harchane H., El Addas H., Amsaguine S., El Amrani N., Radallah D. (2012).** Effet de l'extrait aqueux des graines du Fenugrec (*Trigonella foenum graecum*) sur l'amélioration du profil lipidique du rat. *Phytothérapie. Springer.* 10: 357-362.

**Harbone, J.B. (1998).** Phytochemical Methods, a guide to modern techniques of plant analysis. Ed. Chapman et Hall, London, 56-58 pp.

**Hegnauer R. (1973).** Chemotaxonomie des Pflanzen, Birkhauser. Verlag, Basel, Stuttgart, 6 : 761-765 .

**Hermann H., Day P. (2001).** Plant fungal pathogen interaction, *Classical and molecular view, Springer Science and Business Media,* 214 p.

**Hemaiswarya S., A.K. Kruthiventi et M. Doble. (2008).** Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine,* 15, 639-652.

**Hermingway R.W. (1992).** Structural Variation In Proanthocyanidins And Their Derivatives In Lplant Polyphénols : Synthesis, Properties, Significance. *Plenum Press,* New York. 657 p.

**Hedqvist H. (2004).** Metabolism of soluble proteins by rumen microorganisms and the influence of condensed tannins on nitrogen solubility and degradation.

**Hmouni A., Hajlaoui M.R., Mlaiki A. (1996).** Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPOO Bull,* 26 : 697-705.

**Johnson R., Vitha M. F. (2011).** Chromatography selectivity triangle. *Journal Of Chromatography A.* 4: 559-560.

**Jungbluth. (2008).** Les espèces réactives de l'oxygène et leur principales implications dans la physiologie canine. Université de Claude-Bernard (Lyon). Thèse de doctorat.

**Kahkonen Marja.P., Hopia Anv I., Vuorela Heikkij., Rauha Jussi-P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. (1999).** Antioxydant Activity Of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry.* 47: 3954-3962.

**Kansole M.M.R. (2009).** Etude Ethnobotanique, Phytochimique et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Burkina Faso : Cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin). *Journal Of Essential Oil Research (JEOR).*

**Karou D., Dicko M.H., Simpore J., Taraore A.S. (2005).** Antioxydant And Antibacterial Activities Of Polyphenols From Ethnomedicinal Plants Of Burkina Faso. *African Journal Of Biotechnology*. 4: 823-828.

**Khireddine H. (2013).** Comprimés de poudre de dattes comme support universel des principes actifs de quelques plantes médicinales en Algérie. Thèse de Magister. Faculté des Sciences de l'Ingénieur. Université M'hamed Bougara-Boumerdes, 160.

**Kolai N., Saiah F., Boudia A. (2012).** Effet inhibiteur in vitro de l'huile essentielle d'Artimesia herba alba sur deux souches de *Fusarium oxysporum*. *Sp. radialis- lycopersici*. *Algerian Journal of Arid environment*, 2 : 71-76.

**Kumar S., Mehla R.K., Dang A.K. (2013).** Use of Shatavari (*Asparagus racemosus*) as a galactopoietics and therapeutic herb, *Agricultural review*, 29(2): 132-138.

**Lahouel M., S. Boulkour, N. Segueni et J. Fillastre. (2004).** The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipidperoxydation and increasing liver glutathione concentration. *Pathologie-biologie*, 52, 314.

**Lepoivre P. (2005).** Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondement des stratégies de lutte, *Phytopathologie*.79-103.

**Liyama K., Tuyet Lam T.B., Stone B.A. (1994).** Covalent Cross-Links In The Cell Wall. *Plant Physiol*. 104: 315-320.

**Loi R., Buchanan B. (1994).** Severe Sensivity To Ultraviolet Radiation In An Arabidopsis Mutant Deficient In Flavonoïd Accumulation. *Planta*. 194 : 504-509.

**Longanga Otshudi A., Foriers A., Vercruyse A., Van Zeebroeck A., Lan Wers S. (2000).** In vitro Antimicrobial Activity Of Six Medicinal Plants Traditionally Used For The Treatment Of Dysentery And Diarrhoea In Democratic Republic Of Congo (Drc). *Phytomedicine*.7(2): 167-172.

**Lopez-Malo, A., Alzamora , S.M., Palou, E. (2005).** Aspergillus flavus growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal Food Microbiology*, 99: 119-128.

**Macheix J.-J., A. Fleuriet et C. Jay-Allemand (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.

**Madhava-Naidou M., Shyamala B., Pura J., Naik F., Sulochanamma G., Srinivas P. (2011).** Chemical composition and antioxydant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *LWT- Food Science and Technology*. 44: 451-456.

**Malesev D., Kunti V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reaction, *Journal of Serbian chemical Society*, 72(10): 921-939.

**Maletic R., Jevdjovic R. (2007).** Sowing date –the factor of yield and quality of fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum* L.), *Journal of Agricultural Sciences*, 52(1): 1-8.

**Mangino M.E. (1994).** Protein interaction in emulsion: in protein functionality in food system, Ed: Hettiarachy et N.S. Ziegler.56p.

**Mansfield J. (2012).** The top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology, *Molecular Plant Pathology*, 13(6): 614-629.

**Masibo M., He Q. (2009).** In vitro Antimicrobial Activity And The Major Polyphenol In Leaf Extract Of Mangifera Indical. *Malaysian Journal Of Microbiology*. 5: 73-80.

**Mathieu J. (1998).** Initiation à la physicochimie du lait, Ed, et Doc, Lavoisier, Paris, p220.

**Meghwal M., Goswami T.K. (2012).** A review on the functional properties, nutritional content, medicinal utilization and potential application of fenugreek, *J. Food Process Technol.*, 3(12): 9p.

**Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques.

**Mokkedem A. (2004).** Guide pratique des cultures en secs de quelques médicinales, condimentaires et aromatiques, INRA. Baraki-Alger.10p.

**Moorthy R., Prabhuk M., Murthy P.S. (2010).** Anti-hyperglycemic compound GII from fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L) seeds, tks purification and effect in diabetes mellitus. *IndJExBiol*.2010 ;4811 11-1118.

**Mori A., Nishino C., Enoki N., Tawata S. (1987).** Antimicrobial Activity And Mode Of Action Of Plant Flavonoids Against *Proteus Vulgaris* And *Staphylococcus Aureus*. *Phytochemistry*. 26: 2231-2234.

**Nielsen, S.S. (2010).** Food Analysis. 4th Ed. Springer. USA. 602 P.

**Nitsch J., Nitsch C. (1961).** Synergistes naturels des auxines et des gibberellines. *Bull. Soc. Fr.*, 26, 2237-2240.

**Oxenham S. K., K. P. Svoboda and D. R. Walters. (2005).** Antifungal activity of essential oil Basil (*Ocimum basilicum*). *Phytopathology*. 153 : 174 - 180.

**Oyaizu M. (1986).** Studies On Product Of Browning Reaction Prepared From Glucose Amine. *Journal Of Nutrition*. 44: 307-315.

**Paris M., Hurabielle M. (1980).** Abrégé des matières médicale (pharmacognosie) ,Tome 1 :généralités,Monographies,Masson ,Paris 339 P.

**Pérombelon M.C.M. (2002).** Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol* ; 51 : 1-12.

**Pincemail J., Defraigne J. (2004).** Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. In *Symposium «antioxydants et alimentation»*, Institut Danone, Bruxelles.

**Prasad R., Tripathi V.D., Singh P., Handa A.K., Allam B., Singh R., Chaturvedi O.P. (2016).** Allelopathic potential of *Butea monosperma* L. Effect of aqueous leaf extract on seed germination and seedling growth of winter season crops. *Indian Journal of Agroforestry*, 18: 63-69.

**Priou S, Jouan B. (1996).** Les maladies provoquées par les bactéries pathogènes du genre *Erwinia*. In :Rousselle P, Robert Y, Crosnier JC, eds. *Mieux comprendre la pomme de terre*. Paris (France : Inra éditions, 1996.

**Priya V., Jananie K., Vijayalakshmi K. (2011).** Studies on antioxidant activity of *Trigonella foenum graecum* seed using in vitro models. *antioxydants et alimentation*, 24: 2225-2231.

**Rahmani M., Toum S., Benali. F., Hamel L, Dif M.M. (2015).** Aperçu ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Trigonella foenum-graecum* L. *Phytothérapie*. 3 :1-3.

**Rees et Harborne (1985).** The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry*, 24, 2225-2231.

**Rezaire A. (2012).** Activité Antioxydante et caractérisation du fruit De Palmier Amazonier *Oenocarpus Botana* (Patoa). Thèse de doctorat en phytochimie. Université des Antilles et de la Gyane. France, 96.

**Ribereau Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Ed, Dunod. Paris.254p.

**Richter (1993).** Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presses polytechnique et univrstitaires ramandes, CH-1015. 318-338.

**Rodier, J. (1997).** L'analyse de l'eau, eau naturelle, eau résiduaire, eau de mer .8<sup>ème</sup> Ed. Dunod . France. 57-65 pp.

