

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA DE BEJAÏA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie physico-chimique



Mémoire de master

Filière : biologie
Option : biochimie appliquée

Thème

Etude de l'activité antioxydante des polyphénols des graines de Trigonella foenum-graecum L. (Fenugrec)

Présenté par : M^{elle} AIT BRAHAM Karima et M^{elle} MESSAOUDI Siham

Membres de jury :

Présidente : M^{me} ABDERRAHIM S.

Examineur 1 : M^r BRIBI N.

Examineur 2: M^r BOUGUEZZA Y.

Promoteur : M^r BASLI ABK.

Grade :

(M. A. A.)

(M. A. A.)

(M. A. A.)

(M. A. A.)

2012-2013

Remerciements

Nous remercions tout d'abord le bon Dieu de nous avoir donné de courage et de patience pour mener à terme de ce modeste travail.

Notre promoteur Mr BASLI ABK, pour avoir accepté de nous encadrer, pour ses remarques, ses conseils et orientations.

On tient aussi à exprimer notre gratitude à Dr BEDJOU et M^{me} BENABDESSELAM pour avoir accepté de nous accueillir au sein de leur laboratoire.

Nous remercions très sincèrement M^{me} ABDERRAHIM S. de nous avoir fait l'honneur de présider le jury et d'évaluer ce mémoire.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à Mr BRIBI N. et Mr BOUGUEZZA Y. pour leur aide et conseils et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Notre profonde gratitude va à M^{elle} ADRAR, Mr TACHARFIOUT, M^{me} AMROUCHE et Dr KHETTAL pour leurs aides et leurs conseils, ainsi que pour le temps qu'ils nous ont consacré.

On tient également à remercier tout le personnel des laboratoires de biologie moléculaire et d'enzymologie en particulier saida, habiba et fella, pour leur disponibilité, leur aides et encouragement.

Nous exprimons également nos remerciements au personnel du laboratoire biophysique, en particulier Mr BOUCHENOUA et M^{me} MESSAOUDEN.

Enfin nous tenons à remercier tous nos amis(es) et collègues pour leur soutien, tous ceux et celle qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre dans notre travail

Siham et Karima

Dédicaces

En guise de reconnaissance, Je dédie ce modeste travail à

*Mes cher parents qui n'ont pas cessé de m'encourager durant toutes mes années d'études,
Que Dieu le tout puissant les protège et leur prête une longue vie.*

Mes chères sœurs Nouara, yasmîna, lîla, lynda et sarah

Mes oncles et tantes et toute leur famille

Mes très cher cousins et cousines

Mon futur mari et toute sa famille

Mes meilleurs amis (es)

Tous les êtres chers à mes yeux que je n'ai pas évoqués

Siham

Dédicaces



A ceux qui nous ont tout donné sans rien en retour

*A ceux qui nous ont encouragés et soutenus dans les
moments les plus difficiles*

A mes chers parents pour leur amour et leur support continu.

*Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de
notre profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait
pour nous.*

A mon frère et mes sœurs

A mon oncle et mes Tantes

A mes cousines

A Toutes la famille Ait braham et Ihaddaden.

*A mes meilleurs amies (mariame, sonia ,lymane, zahou,
nadjia , fatima, wiza, hanan, razkia....)*

*A toute la promotion BIOCHIMIE APPLIQUEE
2012/2013.*

Et à tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail.



KARIMA



Liste des figures

N° figure	Titre	Page
1	Photographie de <i>Trigonella foenum-graecum L.</i>	2
2	Les graines de <i>Trigonella foenum-graecum L.</i>	3
3	Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène	9
4	Structure de la vitamine E	13
5	Structure de la vitamine C	14
6	Structure d'un phénol simple.	16
7	Structure de base des flavonoïdes	19
8	Les différentes structures des flavonoïdes	20
9	Structure générale d'un tanin hydrolysable	21
10	Structure générale d'un tanin condensé	21
11	Diagramme représentatif du protocole expérimental d'extraction des polyphénols	25
12	Chambre de développement à cuve verticale et plaque CCM	30
13	Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits des graines de <i>Trigonella foenum-graecum L.</i>	34
14	Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des graines de <i>Trigonella foenum-graecum L.</i>	36
15	Teneurs en pro-anthocyanidine dans les extraits des graines de <i>Trigonella foenum-graecum L.</i>	37
16	Pouvoir anti radicalaire des extraits des graine de <i>Trigonella foenum-graecum L.</i> à différentes concentrations	38
17	Activité anti radicalaire des standards (BHA et Acide ascorbique à différentes concentrations)	38

18	Pouvoir réducteur de fer ferrique des extraits des graines de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	40
19	Pouvoir réducteur de fer ferrique de standard (BHA)	41
20	Pouvoir réducteur de phosphomolybdate d'ammonium des extraits des graines de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	42
21	Pouvoir réducteur de phosphomolybdate d'ammonium des standards (Ac. Gallique et la quercétine)	42
22	Chromatogramme obtenu par le système 1 (butanol, acide acétique et l'eau : 40, 10, 50)	45
23	Chromatogramme obtenu par le système 2 (acétate d'éthyle, acide formique, acide acétique, eau: 100, 11, 11, 26)	47
24	Chromatogramme obtenu par le système 3 (toluène, acétone, acide formique : 60, 60, 10)	48
25	Chromatogramme obtenu par le système 4 (acétate d'éthyle, méthanol, eau : 27 ; 4,5 ; 14)	50

Liste des tableaux

N° Tableaux	Titre	Page
I	Les différents radicaux libres et leurs dérivés	9
II	Principaux acides hydroxybenzoïques	17
III	Principaux acides hydroxycinnamiques	18
IV	Les différents systèmes de migrations (phase mobile) utilisés dans l'étude chromatographique	31
V	Les taux d'extraction avec différents solvants	33
VI	Les valeurs d'IC ₅₀ des extraits des graines de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. et les standards (Ac. ascorbique, BHA) de l'activité scavenging du DPPH.	39
VII	Les valeurs d'IC ₅₀ des extraits des graines de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L et les standards (Ac. ascorbique, BHA) de l'activité scavenging du DPPH	43
VIII	Résultats de la CCM concernant le premier système	44
IX	Résultats de la CCM concernant le deuxième système	46
X	Résultats de la CCM concernant le troisième système	48
XI	Résultats de la CCM concernant le quatrième système	49

Liste des abréviations

Abs	Absorbance
Ac	Acide
ADN	Acide Désoxyribo-nucléique
AGPI	acides gras polyinsaturés
AlCl₃	chlorure d'aluminium
CCM	chromatographie sur couche mince
DPPH	2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DPPH-H	2,2 diphényl-1-picrylhydrazine
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
EQ	Equivalent de Quercétine
EAG	Equivalent Acide Gallique
ES	Extrait Sec
GSH	molécules de glutathion
GSHPX	Les glutathions peroxydases et réductases
GP_x	glutathion peroxydase
GSSG	glutathion-disulfure
HPLC	Haute Performance Liquide Chromatographie
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
LDL	Low Density Lipoprotein
M	Molaire
mM	millimolaire
N	Normale
nm	nanomètre

pH	potentiel d'hydrogène
R_f	Rapport frontal
RL	Radical Libre
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SOD	Super Oxyde Dismutase
t/min	tour par minute
µm	micromètre
µl	microlitre

Sommaire

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralité sur le fenugrec

I.1.Historique.....	2
I.2. Description botanique.....	2
I.3. Classification de fenugrec.....	3
I.4. Compositions chimiques de fenugrec.....	3
I.5. Propriétés du fenugrec.....	4
I.5.1. Propriétés anti-oxydantes.....	4
I.5.2. Propriétés anti-inflammatoires et hepatoprotective	4
I.5.3. Propriétés antimicrobiennes.....	4
I.5.4. Propriétés anti-tumorales	4
I.5.6. Propriétés anti-cancérogènes.....	5
I.5.7. Propriétés hypocholestérolémiantes.....	5
I.5.8.Propriétés hypoglycémiques	5
I.6. Autres propriétés de fenugrec	5
I.7.Les effets indésirables	6

Chapitre II : Le stress oxydant et l'activité antioxydante

II.1.Les radicaux libres	7
--------------------------------	---

II.1.1.Définition	7
II.1.2.Les espèces réactive de l'oxygène	7
II.1.3. Production des radicaux libres	9
II.1.4. Origines des radicaux libres	10
II.1.4.1.Origine endogène	10
II.1.4.2.Origine exogène	10
II.1.5 Les cibles de radicaux libres.....	10
II.1.5.1. L'ADN	10
II.1.5.2. Les protéines	10
II.1.5.3. Les lipides.....	11
II.2. Le stress oxydatif.....	11
II.2.1. Définition.....	11
II.2.2. Conséquences du stress oxydatif	11
II.3. Activité antioxydante	11
II.3.1. Définition	12
II.3.2. Classification des antioxydants.....	12
II.3.2.1. Les antioxydants endogènes	12
II.3.2.2.Les antioxydants exogènes	13

Chapitre III : Les polyphénols

III.1. Généralités.....	15
III.2.Biosynthèse.....	15
III.2.1.Voie de shikimate.....	15
III.2.2.Voie d'acétate malonate	16
III.3. Classification.....	16

III.3.1. Composés phénoliques simples	16
III.3.1.1. Acides hydroxybenzoïques	16
III.3.1.2. Acides hydroxycinnamiques (phénylpropanoïdes).....	17
III.3.1.3. Les flavonoïdes.....	18
III.3.1.3.1. Classification des flavonoïdes.....	19
III. 3.2. Les composés phénoliques condensés.....	20
III.3.2.1.Tanins	20
III.3.2.1.1.Tanins hydrolysables	20
III.3.2.1.2. Tanins condensés	21
III.3.2.1.3. Les lignines.....	22
III.4.Rôles physiologiques des composés phénoliques.....	22
III.5. Propriétés biologiques des composés phénoliques.....	22
III.5.1. Propriétés antibactériennes	22
III.5.2. Propriétés antioxydantes	23

Partie Pratique

Chapitre I: Matériel et méthodes

I.1 Matériel végétal.....	24
I.2. Méthodes.....	24
I.2.1. Broyage et tamisage.....	24
I.2.2. Extraction des composés phénoliques.....	24
I.2.3.Dosage des composés phénoliques.....	26
I.2.3.1.Dosage des polyphénols totaux	26
I.2.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	26
I.2.3.3.Dosage des tanins condensés (pro-anthocyanidine).....	27

I.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante	27
I.2.4.1. Pouvoir anti-radicalaire au test DPPH.....	27
I.2.4.2. Evaluation du pouvoir reducteur.....	28
A. Méthode de réduction de fer ferrique en fer ferreux	28
B. Test de phosphomolybdate d'ammonium.....	29
I.2.5. Séparation par chromatographie sur couches minces des extraits de graines de <i>Trigonella foenum-graecum</i>	29

Chapitre II: Résultats et discussions

II.1. Taux d'extraction	33
II.2. Teneur en composés phénoliques.....	34
II.2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	34
II.2.2. Teneur en flavonoïdes	35
II.2.3. Teneur en pro-anthocyanidine.....	36
II.3. Activité antioxydante des extraits phénoliques des graines de <i>Trigonella foenum-graecum L</i>	37
II.3.1. Activité anti-radicalaire (DPPH).....	37
II.3.2. Pouvoir réducteur de fer ferrique	40
II.3.3. Pouvoir réducteur de phosphomolybdate d'ammonium	42
II.4. Etude chromatographique des extraits des graines de <i>Trigonella foenum-graecum L</i>	44
Conclusion et perspectives.....	51

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Depuis les temps les plus anciens, l'homme a utilisé les plantes pour se nourrir. Mais à côté de cette fonction nutritionnelle, il découvrit d'autres fonctions que pouvaient lui procurer les plantes : notamment le pouvoir de guérison (**Piétroni, 1996**).

En effet, les plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle, sont de véritables usines qui produisent des substances naturelles biologiquement actives. Parmi ces molécules, on trouve les métabolites secondaires qui font actuellement l'objet de nombreuses recherches.

Les effets protecteurs des plantes médicinales et aromatiques contre diverses maladies ont été attribué à la présence de composés phytochimiques, dont les polyphénols qui forment une classe de molécule très importante, et sont connus par leurs nombreuses activités biologiques, comme l'activité antivirale, anti-inflammatoire, antioxydante, anticancéreuse...etc (**Bahorun, 1997**).

Le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) est une plante médicinale et aromatique très ancienne, les graines de cette plante sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle, et dans de nombreux pays pour lutter contre diverses pathologies. Elles possèdent des propriétés thérapeutiques extraordinaires et prometteuses (anti-tumorale, hypoglycémiant, anti-inflammatoire, hypocholestérolémie, et antioxydante) (**Kumar et al., 2013**).

Depuis quelques années, le monde biologique et médical est envahi par un nouveau concept, celui du stress oxydant, causé par la présence en excès des radicaux libres oxygénés, impliqués dans de nombreuses maladies. La recherche de nouveaux composés antioxydants a de ce fait suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs pour mettre fin à ces radicaux libres liés à l'origine d'apparition de diverses pathologies. Ainsi, l'objectif de notre travail est de rechercher les substances potentiellement actives à l'égard de ces radicaux libres et de mettre en valeur ces substances comme de molécules à activité antioxydante. Cette étude a porté sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques obtenus à partir de graines de *Trigonella foenum-graecum* L.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Généralités sur le fenugrec

I.1. Historique

Le fenugrec appelé aussi Trigonelle ou Trigonella (du latin *trigonus*, triangulaire, allusion à l'aspect de la corolle), c'est une plante médicinale et aromatique très ancienne, elle est originaire du moyen orient et cultivée en Afrique du Nord, en France, en Egypte et aux Indes (Alarcon et al., 1998). Le fenugrec tient le nom latin *foenum- graecum* « foin grec » car il est utilisé comme fourrage à l'époque de l'empire romain. 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 digestive, soulageait les inflammations et les douleurs rhumatismales (Sauvaire et al., 1996).

I.2. Description botanique

Le Fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L) aussi appelé Trigonelle ou sénégrain est une plante annuelle herbacée appartenant à la famille des légumineuses (Fabacées). Elle peut atteindre 40 à 60 cm de hauteur. Il produit des gousses longues et minces qui renferment jusqu'à deux dizaines de minuscules graines (Volpé et al., 2009), (figure 1).

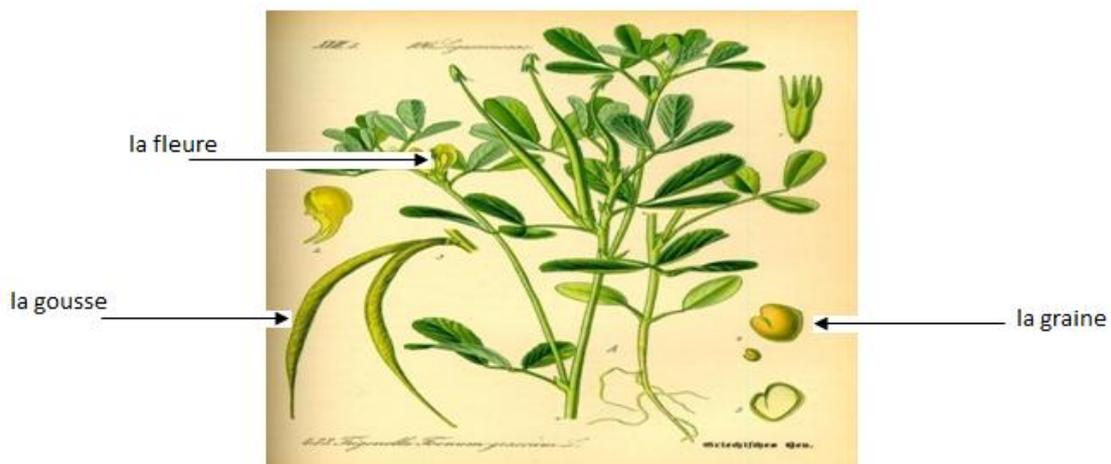


Figure 1 : Photographie de *Trigonella foenum-graecum* L. (Volpé et al., 2009) .

Les graines de Fenugrec sont en forme d'un disque, constituées d'un embryon jaune central entouré d'une couche cornée et relativement importante de blanc, 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 et al., 2011) (figure 2).

La plante toute entière dégage une odeur épicée caractéristique.



Figure 2 : Les graines de *Trigonella foenum-graecum* L.

I.3. Classification de fenugrec

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

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Genre	<i>Trigonella</i>
Espèce	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L

I.4. Compositions chimiques de fenugrec

Le fenugrec est une plante d'une grande qualité nutritive. Les graines de fenugrec sont d'une composition hétérogène de substances variées et renferment: les alcaloïdes (trigonelline, gentianine, choline), salicylés, des polyphenols (flavonoïdes) (Ahmadiani, 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).

I.5. Propriétés du fenugrec

Le Fenugrec possède plusieurs propriétés thérapeutiques parmi lesquelles :

I.5.1. Propriétés antioxydantes

Le fenugrec contient des composés phénoliques et flavonoïdes qui aident à améliorer sa capacité antioxydante. Cette propriété pourrait être utile en empêchant ou en ralentissant le progrès des certaines maladies en raison de l'effort oxydant (Priya *et al.*, 2011), et aussi pour retarder l'oxydation des lipides dans une variété des produits alimentaires (Madhava *et al.*, 2011).

I.5.2. Propriétés anti-inflammatoires et hepatoprotective

Le fenugrec a démontré, lors de recherches *in vitro*, des capacités anti-inflammatoires et hepatoprotective. Les graines de *Trigonella foenum-graecum* L. agissent comme un agent protecteur contre les anomalies induites dans le foie (Oner *et al.*, 2008). De plus, ses graines sont utilisées pour soulager les inflammations, les rhumatismes, les muscles endoloris (Yacoubi *et al.*, 2011).

I.5.3. Propriétés antimicrobiennes

Les graines de Fenugrec ont des propriétés antimicrobiennes avec un large spectre d'action. Elles agissent contre les bactéries. 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.5.4. Propriétés anti-tumorales

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*, 2011).

I.5.6. Propriétés anti-cancérigènes

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.

