

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotechnologies végétales

ETUDE PHYTOCHIMIQUE, BIOLOGIQUE ET APTITUDE A LA
CALLOGENESE CHEZ *Trigonella foenum-graecum* L. DE LA ZONE
DE TAMANRASSET

Par

FENAGHRA Latifa

Devant le jury composé de:

F. SAÏDI	Professeur, U. de Blida	Présidente
A. BERBER	Maître de conférence A, U. de Blida	Examineur
M. BENCHAÂBANE	Maître de conférence A, U. de Blida	Examineur
F.Z. CHAOUCH	Maître de conférence A, U. de Blida	Promotrice
A. ROUBI	Maître assistant A, U. de Blida	Co-promoteur

Blida, Avril 2011

RESUME

Notre travail a porté, en premier lieu, sur l'étude de la phytochimie et des activités biologiques de la poudre des graines et des feuilles de *Trigonella foenum-graecum* L., qui est une plante de la famille des Légumineuses, caractéristique des régions méditerranéennes et de l'Asie et, en deuxième lieu, sur son aptitude à la callogenèse et la composition chimique de leurs cals.

Les grands groupes chimiques ont été déterminés par la CCM et la spectrophotométrie. La caractérisation des constituants chimiques de l'extrait aqueux et alcoolique de *Trigonella foenum-graecum* L. a révélé la présence de terpénoïdes, d'alcaloïdes, de saponosides, de protéines, de composés phénoliques, de l'huile essentielle et de cendres.

L'extrait alcoolique des graines et des feuilles du fenugrec ainsi que l'huile essentielle extraite des graines n'ont présenté aucun pouvoir antimicrobien vis-à-vis les souches testées.

L'activité hypoglycémiante a été observée dans l'extrait aqueux et méthanolique des graines du fenugrec mais à des réponses différentes.

Quant à l'effet anti-inflammatoire et antipyrétique, l'extrait aqueux des graines à une dose de 120 mg/kg a présenté une activité anti-inflammatoire considérable comparativement avec le Diclofénac et l'huile essentielle extraite. En outre, l'administration de l'extrait aqueux à une dose de 120 mg/kg provoque le même effet antipyrétique induit par le paracétamol.

Sur le plan biotechnologique, le fenugrec a manifesté *in vitro* de fortes propriétés callogènes.

L'initiation de la callogenèse et la croissance des cals présentent une variabilité de réponses liées aux facteurs chimiques. Des cals de prolifération intense ont été obtenus en une courte période (quatre semaines) sur le milieu MS contenant une combinaison hormonale auxine/cytokinine à partir des plantules incubées à une photopériode de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité.

La meilleure croissance des cals a été enregistrée sur le milieu MS auquel est ajouté 0,1 mg/l de 2,4-D et 3 mg/l de BAP.

Trois types de cals friables, compacts et mous, de couleur chlorophyllienne ou jaune sont obtenus à partir de divers types d'explants et en diverses conditions montrant ainsi une grande variabilité morphologique de ces derniers.

L'analyse phytochimique réalisée sur les cals du fenugrec a confirmé la présence des phénols totaux, des tanins condensés, des cendres totales et des flavonoïdes totaux.

Mots clés : *Trigonella foenum-graecum* L. ; analyse phytochimique ; pouvoir antimicrobien ; effet hypoglycémiant ; effet anti-inflammatoire ; effet antipyrétique ; callogenèse, cals.

ABSTRACT

Our work carried in the first place, on the survey of the photochemical and the biological effects of the seeds and the leaves powder of *Trigonella foenum-graecum* L., and in second place, on the chemical composition of their calluses.

The big chemical groups have been determined by the CCM and the spectrophotometer. The characterization of the constituent chemical of the aqueous and alcoholic excerpt of *Trigonella foenum-graecum* L. revealed the presence of terpenoids, alkaloids, saponosids, proteins, phenolic compounds, flavonoids, ashes and the essential oil.

The alcoholic excerpt of the seeds and the leaves of the fenugreek as well as his essential oil extracted of the seeds haven't an antimicrobial power on the strains tested.

The hypoglycaemic activity has been observed in the aqueous and methanolic excerpt of the fenugreek seeds but to different answers.

As for the anti-inflammatory and antipyretic effect, the aqueous excerpt of the seeds to a dose of 120 mg/kg presented a considerable anti-inflammatory activity comparatively with the Diclofenac and the essential oil extracted. Besides, the administration of the aqueous excerpt to a dose of 120 mg/kg provokes the same antipyretic effect misleads by the paracetamol.

On the biotechnical plantation, the fenugreek demonstrated *in vitro* of strong callogenesis properties.

The initiation of the callogenesis and the growth of the calluses present a variability of answers bound to the chemical factors. Calluses of intense proliferation have been gotten in a short period (four weeks) on the MS middle containing a combination hormonal auxine/cytokinine from the plant hatched to a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of obscurity. The best growth of the calluses has been recorded on the MS middle added of 0.1 mg/l of 2,4-D and 3 mg/l of BAP.

The calluses gotten from various types of explants and in various conditions show a big morphological variability of which one got three types of calluses: crumbly, compact and soft of chlorophyllen or yellow color.

The phytochemical analysis achieved on the calluses of the fenugreek confirmed the presence of phenols, tannins, ashes and flavonoids.

Key words: *Trigonella foenum-graecum* L. ; phytochemical analysis ; antimicrobial power; hypoglycaemic activity ; anti-inflammatory effect ; antipyretic effect ; callogenesis; calluses.

ملخص

يتمحور عملنا ، أولا ، حول دراسة الكيمياء النباتية والأنشطة البيولوجية لبذور وأوراق مسحوق *Trigonella foenum-graecum* L.، نبات من العائلة البقولية ، الذي يميز المناطق المتوسطة و الآسيوية، وثانيا ، حول دراسة قدرته على تكون الكالوس والتركيب الكيميائي لهذه الأنسجة.

لقد تم تحديد المجموعات الرئيسية من المواد الكيميائية للمستخلص المائي و الكحولي لنبات *Trigonella foenum-graecum* L. باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا الطبقة (CCM) و القياس الطيفي الفوتومتري (Spectrophotométrie)، التي كشفت وجود التربينويدات ،الألكالويدات، السابونين، البروتينات، المركبات الفينولية، الزيوت الأساسية والرماد.

إن استخدام المستخلص الكحولي لبذور و أوراق نبات الحلبة بالإضافة إلى الزيوت الأساسية للبذور لم يظهر أية فعالية ضد سلالات الميكروبات المستعملة لهذه الدراسة. وقد لوحظ انخفاض نسبة سكر الدم في المستخلص المائي والميتانولي لبذور الحلبة ولكن مع إجابات مختلفة. أما بالنسبة للفعالية المضادة للالتهابات والممانعة للحرارة ، فإن تناول جرعة مقدارها 120 ملغ/كغ من المستخلص المائي للبذور، قد قدم نشاطا كبيرا مضادا للالتهابات مقارنة مع الديكلوفيناك و الزيوت الأساسية المستخرجة. وبالإضافة إلى ذلك ، فإن تناول جرعة مقدارها 120 ملغ/كغ من المستخلص المائي يسبب نفس التأثير الخافض للحرارة الناجم عن الباراسيتامول.

على صعيد التكنولوجيا الحيوية ، فإن نبات الحلبة قد أظهر في الظروف المخبرية، قدرة كبيرة على تكون الكالوس. لقد أظهرت نتائج عملية تكوين الكالوس و نموه، اختلافات كبيرة في الإستجابة التي كانت لها علاقة مباشرة بالعوامل الكيميائية. كما أظهر نبات الحلبة خاصية هامة جدا في تكوين الكالوس، حيث تحصلنا خلال فترة قصيرة (أربع أسابيع) على مجموعة كبيرة من الكالوس و ذلك في وسط الزرع MS، مضاف إليه خليط هرموني (أوكسين/سيتوكينين)، انطلاقا من نباتات كانت معرضة لتواقى ضوئي (16 ساعة ضوء و 8 ساعات ظلام). فقد سجلنا أحسن الاستجابات في نمو الكالوس في وسط الزرع MS مضاف إليه 0.1 ملغ/ل من 2,4-D و 3 ملغ/ل من BAP، فالكالوس المتحصل عليه من خلال مختلف أجزاء النبات (جذور، سيقان و أوراق) و في مختلف الظروف أظهرت اختلافات مورفولوجية كبيرة، حيث تحصلنا على كالوس فتاتي، صلب و إسفنجي ذو لون يخضوري أو أصفر.

التحليل الكيميائي النباتي لكالوس نبات الحلبة أكد وجود بعض المكونات الكيميائية الخاصة بهذه النبتة.

المفاتيح: *Trigonella foenum-graecum* L. ؛ التحليل الكيميائي النباتي ؛ القدرة المضادة للميكروبات ؛ انخفاض نسبة سكر الدم ؛ الفعالية المضادة للالتهابات ؛ الفعالية المضادة للحرارة ؛ الكالوس.

REMERCIEMENTS

J'exprime mes sincères remerciements à Mme *CHAOUCH F.Z.* et Mr *ROUIBI A.*, respectivement Promotrice et Co-promoteur de ce mémoire, d'avoir accepté de diriger tous les travaux s'y rapportant du début à la fin.

Mes plus vifs remerciements vont à Mme *SAÏDI F.*, qui nous a fait l'honneur d'assurer la présidence du jury.

A Mr *BERBER A.* et Mr *BENCHAÂBANE M.*, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également, pour leur soutien et leur assistance, Mr *NEMRI M.* et Mr *BENAYED B.*, de l'unité ANTIBIOTICAL MEDEA.

Je tiens par ailleurs à exprimer mes remerciements aux ingénieurs de laboratoires de recherches de biologie végétale du département de biologie et aux ingénieurs de laboratoires d'amélioration des plantes du département d'agronomie à l'université de Blida.