**Rodolfo J., Koroch A., Simon J., Hitiamana N. (2006).** Quality Of Geranium Oils : Case Studies in Southern And Eastern Africa. *Journal Of Essential Oil Research*. 18: 116-121.

**Ronchetti F., Russo G. (1971).** A New Alkaloid From Rauwolfia. *Phyto Chem.* 10: 1385-1388.

**Rosengarten F. (1969).** The Book Of Spice ,Livingston,Wynnewod. Penns ; USA.

**Rouk H.F.F., Mangesha H. (1963)** .Fenugreek (*Trigonella foenum –graecum L*) Tts relationship, geography and economic importance, *Exper. Stat, Bull.No. 20, Imper Ethiopian College of Agric , and Mach. Art.*

**Sadasivam S., Manickarn A. (1996).** Biochemical methods .2<sup>ème</sup> Ed .New Age International. New Delhi. 256 p.

**Saison C., V. Helias, B. A. Ballif, T. Peyrard, H. Puy, T. Miyazaki, S. Perrot, M.Vayssier-Taussat, M. Waldner., P.-Y. Le Pennec (2012).** Null alleles of ABCG2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system Junior. *Nature genetics*, 44, 174-177.

**Sarah D., Michael J., Coplin D. (2014).** Bacterial diseases of plant, Ohio State University extension, 7(14).

**Sarni-Manchado P., Cheynier V. (2006).** *Polyphenols in food products*. Editions Tec & Doc.

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

**Schayenberg k., Apris I. (1990).** Guide to Medicinal Plants,Lutterworth Press,Cambridge,UK.

**Sean A., Hogan Brien F., Mc Namee E., O'Riordan D., O'Sullivan M. (2004).** Stabilisation of emulsion by cod protein extracts, *J. Agric. Food Chem*, 52(12).

**Sergeant N., B. Sablonnière, S. Schraen-Maschke, A. Ghestem, C.-A. Muraige, A. Wattez P. Vermersch., A. Delacourte. (2001).** Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Human molecular genetics*, 10, 2143-2155.



**Singlerton V.L., Rossi J.A. (1965).** Colorimetry Of Total Phenolics With Phosphomolybdic, Phosphotungstic acid reagents. *American Journal Of Enology And Viticulture*. 16 : 144-158.

**Smadja B, Latour X, Faure D. (2004).** Involvement of *N*-acylhomoserine lactones throughout the plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Mol Plant Microbe Interact* ; 17 : 1269-78.

**Smith D.A., Harrer J. M., Cleveland T. E. (1982).** Relation Between Production Of Kevitone Hydrastase By Isolates Of Fusarium And Their Pathogenicity On Phaseolus Vulgaris. *Phytopathology*. 72: 11319-1323.

**Snehlata H.S., Payal D.R. (2012).** Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.): an overview, *Int.J. Curr. Pharm. Rev. Res*, 2(4): 169-187.

**Sowunmi S., Ebebele RO., Peters O., Conner A.H. (2000).** Differential scanning calorimetry of hydrolysed mangrove tannin. *Polym Int*. 49(1) : 574-578.

**Sturza R. (2005).** Interaction Fer-caséine dans les émulsions alimentaires H/E, *Scientific study and research*, 6(2) :223-230.

**Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Domme J. (2009).** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food chemistry*. 113: 1226 – 1223.

**Thomas J.E., Basu S.K., Acharya S.N. (2006).** Identification of *Trigonella* accessions which lack antimicrobial activity and are suitable for forage development, *Can. J. Plant Sci*, 86: 727-732.

**Toumou L., Seck D., Namkossere S., Cisse N. (2012).** Utilisation des plantes indigènes à l'effet insecticide pour la protection des denrées stockées contre des insectes ravageurs à Boukoko. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 6(3): 1040-1050.

**Van Vuuren S. (2008).** Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 462-472.

**Velsse R. (1975)** .Technologie de Lait ,3ème édition, La maison Rustique ,Paris,698.

**Vollak .J et Stodola.J .(1983).** Plante médicinales. Edit, La maison Rustique, Paris, p698.

**Volpé Jean-Sébastien, Patricia Sergeant., Aurélie Fakler., Gisèle Kanny . (2009).** FENUGREC Aliment, médicament Hôpital Central - 29, Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny actualisé le 14 mai 2009.

**Wangcharoen W., Morasuk W. (2007).** Antioxydant capacity and phenolic content of chilies. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 41: 561-569.

**Wichtl M., Anton R. (2003).** Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutiques. *Edition Médicales Internationales.* Tec et Doc, Paris. 2<sup>ème</sup> éd : 423.

**Xiao Q., Xia J.H., Zhang X.J., Li Z., Wang Y., Zhou L., Gui J.F.(2014).** Type IV antifreeze proteins are essential for epiboly and convergence in gastrulation of zebrafish embryos, *International Journal of Biological Sciences*, 10: 715-732.

**Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A. (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 411-420.

**Zahir I. (2016).** Effect of plants against phytopathogenic microorganisms: A Review. *Br Biotechnol J*, 10(1): 1-36.

**Zango, C., Savadogo, A., Somda, K.M., Koudou, J., Traore, A. S. (2011).** In vitro evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of extracts from whole plant of *Alternanthera pungens* H.B.& K. and leaves of *Combretum sericeum* G. Don. *International Journal of Phytomedicine*, 3: 182-191.

Annexes

**Annexe 1: Verreries et appareillages du laboratoire utilisés.**

Appareils	Verreries et autres
Agitateur (RTC Basic)	Ballons
Bain marie (MEMMERT)	Béchers
Balance (SARTORIUS Basic)	Boîtes Pétri
Centrifugeuse (SIGMA Laborzentrifigen)	Burettes
Conductimètre (PHYWE)	Creusets
Etuve (MEMMERT)	Eprouvettes
Four à moufle (HERAEUS instruments)	Erlenmeyers
HPLC (YL-9100, South Korea)	Fioles jaugées
Plaque chauffante (RTC basic)	Micropipette (1000 µl)
pH- mètre (SCHOTT GERATE CG-822)	Mortier à pilon
Refractomètre (ABBE)	Pipettes ; papier wattman (n° 40)
Spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1202)	Tubes à essai
Appareil ultra turrax( kikalaboratechnik, T25)	Verres de montres
Viscosimètres ‘‘Thermocorporation’’	Dessiccateur, Barreau magnétique
	Passoire plastique N0,1 Brand (0.5mm)
	Pycnomètre

**Annexe 2: Produits utilisés**

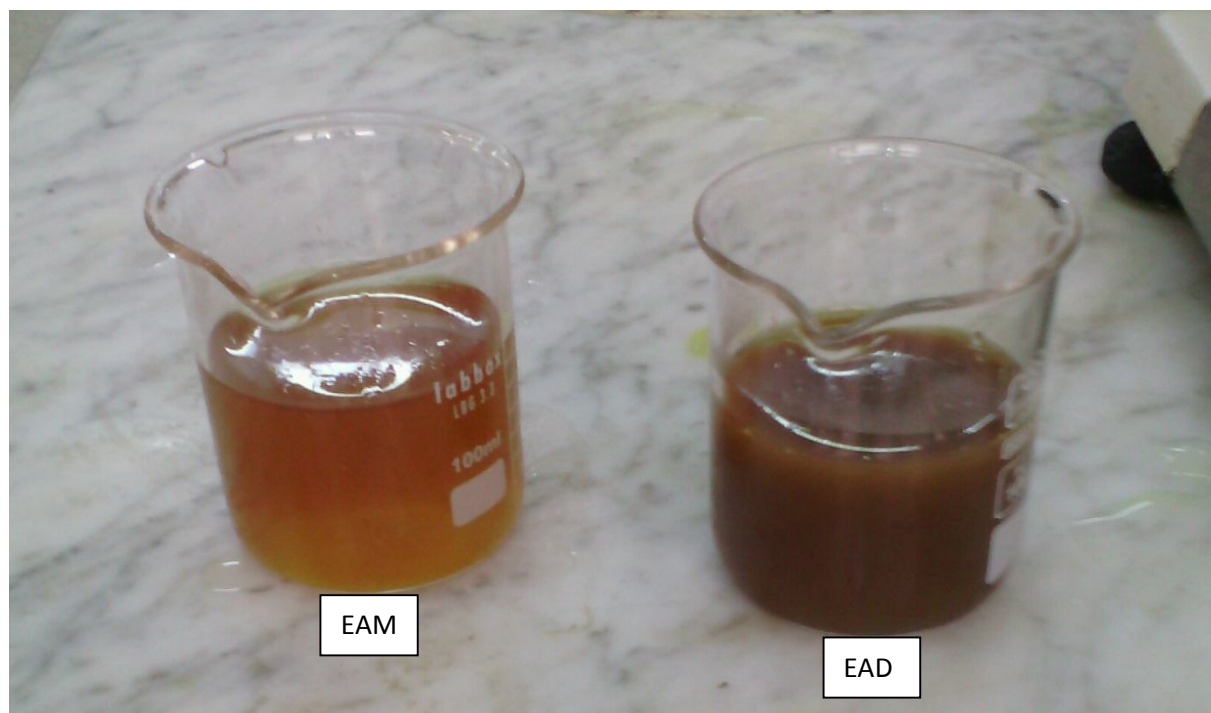
Produits chimiques et réactifs : -DNSA ( $C_7H_4N_2O_7$ ) ; Glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ) ; acide gallique; tampon phosphate; biuret  $NH_2-CO-NH-CO-NH_2$  ; Réactif de Folin-Ciocalteu ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) + ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ); Stabilisant (Caséinates de Na) ; Tween 20 ; Tween80 ; Huile d'olive vierge;