I.5.7. Propriétés hypocholestérolémiantes

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**).

I.5.8. Propriétés hypoglycémiantes

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**).

I.6. Autres propriétés du Fenugrec

- **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 et al., 2010**).

- **Le Fenugrec est un galactagogue** : 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.

I.7. Les 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**).

Chapitre II

Le stress oxydant et l'activité antioxydante

II.1. Les radicaux libres

II.1.1. 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.

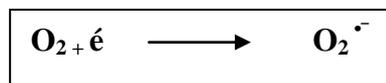
II.1.2. Les espèces réactives de l'oxygène

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 réactifs non radicalaires (oxygène singulet, peroxyde d'hydrogène, hydroperoxyde), (**Bartosz, 2003 ;Halliwell et Whiteman, 2004**) (Tableau I).

Les principales espèces réactives d'oxygène :

- **L'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$**

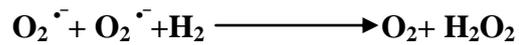
L'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ est un dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réaction conduisant à la production de molécule très nocives. En présence d'une quantité d'énergie suffisante avec la molécule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



- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

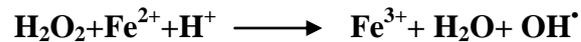
Le radical peroxyde est considéré comme une espèce réactive dérivée d'oxygène (ERO).

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est le résultat d'une réaction entre deux anions super oxyde (Gardes-Albert et al., 2003; Parent et al., 2008).



- Le radical hydroxyle (OH[•])

C'est le produit de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec les ions métalliques (exemple : Fe⁺²) (Pastre et Priymenko, 2007).



Les radicaux hydroxyles jouent un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique (milane, 2004) et attaquent tous les matériaux biologiques (ADN, protéines, lipides...etc).

- L'oxygène singulet (¹O₂)

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) selon la réaction suivante :

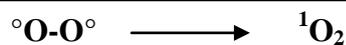


Tableau I: Les différents radicaux libres et leurs dérivés .

Nom	Symbole
Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroxyl	OH^{\cdot}
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Hydroperoxyde	$ROOH$
Oxygène singulet	1O_2

II.1.3. Production des radicaux libres

Pour passer de l'O₂ à l'eau il y a utilisation de 4 e⁻ venant de la chaîne respiratoire. Les formes radicalaires sont les intermédiaires dans cette transition. Les espèces réactionnelles de l'O₂ ne sont pas indépendantes les unes des autres, elles agissent en cascade. (Goudablet Favier, 1997)(Figure 3).

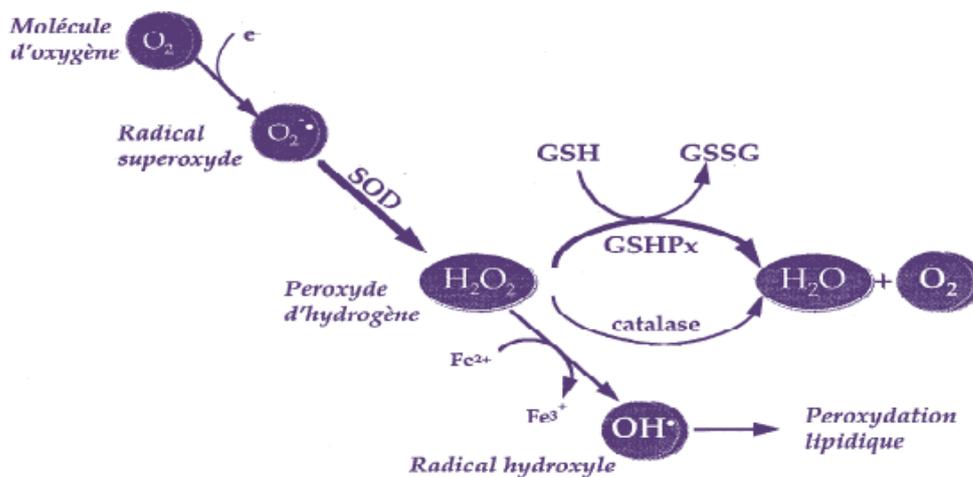


Figure 3: Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène

II.1.4. Origines des radicaux libres

Selon **Favier (2003)**, on distingue deux origines pour la génération des radicaux libres (endogène et exogène) :

II.1.4.1. Origine endogène

Les systèmes biologiques les plus simples générant des ERO sont les constituants cellulaires solubles capables d'activer l'oxygène moléculaire lors des réactions d'auto oxydation. Mais la production des ERO dans les cellules mammifères est essentiellement d'origine enzymatique.

II.1.4.2. Origine exogène

Il existe plusieurs source exogène 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 ionisantes 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.

II.1.5 Les cibles de radicaux libres

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

II.1.5.1. L'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 ; moussard, 2006**).

II.1.5.2. Les protéines

Les acides aminés des protéines sont la principale cible des ERO, cette action se situe essentiellement :

- au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydation
- au niveau de la liaison peptidique, en entraînant la fragmentation de la chaîne (**Saison et al., 2012 ; moussard, 2006**).

II.1.5.3. Les 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 ; moussard, 2006).

II.2. Le stress oxydatif

II.2.1. Définition

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de la capacité du corps 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).

II.2.2. Conséquences du stress oxydatif

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 et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides.

Le stress oxydant cause plusieurs maladies : cancer, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigüe, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, le diabète, les maladies cardiovasculaires, maladie d'Alzheimer (Favier, 2003).

II.3. Activité antioxydante

De nombreuses espèces oxydantes sont produites et bien qu'elles soient souvent indispensables à l'organisme, elles ne sont pas moins responsables de dégâts importants.

Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défense que l'on qualifie d'antioxydants. Mais bien que le terme «antioxydant »soit fréquemment utilisé, il est difficilement définissable car il couvre un large nombre de molécules et des domaines très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

II.3.1 .Définition

Un antioxydant est toute substance capable de retarder ou de prévenir l'oxydation des substrats (**Halliwell et Gutteridge, 1999**). Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine.

Certains antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres telles les vitamines et polyphénols, doivent être apportés par notre alimentation (**Pincemail et Defraigne, 2004**).

II.3.2. Classification des antioxydants

Selon (**Milane, 2004**), les antioxydants sont classés en :

II.3.2.1. les antioxydants endogènes

ce sont des agents réducteurs ou des enzymes qui participent à :

- **Un système de défense primaire**

Composés d'enzymes et de substances oxydantes (la catalase, superoxyde dismutase (SOD), et glutathion peroxydase (GP_x).

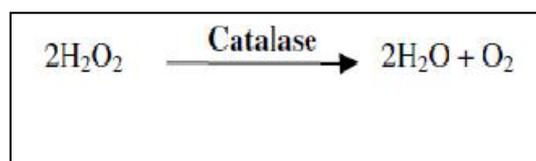
- **Un système de défense secondaire**

Composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipases, ADN endonucléases et ligase.

A.1. exemples d'antioxydants endogènes

1.1. La catalase

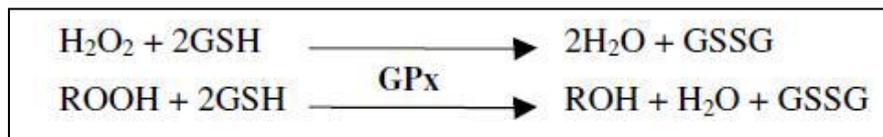
La catalase est une enzyme qui réduit le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , en libérant de l'oxygène et de l'eau. Elle est localisée surtout dans les peroxysomes. (**Lindau-Sehpard et Shaffer, 1993**).



1.2. Les glutathions peroxydases et réductases (GSHPX)

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools.

Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) (**Théron et Denis, 2005**).



II.3.2.2. Les antioxydants exogènes

L'organisme possède une seconde ligne de défense, ce sont des composés apportés par l'alimentation dont le but est de neutraliser les effets toxiques des ERO. Parmi ces substances, on connaît notamment le bêta-carotène, l'acide urique, les composés phénoliques (flavonoïdes), l'acide ascorbique, la vitamine E, les caroténoïdes.

B.1. Exemples d'antioxydants exogènes

1.1. La vitamine E (α -tocophérol)

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature. Elle intervient directement au niveau des membranes biologiques où elle piège les radicaux libres avant qu'ils n'atteignent leurs cibles (**Goussard, 1999**). La vitamine E étant liposoluble (Figure 4), elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres en empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (**Packer et al, 2001**).

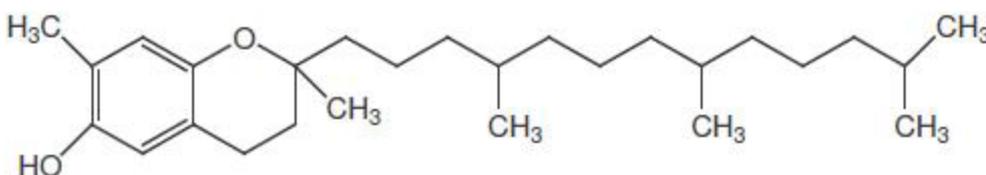


Figure 4 : Structure de la vitamine E

1.2. La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique est l'antioxydant hydrosoluble majeur (figure 5). Elle se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\bullet-}$ et l' OH^{\bullet} . Elle peut aussi réduire le radical et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Barus, 2008).

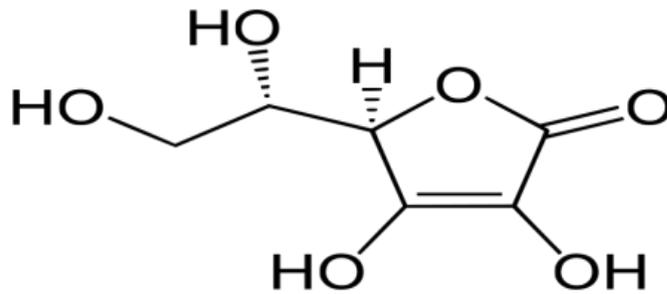


Figure 5 : Structure de la vitamine C

1.3. Les polyphénols

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).

Chapitre III

Les polyphénols

III.1. Généralités

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires 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**).

La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (**Macheix *et al.*, 2005**).

III.2. 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**).

III.2.1. 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 cinnamique et à leurs dérivés (acide benzoïque, coumarines).

III.2.2. 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**).

III.3. 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 :

III.3.1. Composés phénoliques simples

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**) (Figure 6).

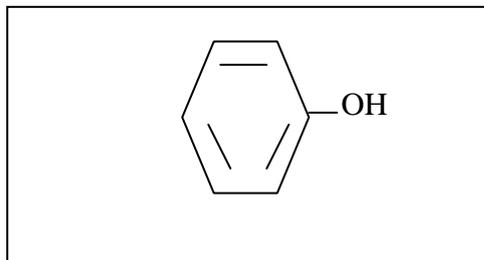
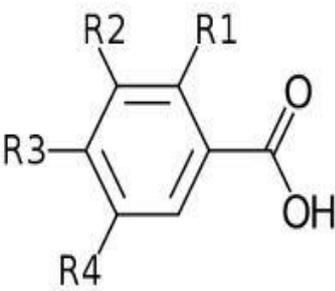


Figure 6: structure d'un phénol simple.

III.3.1.1. acides hydroxybenzoïques

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6-C1), 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 et sont représentés dans le (tableau II) (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

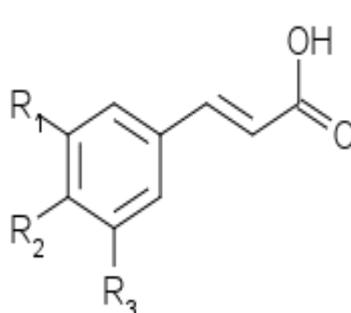
Tableau II: Principaux acides hydroxybenzoïques

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

III.3.1.2. Acides hydroxycinnamiques (phénylpropanoïdes)

Ils dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C₆-C₃), 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 Cheyner, 2006) (tableau III).

Tableau III : Principaux acides hydroxycinnamiques

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	OH	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

III.3.1.3. Les 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 C₆ reliés par une chaîne en C₃ (figure 7). Le pont à 3 carbonnes 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.

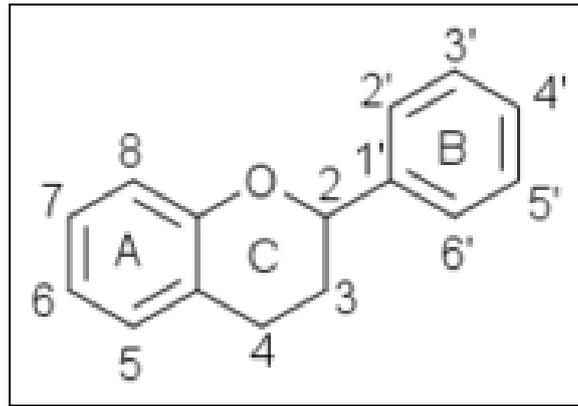


Figure 7 : structure de base des flavonoïdes

III.3.1.3.1. Classification des flavonoïdes

Selon le degré d'oxydation du squelette de base, les flavonoïdes sont ainsi divisés en différents sous-groupe (**Richter, 1993**), voir (figure 5) :

A-1. Les flavanols

Les flavanols sont caractérisés par la présence de deux groupements hydroxyles en C3-C3', d'où le nom de dihydroflavanols.

A-2. Les flavonols

Dans la plupart du temps, ils sont présents sous forme d'O-glycosides comme la quercétine, la myricétine, l'isorhamnétine.

A-3. Les flavanones

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

A-4. Les flavones

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

A-5. Les anthocyanidines

Ce sont des dérivés du 2-phénylbenzopyrylium (Milan, 2004) possèdent des fonctions phénol libres, éthers ou glycoside.

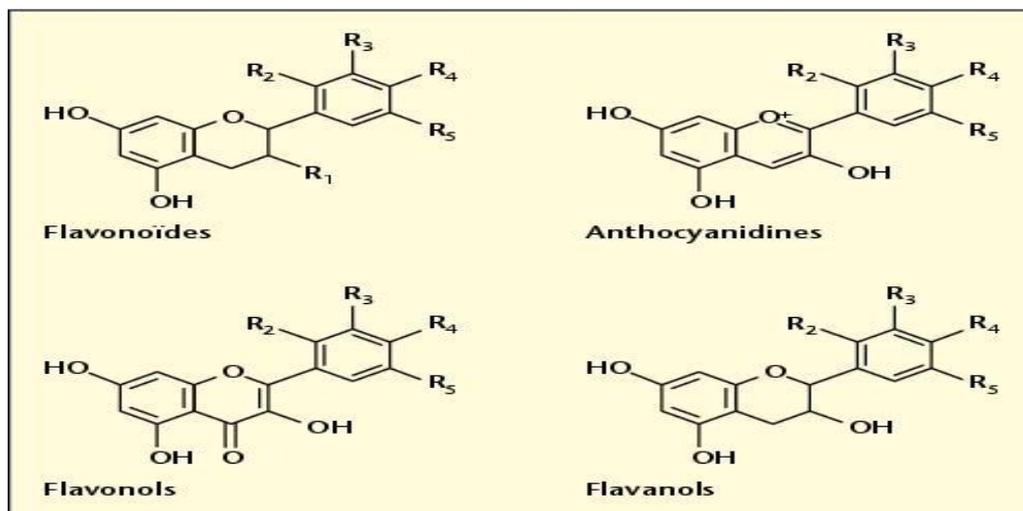


Figure 8: les différentes structures des flavonoïdes

III. 3.2. Les composés phénoliques condensés

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

III.3.2.1. 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).

III.3.2.1.1. 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 (Figure 9), (**Paris et Hurabeille, 1981**).

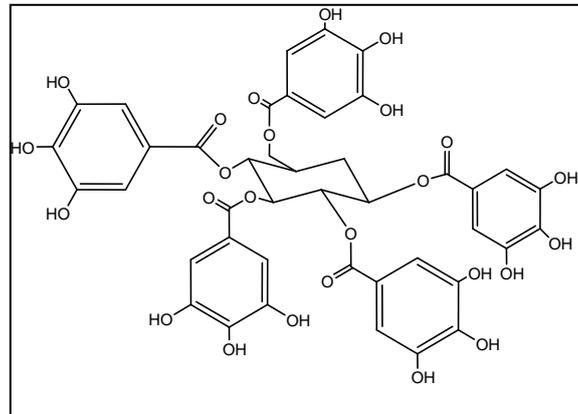


Figure 9: structure générale d'un tanin hydrolysable

III.3.2.1.2. 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 (figure 10), (**Paris et Hurabeille, 1981**).

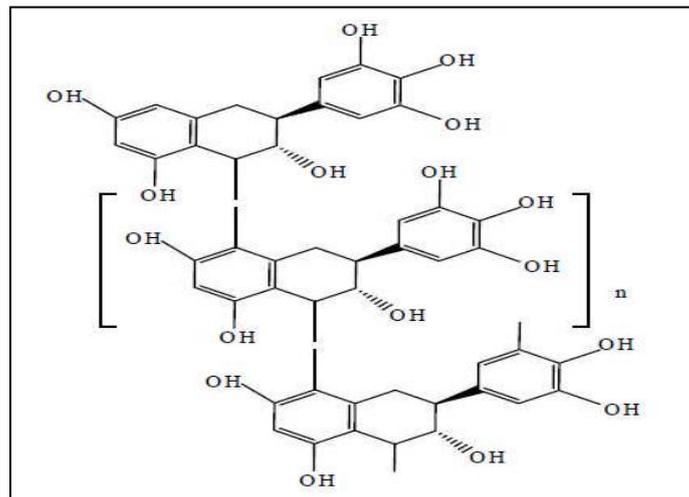


Figure 10: Structure générale d'un tanin condensé

III.3.2.1.3. Les 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).

III.4. 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 (Nitsh et Nitsh, 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 pathogenèses 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).

III.5. Propriétés biologiques des composés phénoliques

Les polyphénols possèdent plusieurs propriétés :

III.5.1. Propriétés antibactériennes des composés phénoliques

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 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**).