DEDICACES

Je dédie ce travail à:

- ❖ Mes chers parents qui ont donné beaucoup de sacrifices pour me guider et m'assurer une éducation rationnelle et des études aussi réussies que possible. Je leur souhaite une longue vie et que Dieu le Tout-Puissant les garde et les protège.*

- ❖ Ma sœur Wassila, mes frères, Abdelhamid et Oussama et mon beau-frère Redhouane, qui sont mes bons compagnons et auxquels je souhaite tout ce qu'il y a de mieux dans la vie.*

- ❖ Mes amies: Fatima, Souad, Halima, Asmaa, Faiza, Messaouda et Khadidja, sans oublier mes camarades d'études : Meriem, Fouzia, Sabrina, Sarah et Nadjib et à tous ceux qui me connaissent de proche ou de loin.*

TABLE DES MATIERES

RESUME	
ABSTRACT	
ملخص	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	
INTRODUCTION	15
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1.1. Les plantes médicinales	17
1.2. Les huiles essentielles	19
1.3. Biologie de l'espèce	22
1.4. Les biotechnologies et l'amélioration des plantes	37
2. MATERIEL ET METHODES	43
2.1. Screening phytochimique de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	43
2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait alcoolique de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	59
2.3. Etude de l'effet hypoglycémiant de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	62
2.4. Etude de l'activité anti-inflammatoire de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	64
2.5. Etude de l'activité antipyrétique de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	66
2.6. Aptitude à la callogénèse de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	69
3. RESULTATS ET DISCUSSION	78
3.1. Composition chimique du fenugrec (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.)	78
3.2. Analyse microbiologique	91
3.3. Etude de l'activité hypoglycémiante	92
3.4. Effet anti-inflammatoire	96
3.5. Effet antipyrétique du fenugrec	99
3.6. Culture <i>in vitro</i> du fenugrec	101
CONCLUSION	120
APPENDICES	
A. Liste des abréviations	
B. Méthodes physico-chimiques utilisées	
C. Fréquences d'absorption IR	
D. Appareillage	
E. Mode opératoire de la méthode déterminant la teneur en protéines	
F. Photos de l'étude anti-inflammatoire de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	
G. Photos de l'étude antipyrétique de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	

- H. Structure chimique des hormones de croissance
- I. Etude statistique
- J. Glossaire

REFERENCES

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1.1.	Plante du fenugrec	26
Figure 1.2.	Structure chimique des sapogénines stéroïdiques du fenugrec	33
Figure 1.3.	Structure chimique de la trigonelline	35
Figure 1.4.	Structure chimique de la choline	36
Figure 1.5.	Structure chimique de la coumarine	37
Figure 2.1.	Matériel végétal utilisé lors de l'expérimentation [A : graines (originale 2008) ; B : feuilles (originale 2008)]	44
Figure 2.2.	Protocole expérimentale de l'hyperthermie par l'endotoxine à 5EU/ml vis-à-vis de l'extrait aqueux des graines de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. et du paracétamol	68
Figure 2.3.	Types d'organogenèse contrôlés par les concentrations relatives d'auxine et de cytokinine	73
Figure 3.1.	Plaques CCM après révélation au chlorure d'antimoine ($SbCl_3$) (A : feuilles ; B : graines)	78
Figure 3.2.	Plaque CCM après révélation au réactif de Dragendorff pour l'extrait méthanolique des graines	79
Figure 3.3.	Plaque CCM après révélation au réactif d'iodoplatinate pour l'extrait méthanolique des graines	79
Figure 3.4.	Plaque CCM après révélation à la vanilline sulfurique pour les extraits méthanoliques des graines	81
Figure 3.5.	Plaque CCM après révélation à la potasse alcoolique 5% pour l'extrait chloroformique des graines	82
Figure 3.6.	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	86
Figure 3.7.	L'huile essentielle de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. extraite des graines	87
Figure 3.8.	Spectre infra rouge de l'huile essentielle extraite du fenugrec de l'Algérie	90
Figure 3.9.	Spectre infra rouge de l'huile commerciale du fenugrec de l'Egypte	90
Figure 3.10.	Absence de zones d'inhibition (A : huile essentielle du fenugrec ; B : extrait alcoolique du fenugrec)	92
Figure 3.11.	Courbes du taux du glucose sanguin en fonction du temps et des doses de l'extrait aqueux des graines du fenugrec	93
Figure 3.12.	Courbes du taux du glucose sanguin en fonction du temps et des doses de l'extrait méthanolique des graines du fenugrec	94

Figure 3.13.	Courbes des pourcentages d'inhibition de l'œdème en fonction du temps et des doses avec l'huile essentielle du fenugrec	97
Figure 3.14.	Courbes des pourcentages d'inhibition de l'œdème en fonction du temps et des doses avec l'extrait aqueux du fenugrec	98
Figure 3.15.	Courbes d'évolution des pourcentages d'inhibition de l'œdème en fonction du temps et des fortes doses comparativement au Diclofénac	98
Figure 3.16.	Dose inhibitrice de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux du fenugrec à la cinquième heure	99
Figure 3.17.	Evolution des températures moyennes avant et après le traitement	100
Figure 3.18.	Courbes de germination des graines du fenugrec cultivées <i>in situ</i>	102
Figure 3.19.	Courbes de germination des graines du fenugrec cultivées <i>in vitro</i>	104
Figure 3.20.	Vitro-semis obtenus après 10 jours de culture	104
Figure 3.21.	Courbe de croissance et de développement des plantules après 10 jours de culture <i>in vitro</i>	105
Figure 3.22.	Absence de formation des cals sur le fragment mis en culture sur un milieu MS sans régulateurs de croissance (A : hypocotyle ; B : feuille ; C : racine)	106
Figure 3.23.	Callogenèse sur fragments d'hypocotyle après 4 semaines de culture sur le milieu MS contenant (A : 1 mg/l de 2,4-D ; B : 1 mg/l de l'ANA)	107
Figure 3.24.	Callogenèse sur fragment d'hypocotyle après 4 semaines de culture sur le milieu MS contenant (A : 1 mg/l de BAP ; B : 1 mg/l de l'ANA)	107
Figure 3.25.	Effet de la composition hormonale sur le taux de callogenèse des explants en milieu MS après 4 semaines de la culture	108
Figure 3.26.	Effet de la composition hormonale sur la croissance des cals en poids frais après 4 semaines de culture	109
Figure 3.27.	Effet de la composition hormonale sur la croissance des cals en poids sec après 4 semaines de culture	109
Figure 3.28.	Effet de la fragmentation de l'hypocotyle sur le taux de callogenèse en milieu MS après 4 semaines de culture	111
Figure 3.29.	Effet de la fragmentation de l'hypocotyle sur la croissance des cals en poids frais après 4 semaines de culture	111
Figure 3.30.	Effet de la fragmentation de l'hypocotyle sur la croissance des cals en poids sec après 4 semaines de culture	112

Figure 3.31.	Effet du repiquage sur la croissance des cals (A : cal non repiqué pendant 8 semaines de culture, arrêt de prolifération cellulaire et début de nécrose ; B : cal après repiquage et fragmentation)	113
Figure 3.32.	Cals mous obtenus à partir de l'hypocotyle cultivé <i>in vitro</i> (A: cal mous vert pâle ; B: cal mous vert)	114
Figure 3.33.	Cals friables obtenus à partir de l'hypocotyle cultivés <i>in vitro</i> (A: cal friable chlorophyllien ; B: cal friable jaune)	114
Figure 3.34.	Cals compacts chlorophylliens avec nodules obtenus à partir des feuilles cotylédonaire cultivés <i>in vitro</i>	115
Tableau 1.1.	Classification du fenugrec (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.) selon différents auteurs	24
Tableau 2.1.	Préparation de la courbe d'étalonnage	52
Tableau 2.2.	Souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne	61
Tableau 2.3.	Compositions des solutions minérales de MS	72
Tableau 2.4.	Solution vitaminique de MOREL (1952) en mg pour 100 ml	72
Tableau 2.5.	Régulateurs de croissance utilisés lors de l'expérimentation	75
Tableau 3.1.	Indice de mousse des deux parties de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. comparé à celui de <i>Saponaria officinalis</i> et <i>Spergularia rubra</i> L. appartenant à la famille des Caryophyllacées	80
Tableau 3.2.	Teneur en protéines brutes des graines et des feuilles du fenugrec	83
Tableau 3.3.	Teneur en composés phénoliques des graines et des feuilles du fenugrec	84
Tableau 3.4.	Absorbance des différentes concentrations en acide gallique	86
Tableau 3.5.	Quantité des flavonoïdes totaux dans 1000 mg de poudre des graines et des feuilles du fenugrec	86
Tableau 3.6.	Pourcentage des cendres dans la poudre des feuilles de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	87
Tableau 3.7.	Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle du fenugrec	88
Tableau 3.8.	Différents groupements structuraux de l'huile essentielle du fenugrec	89
Tableau 3.9.	Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et des extraits éthanoliques de l'espèce <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	91
Tableau 3.10.	Taux du glucose sanguin des souris normales après administration de l'eau physiologique	92

Tableau 3.11.	Evolution des températures moyennes enregistrées avant et après traitement par l'extrait aqueux des graines et par le paracétamol	99
Tableau 3.12.	Pourcentages d'inhibition de l'hyperthermie chez les lapins traités par rapport au témoin blanc (témoin 1)	101
Tableau 3.13.	Faculté germinative (%) des graines de fenugrec cultivées <i>in situ</i> à l'obscurité (O) et à la photopériode (L)	101
Tableau 3.14.	Faculté germinative (%) des graines de fenugrec cultivées <i>in vitro</i> à l'obscurité (O) et à une photopériode (L)	103
Tableau 3.15.	Effet de l'apport des auxines et des cytokinines seules sur le poids frais des cals	106
Tableau 3.16.	Effet du repiquage sur la croissance des cals	113
Tableau 3.17.	Effet des milieux de culture sur la nature et l'aspect des cals	118
Tableau 3.18.	Teneurs en phénols totaux, en tanins condensés, en cendres totales et quantité des flavonoïdes totaux au niveau des cals de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	119

INTRODUCTION

Depuis la nuit des temps, les humains apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicinales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autre au contraire semble plus fondées, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des humains [1] ; [2].

Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie reste un moyen de traitement largement utilisé. N'oublions pas que de tout temps, à l'exception des dernières décennies, les hommes n'avaient que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, à l'exemple du rhume ou de la toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. C'est pourquoi on utilise à nouveau l'absinthe chinoise (*Artemisia annua*) et surtout son principe actif pour soigner la malaria, lorsque les protozoaires responsables de la maladie résistent aux médicaments [1].

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels, est bien acceptée par l'organisme et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques [2] ; [3].

La phytothérapie continuera-t-elle à être appréciée à sa juste valeur, comme un large éventail de traitements équilibrés, sains, économiques et écologiques, ou ne sera-t-elle qu'une nouvelle activité économique, devant impérativement générer des bénéfices immédiats ?

En ce qui concerne l'Algérie, vu son importante superficie et sa diversité climatique, elle est riche en flore naturelle. La gamme des plantes médicinales et aromatiques fait partie du grand patrimoine végétal du pays, qui attache beaucoup d'importance à ces plantes, ainsi qu'à leur utilisation dans le domaine pharmaceutique qui vise à exploiter les principes actifs d'origine végétale.

Notre participation dans le cadre de la recherche sur les plantes médicinales, nous a mené à nous intéresser à l'étude du fenugrec « *Trigonella foenum-graecum* L. », une espèce cultivée en Algérie, et utilisée par la population locale.