-Acide ascorbique ( $C_6H_8O_6$ ) ; Acide gallique ( $C_6H_2(OH)_3COOH$ ); Acide phosphorique ( $H_3PO_3$ ) ; Acide TriChloroacétique ( $C_2HCl_3O_2$ ); Acide chlorhydrique (HCl) ; Acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) ; Acide acétique ( $C_2H_4O_2$ ) ;

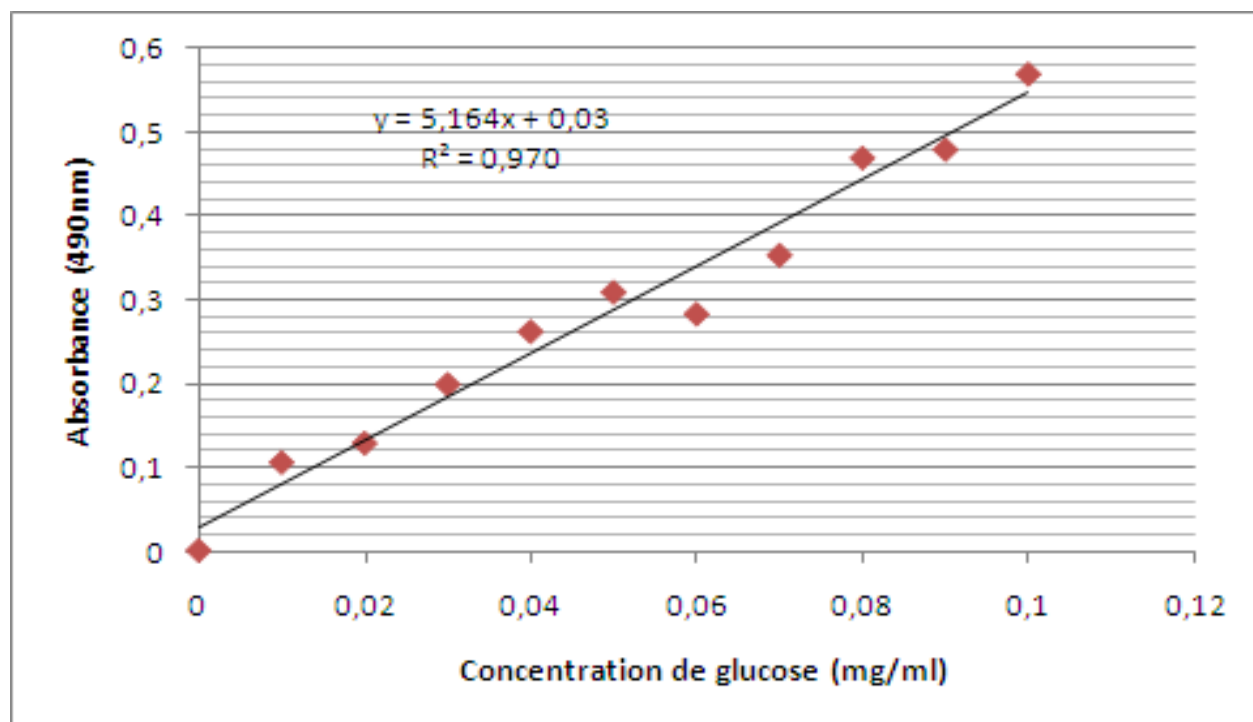
-Chlorure de calcium ( $CaCl_2$ ) ; Chlorure de Fer ( $FeCl_3$ ) ; Eau distillée ( $H_2O$ ); Ethanol ( $C_2H_5OH$ ) ; Ether de pétrole ( $CH_3-(CH_2)_n-CH_3$ ) ; HexaCyanoFerrate du Potassium [ $K_3Fe(CN)_6$ ] ;Hydroxyde de potassium (KOH) ; Méthanol ( $CH_3OH$ ) ;(NaOH) ; carbonate de sodium ; chloroforme ; HPLC ; acétonitrile pure ;

Milieux de culture: -Milieu de Mueller Hinton (composition en g/l : peptone 17,5, extrait de viande 2, amidon 1,5, agar 17) ;

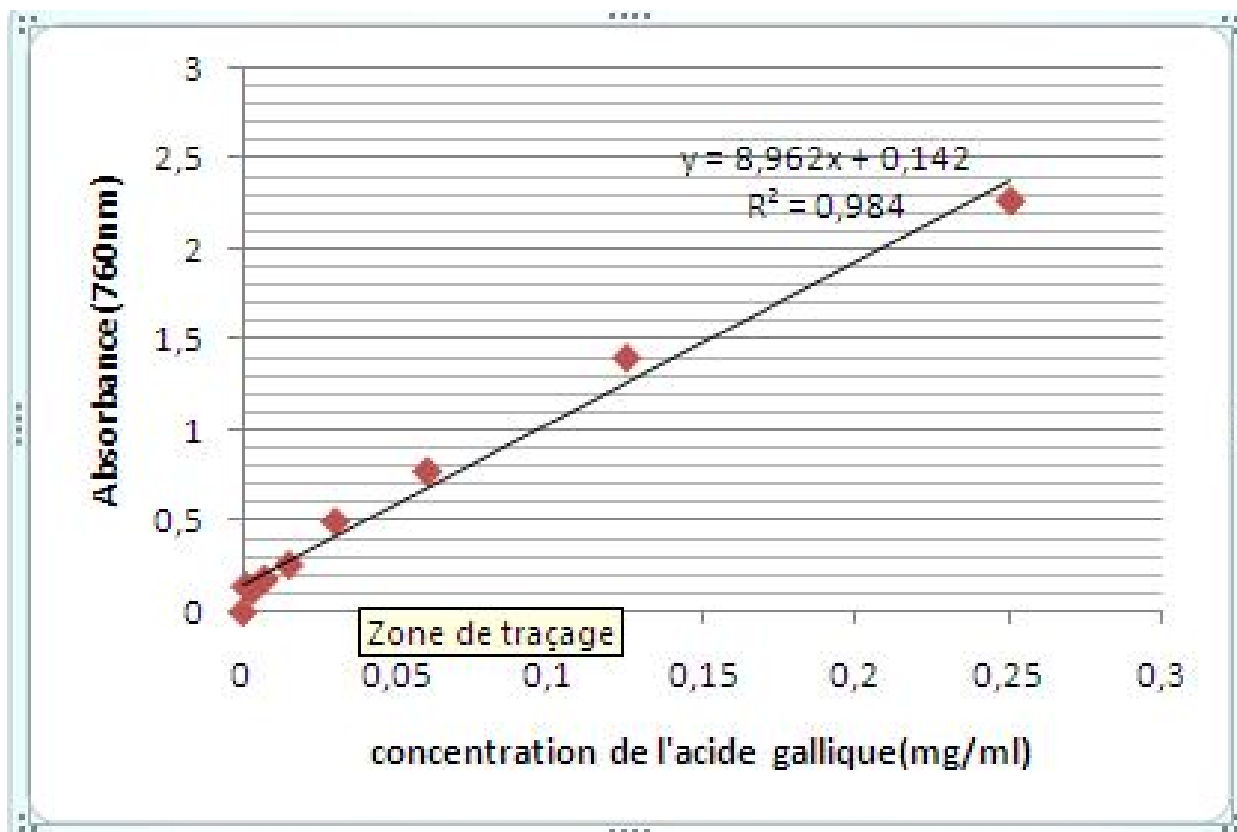
-Milieu de culture Saboraud (composition en g/l : caséine 5, peptone 5, glucose 20).