III.5.2. Propriétés antioxydantes des composés phénoliques

Les composés phénoliques possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de l'environnement (cigarette, polluant, infection) (**Lahouel et al., 2004; Duenas et al., 2006**). Les polyphénols réduisent le stress oxydatif des cellules nerveuses, ce qui pourrait constituer une protection contre les modifications nerveuses liées à l'âge telles que celles constatées dans la maladie d'Alzheimer (**Cieslik et al., 2006**).

Les composés phénoliques inhibent la peroxydation lipidique et l'oxydation des LDL, ainsi ils préviennent les maladies cardiovasculaires (**Blute et al., 2000; Akula et Odhav, 2008**). Ils seraient également impliqués dans la prévention de nombreux cancers (colon, poumon, peau etc...) (**Koprivnjak et Peschel, 2011**).

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants et potentiellement très puissant dans nos régimes alimentaire (**Edeas, 2007**).

Les composés phénoliques sont munis de plusieurs autres activités biologiques : ils sont antiallergiques, anti-oedémateux et anti-inflammatoires (**Landolfi et al., 1985**).

Partie pratique

Chapitre I

Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal qui a fait l'objet de ce travail est représenté par les graines de *Trigonella foenum-graecum* L., c'est une plante appartenant à la famille des Fabacées. Les graines sont achetées aux niveaux du commerce et ont été cultivées en Pakistan.

I.2. Méthodes

I.2.1. Broyage et tamisage

Les graines de Fenugrec ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. La poudre obtenue a été passée à travers un tamis de maille de 500µm et ensuite par un autre de maille de 250µm.

I.2.2. Extraction des composés phénoliques

En vue de la richesse des graines de Fenugrec par des lipides et afin de faciliter l'extraction des composés phénoliques, une délipidation à l'hexane a été réalisée. La poudre de Fenugrec est mélangé avec de l'hexane, le mélange a été agité pendant deux heures, puis filtré et la poudre a été récupéré pour l'extraction.

L'extraction consiste à obtenir un maximum de molécules phénoliques contenues dans les graines de Fenugrec en utilisant des solvants organiques. De ce fait, une extraction solide-liquide a été réalisée selon le protocole d'**Adedapo et al., 2009**. Plusieurs solvants peuvent être utilisés pour l'extraction des composés phénoliques, trois solvants purs de polarité différente sont utilisés dans cette étude : le méthanol, l'éthanol, et l'acétone. Le protocole d'extraction est résumé dans la figure 1.

Le taux d'extraction est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'extraction(\%)} = [(P_1 - P_0) / E] \times 100$$

Avec : **P₀** : poids de bécher vide en gramme ;

P₁ : poids de bécher après évaporation en gramme ;

E : poids de l'échantillon en gramme.

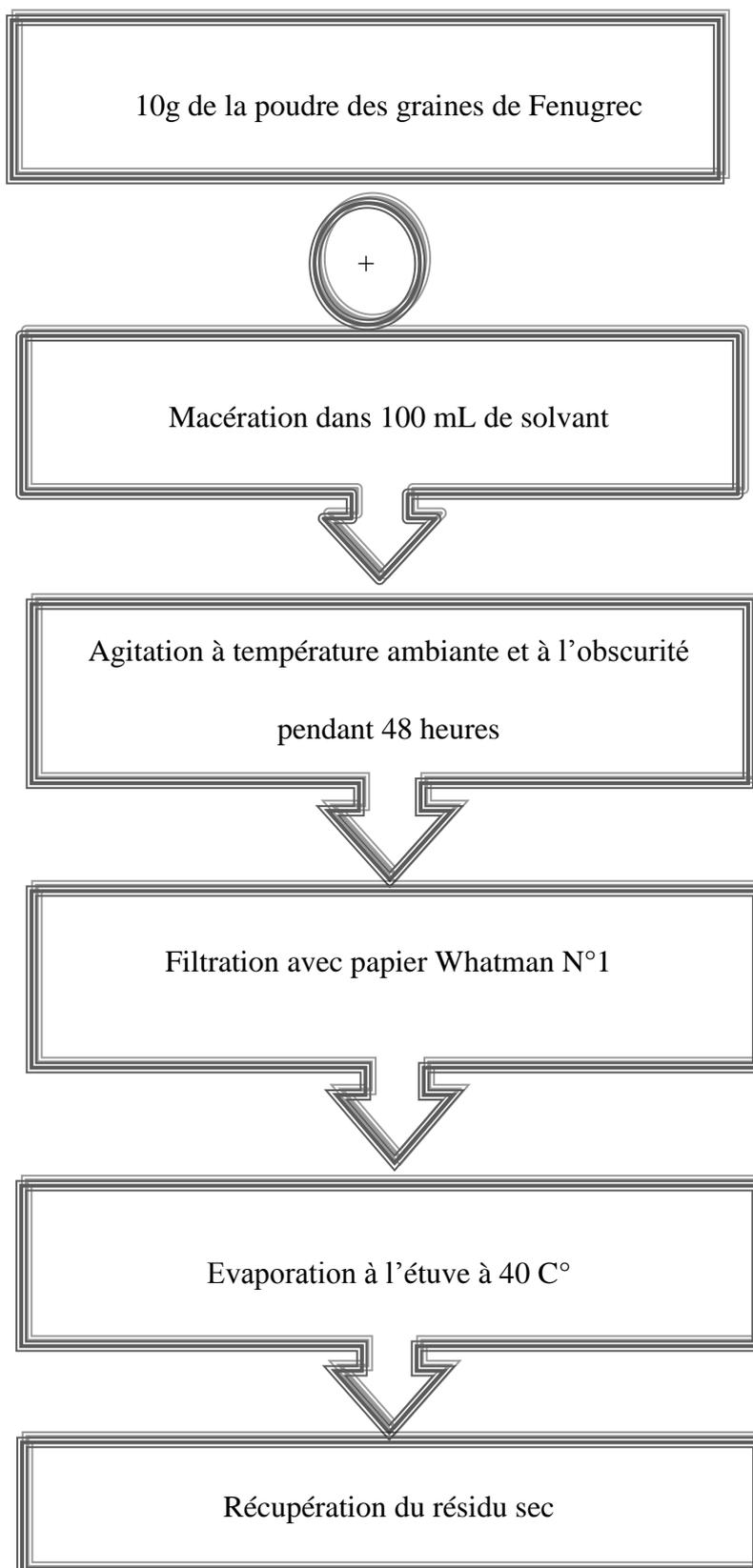


Figure 11 : Diagramme représentatif du protocole expérimental d'extraction des polyphénols (Adedapo et *al.*, 2009).

I.2.3. Dosage des composés phénoliques

I.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum* L. a été déterminée par la méthode colorimétrique décrite dès 1965 par Singleton et Rossi en utilisant le réactif Folin-ciocalteu.

a. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteux de couleur jaune, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), est réduit lors de l'oxydation des polyphénols en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdate (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration bleuâtre obtenue est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits (Boizot et Charpentier, 2006).

b. Mode opératoire

Dans ce travail, la teneur en polyphénols totaux est évaluée en utilisant le protocole décrit par Coe et al., 2013. 200µl d'extrait (1 mg /mL) a été additionné par 1,5 mL du réactif de Folin-Ciocalteux (0.1 N). Après 5 minutes, 1,5 mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2% ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 60 minutes. L'absorbance est mesurée à 725 nm contre un blanc où le volume de l'échantillon est remplacé par un volume équivalant de méthanol.

La concentration en composés phénoliques a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue par l'acide gallique comme standard (annexe 1). Les résultats sont exprimés en mg EAG/g ES.

I.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

a. Principe

Les méthodes de dosage des flavonoïdes sont le plus souvent colorimétriques, elles reposent sur la capacité de ces composés à former des complexes avec le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dont le pic d'absorption est fixé à la longueur d'onde de 430 nm (Djeridane et al., 2006).

b. Mode opératoire

La méthode utilisée dans ce travail est celle décrite par **Bahorun et al., 1996** avec quelques modifications. Un volume de 1mL de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 2% a été mélangé à un volume égal d'extrait (1mg/mL). Les absorbances ont été lues à 430 nm après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, par un spectrophotomètre contre un courbe étalon préalablement tracée avec la quercétine comme standard (**annexe 2**).

I.2.3.3. Dosage des tanins condensés**a. principe**

Le dosage des tanins condensés est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de la vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe rouge qui absorbe à 500 nm (**Schofield et al., 2001**).

b. Mode opératoire

Dans ce cas, le protocole de dosage utilisé est celui décrit par **Sun et al., 1998** : 3 mL de la vanilline (4% avec le méthanol) ont été additionnés à 0,5 mL d'extrait (1mg/mL) et 1,5 mL d'HCl, après incubation 15 minutes à température ambiante, les absorbances ont été lues à 500 nm.

Pour chaque échantillon, un blanc est préparé en remplaçant la vanilline par du méthanol pour éliminer l'absorbance de la vanilline.

I.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante**I.2.4.1. Pouvoir anti-radicalaire au DPPH****a. Principe**

Le 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre coloré capable d'arracher les atomes d'hydrogène labiles des groupements OH les plus réactifs. En présence d'un antioxydant, le DPPH est réduit en (DPPH-H) (**Saadaoui et al., 2006**). Cette réaction conduit à un changement de couleur du violet au jaune et l'absorbance diminue (**Coa et al., 2009**).

b. Mode opératoire

Le protocole expérimental utilisé est celui décrit par **Hemalatha et al., 2010** : 1 mL de solution de DPPH (0,1 mM) est ajouté à 3 mL de solution de l'extrait à différentes concentrations, après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, les absorbances ont été lues à 517 nm contre un blanc de méthanol. Les résultats sont portés par rapport à des antioxydants de référence, comme l'acide ascorbique et le BHA à titre comparatif.

L'activité scavenging du radical DPPH est définie comme étant le pourcentage d'inhibition de DPPH par rapport aux concentrations d'extraits de graines de Funegrec et exprimée selon la formule suivante :

$$\text{Activité scavenging au DPPH}(\%) = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

I.2.4.2. Evaluation du pouvoir reducteur

A. Méthode de réduction de fer ferrique en fer ferreux

a. Principe

Le pouvoir reducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). L'augmentation de l'absorbance de l'extrait indique une augmentation de son pouvoir reducteur (**Bougatef et al., 2009**).

b. Mode opératoire

Selon **Ebrahimzadeh et al., 2008**, 0,5 mL d'extrait à des concentrations différentes est mélangé avec 1 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 1 mL de ferricyanure de potassium (1%), le mélange a été incubé à 50°C pendant 25 minutes. Ensuite 1 mL d'acide trichloroacétique (10%) est ajouté, le mélange a été centrifugé à 3000 t/min pendant 10 minutes. 1 mL de surnageant est mélangé à un 1 mL d'eau distillée et 200 µL de chlorure ferrique, après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les absorbances ont été lues à 700 nm. Le test a été effectué contre une courbe d'étalonnage tracée avec la BHA comme standard.

B. Test de phosphomolybdate d'ammonium

a. Principe

Le test au phosphomolybdate d'ammonium est basé sur la réduction du molybdate VI (Mo^{+6}) en molybdate V (Mo^{+5}) et la formation d'un complexe phosphate/ Mo^{+5} de couleur verte dans un milieu acide (Bougatef et al., 2009).

b. Mode opératoire

Le test de réduction de phosphomolybdate d'ammonium pour les extraits a été réalisé selon le protocole décrit par El sayed saleh ,2008 avec quelques modifications ; 2mL de réactif de molybdate (acide sulfurique à 0,6 M ; phosphate de sodium 28 mM ; molybdate d'ammonium à 4 mM) ont été ajoutés à un volume de solution d'extrait à différentes concentrations, après 90 minutes d'incubation à 95°C, les absorbances ont été lues à 695 nm. Ce test a été effectué contre l'acide gallique et la quercétine comme témoins de référence. Les pourcentages d'inhibition sont calculés avec la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_s - A_c) / A_s] \times 100$$

Où:

A_c : absorbance du contrôle à 695 nm.

A_s : absorbance de l'échantillon à 695nm.

I.2.5. Séparation par chromatographie sur couches minces des extraits de graines de *Trigonella foenum-graecum* L.

a. Principe

La chromatographie sur couche mince repose principalement sur des phénomènes d'adsorption, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvant, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (Caude et Jardy, 1996). La distance de migration des composés est ensuite mesurée et comparée à celle du front de la phase mobile, ceci permet de définir la référence frontale (R_f) caractéristique de chaque composé.

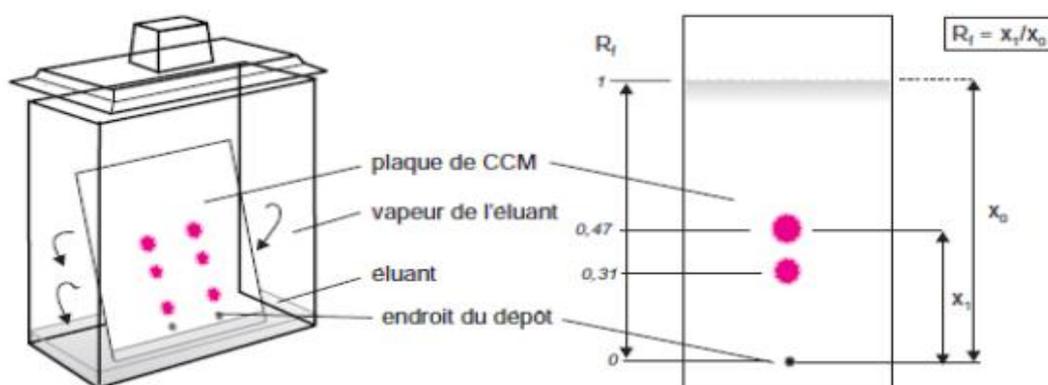


Figure 12 : Chambre de développement à cuve verticale et plaque CCM (Rouessac, 2004)

b. Mode opératoire

- **préparation de la phase stationnaire**

la chromatographie a été réalisée sur des feuilles en aluminium et des plaques en verre, ces dernière ont été recouvertes d'une couche fine de silice à une épaisseur de 0,5 mm. Les plaques ont été séchées à l'air libre puis réactivées à 110 C° pendant 30 minutes.

- **préparation de la phase mobile**

La chromatographie s'opère dans une cuve dont l'atmosphère est saturé aussi complètement que possible par le solvant utilisé dans le développement (Bobbitt *et al.*, 1972), c'est pour cela qu'il faut placer la phase mobile avant de mettre les plaques dans la cuve.

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques, pour cela différents systèmes ont été testés pour définir ce qui donne une meilleure séparation des composés.

Tableau IV: Les différents systèmes de migrations (phase mobile) utilisés dans l'étude chromatographique :

Références	Système de migration	Proportion (mL)
Slimani et Teblache, 2009	<ul style="list-style-type: none"> - Butanol - Acide acétique - Eau 	<ul style="list-style-type: none"> - 40 - 10 - 50
Mellaz, 2009	<ul style="list-style-type: none"> - Acétate d'éthyle - Acide formique - Acide acétique - Eau 	<ul style="list-style-type: none"> - 100 - 11 - 11 - 26
Males et al, 1998	<ul style="list-style-type: none"> - Acétate d'éthyle - Methanol - Eau 	<ul style="list-style-type: none"> - 27 - 4,5 - 14
Adrar, 2009	<ul style="list-style-type: none"> - Toluène - Acétone - Acide formique 	<ul style="list-style-type: none"> - 60 - 60 - 10

- **Développement des plaques**

Les plaques de silice ont été tracées par deux lignes limitant la distance de migration des extraits, ces derniers ont été déposés sous forme de spots de volume égal à 5µL par dépôt, les standards ont aussi été déposés de la même façon.

Après le dépôt des échantillons, la plaque est placée en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve saturée par les vapeurs du système solvant approprié, le niveau de solvant ne doit pas atteindre les spots d'échantillon (**Sine, 2003**).

La migration des molécules dépend des interactions entre la phase mobile et la phase stationnaire et dépend également du coefficient de partage et d'adsorption de chaque molécule.

- **Révélation par des méthodes chimiques**

Ces méthodes consistent à mettre en contact de la plaque, un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler (**Latifou, 2005**). Dans cette étude, la révélation est réalisée par la vanilline sulfurique. Cette caractérisation est accompagnée ensuite par le calcul des rapports frontaux (R_f) de chaque tache correspondant aux extraits et standards selon la formule suivante : (**Mahuzier et Hamon, 1978**).

$$R_f = dx/ds$$

Où :

dx : la distance parcourue par l'analyte.

ds : la distance parcourue par le solvant.

Resultats et discussion

II.1. Taux d'extraction

L'objectif de l'étape d'extraction des composés phénoliques à partir des végétaux est de libérer ces composés des vacuoles où ils se trouvent (Robards et Antolovich, 1997).

L'efficacité de l'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale dépend de la méthode d'extraction, de la granulométrie de la poudre utilisée et du temps de macération (Naczk et Shahidi, 2004 ; Rodriguez-Meizoso et al., 2006). Les solvants organiques sont les plus fréquemment utilisés pour extraire les composés phénoliques à partir de sources végétales différentes. La solubilité des composés phénoliques dépend de la polarité du solvant utilisé (Naczk et Shahidi, 2004).

Dans la présente étude, la méthode d'extraction solide-liquide en utilisant trois solvants à polarité différentes nous a permis d'obtenir les taux d'extraction des polyphénols à partir des feuilles de *Trigonella foenum-graecum* L. résumés dans le tableau V.

Tableau V: Les taux d'extraction avec différents solvants

Solvants	Taux d'extraction (%)
Méthanol	8,41
Ethanol	4,64
Acétone	1,26

Les résultats obtenus montrent que le meilleur taux a été obtenu par le méthanol. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux rapportés par **Birjees-Bukhari et al., (2008)** qui ont signalé des taux de l'ordre de (25,89%) pour la fraction méthanolique, (25,32%) pour la fraction éthanolique et de (17,65%) pour la fraction acétonique. Cette variation est probablement due à la différence de polarité existante entre les solvants utilisés et la méthode d'extraction (**Naczk et Shahidi, 2006**).

II.2. Teneur en composés phénoliques

II.2.1. Teneur en polyphénols totaux

Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses et peu solubles dans les solvants organiques apolaires (**Bruneton, 1999**).