Le but de notre étude est d'apporter des éléments de connaissances chimiques et biologiques, relatifs à la plante du fenugrec qui est très utilisée en phytothérapie. La méthode de travail que nous avons adoptée est basée sur une action pluridisciplinaire visant la valorisation de la matière végétale. Cette méthode permet de relier les éléments d'information apportés par les ethnobotanistes, les chimistes et les biologistes.

A l'effet d'atteindre le but que nous nous sommes assignée, nous avons procédé à :

1. L'identification, l'extraction et le dosage de certains composés chimiques de *Trigonella foenum-graecum* L.
2. L'étude biologique portant sur l'effet antimicrobien de *Trigonella foenum-graecum* L., ainsi que ses effets hypoglycémiant, anti-inflammatoire et antipyrétique.
3. La détermination du milieu et des conditions de culture favorables pour l'aptitude à la callogenèse de l'espèce *Trigonella foenum-graecum* L. ainsi que la composition chimique des cals obtenus *in vitro*.

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les plantes médicinales

1.1.1. Définition

Selon SCHAWENBERG et *al.*, (1977) [4], on appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces peuvent avoir des actions très différentes suivant leur préparation.

Les plantes médicinales sont des végétaux dans lesquels les éléments, et les forces de la nature engendrent des substances spéciales. Certaines sont capables de vivifier et de favoriser les fonctions de l'organisme humain. D'autres peuvent exercer une action thérapeutique sur des états pathologiques de ces fonctions [5].

Les plantes médicinales font appel à des formes galéniques diverses : plantes en nature, poudres, gélules de poudre, nébulisats, alcoolats, extraits, teintures et huiles essentielles [6].

1.1.2. Phytothérapie

La phytothérapie, étymologiquement le traitement par les plantes, est une méthode thérapeutique qui utilise l'action des plantes médicinales. On peut distinguer deux types de phytothérapie [7]:

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne, basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'O.M.S, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle. Elle est encore massivement employée dans certains pays dont ceux en voie de développement.
- Une pratique basée sur les avancées scientifiques et la recherche des principes actifs des plantes. Cette phytothérapie est assimilée aux médicaments. On parle alors de pharmacognosie.

Selon LAVERY (1999) [8], le terme « phyto » inclut toute la plante ou une partie de plante, que l'on peut utiliser pour fabriquer un remède, tels que les fleurs, les racines, les bulbes, les écorces et les graines. On y inclut également les plantes aromatiques, les épices et plusieurs fruits et légumes.

1.1.3. Récolte des plantes médicinales

D'après THURZOVA (1981) [9], la quantité en principes actifs dans la plante dépend de son biotope, de son stade de développement et de son âge. Toutefois, il est à signaler que la quantité et la composition en principes actifs varient au cours de la croissance ainsi qu'au cours de la journée. Les plantes médicinales seront donc cueillies lorsque la teneur en matières actives est la plus forte. La récolte se fait par temps sec, après le levé du soleil et la disparition de la rosée. Les parties aériennes de la plante se récoltent au moment de la floraison.

Quant aux parties souterraines, elles se récoltent en automne, c'est-à-dire après la mobilisation des réserves [10].

Au contraire, les plantes à huiles essentielles se récoltent le matin, avant le levé du soleil pour éviter l'évaporation des principes volatils [11].

1.1.4. Séchage et conservation des plantes médicinales

En dehors des plantes qui s'utilisent fraîches, il est nécessaire de faire sécher très soigneusement celles qu'on désire conserver. Il est très important que ce séchage se fasse rapidement, afin d'éviter l'altération des plantes, leur fermentation et la perte de leurs principes actifs [12]. Le séchage se fait à l'abri de la lumière, car les rayons solaires causent une déperdition des matières actives, un jaunissement et un brunissement rapides des végétaux, ainsi qu'une altération de leur valeur médicinale [9].

Selon DEBUIGUE (1984) [12], l'opération du séchage a pour but d'enlever aux plantes l'eau qu'elles renferment : il est évident que le mode de dessiccation sera variable selon les parties de la plante à conserver, l'eau n'étant pas répartie de la même façon, ni dans les mêmes proportions, dans les divers organes de la plante.

Les racines et les rhizomes, débarrassés de leurs parties abîmées, lavés avec un soin méticuleux, seront épongés, puis coupés en tranches, en lanières ou fendus suivant leurs dimensions. Ils seront mis à sécher au soleil ou au four [12].

Les tiges, les écorces et le bois sécheront au soleil, à l'air libre et sec, ou encore au four doux. Les feuilles et les plantes entières seront disposées sur des claies, à l'ombre, dans un endroit chaud et bien ventilé. Les feuilles doivent être mondées : cette opération peut s'effectuer avant ou après le séchage [12].

Les fleurs et les sommités fleuries sont assez difficiles à traiter (il en est de même de certaines feuilles : verveine ou menthe, par exemple). Il est important de conserver leur couleur, ce qui est assez délicat. Le mieux est de les déposer à l'ombre sur des claies, à 20-25°C, et en prenant la précaution de les recouvrir de papier gris, afin de préserver leur couleur. Les fruits charnus (airelles, baies de genévrier) seront séchés au soleil ou au four doux [12].

D'après LECLERC (1983) [13], le séchage est suivi d'une conservation. Toutes les drogues doivent être conservées à sec, et à l'obscurité, dans des récipients fermés. Elles peuvent être éventuellement conservées dans des boîtes en carton ou des sachets en papier. Lorsqu'il s'agit d'une quantité importante, on emploie des sacs en toile, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Les emballages dans des sachets en plastique sont à éviter.

Certaines drogues sont particulièrement sensibles à l'humidité de l'air (drogues hygroscopiques). Elles sont conservées exclusivement dans des bouteilles en verre brun [14].

Selon ISERIN (1996) [1], pour une bonne conservation des drogues, on vérifie souvent l'état des plantes. Toute trace d'humidité, de moisissure ou d'insectes qui altèrent leur valeur médicinale est à proscrire.

1.2. Les huiles essentielles

1.2.1. Définition

Les huiles essentielles sont des liquides aromatiques appelées aussi essences aromatiques. Elles sont des complexes de molécules volatiles et odorantes, issues du métabolisme secondaire de la plante [15].

Le terme « huile » provient du fait que les substances volatiles sont visqueuses et hydrophobes et qu'elles ont la propriété de se solubiliser dans l'alcool et l'huile grasse, mais pas dans l'eau. La dénomination « essentielle » reflète le caractère principal des plantes à dégager des odeurs agréables [16].

D'après DUBOURG (1992) [17], les huiles essentielles sont des composés organiques, d'un caractère huileux, qui contiennent des terpènes, des sesquiterpènes et d'autres composants. Elles possèdent une action unique comme elles peuvent avoir de multiples fonctions : antifongique, antidiurétique, tonique, etc. Elles possèdent cependant une indication majeure due à l'importance éminente d'un principe actif.

1.2.2. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles peuvent se rencontrer dans toutes les parties vivantes de la plante comme : les racines du vétiver, les écorces du cannelier, le bois du camphrier, les fruits des agrumes, les feuilles du laurier et les fleurs du rosier [18].

Selon BERNARD et *al.*, (1988) [19], elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules où elles se rassemblent sous forme de gouttelettes. Ensuite, elles sont stockées dans des cavités résultant de la fusion de plusieurs cellules. Les mêmes auteurs déclarent que la synthèse et l'accumulation des huiles essentielles s'accompagnent de structures histologiques spéciales, différenciées et variables suivant les familles botaniques.

Les réservoirs des huiles essentielles se forment, soit par schizogonie (division et séparation), soit par lysogénie (fragmentation et désintégration), exemple [20]:

- ✓ Les poils sécréteurs des Lamiaceae,
- ✓ Les cellules sécrétrices des Lauraceae,
- ✓ Les canaux sécréteurs des Apiaceae et des conifères,
- ✓ Les poches sécrétrices des Rutaceae.

1.2.3. Procédés d'obtention des huiles essentielles

Selon AZOUDJ (1999) [21], le procédé d'extraction dépend de la localisation histologique de l'essence dans le végétal, de son utilisation dans les diverses industries et surtout selon la fragilité et la sensibilité de celle-ci aux températures élevées.

1.2.3.1. Distillation

C'est la méthode la plus simple et la plus répandue, découverte au 10^{ème} siècle par le grand médecin AICENE, elle représente 80% de la récupération des huiles essentielles.

D'une façon générale, la distillation est un procédé de séparation, basé sur la différence de composition entre un liquide et la vapeur engendrée des huiles essentielles. Celles-ci sont volatiles, lipophiles et entraînaibles à la vapeur d'eau. Cette technique implique la condensation de la vapeur par un système de réfrigération par un courant d'eau, et la récupération des fractions résultantes [22]; [23].

1.2.3.2. Enfleurage

Selon SALLÉ (1991) [22] et GAUCHER (2001) [23], cette opération très ancienne est réservée aux organes végétaux particulièrement fragiles qui sont les fleurs. Elle concerne l'extraction des parfums de ces dernières par contact avec une matière grasse. Ce procédé a tendance à disparaître car il est très coûteux ; néanmoins il se pratique encore pour le jasmin et la tubéreuse.

1.2.3.3. Expression

Cette technique concerne uniquement la récupération des huiles essentielles des agrumes (hespéridés) tel que les oranges, les mandarines, les pamplemousses, les citrons, etc. En industrie, le zeste du fruit est pressé à l'aide d'une presse hydraulique, l'huile obtenue est séparée de la phase aqueuse par centrifugation, après élimination des déchets solides [16].

1.2.3.4. Incision

D'après SALLÉ (1991) [22], ce procédé est rarement utilisé, il est spécifique aux écorces des arbres. Il suffit d'inciser l'écorce pour récolter le suc, comme chez le caoutchouc de l'hévéa.

1.2.3.5. Extraction par solvants organiques

Selon BOUMGHAR (1989) [24], de nombreuses usines se sont développées autour de ce procédé. Les solvants mis en œuvre sont le cyclohexane qui a remplacé le benzène des hydrocarbures aliphatiques, et l'anhydre carbonique à l'état supercritique. C'est précisément le développement de l'industrie pétrolière à la fin de ce dernier siècle qui a aidé au développement de cette méthode.

Certaines huiles essentielles ont une densité voisine de l'eau et le procédé par distillation à la vapeur d'eau ne peut être utilisé. C'est une méthode très employée, qui consiste à faire macérer la plante dans le solvant à froid afin de faire passer les substances odorantes dans le solvant [22].

Les huiles essentielles ont la propriété d'être solubles dans les solvants organiques (pentane, hexane, éther de pétrole, etc.). Les solvants à température d'ébullition peu élevée sont employés pour éviter la décomposition des molécules odorantes les plus fragiles [25].