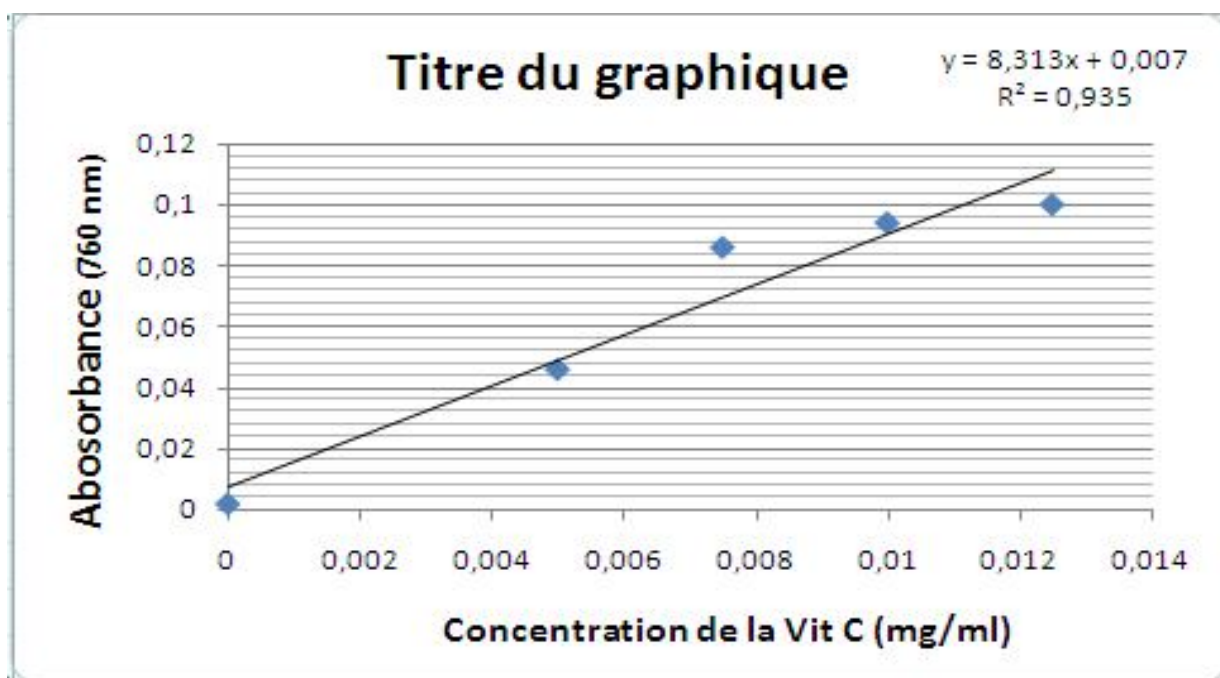
**Annexe 3 :** Extraits aqueux de graines de fenugrec obtenus par macération (EAM) et décoction (EAD).



**Annexe 4 :** Courbe d'étalonnage de glucose pour la détermination du taux des sucres totaux.



**Annexe 5:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la teneur des polyphénols.



**Annexe 6 :** Courbe d'étalonnage de la Vit C pour évaluer l'activité antioxydante (test de FRAP)

**Annexe 7 : Résultats des analyses physicochimiques des extraits aqueux des graines de fenugrec**

Paramètres	Extrait aqueux de macération (EAM)	Extrait aqueux de décoction (EAD)
Rendement(%)	45±2	15±1
pH à 20°C	5,98±0,2	6,45±0,2
Conductivité (mS/cm)	2,92±0,35	5,21±0,28
°Brix	8±0,9	12±0,5
Indice de réfraction à 20°C	1,345	1,35
Densité à 20°C	1,005±0,002	1,02±0,01
Viscosité (cP)	2,76±0,06	6,65±0,19
Teneur en cendres (%)	0,2±0,01	0,96±0,12
Teneur en protéines (%)	10,56±0,32	15,87±0,13
Teneur en sucres totaux (%)	4,68±0,08	6,88±0,05

**Annexe 8 : Résultats de la variation de la stabilité en fonction du temps.**

	EAD		EAM		Tween 20		Tween 80	
	ss	as	ss	as	ss	as	ss	as
t <sub>0</sub>	100	100	100	100	100	100	100	100
t <sub>24h</sub>	96,52	91,20	97,19	97,18	92,98	88,59	98,59	94,40
t <sub>48h</sub>	65,08	91,20	75,70	96,71	89,94	88,42	79,57	93,60
t <sub>72h</sub>	52,29	65	71,96	50,70	88,85	81,65	73,94	92,8

**Annexe 9 : Résultats des indices de crémage (IC%) des deux types d'extraits aqueux des graines de fenugrec durant trois jours**

	EAD		EAM		Tween 20		Tween 80	
	ss	as	ss	as	ss	as	ss	as
t <sub>0</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0
t <sub>24h</sub>	15	13	19	15	9	9	6	6
t <sub>48h</sub>	21	18	19	18	12	9	9	9
t <sub>72h</sub>	24	21	21	18	12	9	12	9



**Annexe 10 :** Montage HPLC modèle YL-9100 (LCSCO, Tlemcen).



**Publications**  
**&**  
**Communications**

**Acta Scientifica Naturalis**

Former Annual of Konstantin Preslavsky University – Chemistry, Physics, Biology, Geography  
 Journal homepage: [asn.shu.bg](http://asn.shu.bg)

**Phytochemistry, HPLC profile and antioxidant activity of aqueous extracts of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) seeds grown in arid zones of Algeria**

**Mohammed Nasir Assam BENZIANE<sup>1</sup>, Kamel ACEM<sup>2\*</sup>, Hbib AGGAD<sup>3</sup>, Mustapha ABDALI<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratory of Agro-Biotechnology and Nutrition in Semi-Arid Zones, Faculty of Nature and Life Sciences, University Ibn Khaldoun, BP 78, 14000 Tiaret - Algeria.*

<sup>2</sup> *Laboratory of Plant Physiology Applied to Soilless Crops, Faculty of Nature and Life Sciences, University Ibn Khaldoun, BP 78, 14000 Tiaret - Algeria.*

<sup>3</sup> *Laboratory of Hygiene and Animal Pathology, Institute of Veterinary Sciences, University Ibn Khaldoun, BP 78, 14000 Tiaret - Algeria.*

**Abstract:** *Fenugreek is an herb that has the ability to resist multiple environmental insults, pests, diseases and many pathogens through the synthesis of substances allowing this plant protection, these substances are called phytochemical compounds or secondary metabolites. The aim of this study is to characterize these secondary metabolites in the extracts of fenugreek seeds grown in Algeria and compare the phytochemical profile and antioxidant activity of the aqueous extracts obtained by maceration and decoction. We carried out a "phytochemical screening" on both types of extracts in order to highlight the different classes of secondary metabolites and assaying total polyphenols by the method of Follin ciocaltchu, total alkaloids and tannins contained in these aqueous extracts and appreciate their antioxidant activity using the FRAP technique. A characterization of phytochemical molecules of the two types of Fenugreek extracts was done by chromatographic method with HPLC. Several phytochemical groups were identified in the extracts of fenugreek: tannins, saponins, flavonoids, terpenes and reducing nitrogen compounds. Chromatographic analysis of the samples show that 4 phytochemical molecules were identified in the aqueous maceration extract: kaempferol, genistein, vanillin and myrecitine and 3 molecules for the*

aqueous extract of decoction are: rutin, kaempferol and vanillin. The aqueous extract of decoction was characterized by the total polyphenols content ( $31.7 \pm 0.031$  mg GAE / 100 g of extract), total alkaloids ( $2.12 \pm 0.015\%$ ) and tannins ( $9.75 \pm 0.06\%$ ) that are higher than those obtained in the aqueous extract of maceration: total polyphenols ( $18.9 \pm 0.12$  mg GAE / 100g of extract), total alkaloids ( $1.71 \pm 0.02\%$ ) and  $8.69 \pm 0.02\%$  for the tannins. A non-significant difference was marked for antioxidant activity found in both types of extracts ( $56.90 \pm 0.013$  mg AAE / 100g decoction extract against  $56.37 \pm 0.24$  mg AAE / 100g maceration extract). In the end we conclude that fenugreek may be a promising plant genetic resource responsible for an important biological activity, except its nutritional and therapeutic properties due to their phytochemical compounds.

**Keywords:** *Trigonella foenum graecum* L., aqueous extract, phytochemistry, antioxidant activity, HPLC, Algeria.

### Introduction

Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) is a legume from *fabaceae* family exploited for culinary and medicinal purposes, widespread in the Mediterranean, North Africa, India and China [1]. Besides its therapeutic properties, it has other characteristics such as the ability to resist multiple environmental constraints, pests, and many pathogenic microorganisms through the synthesis of substances called secondary metabolites [2]. These metabolites provide the antioxidant effect that represents the biological mechanism responsible for not only antibacterial and antifungal activities but also for fighting against various attacks on the plant [3]. Chemical control against diseases affecting vegetable crops and stored food has a significant impact on the environment in addition to the emergence of pathogenic agents and pests' resistant to insecticides and fungicides. To overcome this issue, alternative solutions were investigated, such as the use of substances of plant origin as biopesticide rich in secondary metabolites and capable of providing a protective effect due to their antioxidant and biocidal properties [4]. A study conducted by Madhava-Naidou et al. [5] on phytochemical composition of the powder of Fenugreek seeds demonstrated biological activities including antioxidant effect. This phytochemical composition fluctuates depending on the geographic origin of the plant, climate, cultural practices and extraction techniques [6]. The purpose of this study was to identify groups of phytochemical molecules with chromatographic method (HPLC) and to evaluate the antioxidant activity of aqueous extracts of fenugreek seeds grown in Algeria.

### Material and Methods

72

Corresponding author: [kamel\\_acem@yahoo.fr](mailto:kamel_acem@yahoo.fr)

### **Plant material**

The plant material used to make the aqueous extraction is represented by the seeds of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) grown in the region of Biskra -Algeria, identified by the laboratory of Scientific Research and Technical Center on Arid Regions ( CRSTRA) -Biskra.