Lors du dosage des polyphénols totaux et suite à l'addition du réactif de Folin-Ciocalteu, il y a eu apparition d'une coloration bleue relativement proportionnelle au taux des composés phénoliques avec une absorption maximale à 725 nm (**Ribéreau- Gayon, 1968**).

La teneur en composés phénoliques des différents extraits de graines de *Trigonella foenum-graecum* L. a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Annex 1), et les résultats sont exprimés en mg EAG/g d'extrait sec(ES). Ces résultats sont représentés dans la figure ci-dessous :

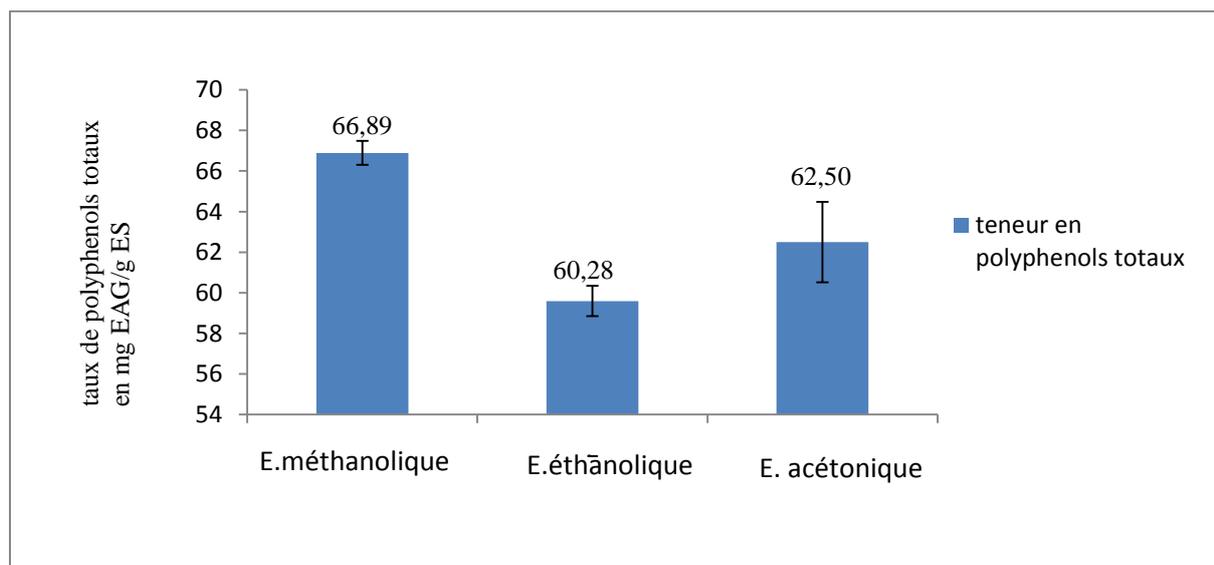


Figure 13: Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum* L.

Les résultats obtenus montrent que la teneur en polyphénols totaux la plus élevée est observée dans l'extrait méthanolique avec une valeur de $66,89 \pm 0,58$ mg d'EAG/g d'extrait sec (ES). Par contre l'extrait éthanolique présente une teneur ne dépassant pas $60,28 \pm 0,74$ mg d'EAG/g ES. Ces résultats sont quasiment similaires à ceux obtenus par **Madhavanaidu et al., 2011** avec 85,88 mg EAG /g ES, de même pour les travaux de **Belguith-Hadriche et al., 2013** qui ont rapporté une teneur presque identique avec 78,1 mg EAG/g ES. Cependant, selon les résultats de **Birjees-Bukhari et al., 2008**, la teneur en polyphenols semble être plus faible comparée à nos résultats et qui est de 5,75 ; 6,85 ; 4,04 mg EAG/g ES pour les extraits méthanolique, éthanolique, et acétonique respectivement.

Cette variation de la quantité en polyphénols peut s'expliquer par la variété, les conditions de séchage ou de stockage, par la méthode et la nature du solvant d'extraction, ainsi que par les conditions d'extraction (temps, température).

II.2.2. Teneurs en flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus hétérogène des composés phénoliques, dont certains sont solubles dans les solvants polaires, tandis que d'autres sont solubles dans les solvants apolaires (**Macheix et al., 2005**).

Une couleur jaunâtre est observée après addition de la solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à nos extraits et dont l'intensité varie en fonction de la concentration de l'extrait en flavonoïdes. Cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les flavonoïdes. Les résultats obtenus en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine (Annexe 2) sont représentées dans la figure ci-dessous :

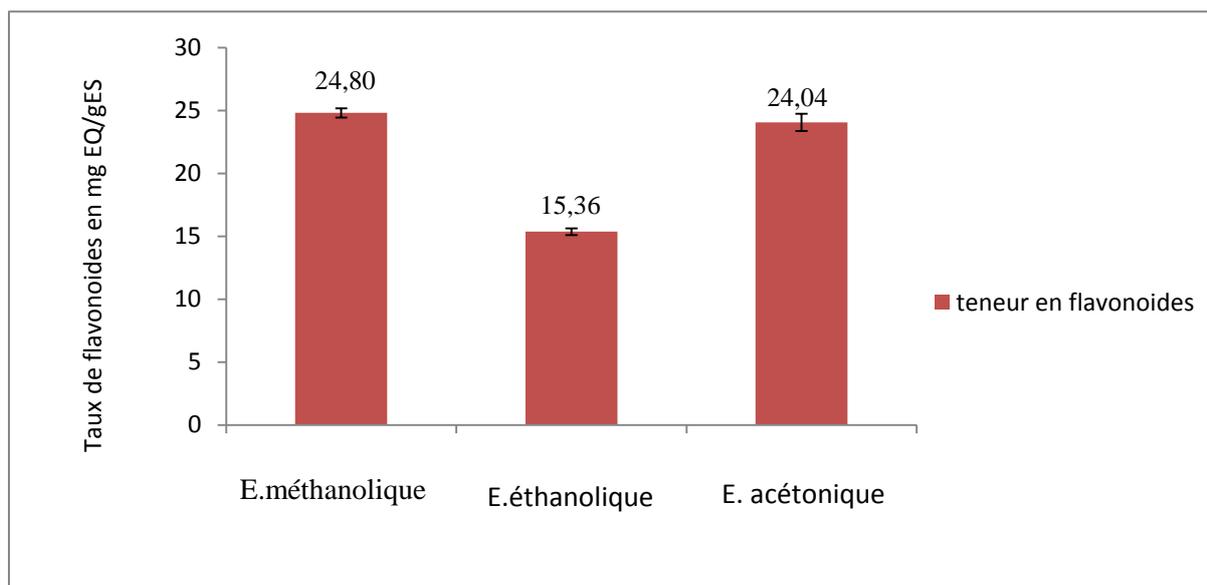


Figure 14 : Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum* L.

D'après ces résultats obtenus, la teneur en flavonoïdes dans l'extrait méthanolique et acétonique semble être quasiment identique, correspondant à une valeur de $24,80 \pm 0,37$ et $24,04 \pm 0,68$ mg EQ/g ES respectivement, suivi par l'extrait éthanolique avec une valeur de $15,36 \pm 0,27$ mg EQ/g ES. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par **Belguith-Hadriche et al., 2013** qui ont montré une teneur de l'ordre de 20,8 mg EQ/g d'extrait. En effet, ces teneurs citées sont très élevées comparées à celles obtenues par **Birjees-Bukhari et al., 2008** qui sont de 0,6 ; 0,65 et 0,41 pour les extraits méthanolique, éthanolique et acétonique respectivement.

De plus, ce travail a montré que le méthanol et l'acétone pourraient être les meilleurs solvants pour l'extraction des polyphénols totaux et les flavonoïdes.

II.2.3. Teneurs en pro-anthocyanidine

Les résultats du dosage des pro-anthocyanidine à partir des graines de *Trigonella foenum-graecum* L, exprimés en mg équivalent catéchine/g d'extrait, sont représentés dans la figure suivante :

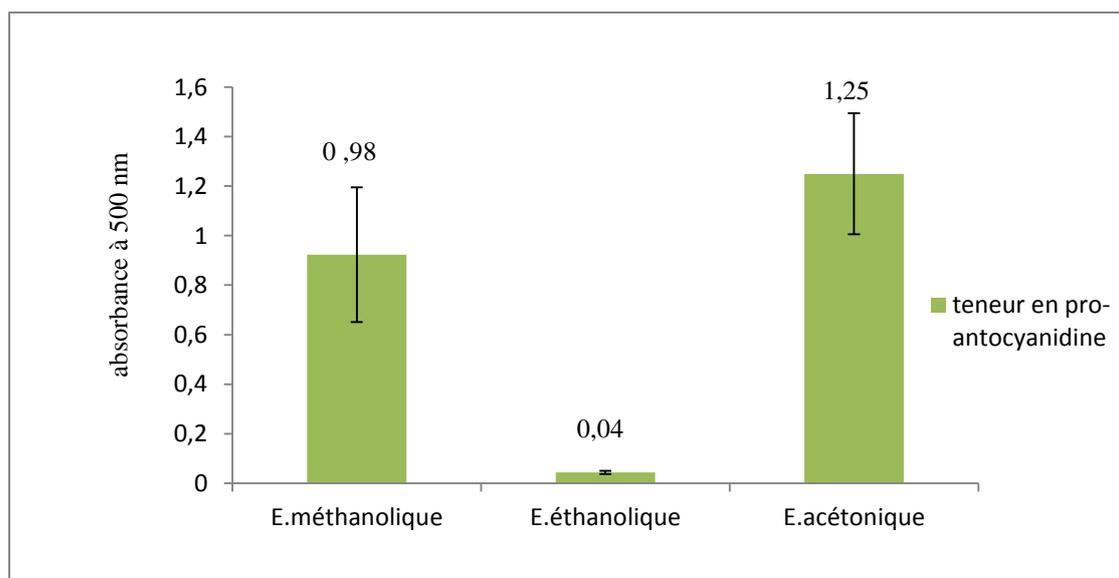


Figure 15 : Teneurs en pro-antocyanidine dans les extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum* L

D'après ce résultat, il s'avère que cette plante est pratiquement pauvre en pro-antocyanidine, la teneur la plus élevée a été signalée par l'extrait d'acétone avec seulement $1,25 \pm 0,27$ mg équivalent catéchine/g ES. De plus, l'extrait éthanolique a montré une portion plus faible et inférieure à celle retrouvée dans les autres extraits qui est de $0,04 \pm 0,006$ mg équivalent catéchine/g ES. En effet, le meilleur solvant pour l'extraction des pro-antocyanidines est l'acétone.

II.3. Activité antioxydante des extraits phénoliques des graines de *Trigonella foenum-graecum* L.

Différentes méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante, entre autre le test DPPH, le pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium, et le test de phosphomolybdate d'ammonium.

II.3.1. Activité anti-radicalaire (DPPH)

Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un radical libre qui est le DPPH (2,2 diphenyl 1-picrylhydrazyl), ce dernier est de couleur violette. En présence de donneurs de protons (antioxydants), le DPPH vire au jaune et se réduit alors en DPPH-H (2,2 diphényl 1 picrylhydrazine). (Maataoui *et al.*, 2006).

Les résultats du test DPPH peuvent être exprimés en termes de valeurs d'IC₅₀. Selon Andrade *et al.*, 2009, le IC₅₀ est défini comme la concentration de l'extrait nécessaire pour

inhiber 50% du radical DPPH. Une faible IC_{50} correspond à une forte capacité réductrice (Chang *et al.*, 2007). Les résultats du test antiradicalaire sont représentés dans la figure suivante :

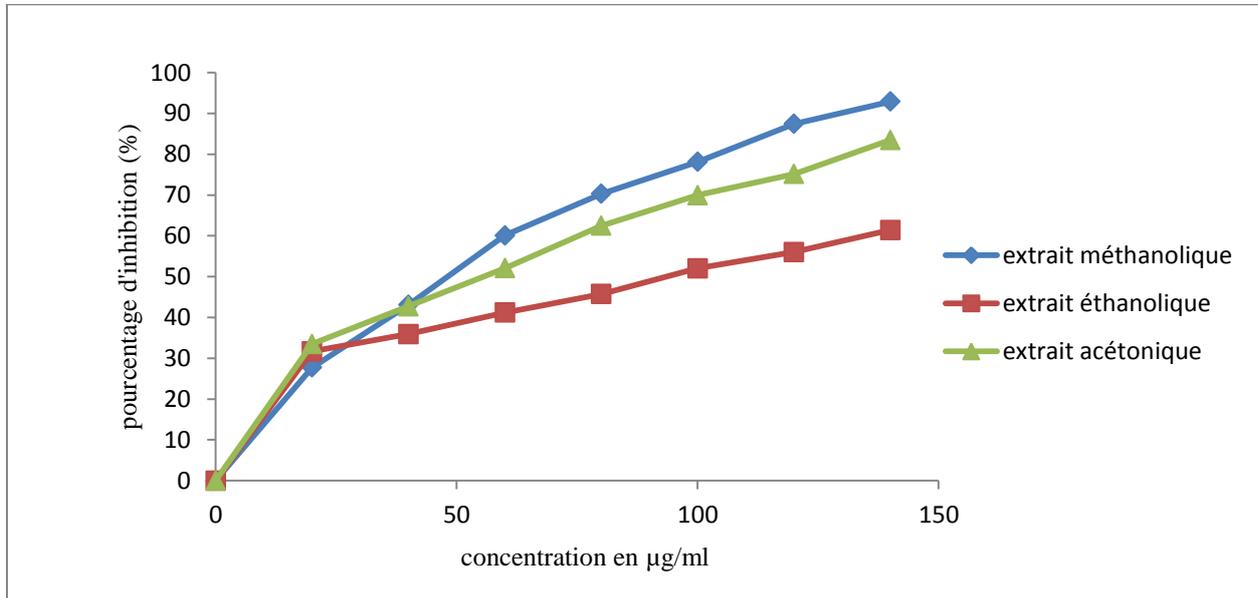


Figure 16 : Pouvoir anti radicalaire des extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum* L. à différentes concentrations.

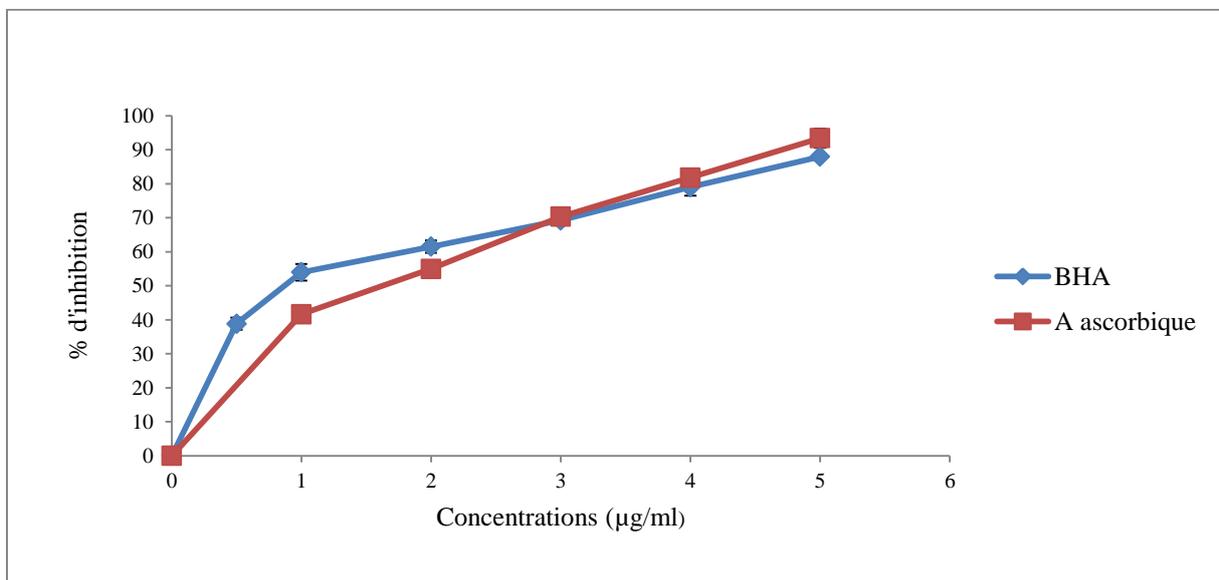


Figure 17 : Activité anti radicalaire des standards (BHA et Acide ascorbique à différentes concentrations)

Tableau VI : Les valeurs d'IC₅₀ des extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum* L. et les standards (Ac.ascorbique, BHA) de l'activité scavenging du DPPH

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait méthanolique	46,63
Extrait éthanolique	85,42
Extrait acétonique	54,28
Acide ascorbique	1,61
BHA	10,38

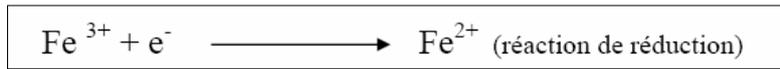
Selon la figure, nous constatons que les extraits méthanolique et acétonique ont dévoilé une forte activité scavenging du radical DPPH, avec des pourcentages de 92,93% et 83,47% respectivement en comparaison avec les standards utilisés (BHA et acide ascorbique) qui ont donné des pourcentages d'inhibition de 97,01% et 96,02% respectivement. Par contre l'extrait éthanolique a montré une faible activité antiradicalaire par rapport aux autres extraits avec un pourcentage d'inhibition de 61,43% en comparaison avec les standards utilisés. Ces résultats sont en étroite accord avec les études réalisées par **Madhava Naidu, 2011**, lequel a rapporté un pourcentage d'inhibition pour l'extrait méthanolique équivalent à 70%, il en est de même pour les travaux de **Yacoubi et al., (2011)** qui ont abouti à des résultats similaires correspondant à 74,71% pour l'extrait acétonique.