1.3. Biologie de l'espèce

1.3.1. Généralités

Le fenugrec est une herbe méditerranéenne et asiatique, annuelle avec des graines aromatiques brunâtres contenues dans des cosses falciformes. Les graines renferment du mucilage, de la choline, une huile volatile à forte odeur, 27% de protides, des sels minéraux, des flavonoïdes, de la trigonelline (dérivé de l'acide nicotinique) qui peut se transformer en nicotinamide (vitamine PP) et de nombreux stérols. Les glucides sont particulièrement abondants : fibres (cellulose, hémicelluloses, etc.) et galactomannanes solubles. La graine constitue également une source potentielle de sapogénines utilisables pour l'hémisynthèse de

stéroïdes (3,26-diglucosides de furostène-5-triols et dérivés voisins donnant, entre autres et par dégradation, diosgénine et yamogénine) [4] ; [26].

Le fenugrec est employé dans le monde entier comme épice culinaire et comme une herbe médicinale pour apaiser les maux d'estomac et pour aider à maintenir des taux de sucre dans le sang. Le fenugrec est l'un des suppléments primaires employés pour soutenir le diabète type 2 ou mellitus de diabète noninsulino-dépendant. Avec ses concentrations phytochimiques élevées, la graine du fenugrec aide à réduire les taux de la glycémie et du cholestérol dans le sang ainsi que les triacylglycéroles de faible densité [26].

Les graines sont également utiles pour abaisser la fièvre. Quelques auteurs comparent leur capacité à celle de la quinine. Elles possèdent aussi un effet apaisant dans le traitement de la gastrite et des ulcères gastriques. Par ailleurs, elles sont souvent utilisées pour induire l'accouchement et pour augmenter la production de lait maternel. Extérieurement, les graines peuvent être appliquées comme pâte aux abcès et aux brûlures de festin. Elles rafraîchissent également, le mauvais souffle et aident à reconstituer un sens de goût alourdi. En outre, le fenugrec est employé, en Chine, dans le traitement du cancer du col de l'utérus [26].

1.3.2. Origine et répartition de la plante

1.3.2.1. Origine

Le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) est originaire de l'Indes et du Moyen Orient, où il existe à l'état spontané dans certaines contrées. Il croît abondamment en Perse, en Mésopotamie et en Grèce [27] ; [28].

Il a été signalé comme plante sub-spontanée en Asie mineure [29], en Orient et dans la région méditerranéenne [30] ; [31].

1.3.2.2. Répartition

➤ Dans le monde

Le fenugrec est largement cultivé dans plusieurs pays : en Inde, dans le Cachemire et les plaines du Gange, en Syrie, en Egypte, en Europe méridionale

et dans le bassin méditerranéen, notamment en France méridionale, en Espagne, au Portugal, au Maroc, en Tunisie, etc. [27] ; [32] ; [33].

➤ En Algérie

Le fenugrec a été signalé à l'état sub-spontané en Algérie ; dans les aghrems du Hoggar, à Tamanrasset et à Temassine [34]. Dans les Oasis, la Saoura et le Sahara central [35]; [36], ainsi que dans pratiquement tout le pays, excepté la zone côtière [37]. Dans le Sahara, il est connu par les autochtones, sous le nom d'Ibdouène [35].

1.3.3. Systématique

La classification botanique du fenugrec diffère d'un auteur à l'autre (Tableau 1.1). Néanmoins, la plus utilisée est celle de BATTANDIER et *al.*, (1890) [30].

D'après BONNIER (1927) [38], *Trigonella* vient du mot grec trigonons : triangulaire, signifiant que l'étendard et les ailes sont disposés en triangle.

Tableau 1.1 : Classification du fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) selon différents auteurs [27] ; [30] ; [32] ; [39] ; [40].

Classification	BATTANDIER et <i>al.</i>, (1890)	FOURY (1954) VILLAX (1963)	TUTIN et <i>al.</i>, (1969)	DAVIS (1969)
Classe	Dicotylédones	Dicotylédones	Dicotylédones	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales	Dialypétales	Dialypétales	Dialypétales
Ordre	Rosales	Rosales	Rosales	Rosales
Famille	Légumineosa	Légumineosa	Légumineosa	Légumineosa
Sous famille	Papilionaceae	Papilionaceae	Lotoidal	Trifoliae
Tribus	Lotées	Trifoliae	/	/
Sous tribus	Trifoliae	/	/	/
Genre	<i>Trigonella</i>	<i>Trigonella</i>	<i>Trigonella</i>	<i>Trigonella</i>

Il y a une grande controverse au sujet du nombre d'espèce que comprend le genre *Trigonella*. Deux cent soixante (260) espèces sont inscrites sous ce genre (cent quatre vingt deux (182) de LINNAEUS en 1885 et soixante dix huit (78) de 1886 à 1965). Mais en 1967, un examen minutieux, réalisé par FAZLI révèle approximativement quatre vingt dix sept (97) espèces. Pendant que VASIL'CHENKO (1953) a décrit cent vingt huit (128) espèces, HECTOR (1956), KAVADAS (1956), ROUK et MANGESHA (1963) et HUTCHINSON (1964), ont estimé que le genre compte soixante-dix (70) espèces [28].

Selon BACCOU (1984) [28], les espèces les plus connues du genre *Trigonella* dans le commerce et ayant fait objet d'études antérieures sont :

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| - <i>Trigonella foenum-graecum</i> | = Trigonelle fenugrec |
| - <i>Trigonella caerulea</i> | = Trigonelle bleue |
| - <i>Trigonella monspeliaca</i> | = Trigonelle de Montpellier |
| - <i>Trigonella esculenta</i> | = Trigonelle comestible |
| - <i>Trigonella gladiata</i> | = Trigonelle en glaive |
| - <i>Trigonella polyceratia</i> | = Trigonelle à cornes |

Le fenugrec est connu dans le monde entier sous plusieurs appellations : en espagnol, on parle de alholva ou fenogreco, en anglais de fenugreek ou trigonel, en italien de fieno greco ou sortola, en allemand de bockshornklee, en japonais de koroha, en portugais de alforva, en russe de pazhitnik, en finlandais de sarviapila, en hollandais de fenegriek, en chinois de k'u-tou et en arabe de hulba ou halba [41].

1.3.4. Description botanique

Le fenugrec est une plante herbacée (Figure 1.1) annuelle. Elle possède une racine principale bien développée avec des racines secondaires grêles comprenant des nodosités fixatrices d'azote en symbiose avec *Rhizobium meliloti* [26].

La tige est dressée avec une hauteur qui varie entre 5 et 70 cm selon les pays et dans un même pays selon les régions. Cette tige porte des feuilles alternées à trois folioles oblongues (trifoliées) dentées dans leurs parties

supérieures, à stipules entières soudées aux pétioles par leurs bases [27] ; [30] ; [38].

Les fleurs d'un blanc nuancé de jaune sont axillaires, solitaires ou groupées par deux, de 8 à 15 millimètres de longueur [36] ; [37].

Le fruit appelé gousse est de 2,5 à 15 cm de longueur. Il est trois fois plus long que large, plus ou moins arqué, parcouru de veines longitudinales. Les gousses contiennent 5 à 20 graines, dures presque lisses, couvertes de très petits tubercules non distincts à l'œil nu [30]; [37].

La graine est polyédrique, rhomboïdale, à ongles latéraux arrondis mais nettement tronqués aux deux extrémités. Elle mesure 4 à 6 mm de longueur avec un poids de 1000 graines variant de 8 à 23 grammes selon les cultivars. Aussi, elle est recouverte par un tégument de couleur variable jaune, un peu verdâtre, parfois rougeâtre et porte une dépression centrale contenant le hile et le micropyle [30] ; [42].

Il est important de noter que la plante, après dessiccation ainsi que les graines exhalent une forte odeur de réglisse pénétrante et persistante, il s'agit de la coumarine qui leur donne un parfum caractéristique [42].

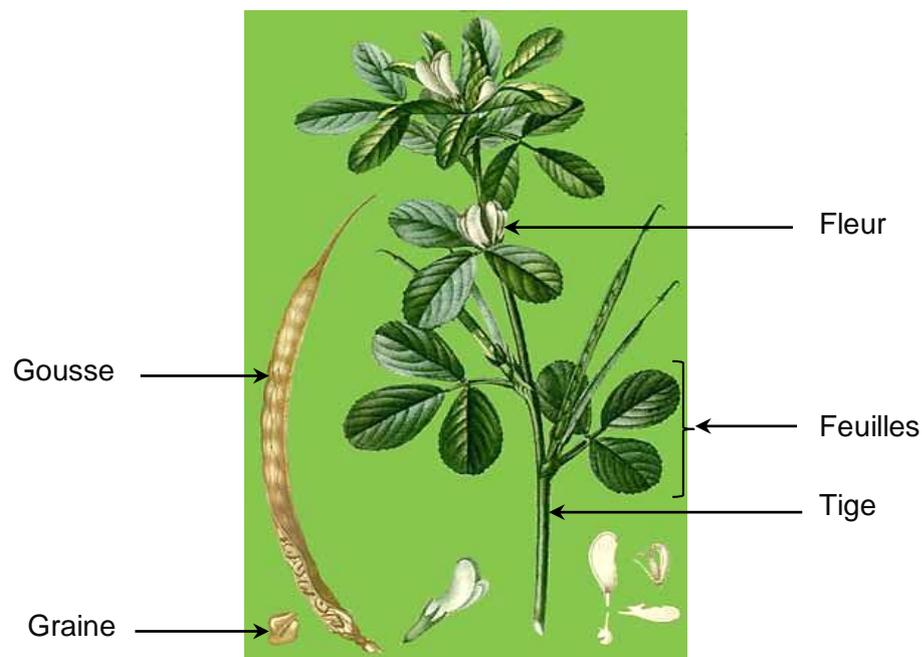


Figure 1.1 : Plante du fenugrec [42] ; [43].

1.3.5. Considération écologique

Le fenugrec s'adapte très bien dans le bassin méditerranéen et ne s'élève pas à une grande altitude dans les montagnes. On le sème aux mois d'Octobre et Novembre ; il fleurit déjà en Janvier, forme ses gousses en Février ou Mars lorsqu'il y a encore assez d'humidité pour favoriser sa croissance. Il est également cultivé avec succès dans les Oasis [32].