### **Aqueous extracts**

Fenugreek seeds are cleaned, sorted then passed to extraction process, we have prepared two types of aqueous extracts from seeds of fenugreek and potable water to 25%; the aqueous extract of maceration (EAM) is obtained by immersing the seeds in water and let stand for 24 hours, for the aqueous extract of decoction (EAD) is prepared after 5 minutes of boiling [7].

### **Photochemical screening**

Active molecules (tannins, polyterpenes, flavonoids, free anthraquinones, and nitrogen compounds, cardiotoxic glycosides, reducing sugars, coumarins and saponins) were identified according the methods previously described [8, 9, 10, 11, 12].

### **Sterols and polyterpenes**

5ml of the extract were evaporated, the residue was dissolved hot in 1ml of acetic anhydride and 0.5ml sulfuric acid (96%) was added to triturate. A blue to blood red color indicates a positive reaction.

### **Free anthraquinones**

5 ml of the extract were added to 2.5ml of ammonium hydroxide (20%) stirring the mixture; a red coloration indicates a presence of free anthraquinones.

### **Flavonoids**

By the reaction of cyaniding, few drops of concentrated hydrochloric acid (96 %) were added to 5 ml of each extract and then, 2- 3 Magnesium chips and let for a few minutes. The appearance of intense orange-pink color indicates a positive reaction.

### **Tannins**

2-3 drops of ferric chloride (2 %) were added to 2 ml of each extract. The reaction is considered positive when a blue-black coloration with a precipitate appears after a few minutes.

### **Saponines**

5ml of extract were added to 10ml of distilled water. Two minutes later, the formation of foam (height greater to 1cm), persistent during 1 hour indicates the presence of saponins.

### **Reducing sugars**

5ml of Fehling liquor were added to 5 ml of the extract and incubated for 8 minutes at 70° C. Formation of a brick red precipitate indicates a positive reaction.

### **Coumarins**

1 ml of the sample (extract) was introduced in a test tube with a filter paper impregnated with Sodium hydroxide (20 %) and heated until boiling. A clear solution indicates a positive reaction (Lactone cycle reaction).

### **Nitrogen compounds**

1ml of extract was mixed with 2 ml of aqueous sodium hydroxide (20%) and then 2 to 3 drops of aqueous solution of copper sulfate (2%) were added. A violet coloration indicates a positive reaction (reaction of Biuret).

### **Cardiotonic glycosides**

1ml of each extract was added to 0.5ml acetic acid (0.1 N) containing traces of ferric chloride (2%) and thereafter 5 ml sulfuric acid (98 %). Formation of two phases, the first red-brown and the second one blue-green confirms their presence (Killer-Kiliani reaction).

### **Carotenoïdes**

After evaporating 5 ml of aqueous extract to dryness, 2 to 3 drops of antimony trichloride were added to chloroform (99%). Final red coloration turning to blue means a positive reaction.

### **Chromatographic analysis**

The analytical method used is high-performance liquid chromatography (HPLC), it allows the identification of substances according to their polarity in the solvents, the model of HPLC used for analytical control was: YL 9100- South Korea, this system is provided with a PERKIN-ELMER type of pump set concentration gradient mode, an injection valve 20µl, column C18 with a cross linked silica: 125mm × 4mm,

a double UV detector and a computer integrator for synthesis graphs. The operating conditions are as follows: - Mobile phase in binary gradient: 2% acetic acid and pure acetonitrile -an injection rate of 1 ml / min - Temperature 38 ° C - Detection at 280nm (channel 1) and 340 nm (Channel 2). The resulting chromatographic profile is compared to standards (standard pure of phytochemical molecules) injected into the same operating conditions as that of the sample. Retention time  $R_t$  of each component is determined by the integrator gives a peak on the chromatogram (AFNOR, 1996).

## Phytochemical assay

### Total polyphenols

The content of total phenolic compounds is determined by the method of Singleron and Rossi [13] by the use of the reagent *Folin cio-calteu*, introduce 2.5 ml of Folin-Cio-Calteu (diluted ten times) in a test tube and add 0.5 ml of each extract, let for 3 minutes and then add 1ml of sodium carbonate 1ml (20%). The mixture was incubated at room temperature in the dark for 15 minutes. The absorbance was measured at 760nm using the spectrophotometer (Shimadzu UV-1202). The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalent (GAE mg / 100g of extract) using the calibration curve of gallic acid as standard.

### Tannins

30 g of seed powder were added to 100 ml of petroleum ether and let to act for 24 hours. After filtration, the marc was recovered while chlorophyll and lipids removed. The recovered marc was diluted in 50 ml of di-ethyl ether then filtered to remove phenols and catechins. The marc was thereafter dissolved in 100 ml of methanol at 60°, filtered in a pre-weighed flask. The methanol filtrate was evaporated until a constant weight is achieved [14]. The tannin content (T) was calculated using the following formula:

W : capsule weight plus tannins.

$$T = (W - W_0) / W_e \times 100 (\%)$$

W<sub>0</sub>: empty capsule weight.

W<sub>e</sub>: weight of the sample.

### Total alkaloides

Shake 3 g of the sample with 25 ml of sulfuric acid (10%) and 5ml of distilled water. Complete to 50 ml with distilled water. After filtration, ammonium hydroxide (20%) was added until reaching pH = 8-9 then extraction was done with 50 ml of chloroform. The filtrate was evaporated in water bath to obtain the dry residue [15]. Alkaloid content (A) is calculated by the following formula [16]:

$$A = (W - W_0) / W_e \times 100 (\%)$$

W : capsule weight plus alkaloids.

W<sub>0</sub>: empty capsule weight.

W<sub>e</sub>: weight of the sample.

### Antioxidant activity

The evaluation of the antioxidant activity was performed by the technique *FRAP* because phenolic compounds provide the reduction of ferric iron Fe<sup>3+</sup> to Fe<sup>2+</sup> [17], 0.5ml of the different dilutions of the sample is mixed with 1.25 ml of a phosphate buffer solution 0.2M (pH = 6.6) and 1.25 ml of a solution of potassium hexacyanoferrate 1%, the whole is incubated at 50 ° C for 20 minutes, then cooled at room temperature, 2.5 ml of trichloroacetic acid at 10 % are added to stop the reaction, then the tubes are centrifuged at 3000 turns / min for 10 minutes, 1.25 ml of the supernatant are added to 1.25ml of distilled water and 250µl of an iron chloride solution at 0.1%, the reading absorbance is against a white 700nm using a spectrophotometer [18]. The calibration curve is established from the absorbances for the read range of ascorbic acid solutions. The antioxidant activity of the sample is expressed as mg Ascorbic Acid Equivalent (mg AAE) per 100 gram of sample by the formula [19]:

$$\text{Antioxidant activity (mg AAE/100 of sample)} = (C/C_0) \times 100$$

C=Concentration (mg/l ascorbic acid); C<sub>0</sub>= Concentration of the extract (g/l).

## Results

### Phytochemical screening

Table 1 shows the results of phytochemical screening of aqueous extracts from fenugreek seeds.

**Table 1.** Phytochemical screening of aqueous extracts from fenugreek seeds.

Chemical groups	Mediator reactions	Types of extracts	
		Maceration	Decoction
Sterols and polyterpenes	Anhydrous acetic	++	+++

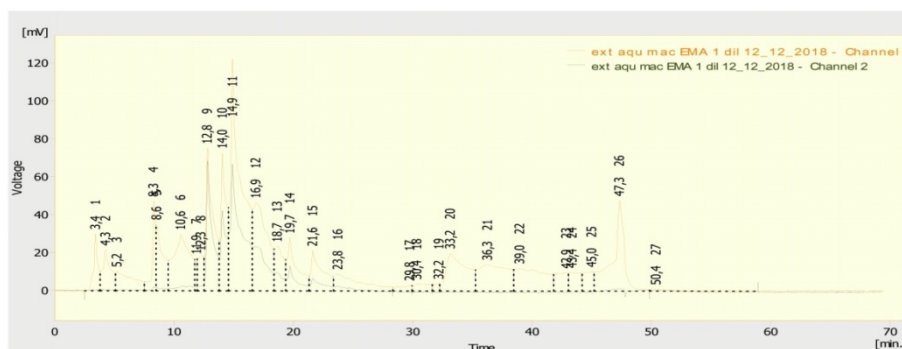
Saponins	–	+++	+++
Tannins	FeCl <sub>3</sub>	+++	+++
Free anthraquinone	NH <sub>4</sub> OH	++	+++
Coumarins	NaOH	–	–
Cardiotonic glycosides	FeCl <sub>3</sub>	+	++
Nitrogen compound	Cu <sup>++</sup>	+	++
Reducing sugars	Fehling	–	–
Carotenoids	–	–	–
Flavonoids	Mg <sup>++</sup>	+++	+++

(-): absent ;(+): low; (++): medium; (+++); high

Qualitative analyses of the chemical groups (table 1) showed in one hand the absence of coumarins, carotenoids and reducing sugars for both types of extracts, and in the other hand presence of tannins, saponins, flavonoids, sterols, free anthraquinones, cardiotonic glycosides, and nitrogen compounds.