Par ailleurs, il est à constater que l'extrait méthanolique possède une activité antiradicalaire la plus élevée avec un IC₅₀ de 46,63µg/mL, étant donné qu'il est le précurseur, donc englobe la totalité des composés phénoliques, suivi de près par l'extrait acétonique avec IC₅₀ de 54,28µg/mL puisqu'il renferme les teneurs en flavonoïdes et en pro-anthocyanidine les plus élevés, sachant que ces derniers constituent de puissants antioxydants (**Iris et al., 1999**). En effet, contrairement aux deux extraits cités, l'extrait éthanolique est avec un pouvoir antiradicalaire le moins fort avec une IC₅₀ de 85,42µg/mL, ces valeurs sont supérieures à celle obtenus par les standards utilisés (Ac.ascorbique et la BHA) qui sont de 1,61 et 0,98 µg/ml respectivement.

Il est aussi important de noter que l'activité scavenging du radical DPPH dépend de la concentration des extraits, et plus la concentration est élevée plus le pourcentage d'inhibition augmente.

II.3.2. Pouvoir réducteur de fer ferrique en fer ferreux

Le pouvoir réducteur est la capacité d'un extrait à donner un électron et à réduire le fer ferrique en fer ferreux. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son pouvoir antioxydant (Huang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009).



La couleur jaune de la solution de ferricyanure de potassium vire vers une couleur bleue verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque extrait.

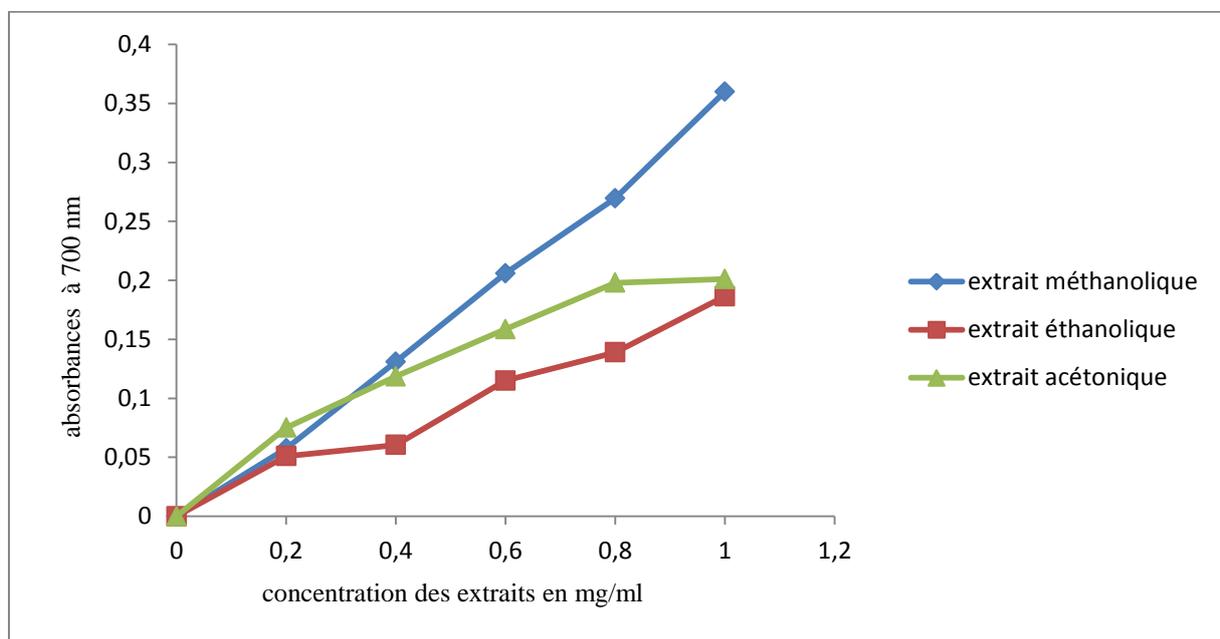


Figure 18 : Pouvoir réducteur de fer ferrique des extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum* L.

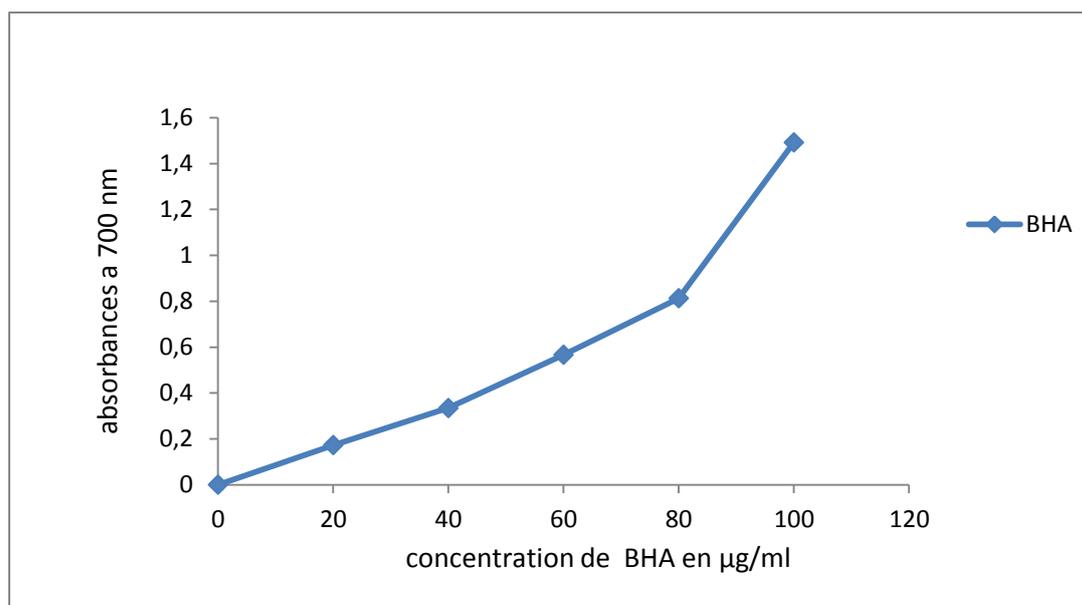


Figure 19 : Pouvoir réducteur de fer ferrique de standard (BHA)

Les courbes obtenues (figure 18) indiquent que l'absorbance augmente au fur et à mesure que la concentration en extrait s'élève. Plusieurs études, ont confirmé que le pouvoir réducteur est proportionnel avec l'augmentation des concentrations (**Moreira et al., 2010**). Ces résultats peuvent être expliqués par la présence de composés donneurs d'électrons qui entraînent la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} . Plus la concentration des extraits augmente plus il y a apport d'antioxydants et par conséquent, le pouvoir réducteur augmente.

D'après ce résultat, l'extrait méthanolique possède le plus grand pouvoir réducteur, suivi de l'extrait acétonique, puis éthanolique. Ces trois extraits présentent un pouvoir réducteur inférieur à celui de la BHA.

Les écarts entre les résultats sont remarquables et pourraient être dus à la quantité des antioxydants contenues dans chaque extrait, ou au solvant.

Il est important de noter que l'extrait méthanolique qui a montré le plus grand pouvoir réducteur pourrait avoir la quantité la plus élevée en composés phénoliques. Contrairement aux résultats obtenus par **Birjees-Bukhari , 2009** signalant que l'extrait éthanolique donne une forte activité réductrice.

Par ailleurs, **Saheedeh et al., 2007** ont rapporté qu'il existe une relation entre l'activité réductrice de l'ion Fe^{3+} et la teneur en polyphénols totaux.

II.3.3 Pouvoir réducteur de phosphomolybdate d'ammonium

La méthode du phosphomolybdate d'ammonium est basée sur la réduction du molybdate Mo^{+6} en Mo^{+5} par des antioxydants (Abdel-Hameed, 2009; Ghafour et al., 2010). Les résultats du test du pouvoir réducteur par le molybdate d'ammonium sont présentés dans la figure suivante :

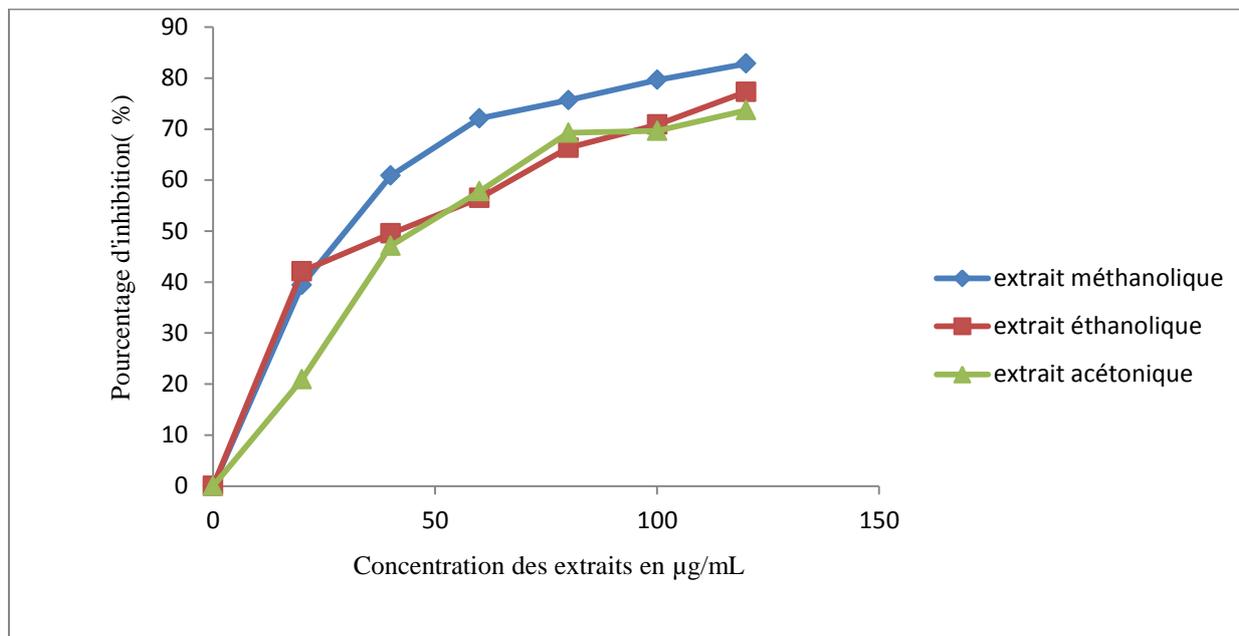


Figure 20 : Pouvoir réducteur de molybdate d'ammonium des extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum* L.

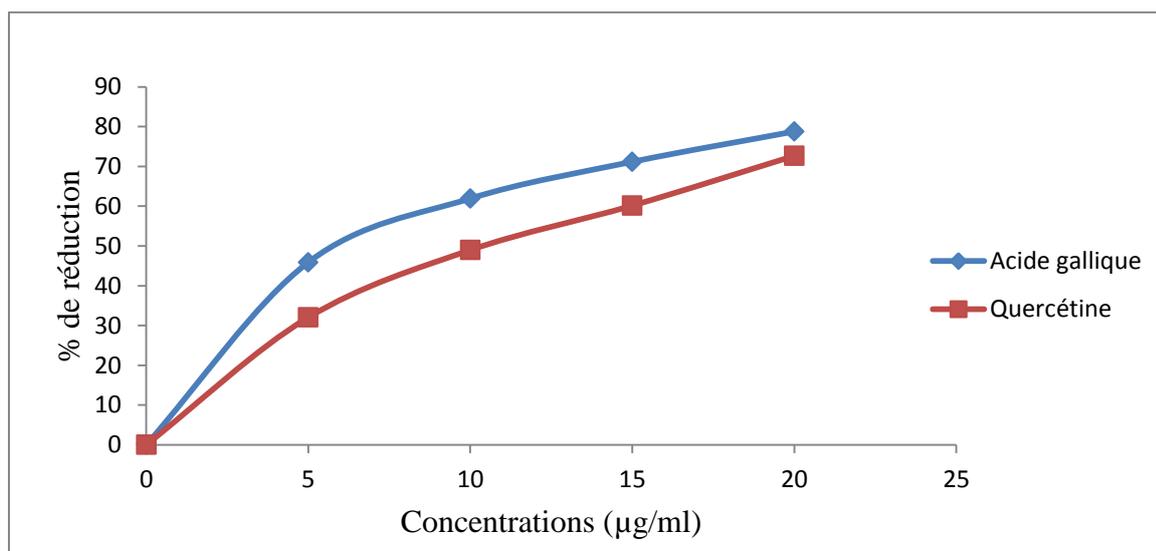


Figure 21 : Pouvoir réducteur de phosphomolybdate d'ammonium des standards (ac. gallique et la quercétine)

Tableau VII : Les valeurs d'IC₅₀ des extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum* L. et les standards (Ac.ascorbique, BHA) de l'activité scavenging du DPPH

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait méthanolique	28,26
Extrait éthanolique	40,4
Extrait acétonique	45,5
Acide gallique	6,22
quercétine	10,38

D'après la figure 20 et le tableau VII, l'extrait méthanolique possède le plus grand pouvoir réducteur avec un IC₅₀ de 28,26 µg/ml, suivie de l'extrait éthanolique avec un IC₅₀ de 40,4 µg/ml, puis l'extrait acétonique avec un IC₅₀ de 45,5 µg/ml, ces valeurs sont supérieures à celle obtenus par les standards utilisés (Ac.gallique et la quercétine) qui sont de 6,22 et 10,38 µg/ml respectivement.

Ces différences pourraient être due à l'interaction des différents composés (phénoliques, acides organiques, et les enzymes), ceci a été confirmé par les travaux de **Meot-Duros et al.,2008** qui ont montré que l'activité antioxydante estimée par la méthode de phosphomolybdate n'est pas due seulement aux polyphénols, mais aussi à d'autres composés tels que les acides organiques qui peuvent augmenter l'activité antioxydante.

II.4. Etude chromatographique des extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum* L

Pour avoir les empreintes flavonoidiques de nos extraits, et avoir une idée sur leur composition chimique, une chromatographie sur couche mince a été réalisée en utilisant quatre systèmes de solvant :

- **Premier système** : butanol, acide acétique et l'eau (40, 10, 50), les résultats de ce système sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau VIII : Résultats de la CCM concernant le premier système

Dépôt	N° spots	R _F
Extrait méthanolique (EM)	1	0,073
	2	0,830
	3	0,992
	4	0,801
Extrait éthanolique (EE)	1	0,073
	2	0,992
	3	0,801
Extrait acétonique (EA)	1	0,794
	2	0,808
	3	0,904
	4	0,985
Ac. Gallique (AG)	1	0,911
Ac. Tannique (AT)	1	0,301
Quercétine (Q)	1	0,882
Rutine (R)	1	0,235

Suite à l'observation des plaques après une révélation et la comparaison des R_F, des spots issus de la séparation des extraits avec ceux des témoins utilisés ont permis d'avoir une idée sur les composés présents dans les graines de *Trigonella foenum-graecum* L.

D'après les R_F obtenus on peut déduire que :

Les extraits méthanolique et éthanolique indiquent trois composés en commun avec des R_F de 0,073; 0,801; et 0,992. Toutefois, ces composés n'ont pas été identifiés car on n'a pas utilisé les standards adéquats.

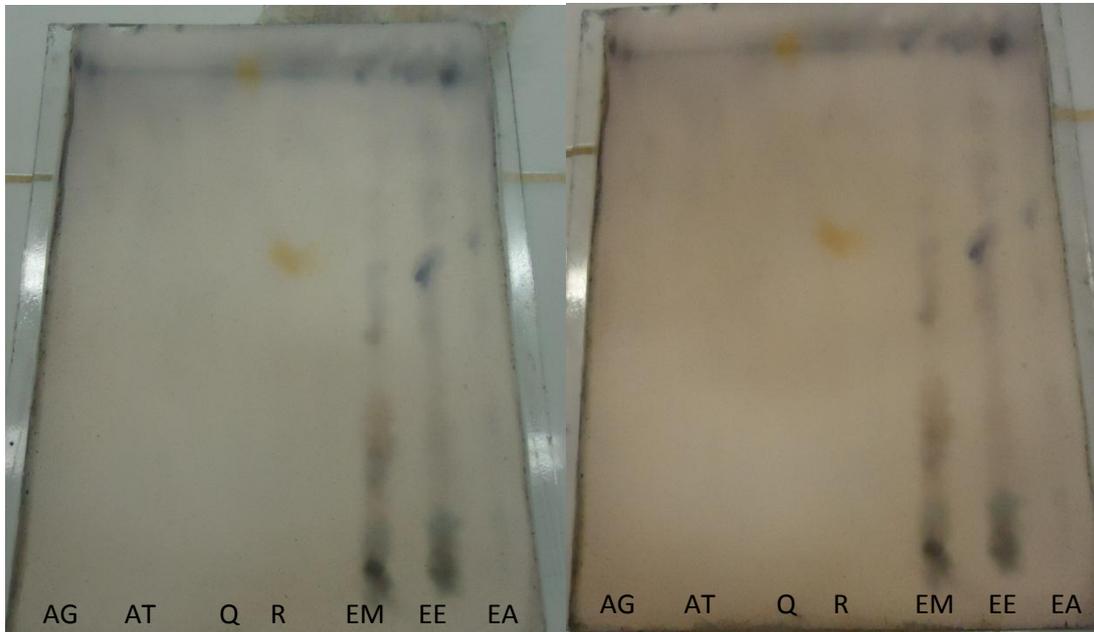


Figure 22 : chromatogramme obtenu par le système 1 (butanol, acide acétique et l'eau : 40, 10, 50) avec une révélation par la vanilline sulfurique.

- **Deuxième système :** acétate d'éthyle, acide formique, acide acétique, eau (100, 11, 11, 26), les résultats de ce système sont mentionnés dans le tableau suivant

Tableau IX : Résultats de la CCM concernant le deuxième système

dépôt	N° spots	R _F
Extrait méthanolique (EM)	1	0,075
	2	0,156
	3	0,218
	4	0,25
	5	0,475
	6	0,556
Extrait éthanolique (EE)	1	0,062
	2	0,143
	3	0,2
	4	0,25
	5	0,5
	6	0,575
	7	0,875
Extrait acétonique (EA)	1	0,25
	2	0,481
	3	0,556
	4	0,943
Ac. Gallique (AG)	1	0,962
Ac. Tannique (AT)	1	0,937
Quercétine (Q)	1	0,968
Rutine (R)	1	0,75
Ac. Caféique (AC)	1	0,968

Par le biais de ce système, nous avons pu mettre en évidence : 6 composés pour l'extrait méthanolique, 7 pour l'extrait éthanolique, et 4 pour l'extrait acétonique mais aucun de ces composés ne correspond aux témoins utilisés, cependant, on a remarqué la présence d'un composé en commun dans les trois extraits ayant un R_F de 0,25.