Bien que le fenugrec soit un autochtone de la région méditerranéenne d'Europe, il s'étend aussi, en Asie centrale et en Afrique du Nord. Il pousse aussi, d'une manière très satisfaisante, en Europe centrale, au Royaume-Unie et aux USA. Cette large distribution de sa culture dans le monde est caractéristique de son adaptation à des conditions environnementales et climatiques variables. Le fenugrec est convenable pour les régions caractérisées par une chute de pluie modérée ou basse. Une saison croissante modérée et fraîche sans températures extrêmes est favorable pour un meilleur développement du fenugrec. Il peut tolérer une température de 10 à 15°C [31] ; [38].

Le fenugrec s'adapte bien à la sécheresse de l'été et à la pluie de l'hiver. Il n'aime pas l'hiver sévère et l'été pluvieux, mais il résiste au froid, surtout quand il est couvert par la neige. Le fenugrec de la Grèce pousse généralement en hiver dans les régions à climat doux et en été dans les régions où le sol garde une humidité appropriée [32].

Le fenugrec des régions à hiver doux, est semé en automne pour mûrir au printemps [31]. Aussi, le fenugrec d'Ethiopie pousse dans les régions dont les conditions climatiques sont proches de celles de la région méditerranéenne. Le climat de ces régions est principalement subtropical et est caractérisé par un temps humide suivi par un temps sec [44].

Selon FAZLI et HARDMAN (1968) [45], il y a des indications, d'un possible avantage des nuits plus froides sur le contenu de la graine en saponines.

En conclusion, le fenugrec se développe dans des régions à climat modéré avec un hiver doux et un été frais. Cependant, les conditions chaudes et sèches sont désirables pour la maturation des cosses.

Selon VILLAX (1963) et LAPEYRONIE (1982) [32] ; [33], ses exigences à l'égard du sol sont très modestes, le fenugrec pousse bien dans des endroits très divers tels que les sols silico-argileux, argilo-calcaires, mais craint les sols lourds et acides. En plus, le fenugrec croît assez bien sur du gravier ou sols sablonneux, comme il est assez tolérant aux sols salins [31].

1.3.6. Considération agronomique

Selon FOURY (1954) [27], le semis est effectué après les premières pluies d'automne à raison de 10 à 30 kg/ha, en lignes espacées de 40 à 50 cm ou à la volée pour la production de semences ou de fourrage. Lorsque le fenugrec est employé comme engrais vert, la densité de semis doit être augmentée jusqu'à 50 à 60 kg/ha.

Le semis doit être fait superficiellement de 3 à 5 cm selon VILLAX (1963) [32] et de 1,5 à 2 cm selon LAPEYRONIE (1982) [33]. Si le semis est effectué en ligne, le binage est nécessaire.

Selon VILLAX (1963) [32], pour l'affouragement, on le fauche au début de la floraison, généralement au mois de Janvier, ensuite, on peut le faire pâturer. Pour la production d'engrais vert, on l'enfuit au mois de Janvier. Quant à la production de graines, la récolte se fait à maturité complète, au mois d'Avril.

1.3.7. Importance de la plante

1.3.7.1. Intérêt économique

Les graines du fenugrec constituent un potentiel économique en médecine vétérinaire, elles servent à augmenter les productions lactées. Le fenugrec est également employé pour l'alimentation du bétail, comme fourrage associé à des graminées. Notons également que l'odeur du fenugrec éloigne les charançons et divers insectes nuisibles [27] ; [46].

Le fenugrec contient l'une des plus importantes matières premières pour la fabrication de stéroïdes : la diosgénine. Il est important de relever que le Mexique qui est le principal exportateur mondial de la diosgénine extraite à partir de tubercules de Dioscoracées (famille de plantes exotiques) a arrêté toute

exportation en 1980. Cet arrêt était dû à la raréfaction et à la diminution de la qualité de ces tubercules exclusivement récoltés dans la nature [28].

Devant cette situation, les sociétés pharmaceutiques se sont intéressées à une autre source de diosgénine : le fenugrec. En effet, compte tenu de la teneur en diosgénine, de la graine du fenugrec (0,8%) et des rendements en graines de 30 quintaux/ha/année en moyenne, il est possible d'obtenir une production de 24 kg/ha de diosgénine. Alors que pour *Dioscorea parviflora* et *Dioscorea zingiberensis* cultivées en Chine, leurs rendements annuels en diosgénine varient entre 11,7 kg/ha à 15 kg/ha [28].

En Algérie, le fenugrec est utilisé traditionnellement comme plante médicinale et condimentaire. Il est cultivé de façon marginale depuis le littoral, les hautes plaines, les Oasis jusqu'au Hoggar [47].

Selon le ministère de l'agriculture et de la pêche, ce n'est que pendant les campagnes de 1985 et 1986, qu'une superficie totale de 458 ha a été réservée au fenugrec, sur une superficie totale de 550 ha destinée aux plantes condimentaires. Durant la période de 1980 à 1986, une augmentation sensible des importations des graines du fenugrec a été enregistrée. Elle passe de 136 tonnes en 1980 à 450 tonnes en 1986 [47].

Depuis, un programme de développement a été établi en 1987 pour les espèces condimentaires qui consiste en une augmentation des superficies de 4800 ha dont 170 ha prévu pour le fenugrec avec une production prévisible de 255 tonnes [47].

Malheureusement, cette perspective de développement n'a pas abouti, et à ce jour aucune trace de bilan statistique ne mentionne la culture du fenugrec à travers le territoire algérien. Cette dernière reste encore une culture marginale qui a tendance à se perdre [47].

1.3.7.2. Intérêt thérapeutique

Le fenugrec est connu comme étant une plante médicinale ayant des propriétés thérapeutiques multiples. Cette plante contient l'une des plus importantes matières premières pour la fabrication des stéroïdes : diosgénine [28].

Les résultats d'une enquête réalisée en 1976 aux USA à partir de 1,5 milliards de prescriptions médicales, placent en tête les médicaments stéroïdiques issus de la diosgénine, avec une fréquence de 65 % nettement supérieure à celle des substances alcaloïdiques [28].

Le fenugrec constitue l'une des nombreuses légumineuses possédant des propriétés thérapeutiques connues depuis des siècles. Certaines gélules ont été fabriquées à base de fenugrec et sont préconisées pour la prise de poids, l'augmentation de l'appétit chez les personnes souffrant d'anorexie et de diabète léger [48]. Nous pouvons citer à titre d'exemple la biotrigone qui est un médicament préconisé pour la prise de poids et l'augmentation de l'appétit [49] ; [50].

Outre leurs qualités reconstituantes, les graines du fenugrec sont utilisées dans les troubles digestifs et intestinaux pour leurs propriétés laxatives et carminatives [28].

Les graines ont permis la fabrication de médicaments hormonaux, cortisoniques et contraceptifs. Précisons, qu'une grande partie des médicaments et d'hormones stéroïdiques sont fabriqués à partir des sapogénines et en particulier la diosgénine qui constitue le précurseur le plus polyvalent et que l'on extrait industriellement à partir des plantes exotiques. Ainsi, trouver une source locale de cette substance et pouvoir l'obtenir dans des conditions économiques rentables, a constitué le but initial de tous les travaux sur le fenugrec [28] ; [51].

Grâce à une nouvelle méthode d'extraction de la diosgénine à partir des sapogénines stéroïdiques, BACCOU en 1984 [28], a pu obtenir cette substance chez le fenugrec avec un excellent rendement et a pu doser toutes les sapogénines quelles que soient leurs particularités structurales.

Les graines sont connues également pour leurs propriétés antidiabétiques et amélioratrices de la lactation [28]. RIBES et *al.*, (1986) [52], ont montré une réduction de la cholestérolémie chez le rat consommant les graines du fenugrec.

En usage externe, le fenugrec possède des propriétés émollientes et résolutive : il soigne les furoncles, les enflures, les ulcérations et les engelures [53].

1.3.7.3. Intérêt agronomique

1.3.7.3.1. La plante entière

Selon BACCOU (1984) [28], l'intérêt agronomique du fenugrec réside dans son aptitude à la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique et l'enrichissement du sol en azote (engrais vert). Cette plante constitue un excellent précédent cultural prouvé, en réalisant une culture de maïs et de tournesol au cours de la même année.

Le fenugrec est aussi utilisé pour la création de prairies annuelles et peut servir à l'affouragement en vert ou au pâturage. Il sera alors mélangé après la récolte avec la paille, ou, avant le semis, avec d'autres espèces de graminées plus savoureuses pour faciliter son affouragement telles que : l'orge et l'avoine (dans ce cas on sème 90 à 120 kg/ha de mélange dont 1/3 de fenugrec) [32].

1.3.7.3.2. Les graines

Les graines sont également utilisées pour l'engraissement des animaux afin d'exciter l'appétit du bétail (notamment des bovins et des équidés) et de la volaille [33]. Cependant les déficiences en acides aminés soufrés dans les rations apportées doivent être corrigées par un apport synthétique et, les facteurs antinutritionnels (alcaloïdes), par un prétraitement (germination, fermentation, décorticage). La dose journalière à apporter ne doit pas dépasser 100 à 300 g par animal [32].

Il est important de suspendre l'administration du fenugrec 15 jours à 2 mois avant l'abattage pour éviter une odeur trop forte de la viande [27] ; [33].

1.3.8. Etude biochimique

D'après PERROT (1944) [54], la graine est composée de :

- ✓ 7,36 % de matières grasses.
- ✓ 40,72 % de matières amylacées.
- ✓ 28,91 % de substances azotées.

Comme de nombreuses plantes médicinales, le fenugrec est très riche en minéraux, qui participent activement à son activité thérapeutique [55]. La teneur

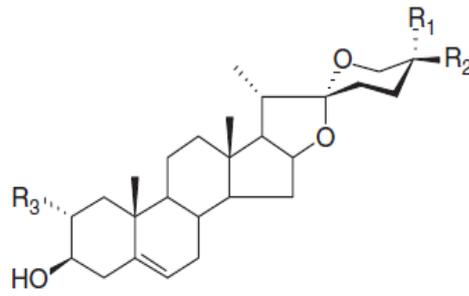
en phosphate chez le fenugrec est élevée et provient des phytines, des nucléoalbumines et des lécithines. Les graines renferment également, du fer, du soufre, du cuivre, du magnésium, du calcium, du potassium, du chrome, du cobalt, du zinc, du manganèse, du sélénium, du silicium et du sodium [56] ; [57].

Bien qu'elles soient souvent négligées, de nombreuses plantes médicinales sont particulièrement riches en vitamines. Le fenugrec, contient les vitamines A, B1, B2, B3, B6, B8, B12, C, et K [26].