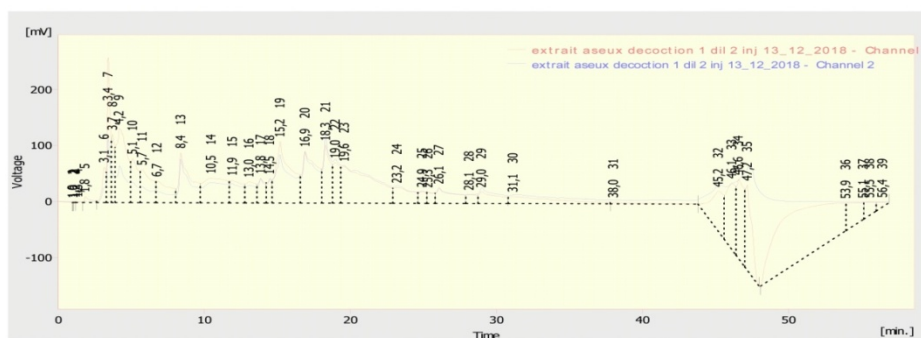
### Chromatographic analysis

The molecular separation of aqueous extracts from fenugreek seeds by HPLC was realized in two different wave lengths 280nm and 340nm, the results obtained are shown in the chromatograms with peaks and retention time of each molecule (Figures 1 and 2).



**Fig.1.**Chromatogram of the aqueous extract of macerated fenugreek seeds at 280nm and 340nm.





**Fig.2.** Chromatogram of aqueous extract of decocted fenugreek seeds at 280nm and 340nm.

The results of HPLC revealed the presence of 23 components for aqueous maceration extract (figure1) and 39 components to that of the decoction (figure2), the identification of molecules contained in the samples is based on comparison between their retention times (Rt) with that of pure standards under the same experimental conditions, compounds identified in the aqueous extracts of Fenugreek seeds are mentioned in table 2.

**Table 2:** Phytochemical molecules of aqueous extracts of fenugreek seeds detected by HPLC.

Retention time (min)	EAM	EAD
3.4	/	Rutin
4.3	Kaempferol	Kaempferol
5.2	Genistein	/
14.6	Vanillin	Vanillin
19.5	Myricitine	/

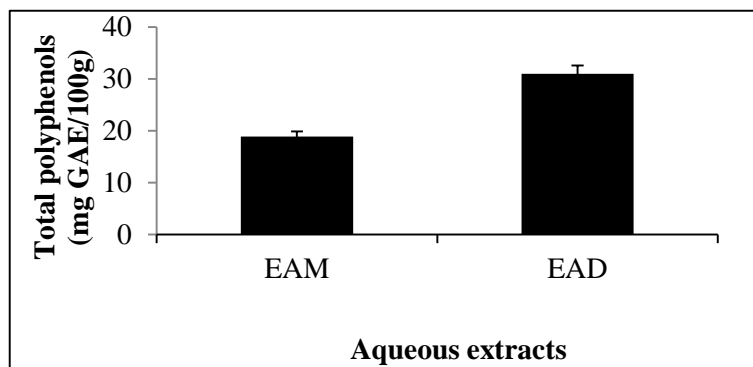
/ : Not determined

Chromatographic analysis of the samples identified 4 phytochemical molecules for aqueous maceration extract (EAM) namely: Kaempferol, Genistein, Vanillin and Myricitine and 3 molecules for aqueous decoction extract (EAD) which are: Rutin, Kaempferol and Vanillin, the rest of the analytes that appear on the chromatograms could not be identified.

**Phytochemical assay**

**Total polyphenols**

Figure 3 represents the average content of total polyphenols of aqueous extracts from fenugreek seeds.

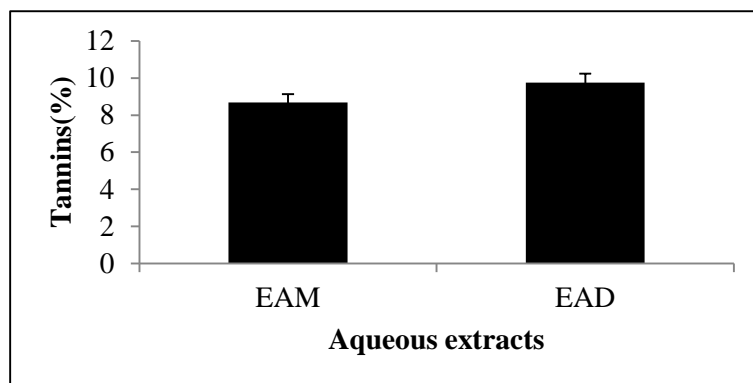


**Fig.3.** Average total polyphenols content of aqueous extracts of fenugreek seeds.

Total polyphenols content from the aqueous decoction extract estimated to  $31 \pm 0.031$  mg GAE/100g, was higher to that from maceration extract ( $18.9 \pm 0.12$  mg GAE/100g).

**Tannins**

Figure 4 gives the average content of tannins aqueous extracts from fenugreek seeds.

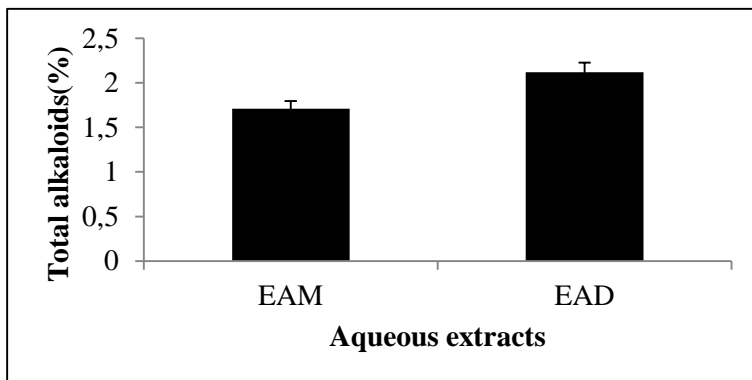


**Fig.4.** Average tannins content of aqueous extracts of fenugreek seeds.

A slight elevation of the tannin content was observed in the aqueous extract of decoction compared to the aqueous extract of maceration:  $9.75\% \pm 0.06$  against  $8.69 \pm 0.02\%$ .

**Total alkaloids**

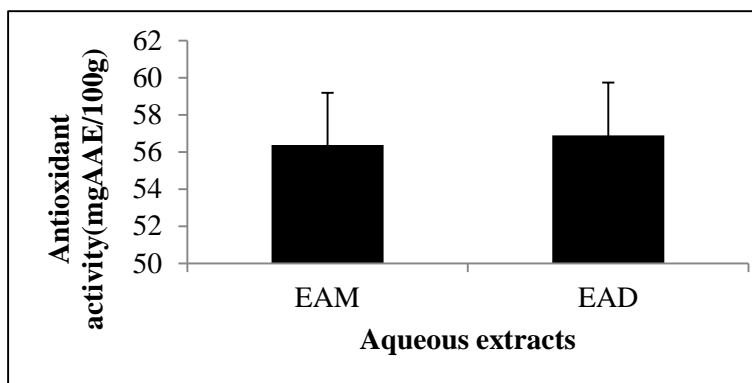
The average rate of total alkaloids is shown in figure 5. Alkaloids content was  $1.71 \pm 0.02\%$  in aqueous extract of maceration and  $2.12 \pm 0.015\%$  for decoction.



**Fig.5.** Average total alkaloids content of aqueous extracts of fenugreek seeds.

**Antioxidant activity**

Figure 6 shows the evaluation of the antioxidant activity expressed in mg equivalent of ascorbic acid per 100 g of each extract.



**Fig.6.** Average antioxidant activity of aqueous extracts of fenugreek seeds.

Antioxidant activity values determined by the test of FRAP were  $56.37 \pm 0.24$  mg AAE/100g for maceration extract and  $56.90 \pm 0.013$  mg AAE/100g for the decoction one. The test of reducing iron (FRAP) is a colorimetric, fast, and universal test applied to the organic and aqueous extracts of plants measured at 700nm.

## Discussion

According to the work of Rodolfo et al. [16] performed on the same plant, the phytochemical screening showed the presence of flavonoids, nitrogen compounds, carotenoids and saponins with no tannins. While another research of Rahmani et al. [20] has used the powder of fenugreek seeds, that found the presence of saponins, steroids, alkaloids, and mucilage. Fluctuations and variations found in the phytochemical composition can be attributed not only to the extraction technique but also to the interaction of many factors, the most important of them are cultural practices such as weeding that has a positive effect on phytochemical molecules yields, several studies have confirmed this trend [6], drying time can also intervene extraction quality as reported by Gomes et al. [21] in a comparative study where dry plants and yellow foliage give the best of quantitative and qualitative extracts. The phytochemical composition of the extracts obtained depends on climatic conditions, geographic origin of seeds and cultural practices, it is even more complex to guarantee a constant quality of the extracts [22]. Other studies had shown the influence of extraction technique and vegetative cycle on the yield and quality of the extract [21]. In the case of our study, two extraction techniques have been used: maceration of fenugreek seeds with water was kept at 24 h, and the decoction which requires a solvent boiling temperature for 5 min to solubilize a significant content of phenolic compounds. According to Laws and Buchanan [23], the phenolic compounds involved in the protection against plant's environment (pathogens) or physical (radiation, drought). The phytochemical molecules are involved in defense mechanisms of plants against different attacks because their accumulation is generally greater in resistant plants [24]. They act in the reinforcement of plant cell walls, lubrication and tissue lignifications [25]. These secondary metabolites also have an antimicrobial effect related to membrane alterations [26] and inhibition of the synthesis of the RNA and DNA synthesis [27]. Studies that have been made by Benhamou and Patrice [2] found that fenugreek seed's extract (*Stifenia*) is primarily intended for fight against vine mildew; however, it seems effective against peach blister (*Taphrina deformans*) and mildew in various plants due to its richness in polyphenols.