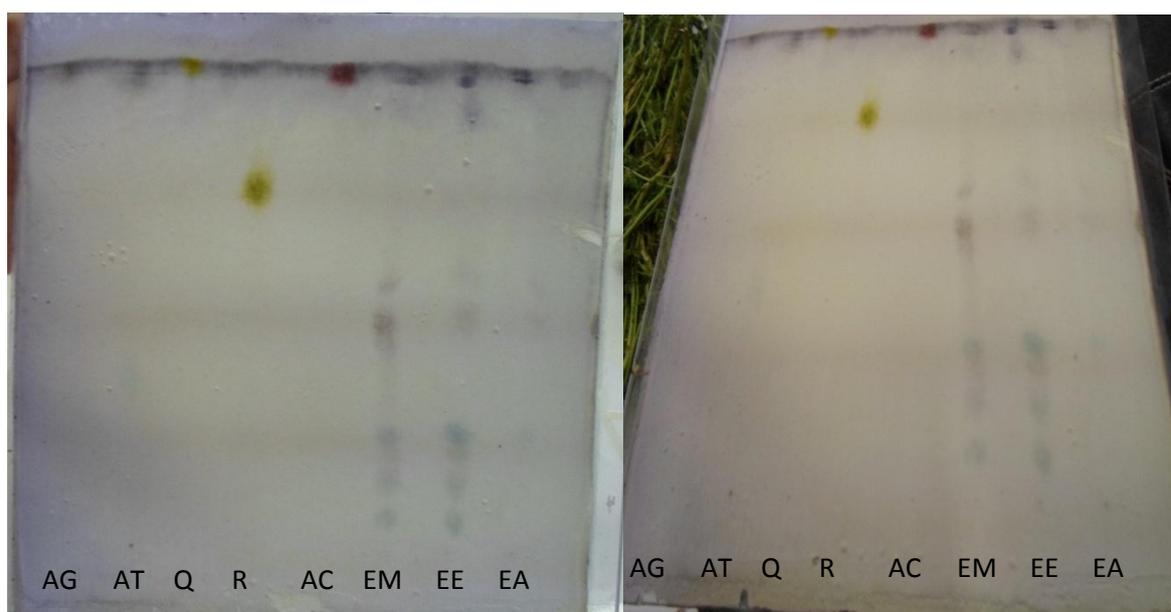


Figure 23 : Chromatogramme obtenu par le système 2 (acétate d'éthyle, acide formique, acide acétique, eau:100 ,11 ,11 ,26), après révélation par la vanilline sulfurique.

- **Troisième système** : toluène, acétone, acide formique (60, 60, 10) les résultats de ce système sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau X : Résultats de la CCM concernant le troisième système

Dépôt	N° spots	R _F
Extrait méthanolique (EM)	1	0,035
	2	0,071
	3	0,171
Extrait éthanolique (EE)	1	0,057
	2	0,214
	3	0,321
Extrait acétonique (EA)	1	0,035
	2	0,064
Ac .gallique (AG)	1	0,678
Ac. Tannique (AT)	1	0,571
Quercétine (Q)	1	0,821
Rutine (R)	1	0,157
Catéchine (Cat)	1	0,785

D'après l'observation des plaques on remarque que ce système n'a pas donné une bonne séparation des composés phénoliques et d'après les R_F obtenus on a remarqué la présence d'un composé en commun dans les extraits méthanolique et éthanolique avec un R_F de 0,035.

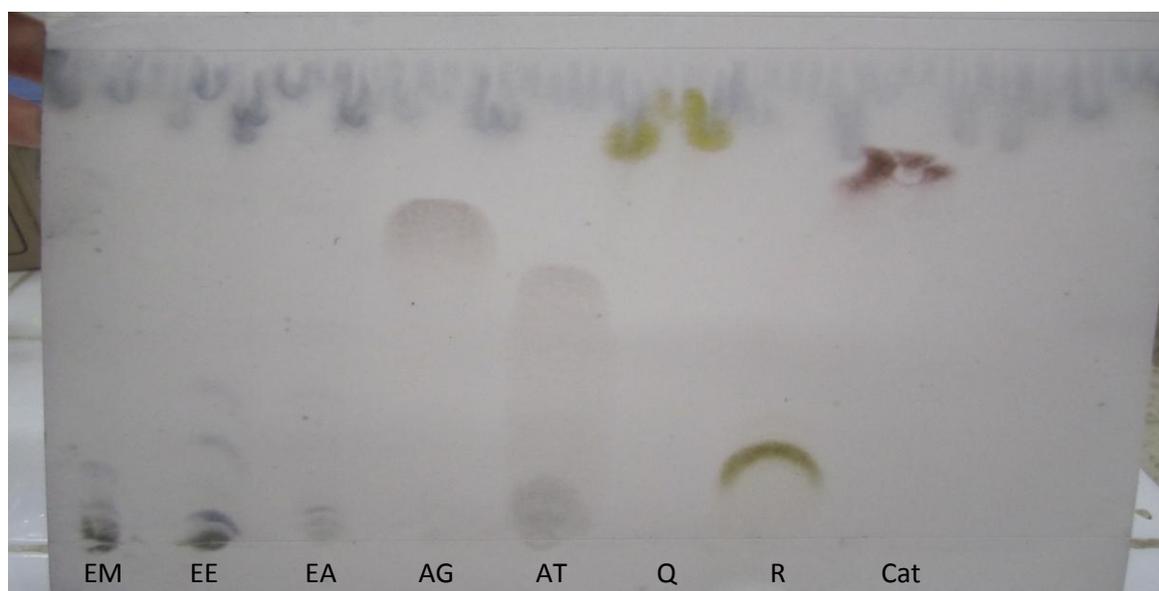


Figure 24 : Chromatogramme obtenu par le système 3 (toluène, acétone, acide formique : 60, 60, 10) après révélation par la vanilline sulfurique.

- **Quatrième système** : acétate d'éthyle, méthanol, eau (27 ; 4,5 ; 14) les résultats de ce système sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XI : Résultats de la CCM concernant le quatrième système

Dépôt	N° spots	R _F
Extrait méthanolique (EM)	1	0,093
	2	0,156
	3	0,306
	4	0,425
	5	0,568
	6	0,968
Extrait éthanolique (EE)	1	0,056
	2	0,093
	3	0,131
	4	0,168
	5	0,306
	6	0,4
	7	0,568
	8	0,968
Extrait acétonique (EA)	1	0,05
	2	0,093
	3	0,15
	4	0,4
	5	0,568
	6	0,968
Ac. Gallique (AG)	1	0,587
Ac. Tannique (AT)	1	0,556
Ac. Caféique (AC)	1	0,656
Quercétine (Q)	1	0,968
Rutine (R)	1	0,293

Ce système nous a permis d'observer plusieurs taches pour les trois extraits, comme on peut remarquer aussi la présence de trois composés en commun dans les trois extraits avec des R_F de 0,093; 0,568; 0,968. Un composé en commun dans les extraits méthanolique et éthanolique de R_F de 0,306 a également été détecté, de même pour les extraits éthanolique et acétonique un autre composé en commun avec un R_F de 0,4. Mais aucun de ces composés ne correspond aux témoins utilisés.

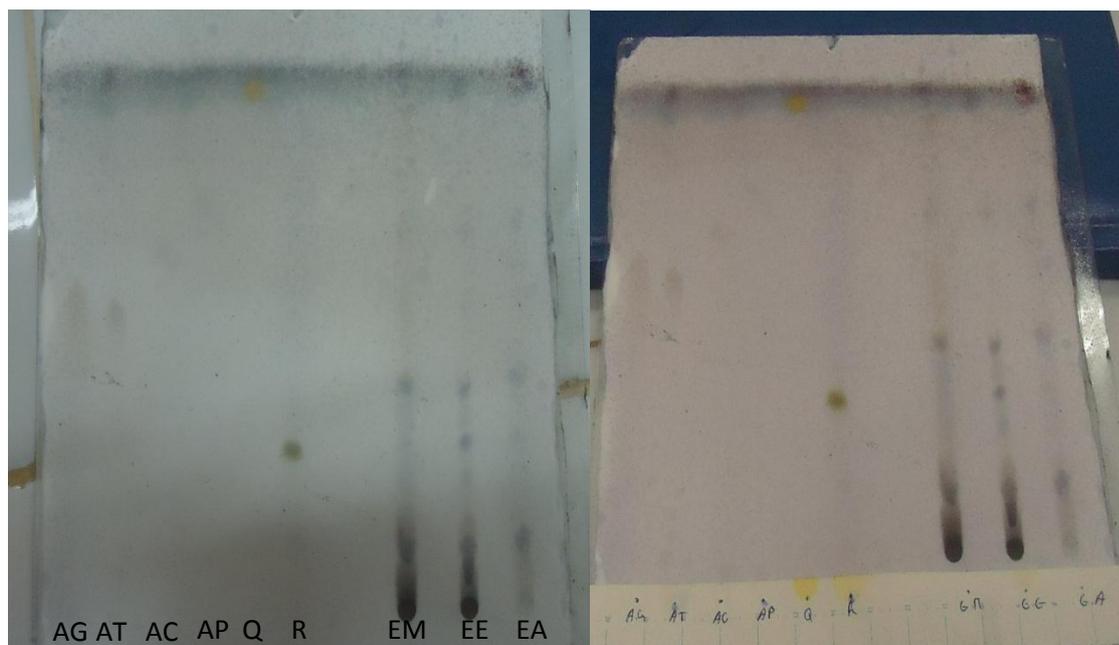


Figure 25 : Chromatogramme obtenu par le système 4 (acétate d'éthyle, méthanol, eau : 27 ; 4,5 ; 14) après révélation par la vanilline sulfurique.

Selon les résultats obtenus en utilisant les quatre systèmes de solvant, on peut en déduire que le quatrième système de migration acétate d'éthyle, méthanol, eau (27 ; 4,5 ; 14) s'est avéré comme le système adéquat, car il a permis d'avoir une très bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots. Toutefois, l'identification des spots n'a pas été établie à cause de non correspondance des taches de standards avec nos extraits et aussi suite au manque d'utilisation d'autres standards qui pourraient dévoiler la caractérisation de ces extraits.

Conclusion et perspectives

Conclusion

Les graines de *Trigonella foenum-graecum* L., ont fait l'objet de la présente étude. Différentes analyses sont appliquées : extraction des polyphénols, le dosage de ces différents composés (polyphénols totaux, flavonoïdes et pro-anthocyanidines) ainsi que l'évaluation des effets antioxydants des extraits de ces graines par deux moyens; pouvoir réducteur (test de phosphomolybdate d'ammonium et pouvoir de chélation des métaux) d'une part et l'activité antiradicalaire à l'égard du DPPH d'autre part. Cette étude est réalisée sur trois extraits à partir des graines de *Trigonella foenum-graecum* L. (extrait méthanolique, extrait éthanolique, et extrait acétonique).

Il en ressort de l'analyse des résultats obtenus pour le rendement d'extraction, que le méthanol pur a permis d'obtenir un rendement le plus élevé qui est de 8,41% par rapport aux autres extraits mais ce taux est inférieur à celui trouvé par d'autres auteurs.

En outre, l'analyse quantitative des polyphénols par la méthode spectrophotométrique a montré que les teneurs sont importantes et pratiquement différentes d'un extrait à un autre, qui varient de 60,28 mg EAG/g ES (extrait éthanolique) à 66,89 EAG/g de ES (extrait méthanolique). D'autre part, les résultats du dosage des flavonoïdes révèlent que les extraits méthanolique et acétonique ont mentionné des valeurs étroitement différentes qui sont de 24,80 et 24,04 mg EQ/g ES respectivement. Au contraire, l'extrait éthanolique est avec une faible valeur de l'ordre de 15,36 mg EQ/g ES. Concernant les teneurs en pro-anthocyanidine, elles sont plus élevées dans l'extrait acétonique suivi par l'extrait méthanolique, cependant, elles sont un peu plus faible dans l'extrait éthanolique.

L'activité antioxydante est estimée en déterminant le pouvoir réducteur et l'activité antiradicalaire. La meilleure activité antiradicalaire avec le radical DPPH et le meilleur pouvoir de chélation des métaux sont obtenus avec les extraits méthanolique et acétonique. Cependant le meilleur pouvoir réducteur de molybdate d'ammonium est enregistré par les extraits méthanolique et éthanolique.

L'étude chromatographique des différents extraits de graines de *Trigonella foenum-graecum* L., nous a permis de visualiser une séparation nette de nombreuses taches et de présumer la présence de différents composés qu'on a pas pu caractériser.

A la lumière des résultats obtenus dans la présente étude, on peut conclure et confirmer que les graines de *Trigonella foenum-graecum* L. constituent une excellente source de composés à activité antioxydante. Il serait alors intéressant d'approfondir ce travail par:

- L'étude d'autres activités (antimicrobienne, antidiabétique, anti-inflammatoire...etc) de ces graines;
- Caractérisation phytochimique des composés phénoliques d'extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum* L. en utilisant d'autres méthodes plus poussées telle que : HPLC couplée à la spectrométrie de masse ou à la RMN
- Etude des autres organes de la plante (feuille, tige, fleur...) afin de déterminer l'organe le plus riche en composés phénoliques.

Références bibliographiques

- ❖ **Abdel-Hameed E.S. (2009).** Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chemistry*, 114: 1271-1277.
- ❖ **Adedapo A., Florence O., Anthony J., et Patrick J. (2009).** Antioxidant Properties of the Methanol Extracts of the Leaves and Stems of *Celtis africana*. *Records of Natural Products*, 3.
- ❖ **Adrar S. (2009).** Evaluation des activités anti-xanthine oxydases et anti-radicalaire des extraits de bourgeons de *Populus nigra* et des feuilles de *Fraxinus angustifolia*. Mémoire de magister de l'université Abderrahman Mira, Béjaïa.
- ❖ **Ahmadiani A., Javan M., Semnani S., Barat E., et Kamalinejad M. (2001).** Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaves extract in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 283-286.
- ❖ **Akula U. S., et Odhav B. (2008).** In vitro 5-lipoxygenase inhibition of polyphenolic antioxidants from undomesticated plants of South Africa. *J Med Plants Res*, 2, 207-212.
- ❖ **Alarcon-Aguilara F.J. , Roman-Ramos R., Perez-Gutierrez S., Aguilar-Contreras A., Contreras-Weber and Flores-Saenz J.L. (1998).** *Ethnopharmacol.* 61-101.
- ❖ **Andrade D. Gil C., Brietenfeld L., Domingues F. et Duarte A.P. (2009).** Bioactive extracts from citrus *Adamifer* and *Arbutus unedo* L. *Industrial crop and products journal*, (30): 165-167.
- ❖ **Bahorun (1997).** Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle Ed AMAS. P 1-17.
- ❖ **Bahorun T., B. Gressier, F. Trotin, C. Brunet, T. Dine, M. Luyckx, J. Vasseur, M. Cazin, J.-C. Cazin et M. Pinkas (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46, 1086-1089.
- ❖ **Bartosz G (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. 9: 5-21.
- ❖ **Barus C (2008).** Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique-Application aux produits dermocosmétiques. Université de Toulouse III-Paul Sabatier.
- ❖ **Belguith-Hadriche O., M. Bouaziz, K. Jamoussi, M. S. J. Simmonds, A. El Feki et F. Makni-Ayedi (2013).** Comparative study on hypocholesterolemic and antioxidant activities of various extracts of fenugreek seeds. *Food Chemistry*, 138, 1448-1453.

- ❖ **Birjees-Bukhari S., Iqbal M. et Memon S. (2008).** Antioxidative activity of extracts from fenugreek seeds (*Trigonella foenum-greacum*), Pakistan journal environ. chimistry, 2:78-83.
- ❖ **BluteM., S. J. Ackerman, A. L. REIN, K. Beusterien, E. M. Sullivan, C. P. Tanio, M. J. Strauss et M. J. Manyak (2000).** Cost effectiveness of microwave thermotherapy in patients with benign prostatic hyperplasia: part II-results. *Urology*, 56, 981-987.
- ❖ **Bobbit J.M., Schawarting A.E. et Gritter R.J. (1972).** Introduction à la chromatographie. Edition Gauthier Villars. 1-100.
- ❖ **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.
- ❖ **Bougatef A., M. Hajji, R. Balti, I. Lassoued, Y. Triki-Ellouz M. et Nasri (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4): 1198-1205.
- ❖ **Bruneton J (1987).** Eléments de phitochimie et de pharmacognosie. Technique et Documentation-Lavoisier.
- ❖ **Bruneton J (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. Technique et documentation. Edition, Lavoisier, 3 : 232-389.
- ❖ **Burns J., N. Landrault, W. Mullen, M. Lean, A. Crozier et P. Teissedre (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.
- ❖ **Cao L., Yong si J., LiLu Y., Sun H., Jin W., Li Z., Hong Zhao X. et le Pan R. (2009).** Essential oil composition, antimicrobial and antioxydant properties of *Moslachinensismaxin*. *Food chemistry* .115:801-805.
- ❖ **Caude et Jardy (1996).** Méthodes chromatographiques. Dossier P1445. Base documentaire: Techniques d'analyse. Vol; papier TA2.
- ❖ **Chang, Huang, Agrawal, Wu et Tsay (2007).** Antioxydant activities and polyphénol contents of six folk medicinal ferns used as "Gusuibu". *Botanical Studies*. 48: 397-406.
- ❖ **Cieślik E., A. Gręda et W. Adamus (2006).** Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry*, 94, 135-142.