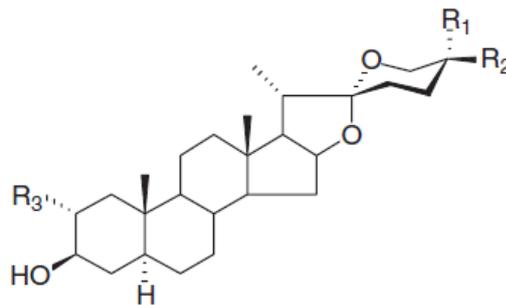
Les composants chimiques les plus importants sont :

1.3.8.1. Les saponines stéroïdiques

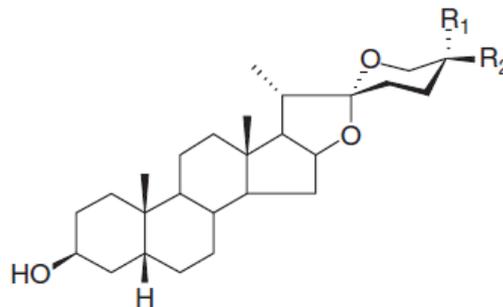
Les saponines stéroïdiques sont constituées par une osidique et par une sapogénine, elles représentent 3,85% de la matière sèche des graines. SAUVAIRE et BACCOU en 1978 [57], montrent qu'après hydrolyse acide, des sapogénines stéroïdiques sont récupérées avec comme principal produit la diosgénine [Spirost-5-én-3-ol-(3- β , 25R)-]. Cette sapogénine stéroïdique est le point de départ de nombreuses réactions chimiques et biotechnologiques aboutissant à des médicaments tels que les corticostéroïdes, les hormones sexuelles, les anabolisants, les contraceptifs et les spironolactones. En outre, la graine du fenugrec renferme d'autres sapogénines (Figure 1.2) dont : yamogénine, gitogénine, tigogénine, néotigogénine, néogitogénine, smilagénine, sarsapogénine et yuccagénine [58].



	R ₁	R ₂	R ₃
Diosgénine	H	CH ₃	H
Yamogénine	CH ₃	H	H
Yuccagénine	H	CH ₃	OH



	R ₁	R ₂	R ₃
Gitogénine	H	CH ₃	OH
Tigogénine	H	CH ₃	H
Néotigogénine	CH ₃	H	H
néogitogénine	CH ₃	H	OH



	R ₁	R ₂
Sarsapogénine	H	CH ₃
Smilagénine	CH ₃	H

Figure 1.2 : Structure chimique des sapogénines stéroïdiques du fenugrec [59].

1.3.8.2. Les galactomannanes

Les galactomannanes ont la structure d'une chaîne polysaccharidique neutre, constituée d'un squelette linéaire composé d'unités (1-4)- β -D-mannopyranosyl et de branchements latéraux très courts formés d'unités de D-galactopyranose reliées en C₁₆ à la chaîne principale de mannoses. Chaque galactomannane est caractérisé par le rapport taux de mannoses/taux de galactoses (M/G). Ce rapport qui détermine le degré de substitution de la chaîne polysaccharidique est en fait une moyenne. La périodicité de la répartition des galactoses le long de la chaîne de mannoses étant irrégulière [60].

La solubilité des galactomannanes est liée à la présence de résidus-D-galactopyranosyl sur le squelette linéaire de mannoses. Elle est inversement proportionnelle au rapport M/G [55].

Ces fibres solubles permettent de [55]:

- réduire le LDL cholestérol (mauvais cholestérol),
- maintenir le HDL cholestérol (bon cholestérol),
- donner un effet modérateur d'appétit.

1.3.8.3. Le mucilage

Les mucilages sont des polysides hétérogènes, polymères d'oses et d'acides uroniques contenus dans l'albumen de diverses graines. Ils présentent un fort pouvoir de rétention d'eau, ils sont peu dégradés par le colon, et sont fermentescibles. Les principales espèces mucilage sont la graine de lin, le séné, la mauve, le guar, la caroube et l'ispaghul. Le mucilage est essentiellement employé en tant qu'agent de texture dans l'industrie alimentaire et largement utilisé en thérapeutique dans certaines pathologies digestives et métaboliques comme adjuvant dans les traitements du diabète noninsulino-dépendant, de l'hypercholestérolémie, des hyperlipémies et de l'obésité [55] ; [60].

1.3.8.4. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont souvent amers. Ce sont des composés azotés, basiques, (d'où l'appartenance à la famille des amines). Ces derniers les rendent

pharmaceutiquement très actifs. D'origine naturelle et de distribution restreinte, les alcaloïdes existent sous la forme de sels solubles ou sous forme d'une combinaison avec les tanins [60].

D'après GUIGNARD (2000) [61], leur chimie est complexe et on les classe, selon la composition de leur noyau, en différents groupes. On les rencontre surtout chez les angiospermes, sont très peu présents chez les thallophytes, les gymnospermes et les ptéridophytes. Au niveau cellulaire, ils s'accumulent dans les vacuoles, et constituent la source la plus importante de nos médicaments.

Les alcaloïdes renfermés dans la graine du fenugrec se présentent par la trigonelline et la choline [62].

1.3.8.4.1. La trigonelline

La trigonelline est un alcaloïde dont la formule chimique est : $C_7H_7NO_2$ (N-méthyl-pyridinium-3-carboxylate). C'est un sel intérieur constitué par l'addition d'un groupe méthylique à l'atome d'azote de la niacine (Figure 1.3). C'est un produit du métabolisme de la niacine (vitamine B3) qui est excrétée dans l'urine [63].

Cet alcaloïde se répartit dans le plant d'une façon très dense, il peut servir comme une forme de conservation de l'acide nicotinique. Comme, il peut avoir une signification d'ordre physiologique par son action similaire à la kinétine, dans l'inhibition du jaunissement des feuilles isolées d'épis de blé [62] ; [63].

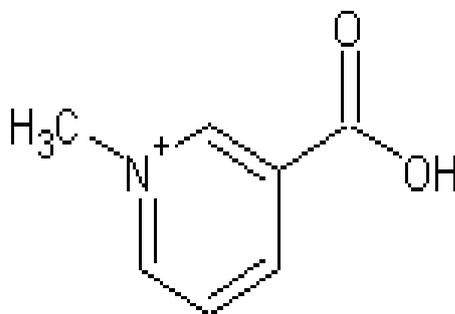


Figure 1.3 : Structure chimique de la trigonelline [58].

1.3.8.4.2. La choline

La choline est une molécule de la famille des alcools aminés, elle est chargée positivement, de formule chimique $(CH_3)_3N^+CH_2CH_2OH$ et de masse

molaire $104,2 \text{ g.mol}^{-1}$ (Figure 1.4). La choline est aussi connue sous le nom de 2-hydroxyéthyl triméthylammonium, elle est présente en grande quantité, sous forme de phosphatidylcholine (appelée aussi lécithine), un des lipides garantissant l'intégrité des membranes cellulaires [63].

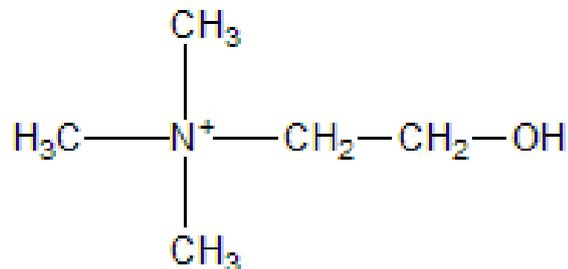


Figure1.4 : Structure chimique de la choline [26].

1.3.8.5. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des combinaisons naturelles de phénol avec des noyaux aromatiques. En fonction de leur structure et du degré d'oxydation, ils se divisent en flavonole, flavones et flavonones [61].

Selon BRUNETON (1999) [60], les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet.

Les flavonoïdes ont une large gamme d'effets pharmacologiques sur l'organisme. Ils augmentent la solidité des capillaires, participent aux processus oxydants et désoxydants et produisent des effets spasmolytiques et anti-inflammatoires [61].

1.3.8.6. L'huile

Le fenugrec contient des proportions intéressantes d'acide linoléique et d'acide linoléique. Elle représente environ 6,7 % de la masse de la matière sèche des graines. Cette huile pourrait être employée dans la fabrication des résines alkydes utilisées dans l'industrie des peintures [56].

1.3.8.7. Les protéines

La teneur en protéine varie entre 20 à 30 % du poids de la graine sèche [28] ; [64].

Les recherches ont montré que les protéines peuvent être concentrées à près de 70 % du poids du tourteau après les différents processus de transformation de la graine (après décorticage et récupération de l'huile et des sapogénines stéroïdiques) [65].

1.3.8.8. Les coumarines

La coumarine est une molécule aromatique au sens olfactif (Figure 1.5). Elle est présente sous forme glycoconjuguée chez certaines graminées (ex : la flouve odorante) [60].

D'après IGOR PASSI (2002) [66], plusieurs coumarines ont des propriétés bactériostatiques, ces composés représentent donc des phytoalexines chez un certain nombre de plantes (ex : la scopolétine qui s'accumule chez le tabac au cours de la réaction hypersensible). Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et péroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité anti-péroxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes.

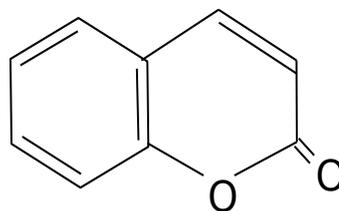


Figure 1.5 : Structure chimique de la coumarine [26].

1.4. Les biotechnologies et l'amélioration des plantes

1.4.1. Introduction

Depuis le début de l'agriculture, l'homme a cherché à améliorer les plantes qu'il cultivait, par rapport à des critères de qualité ou de rendements correspondant à ses besoins. L'objectif de l'amélioration des espèces végétales

est de créer de nouvelles variétés combinant un certains nombres de caractères définis par le sélectionneur [67].

L'innovation technologique et génétique et l'arrivée des biotechnologies végétales ont permis d'apporter des solutions de choix pour beaucoup d'espèces où la multiplication n'est pas aisée par bouturage ou coûteuse par greffage [68]. En effet, des chercheurs ont adapté les techniques de culture *in vitro* et se sont investis dans l'établissement de ces méthodes propres à chaque sélection. Il en résulte que l'application des techniques de culture *in vitro* et de biotechnologies permet l'obtention de génotypes nouveaux et performants en un temps moindre, pour la réalisation d'un programme de création variétale à comparer avec les programmes de sélection classique [69].

1.4.2. Principales techniques appliquées aux plantes

Toute cellule végétale vivante, quelque soit sa spécialisation, du moment qu'elle est vivante et possède un noyau, est capable de reproduire la plante entière d'où elle provient. C'est à cette remarquable capacité (totipotence) de la cellule végétale que la culture *in vitro* doit toute son extension [70].

La culture *in vitro* consiste à cultiver des tissus ou des cellules dans des conditions totalement artificielles, elle sous-entend que les conditions d'asepsie sont totales [71].