The chromatographic profile provided precious data on secondary metabolites of aqueous extracts of fenugreek seeds grown in arid areas of Algeria, the results showed the richness of samples in phenolic compounds known by their biological activities. Chromatographic analysis of the samples identified 4 phytochemical molecules for aqueous maceration extract namely: kaempferol, genistein, vanillin and

myrecitine and 3 molecules were identified for aqueous extract of decoction (EAD): Rutin, kaempferol and vanillin.

Kaempferol is a pigment which belongs to the family of flavonol glycosides synthesized by hydrolysis of heteroside found in the epidermis to protect the plants against harmful radiation. Myrecitine is a glycoside family of flavonols present in many plants and is a natural antioxidant. Rutin is a diglycoside able to trap free radicals, several studies have shown that rutin has less antioxidant capacity than the myrecitine and higher than kaempferol [28], other studies have been done on the phytochemical composition of the methanol extract of fenugreek seed powder by chromatographic method where the results revealed the presence of several phenolic compounds belonging to the class of flavonoid glycosides which the major constituent was kaempferol with a retention time of 53 min [29]. The results of the characterization by HPLC depend on the separating power of the column, the flow velocity and the composition of the mobile phase and column temperature [30].

The polyphenols assay was performed by the method of Follin cio-caltchu for both types of extracts including that the extract of decoction gave the best content, polyphenols are effective on insect's pests by decreasing their reproduction rate, biological activity of polyphenols concerns not only insects, it has been demonstrated that polyphenols constitute a physicochemical barrier allowing the plant more resistant towards plant pathogenic fungi [31]. The diversity of the activities of these molecules in resistant plants may well be a biocontrol strategy against pests [32]. Polyphenols are the most abundant antioxidants in medicinal and aromatic plants [33], they have in vitro an antioxidant potential allowing them to act as oxygen extinguishers reducing agents [34].

The tannins content recorded for aqueous extracts of fenugreek seeds was better, compared to that recorded in the works of Al-Maamari et al. [35] for the same species that have found a tannin content of 0.78%, this difference is probably due to the soil composition. Tannins are substances of organic origin that are found in all parts of the plant [36], those are proton donors to free radicals produced during peroxidation allowing cessation of auto-oxidation reaction [37]. They have the property of precipitating fungal proteins and heavy metals and enter the tissue regeneration [38].

The dosing of alkaloids in both types of extracts of fenugreek seeds brought low levels compared to those reported by Khireddine [16] who found a rate of 25.98% in the fine powder of fenugreek seeds. Alkaloids are extracted by a nonpolar solvent in an alkaline solution or with a polar solvent in an acid solution [39]. These substances are endowed with high biological activity even in small quantities, alkaloids are involved in the mechanisms of plant defense against herbivorous, they act as natural defenders and toxic to insects [40].

The presence of antioxidant molecules in aqueous extracts of fenugreek seeds was confirmed by the technique of reduction of iron, phytochemicals molecules increase the intensity of blue color in the reactive group ( $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ ). The results are recorded on the antioxidant activity at 700 nm are higher than those found by Cheurfa [41] in the hydro-alcoholic extract of fenugreek namely  $39.77 \pm 0.04 \text{ mg AAE} / 100 \text{ g}$  of extract.

The biomolecules antioxidant activity is exercised not only by inhibiting free radicals; it also manifests itself by neutralizing oxidative enzymes and chelation trace metal ions responsible for the production of reactive oxygen species [42]. The phenolic compounds and other secondary metabolites in the plant are good natural antioxidants [43] that intervene in a natural way in protecting plants against various predatory insects, herbivorous [40]. They have the ability to degrade proteins of some plant pathogenic fungi [38].

### Conclusion

The analytical study of aqueous extracts from fenugreek seeds showed that this plant develops a particular metabolism allowing it to synthesize bioactive molecules mainly flavonoids known by their protective effect against biotic and abiotic stress threaten the plant. Phytochemical screening revealed presence of several secondary metabolites from both types of extracts (tannins, saponins, flavonoids, terpenes, and nitrogen compounds). Moreover, the quantitative analysis showed high concentration in some bioactive molecules from aqueous extracts: total polyphenols ( $31.7 \pm 0.031 \text{ mg GAE} / 100 \text{ g}$  extract of decoction versus  $18.9 \pm 0.12 \text{ mg GAE} / 100 \text{ g}$  extract of maceration), tannins ( $8.69 \pm 0.02\%$  in the extract of maceration while  $9.75 \pm 0.06\%$  for decoction extract) and  $1.71 \pm 0.02\%$  of total alkaloids in the maceration extract against  $2.12 \pm 0.015\%$  for that of the decoction. The antioxidant profile revealed by the iron reduction method showed significant activity estimated at  $56.90 \pm 0.013 \text{ mg AAE} / 100 \text{ g}$  of aqueous decoction extract which was slightly higher than that of the aqueous maceration extract ( $56.37 \pm 0.24 \text{ mg AAE} / 100 \text{ g}$ ). The phytochemical and antioxidant studies of aqueous extracts from fenugreek seeds have shown that they could be a promising active material in crop protection.

### References

- [1]. Wichtl, M.; Anton, R., “Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutiques », Edition *Médicales Internationales*, Tec et Doc, Paris, 2<sup>ème</sup> éd, **2003**, 423.
- [2]. Benhamou, N. ; Rey, P., « Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d’ecoproduction durable », *Phytoprotection*, **2012**, Quebec, 92(1) : 24 – 35.

- [3]. Attou, A., « Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalpensis* (*Fidjel*) de la région d'Ain Temouchent », Thèse de Magistère en biologie, Département de biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Aboubakr Belkaid de Tlemcen, **2011**, 119.
- [4]. Toumnou, L. ; Seck, D. ; Namkossere, S. ; Cisse, N., « Utilisation des plantes indigènes à l'effet insecticide pour la protection des denrées stockées contre des insectes ravageurs à Boukoko », *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **2012**, 6(3), 1040-1050.
- [5]. Madhava-Naidou, M.; Shyamala, B.; Pura, J.; Naik, F.; Sulochanamma, G.; Srinivas, P., “Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds”, *LWT- Food Science and Technology*, **2011**, 44, 451-456.
- [6]. Rodolfo, J.; Koroch, A.; Simon, J.; Hitiamana, N., “Quality of geranium oils: case studies in southern and eastern Africa”, *Journal of Essential Oil Research*, **2006**, 18, 116-121.
- [7]. Harchane, H.; El Addas, H.; Amsaguine, S.; El Amrani, N.; Radallah, D., “Effet de l'extrait aqueux des graines du Fenugrec (*Trigonella foenum graecum* L.) sur l'amélioration du profil lipidique du rat », *Phytothérapie*, **2012**, Springer, 10: 357-362.
- [8]. Ronchetti, F.; Russo, G., “A New Alkaloid from *Rauvolfia*”, *Phyto Chem*, **1971**, 10, 1385-1388.
- [9]. Hegnauer, R., « Chemotaxonomie des Pflanzen, Birkhäuser », Verlag, Basel, Stuttgart, **1973**, 6, 761-765.
- [10]. Bruneton, J., « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales », Tec et Doc, Paris. 3<sup>ème</sup> Ed, **2013**, 841-856.
- [11]. Longanga Otshudi, A., Foriers A., Vercruysse A., Van Zeebroeck A., Lan Wers S., “In vitro antimicrobial activity of six medicinal plants traditionally used for the treatment of dysentery and diarrhoea in democratic republic of congo (drc)”, *Phytomedicine*, **2000**, 7(2), 167-172.
- [12]. Bekro, Y.A.; Bekro, J.A.M.; Boua, B.B.; Tra, B.F.H.; Ehilé, E.E., “Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia Benthamiana* (Bail) (Caesalpiniaceae)”, *Rev. Sci Nat*, **2007**, 4, 217-225.
- [13]. Singleron, V.L.; Rossi, J.A., “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic, phosphotungstic acid reagents”, *American Journal Of Enology And Viticulture*, **1965**, 16, 144-158.
- [14]. Sowunmi, S.; Ebewe, R.O.; Peters, O.; Conner, A.H., “Differential scanning calorimetry of hydrolysed mangrove tannin”, *Polym Int*, **2000**, 49(1), 574-578.
- [15]. Edeoga, H.; Okwu, D.E.; Mbaebie, B.E., “Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants”, *African Journal of Biotechnology*, **2005**, 4, 685-688.