- ❖ **Coe S., A. F. et Ryan L. (2013).** Polyphenol Bioaccessibility and Sugar Reducing Capacity of Black, Green, and White Teas.
- ❖ **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.
- ❖ **Djeridane A., M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker et N. Vidal (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97 (3), 654-660.
- ❖ **Duenas A.M., R. Goold et P. Giunti (2006).** Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*, 129, 1357-1370.
- ❖ **Ebrahimzadeh p. et Hafezi (2008).** Antioxidant activities of Irania comsilk. *Turk.J.Biol.*, 32:43-49.
- ❖ **Edeas M. (2007).** Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5, 264-270.
- ❖ **El sayed Saleh (2008).** Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples.
- ❖ **Elmastaşa G., Işildaka K.İ. , et Aboul-Eneinc (2006).** Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of Bay Leaf Extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3:258-266.
- ❖ **Favier A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
- ❖ **Fleuriet A. et Macheix J. (1977).** Effect des blessures sur les composés phénoliques des fruits de tomates cerise (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*). *Physiol Veg*, 15, 239-250.
- ❖ **Gardés-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D. (2003).** Espèce réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*.
- ❖ **Ghafoor K., Park J. et Choi Y. (2010).** Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 485–490.
- ❖ **Ghedira K. Goetz P. et Le Jeune R. (2010).** Fenugrec: *Trigonella fœnum-græcum* L. (Fabaceae ex. Leguminosae). *Phytothérapie*, 8, 180-184.
- ❖ **Goudable J. et Favier A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11, 115-120.
- ❖ **Goussard S. et P. Courvalin (1999).** Updated sequence information for TEM β -lactamase genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43, 367-370.
- ❖ **Guignard J.-L. et F. Dupont (2004).** Botanique: systématique moléculaire. Masson.

- ❖ **Halliwell B. et J. M. Gutteridge (1999).** *Free radicals in biology and medicine.* Oxford university press Oxford.
- ❖ **Halliwell B. et 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.
- ❖ **Hedqvist H (2004).** Metabolism of soluble proteins by rumen microorganisms and the influence of condensed tannins on nitrogen solubility and degradation.
- ❖ **Hemaiswarya S., A.K. Kruthiventi et M. Doble (2008).** Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15, 639-652.
- ❖ **Hemalatha, Lalitha et Arulpriya (2010).** Antioxidant activities of the extracts of the aerial roots of *Pothos aurea* (Linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, 2(6): 84-89.
- ❖ **Huang D., Chen H.J., Lin C.D. et Lin Y.H. (2005).** Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) constituents. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 46 : 99-106.
- ❖ **Iris F., Benzie F et Szeto Y.T. (1999).** Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem*, 47:633-636.
- ❖ **Jungbluth (2008).** Les espèces réactives de l'oxygène et leur principales implications dans la physiologie canine. Université de Claude-Bernard (Lyon). Thèse de doctorat.
- ❖ **Koprivnjak T. et A. Peschel (2011).** Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 2243-2254.
- ❖ **Kumar G.P., T. Anand, D. Singsit, F. Khanum et K. R. Anilakumar (2013).** Evaluation of antioxidant and anti-fatigue properties of *Trigonella foenum-graecum* L. in rats subjected to weight loaded forced swim test. *Pharmacognosy Journal*, 5, 66-71.
- ❖ **Lahouel M., S. Boulkour, N. Segueni et J. Fillastre (2004).** The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxydation and increasing liver glutathione concentration. *Pathologie-biologie*, 52, 314.
- ❖ **Landolfi N.F., J. Leone, J.E. Womack et R.G. Cook (1985).** Activation of T lymphocytes results in an increase in H-2-encoded neuraminidase. *Immunogenetics*, 22, 159-167.
- ❖ **Latifou L. (2005).** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur de Strasbourg.

- ❖ **Li H., Wang X., Li Y., Li P. et Wang H. (2009).** Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112 : 454–460.
- ❖ **Lindau-sehpard B. et J. Shaffer (1993).** Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage, *Free radical Med* , 15:581-8.
- ❖ **Maataoui B.S., Hmyene A. et Hilali S (2006).** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus-indica*). *Lebanese Science Journal* N°17.
- ❖ **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-Naidu M., B. Shyamala, J. Pura, Naik, G. Sulochanamma et P. Srinivas (2011).** Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *LWT-Food Science and technology*, 44, 451-456.
- ❖ **Mahuzier G., et Hamon M. (1978).** Abrégé de chimie analytique. Méthode de séparation. Edition Masson. 155-165.
- ❖ **Meghwal M. et T. Goswami (2012).** Evaluation of size reduction and power requirement in ambient and cryogenically ground fenugreek powder. *Advanced Powder Technology*.
- ❖ **Meot-Duros L., Floch G. L. et Magné C (2008).** Radical scavenging , antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*. 116:258-262.
- ❖ **Milane H (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques.
- ❖ **Moreira L., Dias L.G., Pereira. J. A. et Estevanho L (2008).** Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 3482-3485.
- ❖ **Moussard C (2006).** Biochimie structurale et métabolique. De Boeck Supérieur.
- ❖ **Nacz M., F. et Shahidi (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95-111.
- ❖ **Nisha P, Abdul Nazar P. et Jayamurthy P (2009).** A comparative study on antioxidant activities of different varieties of *Solanum melongena*. *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp: 2640-2644.

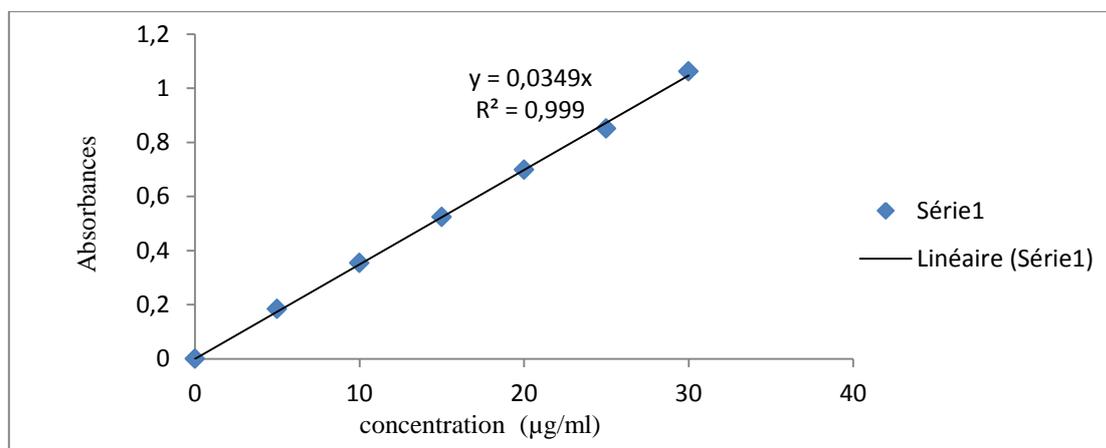
- ❖ **Nitsch J. et C. Nitsch(1961)**. Synergistes naturels des auxines et des gibberellines. *Bull. Soc. Fr*, 26, 2237-2240.
- ❖ **Öner A. C., U. Mercan, H. Öntürk, N. Cengiz, R. Erten et H. Özbek (2008)**. Anti-inflammatory and hepatoprotective activities of *Trigonella foenum graecum* L. *Pharmacologyonline*, 2, 126-132.
- ❖ **Packer L., S. U. Weber et G. Rimbach (2001)**. Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *The Journal of nutrition*, 131, 369S-373S.
- ❖ **Parent C., N. Capelli et J. Dat (2008)**. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 255-261.
- ❖ **Paris M. et M. Hurabielle (1981)**. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie).: Generalites. Monographies (1re partie). Plantes a glucides (holosides, heterosides) a lipides, a huiles essentielles, a protides et a alcaloides (*dedut*). Masson.
- ❖ **Pastre J. et N. Priymenko (2007)**. Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue de médecine vétérinaire*, 1, 180-189.
- ❖ **Piétroni P (1996)**. Manuel pratique. Médecines des douces. (ED). *Hachette*. Paris. 224p.
- ❖ **Pincemail J. et J. Defraigne (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.
- ❖ **Priya V., Jananie K. et Vijayalakshmi K (2011)**. Studies on antioxidant activity of *Trigonella Foenum Graecum* seed using in vitro models.
- ❖ **Rees etHarborne (1985)**. The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry*, 24, 2225-2231.
- ❖ **Ribereau-Gayon P (1968)**. Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, ed. Paris.
- ❖ **Richter (1993)**. Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presses polytechnique et univrstitaires ramandes, CH-1015. 318-338.
- ❖ **Robards et Antolovich (1997)**. analytical chemistry of bioflavonoids. A review. *Analust*, 122, 11r-34r.
- ❖ **Rodriguez-Meizoso I., marin F.R., herrero M., serorans F.J., reglero G., cifuentes A., Ibanez E. (2006)**. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41: 1560-1565

- ❖ **Rouessac (2004)**. Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes, méthodes séparatives. 6ème Ed. Dunod, Paris, P.102.
- ❖ **Saadaoui B., Bekir J., Akrouf J., Ammar S., Mahjoub A. et Mars M (2006)**. Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride Tunisien. *Sipama*.312-316.
- ❖ **Saeedeh A.D et Urooj A (2007)**. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morusindica L.*) leaves. *Food Chemistry*.102 :1233–1240.
- ❖ **Saison C., V. Helias, B. A. Ballif, T. Peyrard, H. Puy, T. Miyazaki, S. Perrot, M.Vayssier-Taussat, M. Waldner et 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.
- ❖ **Sarni-Manchado P. et V. Cheynier (2006)**. *Polyphenols in food products*. Editions Tec & Doc.
- ❖ **Sauvaire Y., Baissac O., Petit P. et Ribes G. (1996)**. Steroid saponins from Fenugreek and some of their biological properties. Pages .37-46 in G.R. Waller et Yamasaki K, eds. Saponins used in food and agriculture; Advances in experimental medicine and biology. Vol.405. Plenum press, New York.
- ❖ **Schofield P., D. Mbugua et A. Pell (2001)**. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 21-40.
- ❖ **Sergeant N., B. Sablonnière, S. Schraen-Maschke, A. Ghestem, C.-A. Maurage, A. Wattez P. Vermersch et A. Delacourte (2001)**. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Human molecular genetics*, 10, 2143-2155.
- ❖ **Sine (2003)**. Séparation et analyse des biomolécules: méthodes physicochimiques cours exercices. Ellipses édition marketing SA.P.99-101.
- ❖ **Singleton V. et J. Rossi (1965)**. Determination of tannins in wines. *J. Enology and viticulture*, 6, 114.
- ❖ **Snehlata H. et Payal D. (2011)**. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*): An Overview.
- ❖ **Sun, Tsuang, Chen, Huang, Hang et Lu (1998)**. An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following acute thermal injury. *Burns* 24, 225-231.

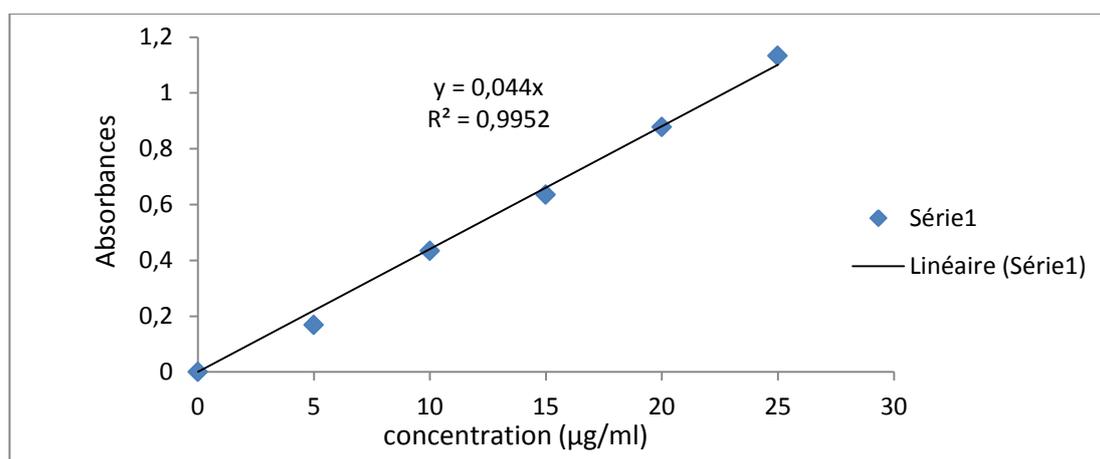
- ❖ **Therond et denis (2005)**. Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et l'azote: effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides. in Delattre J; Beaudoux J.L; Benfont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Ed, Paris: TEC et DOC, Lavoisier, éditions médicales internationales: 114-167.
- ❖ **Thomas J., S. Basu et S. Acharya (2006)**. Identification of *Trigonella* accessions which lack antimicrobial activity and are suitable for forage development. *Canadian journal of plant science*, 86, 727-732.
- ❖ **Van Vuuren S. (2008)**. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 462-472.
- ❖ **Volpé J-S., Sergeant P., Fakler A., Kanny G (2009)**. Fenugrec: Aliment.
- ❖ **Yacoubi L., Rabaoui L., Hédi Hamdaoui M., Fattouch S., Serairi R., Kourda N., Ben Khamsa S (2011)**. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Trigonella foenum-graecum* Linnaeus, 1753 (Fenugreek) seed extract in experimental pulmonary fibrosis.

Annexes

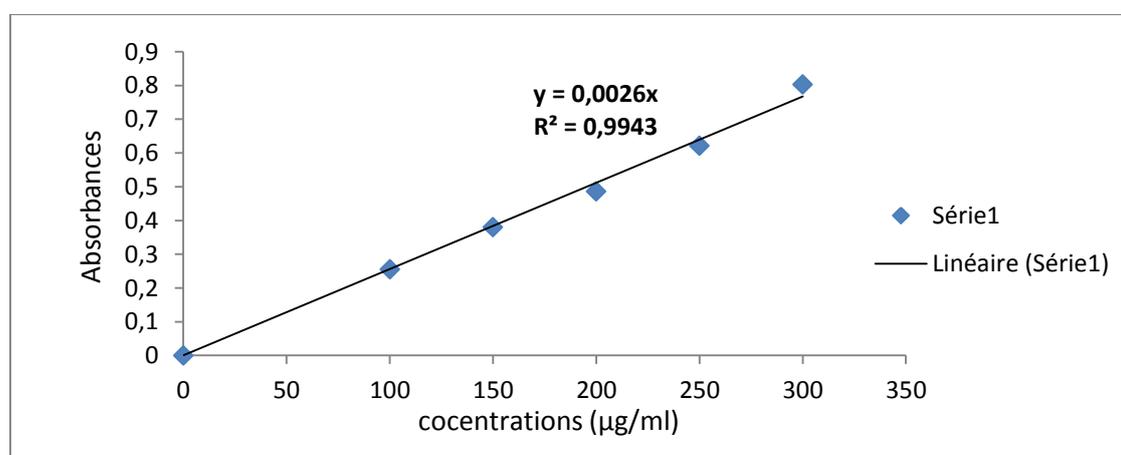
Courbes d'étalonnages utilisées pour le calcul des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et proanthocyanidines :



Annexe 1 : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux ($\lambda=725$ nm)

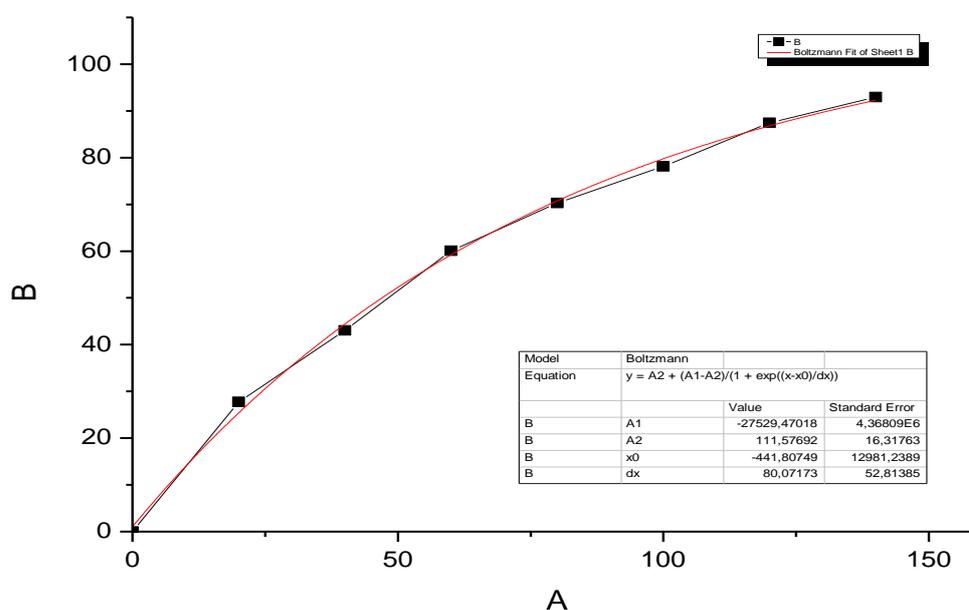


Annexe 2 : Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes ($\lambda=430$ nm)

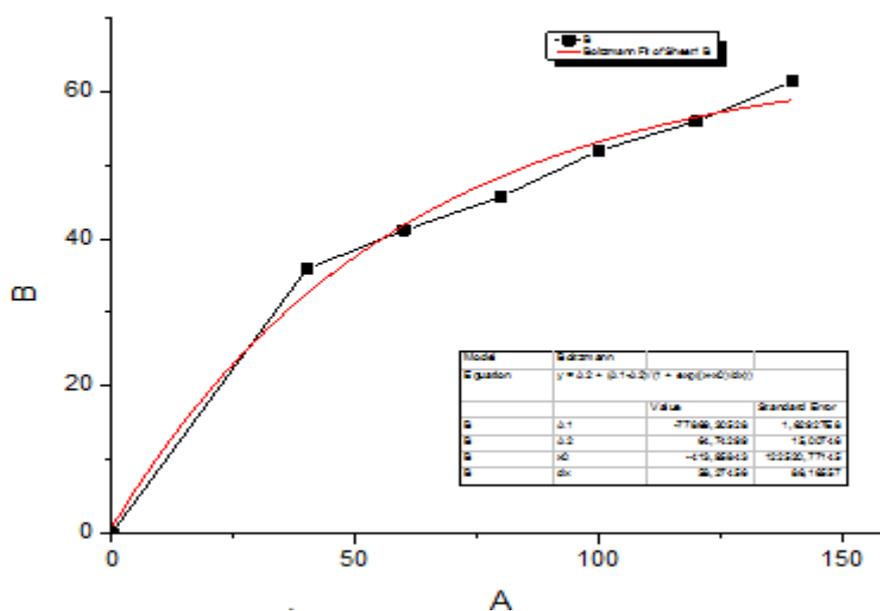


Annexe 3 : Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des proanthocyanidines ($\lambda=500$ nm)