La propagation asexuée des végétaux *in vitro* peut suivre des voies très différentes :

1.4.2.1. Techniques de multiplication conforme

Selon DERMARLY (1985) [72], le principe de la multiplication conforme consiste à prélever un fragment d'une plante, plus ou moins grand, de la taille d'une bouture et d'optimiser les conditions qui rappellent à l'environnement de la plante-mère. Cet ensemble prélevé sera suffisamment complet pour que le réseau de signaux permette la régénération d'un individu qui sera identique à la plante-mère. Plusieurs techniques permettant d'atteindre cet objectif :

- ✓ La micro-propagation qui peut suivre deux voies très différentes, dont le bourgeonnement axillaire et le bourgeonnement adventif.

- ✓ La culture de méristème.

1.4.2.2. Techniques de multiplication non conforme

Les techniques de multiplication non conforme consistent à cultiver *in vitro* un petit élément de tissus, une cellule à la limite. Ce petit fragment mis en culture *in vitro* dans des conditions qui ne réintroduisent pas un nombre de signaux de reconnaissance suffisant va donner une prolifération absolument désordonnée qui ne construira aucune forme cohérente. La morphogène correspondra souvent à un programme génétiquement variant. Les méthodes que l'on peut utiliser pour obtenir ces variations sont [72]:

- ✓ Culture de protoplastes.
- ✓ Embryogenèse somatique.
- ✓ Variation somaclonale.
- ✓ Transfert de gènes.
- ✓ Culture des haploïdes.

1.4.3. Organogenèse

L'organogenèse est définie comme étant la formation des organes. Trois programmes d'organogenèse majeurs sont identifiables : gemmaires, racinaires et embryonnaires [73].

1.4.3.1. La néoformation de bourgeons

Les bourgeons néoformés sur un cal en culture *in vitro* sont appelés bourgeons de néoformation [74].

Il existe une extrême diversité des organes utilisés d'une espèce à une autre pour provoquer la néoformation de bourgeons en culture *in vitro*. Pratiquement toutes les parties de la plante ont été utilisées à savoir des embryons, fragments de tiges ou de feuilles, fragments de plantules (hypocotyle, cotylédon, etc.) et explants d'inflorescence [75].

1.4.3.2. La variation somaclonale et régénération à partir de cals

1.4.3.2.1. Définition

La régénération de bourgeons à partir de cals provenant d'explants différents, sans méristèmes apparents ou de cellules individualisées, a permis de remarquer des phénotypes différents de la plante d'origine, appelés variants [76]. La variation obtenue par cette voie est qualifiée de somaclonale pour bien marquer son origine [77].

L'exploitation du phénomène somaclonal représente donc une nouvelle voie d'obtention de la variabilité pour le sélectionneur et vient indiscutablement enrichir les méthodes traditionnelles [76].

1.4.3.2.2. Les techniques de culture

Les somaclones variants peuvent être le résultat des cultures *in vitro* obtenues de différentes voies [76].

1.4.3.2.2.1. La culture des cals

Selon MARGARA (1982) [74], le cal est un tissu néoplastique, relativement homogène. Initialement, constitué d'un ensemble de cellules non organisées se divisant plus ou moins activement. Sa formation résulte à la fois de la levée d'inhibition consécutive à la séparation de l'explant et de l'action excitatrice des substances trophiques et des régulateurs de croissance du milieu de culture.

Cependant, la croissance des cals est en relation étroite et complexe entre le matériel végétal mis en culture, la composition du milieu et les conditions environnementales [78].

Il existe divers types de cals qui diffèrent par la taille, la texture ou par la forme. Outre cette hétérogénéité morphologique, il y a également des différences dans la croissance des cals [79].

1.4.3.2.2.2. La culture de cellules

Les techniques de cultures cellulaires, largement travaillées et mises au point par plusieurs auteurs, se caractérisent par une culture de cellules isolées en suspension dans un milieu liquide. Ce système de culture, est très perturbant sur

le plan génétique, d'ailleurs on observe des cellules aneuploïdes dans la majorité des cas [80].

1.4.3.2.2.3. La culture de protoplastes

Ce système de culture est très fortement inducteur de variabilité [80]. En effet, les néoformations de plantes après culture de protoplastes sont aussi une source de variants somaclonaux [76].

1.4.3.2.3. Facteurs ayant une action sur la variation somaclonale

1.4.3.2.3.1. Le matériel végétal

La variation somaclonale peut être obtenue à partir de n'importe quel explant. Cependant, la nature de l'explant (feuille, tige, racine, etc.) et son degré de ploïdie influencent la fréquence et les types de variations obtenus. Ordinairement, la variabilité génétique est peu fréquente chez les individus polyploïdes que chez ceux qui sont haploïdes ou diploïdes [81].

1.4.3.2.3.2. Méthodes de culture

Selon MEULMANS (1984) [77], elles constituent le deuxième groupe de facteurs connus pour exercer une influence sur la variabilité somaclonale. Certaines composantes du milieu de culture, parmi lesquelles des régulateurs de croissance, certains éléments nutritifs (sel, saccharose, etc.) ou encore des substances utilisées pour l'assainissement viral peuvent être la cause dans la néoformation de plantes anormales.

1.4.4. Culture *in vitro* et activité biochimique

Toute la stratégie de la sélection de souches végétales actives repose sur le potentiel des cultures de cellules *in vitro* à produire des métabolites les plus diverses. Cette capacité varie tant quantitativement que qualitativement d'une souche à une autre. De ce fait, le crible biochimique ne peut s'envisager que si l'on dispose d'un nombre élevé de souches à la fois pour une même espèce végétale, ou une même plante mais aussi pour des espèces très différentes. Plus la diversité en matériel végétal de départ sera grande, plus la variabilité biochimique obtenue *in vitro* sera importante [82].

Les niveaux d'activité relevés permettent de sélectionner les souches les plus performantes à partir desquelles seront isolées les molécules responsables de l'effet biochimique. Une telle démarche a été suivie par AREN et ses collaborateurs (1986), ainsi une souche de *Podophyllum versipelle* a été sélectionnée parmi 352 pour son activité anti-inflammatoire [83].

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

2.1. Screening phytochimique de *Trigonella foenum-graecum* L.

2.1.1. Choix de la plante

Le choix de notre plante est basé sur :

- Une observation de la pharmacopée européenne.
- Une recherche bibliographique avancée.

2.1.2. Origine géographique et période de récolte

Le matériel végétal est constitué de feuilles et de graines de l'espèce *Trigonella foenum-graecum* L. (Figure 2.1), cultivée à Tamanrasset (sud de l'Algérie) et récoltée au mois d'Avril 2008.

2.1.3. Préparation et conservation du matériel végétal

Après la récolte, le matériel végétal est débarrassé des débris. Pour s'assurer de la bonne conservation de notre plante, un séchage à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours a été réalisé. Il est ensuite conservé dans des flacons à l'abri de la lumière. Toutes ces opérations permettent de pallier la dégradation de certains constituants et contribuent à l'inhibition de toute activité enzymatique responsable de leur dénaturation.

2.1.4. Examen phytochimique

Les légumineuses, y compris le fenugrec, sont de plus en plus intégrées aux régimes alimentaires sains, afin de favoriser le bien-être général et de réduire les risques de maladies.

Dans ce but, les deux parties de *Trigonella foenum-graecum* L. constituées de graines et de feuilles ont été soumises aux tests phytochimiques.



Figure 2.1 : Matériel végétal utilisé lors de l'expérimentation
 A : graines (originale 2008) ; B : feuilles (originale 2008).

2.1.4.1. Terpénoïdes

Nous avons pesé deux grammes (2 g) de matériel végétal en poudre (graines et feuilles), auxquels nous avons ajouté 15 ml d'hexane. Le mélange a été soumis à une sonication de 15 min, une agitation de 30 min et à une filtration. Ensuite, une CCM a été effectuée, en utilisant comme solvant le benzène pur à 98-99 %. Après migration, nous avons pulvérisé la plaque du gel de silice avec du chlorure d'antimoine et nous l'avons placée à l'étuve à 110°C pendant 10 min.

Toute fluorescence observée à 365 nm indique la présence de terpénoïdes [84].

2.1.4.2. Alcaloïdes

Trois tests fondés sur la capacité, qu'ont les alcaloïdes à se combiner avec les métaux lourds ou avec l'iode ont été effectués [84].

2.1.4.2.1. Préparation des extraits méthanoliques

Deux grammes (2 g) de matériel végétal, sec et broyé, sont ajoutés à 100 ml de méthanol 50 %. Après une sonication de 15 min et une agitation toute la nuit, les extraits sont filtrés et évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les résidus sont repris dans quelques millilitres de méthanol pur. Ces extraits sont

soumis à deux tests basés sur la technique de la chromatographie sur couche mince (CCM) et un test de coloration et de précipitation.

2.1.4.2.2. Tests de révélation

2.1.4.2.2.1. Test de Draggendorf

- Une chromatographie sur couche mince (CCM) a été effectuée pour 30 µl d'extrait méthanolique.
- Nous avons utilisé un solvant de migration composé de l'acide éthylique, du méthanol et de l'hydroxyde d'ammonium à 50 % (9 v : 1 v : 1v).
- Après migration, les spots fluorescents à 365 nm ont été pulvérisés avec le réactif de Draggendorf (tétraiodobismuthate de potassium).
- Le réactif de Draggendorf a été préparé avec 0,85 g de bismuthate nitrate basique dissout dans un mélange de 10 ml d'acide acétique glacial et 40 ml d'eau. La solution obtenue a été versée dans un autre mélange formé de 8 g d'iodure de potassium et 20 ml d'eau.

L'apparition, en lumière visible, de taches oranges, témoigne de la présence des alcaloïdes.

2.1.4.2.2.2. Test d'iodoplatinate

- Une CCM a été effectuée pour 30 µl d'extrait méthanolique avec une phase mobile préparée avec les mêmes réactifs utilisés pour le test de Draggendorf.
- Ensuite, nous avons effectué une révélation avec le réactif d'iodoplatinate de potassium. Ce réactif est composé de 3 ml d'acide chloroplatinique à 10 % ajoutés au mélange constitué de 97 ml d'eau et 100 ml d'iodure de potassium à 6 %.

2.1.4.2.2.3. Test de Mayer

A 0,5 g de matériel végétal en poudre (graines et feuilles), nous avons ajouté 15 ml d'éthanol à 70 %. Après une sonication de 15 min et une agitation de 20 h, nous avons laissé reposer l'extrait jusqu'à décantation complète, suivie

d'une filtration et d'une évaporation à sec. Le résidu a été ensuite repris, dans quelques ml d'acide chlorhydrique à 50 %.