- [16]. Khireddine, H., « Comprimés de poudre de dattes comme support universel des principes actifs de quelques plantes médicinales en Algérie », Thèse de Magister. Faculté des Sciences de l'Ingénieur. Université M'hamed Bougara-Boumerdes, **2013**, 160.
- [17]. Oyaizu, M., "Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine", *Journal Of Nutrition*, **1986**, *44*, 307-315.
- [18]. Ferreira, I.C.F.R.; Barros L.; Soares M.E.; Bastors M.L.; Pereira A., "Antioxidant activity and phenolic contents of olea europaea l. leaves sprayed with different copper formulations", *Food and Chemistry*, **2007**, *103*, 188-195.
- [19]. Rezaire, A., « Activité Antioxydante et caractérisation du fruit de palmier Amazonier *Oenocarpus Botana* (Patoa) », Thèse de doctorat en phytochimie. Université des Antilles et de la Guyane. France, **2012**, 96.
- [20]. Rahmani, M. ; Toum, S. ; Benali, F. ; Hamel, L. ; Dif, M.M., « Aperçu ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Trigonella foenum-graecum* L. », *Phytothérapie*, **2015**, *3*, 1-3.
- [21]. Gomes, P.B.; Mata, V.G.; Rodrigues, A.E., "Characterization of Portuguese grower geranium oil (Pelargonium SP)", *Essential oil Res*, **2011**, *16*, 490-495.
- [22]. Demarne, F.E., « Le geranium rosat », *Parfums, Cosmétiques et Aromes*, **1985**, *62*, 85-92.
- [23]. Loi, R.; Buchanan, B., "Severe sensitivity to ultraviolet radiation In An arabidopsis mutant deficient in flavonoïd accumulation", *Planta*, **1994**, *194*, 504-509.
- [24]. Cleriver, A.; El Modafar, C., "Vascular modification In *Platanus acerifolia* seedlings inoculated with creatocystis fimbriata fsp platani", *Eur. J. For path*, **1994**, *24*, 1-10.
- [25]. Liyama, K.; Tuyet Lam, T.B.; Stone, B.A., "Covalent cross-links In The cell wall", *Plant Physiol*, **1994**, *104*, 315-320.
- [26]. Smith, D.A.; Harrer, J. M.; Cleveland, T. E., "Relation between production of kevitone hydrastase by isolates of fusarium and their pathogenicity On *Phaseolus vulgaris*", *Phytopathology*, **1982**, *72*, 11319-1323.
- [27]. Mori, A.; Nishino, C.; Enoki, N.; Tawata, S., "Antimicrobial activity and mode of action of plant flavonoïds against proteus vulgaris and *Staphylococcus aureus*", *Phytochemistry*, **1987**, *26*, 2231-2234.
- [28]. Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Domme, J., "Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests", *Food chemistry*, **2009**, *113*, 1226 – 1223.
- [29]. Benayad, Z.; Gordoves, C.; Essafi, N., "Characterzation of flavonoids glycosides from Fenugreek crude seeds by HPLC-DAD, ESI/MS analysis", *International Journal of Molecular Sciences*, **2014**, *15*, 20668-20685.



- [30]. Johnson, R.; Vitha, M. F., “Chromatography selectivity triangle”, *Journal of Chromatography A*. **2011**, 4, 559-560.
- [31]. Karou, D.; Dicko, M.H.; Simporé, J.; Taraore, A.S., “Antioxydant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso”, *African Journal of Biotechnology*, **2005**, 4, 823-828.
- [32]. Masibo, M.; He, Q., “In vitro Antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica*”, *Malaysian Journal of Microbiology*, **2009**, 5, 73-80.
- [33]. Darchivo, M.; Filesi, C.; Di Benedetto, R., “Polyphenols, Dietary sources and bioavailability”, *Annali de l’Istituto Superiore Di Sanita*, **2007**, 43(3), 48-61.
- [34]. Kahkonen Marja, P.; Hopia Anv, I.; Vuorela Heikkij; Rauha Jussi-P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M., “Antioxydant activity of plant extracts containing phenolic compounds”, *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 3954-3962.
- [35]. Al-Maamari, I.T.; Khan, M.M.; Ali, A.; AL-Sadi, M.A.; Waly, M. I.; Al-Saady, N. A., “Diversity in phytochemical composition of Omani Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). accessions”, *Pakistan Journal Agricultural Sciences*, **2016**, 53, 851-862.
- [36]. Hermingway, R.W., “Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives in plant polyphénols : synthesis, properties, significance”, *Plenum Press*, **1992**, New York. 657.
- [37] Cavin, A., « Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinos pozacispa* (Menispermacées) ,*Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneand* », Thèse de Doctorat, faculté des sciences. Lasanne, **1999**, 241.
- [38] Kansole, M., « Etude ethnobotanique, phytocimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth », Mémoire pour obtenir undiplôme Diplôme d’Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso, **2009**.
- [39]. Debray, M.; Jacquemin, H.; Razafindrombao, R., “Contribution à l’inventaire des plantes médicinales de Madagascar », *Travaux et Document de l’ORSTOM*, **1971**, 8, 1-150.
- [40]. Bouchelta, A. ; Boughdad, A. ; Blenzar, A. « Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum Frutens* L. (Solanaceae) sur *Bemisia Tabaci* (Gennadius) (Homoptera) », *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **2005**, 9, 259-269.
- [41]. Cheurfa, M., « Intérêt des biomolécules d’origine végétale sur la santé ». Thèse de doctorat. département des sciences biologiques. Faculté des sciences. Université Hassiba Ben BouAli – Chlef – Algérie, **2015**, 80.
- [42]. Cotelle, N., « Role of flavonoids in oxidative stress », *Curr Top Med Chem*, **2000**, 1, 569-590.

- [43]. Wangcharoen, W.; Morasuk, W., “Antioxydant capacity and phenolic content of chilies. Kasetsart », *J. Nat. Sci.*, **2007**, *41*, 561-569.



Oran, le 25/01/2017

**Attestation de participation au salon international de l'agriculture  
« AGRIPRO EXPO »**

Nous soussignions EURL XPOSIUM EVENTS, organisateur du salon AGRIPRO EXPO, salon international de l'agriculture qui aura lieu du 25/01/2017 au 15/02/2017 au Centre de Conventions d'Oran (le Meridien), attestons que Mr Benziane Mohamed Nasir Issam doctorant à l'université de Tiaret en valorisation de la flore dans la phytoprotection a animé une conférence sur "les nouvelles technologies innovantes pour le développement agronomique et phytosanitaire, dans le cadre de la préparation de son thème de recherche qui s'intitule " étude de l'effet de molécules phytochimiques d'extrait aqueux des graines de Fenugrec" encadré par Mr Acem Kamel maitre de conférence A, à l'université de Tiaret, faculté des sciences de la nature et de la vie.

L'organisateur.

**EURL XPOSIUM EVENTS**

Cité Dar El-BeNa 18

Coopérative SIAA ~~ORAN~~

Tél: 0553.58.17.09

Association Tunisienne  
de Biotechnologie et  
Valorisation des Bio-Ressources

Tunisian Association  
of Biotechnology  
and Bio-Resources Valorization

# ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le Président de l'AT-BVBR, atteste que

## BENZIANE MED NASIR ASSAM

a présenté au VI<sup>ème</sup> congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources,  
organisé par l'AT-BVBR du 20 au 23 Mars 2018 à Tabarka - Tunisie,  
une communication par Affiche intitulée

C. AFFICHE N°:570.

**EVALUATION DE LA QUALITÉ PHYSICOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DES GRAINES DE  
FENUGREC OBTENU PAR DÉCOCTION**

BENZIANE MED NASSIR ISSAM , ACEM KAMEL , AGGAD HBIB , ABDALI MUSTAPHA .



Président de l'AT-BVBR  
Prof. Mohamed Lamia MARZOUKI





*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de L'Enseignement Supérieur*  
*et de la Recherche Scientifique*  
*Université Djillali Bounaama de Khemis Miliana*  
*Laboratoire de Production Agricoles et Valorisation Durable des Ressources Naturelles*

**PRVDURN**

## **Attestation de participation**

Le président du Symposium International sur la Recherche Antimicrobienne (ISAR 2018), ainsi que le directeur de laboratoire de recherche "Production Agricole et Valorisation Durable des Ressources Naturelles" de l'Université Djillali Bounaama de Khemis Miliana, attestent que Mme/Mr ,

**Benziane Med Nasir Assam**

Co-auteur : Acem Kamel

a participé au 1<sup>er</sup> Symposium International sur la Recherche Antimicrobienne du 2 au 3 Mai 2018 par une communication affichée intitulée : « Etude de la composition physicochimique de l'extrait aqueux des graines de fenugrec obtenu par macération. »

Le Président du Symposium

Président Symposium  
International sur la Recherche  
Antimicrobienne  
AIT OUAZOU AL-ANOUR

Fait à Khemis miliana le 3 Mai, 2018

Le Responsable de laboratoire

مدير المختبر  
المختبر  
أ.د. دواوي  
عبدالقادر