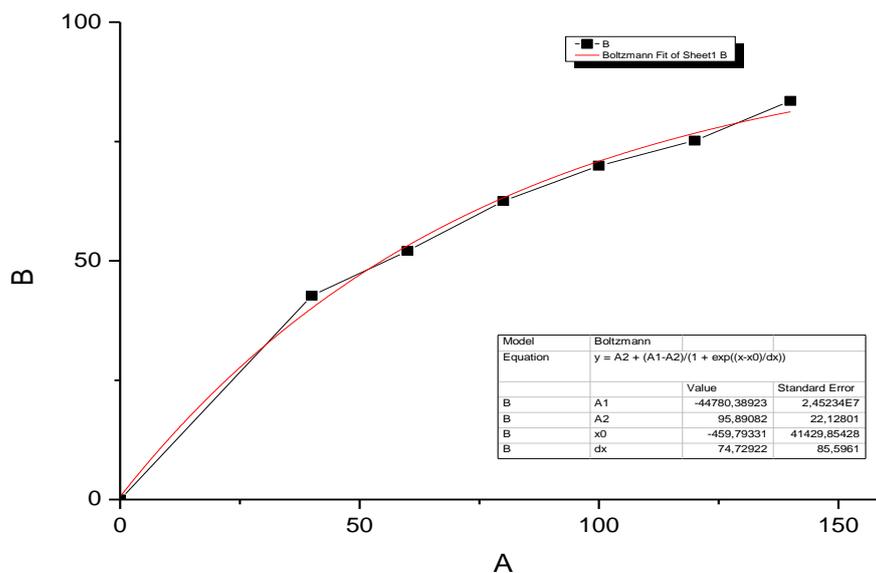
Courbes obtenues par origine 8 pour le calcul des IC₅₀



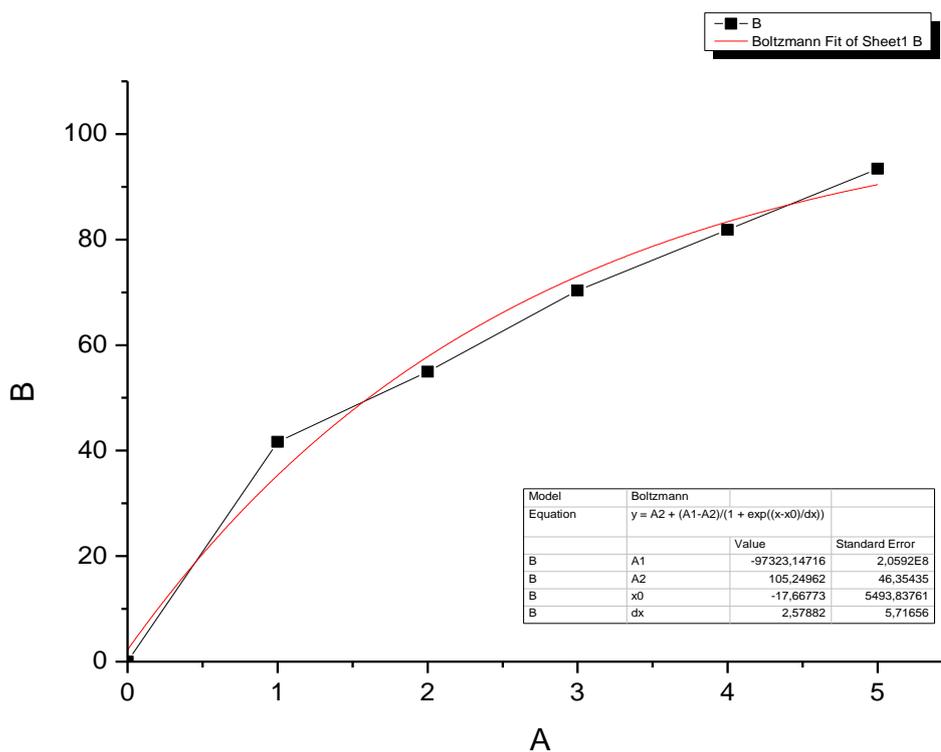
Annexe 4 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait méthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum* L dans l'activité scavenging du DPPH



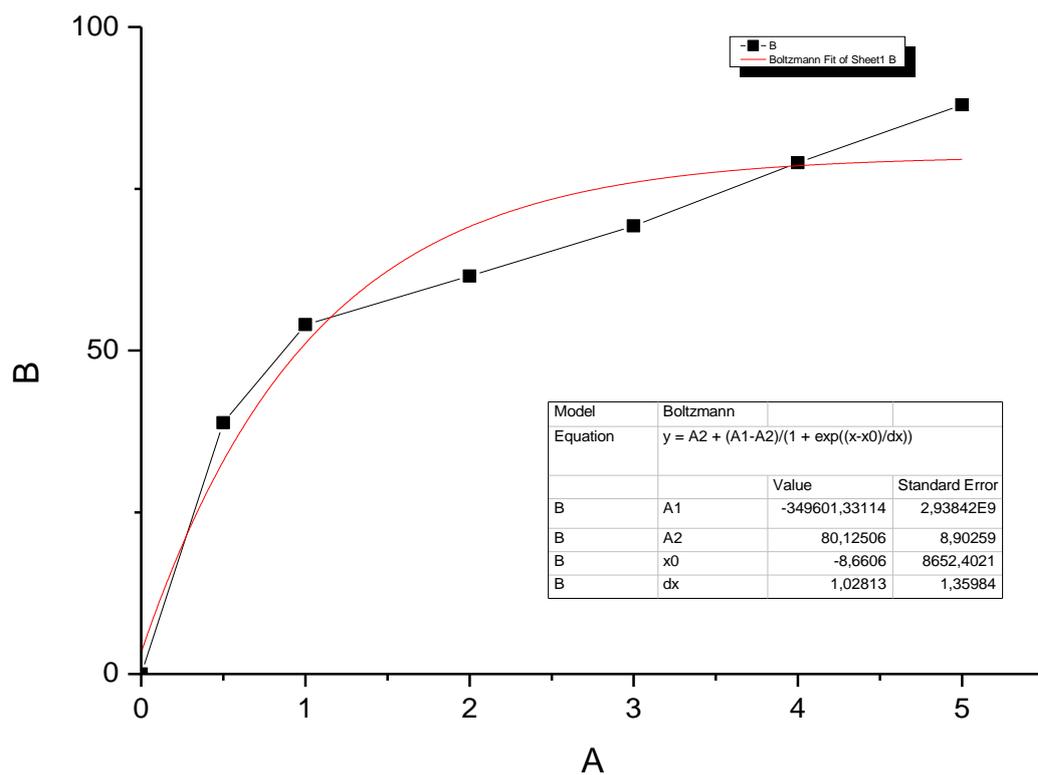
Annexe 5 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait éthanolic des graines de *Trigonella foenum-graecum* L dans l'activité scavenging du DPPH



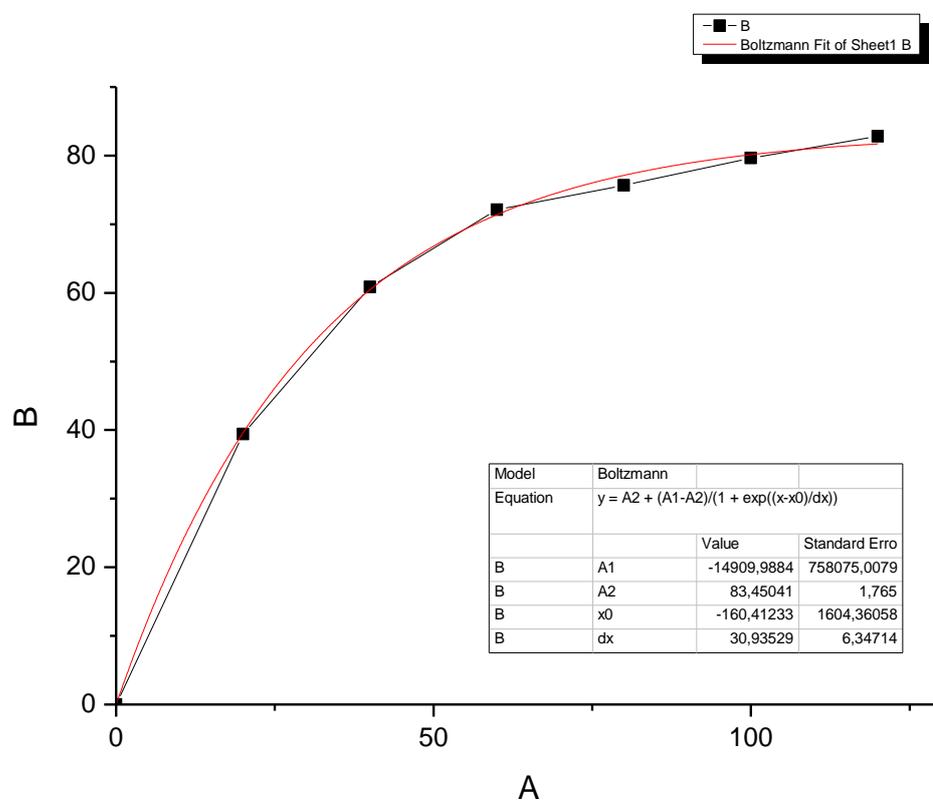
Annexe 6: courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait acétonique des graines de *Trigonella foenum-graecum* L dans l'activité scavenging du DPPH



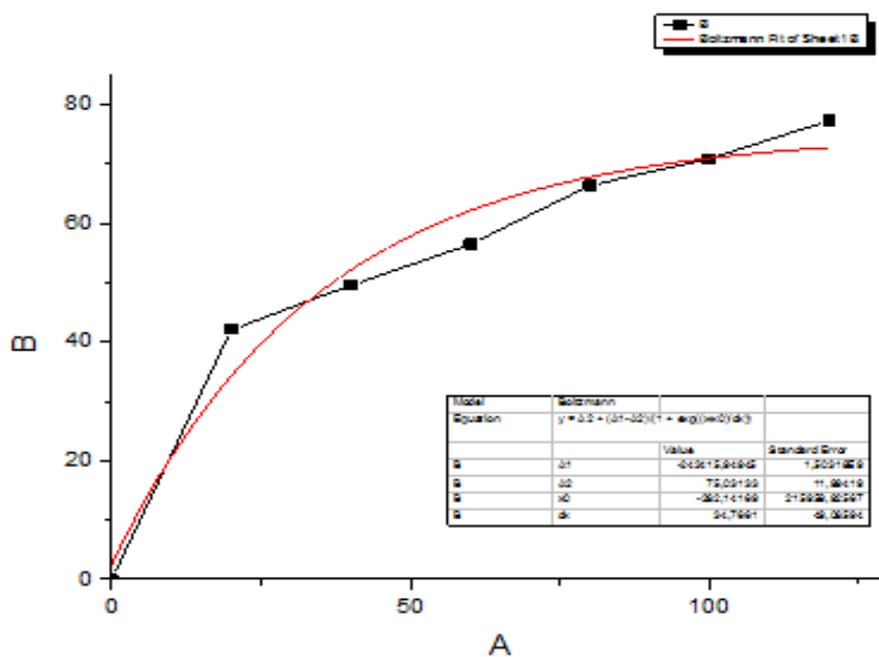
Annexe 7: courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'acide ascorbique dans l'activité scavenging du DPPH



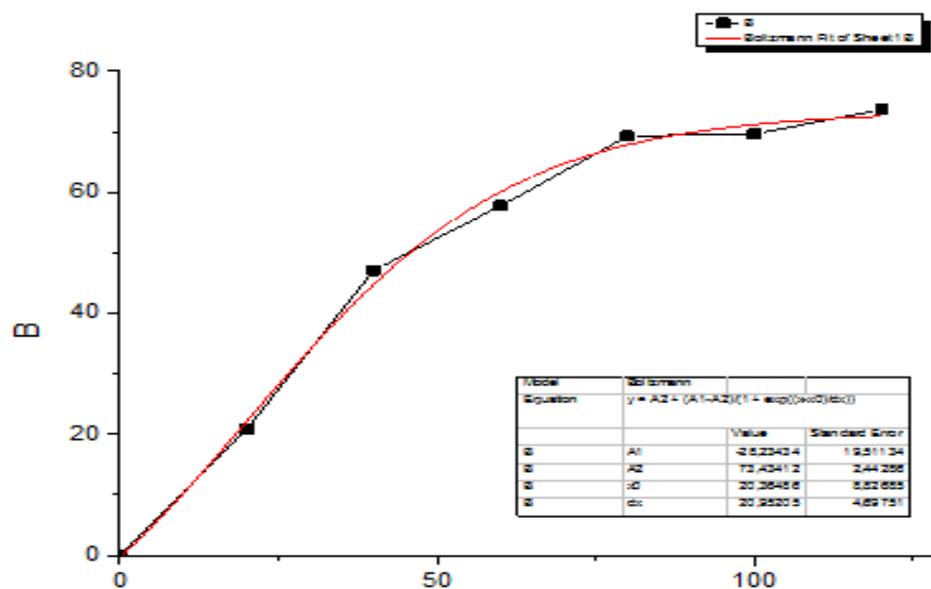
Annexe 8 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de BHA dans l'activité scavenging du DPPH



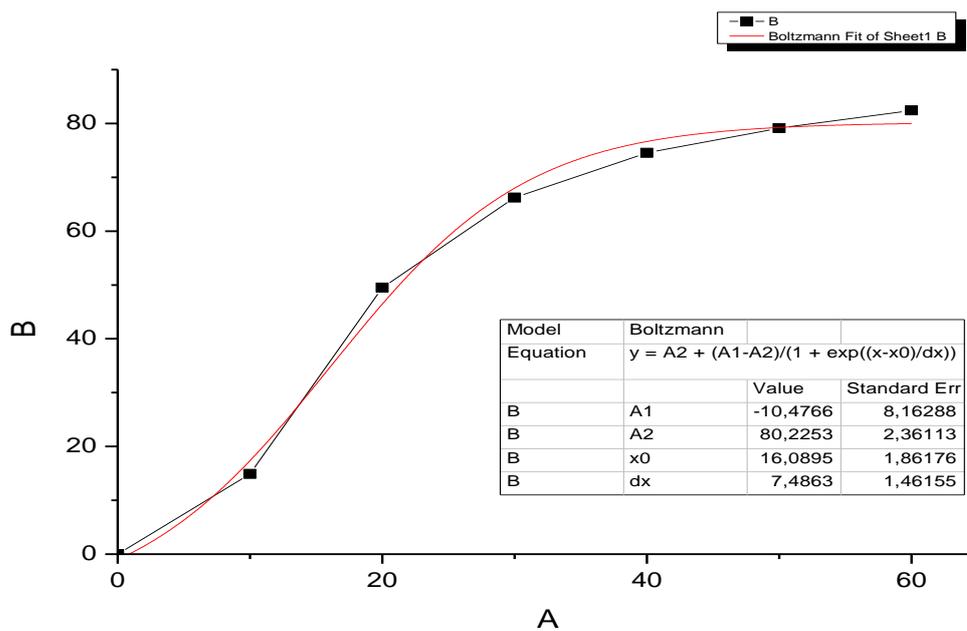
Annexe 9 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait méthanolique dans l'activité réductrice de phosphomolybdate d'ammonium



Annexe 10 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait éthanolique dans l'activité réductrice de phosphomolybdate d'ammonium



Annexe 11 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait acétonique dans l'activité réductrice de phosphomolybdate d'ammonium



Annexe 12 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de BHAdans l'activité réductrice de phosphomolybdate d'ammonium

Résumé :

Trigonella foenum-graecum L. est une plante herbacée appartenant à la famille des légumineuses (Fabacées), c'est une plante d'une grande qualité nutritive, ses graines sont d'une composition hétérogène de substances variées. Afin d'examiner l'activité antioxydante des polyphénols des graine de cette plante on a réalisé trois tests : le pouvoir réducteur, le test phosphomolybdate, et l'activité scavenging du DPPH. Le dosage des principaux groupes des polyphénols de *Trigonella foenum-graecum* L. a montré que l'extrait méthanolique est le plus riche en polyphénols totaux (66,89mg EAG/g ES) et en flavonoïdes (24,80mg EAG/g ES). Les trois extraits ont donnés de très faibles quantités des tannins condensés, et l'extrait acétonique enregistre la teneur la plus élevé (1,25mg E catéchine/g ES).

Les trois tests ont démontré que l'extrait méthanolique qui a donné l'activité antioxydante la plus élevée. L'analyse qualitative des extraits par CCM a mis en évidence l'existence de quelques composés phénoliques

Mots clés : *Trigonella foenum-graecum* L., polyphénols, activité antioxydante,

Abstract:

Trigonella foenum-graecum L. is herbaceous plants belonging to the leguminous family (Fabaceae) . it is a plant of a great food value, its seeds are of a heterogeneous composition of varied substances . In order to examine the antioxidant activity of seed's polyphenols of this plant, three tests were carried out: reducing power, the phosphomolybdate test, and the scavenging activity of the DPPH. The proportioning of the principal groups of polyphenols of *Trigonella foenum-graecum* L showed that the methanolic extract is the richest in total polyphenols (66,89mg EAG/g ES) and in flavonoids (24,80mg EAG/g ES). The three extracts gave very small quantities of condensed tannins, and the acetone extract records the highest content (1,25mg E catechin/g DE).

The three tests showed that the methanolic extract gave the highest antioxidant activity.

The qualitative analysis of the extracts by CCM highlighted the existence of some phenolic compounds

Key words: *Trigonella foenum-graecum* L, polyphenols, antioxidant activity,