La formation d'un précipité jaune, après ajout de quelques gouttes du réactif de Mayer (mercuritétraiodure de potassium), témoigne de la présence des alcaloïdes.

2.1.4.3. Saponosides

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées.

Nous avons utilisé deux grammes (2 g) de matériel végétal, sec et broyé, pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau. Nous avons porté à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, nous avons réajusté le volume à 100 ml. A partir de cette solution-mère, nous avons préparé 10 tubes avec 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, et 10 ml. Le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée.

Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde en maintenant le tube fermé à l'aide du pouce. Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1 cm dans le X^e tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule :

$$I = \frac{\text{hauteur de mousse (en cm) dans le X}^e \text{ tube} \times 5}{0,0X}$$

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100.

Une approche qualitative sur des extraits méthanoliques, préparés selon la méthode décrite pour la recherche des alcaloïdes, se fait par CCM avec, comme solvants de migration, l'acide éthylique, le méthanol et l'eau distillée (100 v : 13,5 v : 4 v) et, comme révélateur, la vanilline sulfurique [85].

2.1.4.4. Coumarines

Deux grammes (2 g) de matériel végétal en poudre sont mélangés à 10 ml de chloroforme. Après un chauffage de quelques minutes et une filtration, les extraits chloroformiques sont soumis à une CCM, le solvant de migration étant le mélange toluène et l'acide éthylique (93 v : 10 v). La visualisation du chromatogramme, après migration et après révélation par la potasse alcoolique à 5 % se fait à 365 nm.

Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous UV [85].

2.1.4.5. Détermination de la teneur en protéine brute

2.1.4.5.1. Principe

La détermination de l'azote total est réalisée par la méthode KJELDHAL (1883) qui s'effectue en trois phases [86]:

- Minéralisation.
- Distillation.
- Titrage.

Le principe consiste à digérer la matière d'analyse par ébullition en présence d'acide sulfurique concentré. Dans ces conditions, l'azote est transformé en ammoniacque fixé par l'acide sulfurique, le carbone et l'hydrogène sont transformés en CO₂ et H₂O. A la fin d'opération, nous disposons d'une solution de sulfate d'ammonium. Par alcoolisation de cette solution, nous déplaçons l'ammoniacque que l'on entraîne par courant de vapeur d'eau [87].

2.1.4.5.2. Mode opératoire

2.1.4.5.2.1. Minéralisation

Nous avons introduit dans un ballon en verre, 0,5 g environ de l'échantillon (poudre de graines et de feuilles de fenugrec). Puis, nous avons ajouté 0,5 g d'un mélange de catalyseur [sulfate de potassium (K₂SO₄) + mercure II oxyde rouge (HgO)] et 10 ml d'acide sulfurique pur. Ensuite, nous avons agité et placé le ballon sur le dispositif de chauffage.

L'ensemble a été chauffé doucement et progressivement jusqu'à ce que la couleur noire disparaisse pour laisser place à une couleur transparente (Appendice E). Par cette opération, l'ensemble de l'azote organique est transformé en azote minéral sous forme d'ammoniaque.

Enfin, nous avons transvasé l'échantillon minéralisé dans une fiole, et nous avons ajouté 50 ml d'eau distillée [86].

2.1.4.5.2.2. Distillation (Unité de distillation Buchi K 314)

Elle consiste en la libération de l'ammoniaque par l'action de la soude qui est retenue dans l'acide borique.

- 10 ml du contenu de la fiole (solution d'essai) est diluée par l'eau. Cette solution d'essai doit être diluée environ dans le rapport 1/2 (1 partie de minéralisât, 2 parties d'eau distillée).

- Puis nous avons ajouté la soude caustique à 32 %; la quantité de la soude mesurée est dans le rapport 1/3 (1 partie de minéralisât, 3 parties de soude caustique).

- Nous avons ensuite recueilli le distillat dans 60 ml d'acide borique à 2 % et nous avons ajouté quelques gouttes d'indicateur de tachiro (10 ml de méthyle rouge à 0,03 % dans l'éthanol 70 % et 1,5 ml de bleu de méthylène). La durée de la distillation requise est environ de 4 min [86].

2.1.4.5.2.3. Titrage

- Le distillat est titré par l'acide sulfurique 0,5 N, jusqu'à l'obtention d'une couleur violette correspondant au virage de l'indicateur de tachiro (Appendice E).

- Le calcul de l'azote total est réalisé selon la formule suivante [86]:

$$TN2 = \frac{(V1 - V2) \times f \times M(N) \times m \times 100 \times D}{501}$$

Avec :

V1 : Volume de titrage (échantillon) en ml.

V2 : Volume de titrage (blanc) en ml.

f: Facteur de correction de la normalité.

M (N) : Masse moléculaire d'azote (g/mol).

m : Masse de l'échantillon (g).

D : Facteur de dilution.

2.1.4.6. Dosage des composés phénoliques

2.1.4.6.1. Méthode d'extraction

- Nous avons mélangé 0,5 g de poudre de l'échantillon (graines et feuilles) avec 70 ml d'acétone et 30 ml d'eau à 100°C sous reflux pendant 40 min.

- Ensuite, nous avons ajouté du métabisulfite de sodium à 0,2 % dans l'eau à raison de 1 ml par 100 ml de mélange de solvant afin d'éviter les phénomènes d'oxydation dans l'extrait polyphénolique ou Solution A [88].

2.1.4.6.2. Dosage des phénols totaux (Méthode de bleu de Prusse)

2.1.4.6.2.1. Principe

Cette méthode est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) par les composés phénoliques, qui conduit à la formation d'un complexe de couleur bleu de Prusse, d'où le nom de la méthode [89].

2.1.4.6.2.2. Mode opératoire

Le protocole de dosage que nous avons appliqué consiste en:

- Une prise d'essai de 7 ml d'extrait (Solution A) est additionnée de 10 ml d'eau distillée.

- A laquelle, nous avons ajouté 1 ml de réactif de chlorure ferrique (FeCl_3 0,1 M dans HCl 0,1 N), suivi immédiatement de 1 ml d'hexacyanoferrate de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 0,008M.

- Ensuite, nous avons laissé réagir 10 min exactement à température ambiante.

- L'absorbance est mesurée à 725 nm.

2.1.4.6.2.3. Expression des résultats

Le calcul de la teneur en phénols totaux exprimée en mg/g est donné par la formule:

$$T = \frac{A \times V \times D}{m} \times 100$$

Avec:

T: Teneur en phénols totaux.

A: Absorbance à la λ max.

V: Volume d'extrait total.

D: facteur de dilution.

m: Masse de la matière sèche.

2.1.4.6.3. Dosage des tanins condensés (Test de vanille avec H₂SO₄)

La méthode de détermination du taux des tanins condensés a été proposée par SWAIN et HILLIS en 1959 [89].

2.1.4.6.3.1. Principe

Ce test est basé sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanille en milieu acide [90].

2.1.4.6.3.2. Mode opératoire

Solution B: [Vanille à 1 % dans 70 % d'acide sulfurique].

Dans un tube, nous avons mélangé 2 ml de solution B et 1 ml de solution A (préparé lors du dosage des composés phénoliques). Ensuite, nous avons mis le tube dans un bain marie pendant 15 min à 20°C et nous avons mesuré l'absorbance à 500 nm [89].

2.1.4.6.3.3. Expression des résultats

La teneur en tanins condensés est calculée par la formule [89] :

$$T = 5,2 \times 10^{-2} \times \frac{DO \times V}{m} \times 100$$

$5,2 \times 10^{-2}$: Constante exprimé en équivalents de cyanidines.

DO: Densité optique.

V: Volume d'extrait utilisé.

m: Masse de l'échantillon.

2.1.4.6.4. Dosage des tanins hydrolysables

2.1.4.6.4.1. Principe

La méthode de MOLE et WATERMAN (1987) [91], est basée sur une réaction avec le chlorure ferrique.

Le mélange, extrait tannique plus réactif (FeCl_3), provoque la coloration rouge violette du complexe d'où la formation des ions ferriques.

2.1.4.6.4.2. Mode opératoire

Nous avons préparé le réactif C (FeCl_3 à 0,01M dans HCl à 0,001M) puis nous avons mélangé dans un tubes, 1 ml de solution A et 3,5 ml de réactif C. Ensuite, nous avons mesuré l'absorbance à 660 nm, 15 secondes après l'addition de réactif C.

2.1.4.6.4.3. Expression des résultats

La formule permettant le calcul de la teneur en tanins hydrolysables est :

$$T = \frac{DO \times M \times V}{\zeta_{\text{mole}} \times m} \times 100$$

DO: Densité optique.

ζ : 2169 de l'acide gallique (constante).

M: 300 (constante).

V: Volume d'extrait utilisé.

m: Masse de l'échantillon.

2.1.4.6.5. Dosage des flavonoïdes

La méthode utilisée pour le dosage des flavonoïdes est celle décrite par Wollenweber (1988) [92].

2.1.4.6.5.1. Préparation de l'échantillon

Nous avons mélangé 1 g de poudre végétale (graines et feuilles) à 10 ml de méthanol. Ensuite, nous avons soumis les extraits méthanoliques obtenus de graines et de feuilles à une filtration. Puis, nous avons additionné 1,5 ml de chlorure d'aluminium à 1 % à 1,5 ml de l'extrait méthanolique filtré. Après une incubation pendant 10 min, nous avons effectué le dosage en balayant le spectre de 330 à 550 nm et en retenant l'absorbance maximale.

La concentration en flavonoïdes des différents échantillons a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage en utilisant l'acide gallique.

2.1.4.6.5.2. Courbe d'étalonnage

Dix fioles de 25 ml sont numérotées de 1 à 10. Dans chacune des fioles, nous avons mis un volume d'acide gallique, puis nous avons ajouté dans chacune d'elles 10 ml de méthanol et 1,5 ml de chlorure d'aluminium. Nous obtiendrons ainsi 10 fioles avec différentes concentrations (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Préparation de la courbe d'étalonnage.

Fioles	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Quantité d'acide gallique (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Méthanol	10 ml									
Chlorure d'aluminium	1,5 ml									

2.1.4.6.5.3. Calcul

La concentration en flavonoïdes a été calculée en fonction de la droite linéaire $y = a x + b$, où :

y : représente la densité optique.

x : représente la concentration en flavonoïdes.

2.1.4.7. Détermination du pourcentage des cendres

2.1.4.7.1. Principe

La détermination du pourcentage des cendres est effectuée selon un procédé chimique, dans lequel le composé est chauffé au dessus de son point de

fusion. Le but est d'éliminer les constituants carboniques et de garder les éléments minéraux [93].

2.1.4.7.2. Cendres totales

2.1.4.7.2.1. Mode opératoire

C'est une méthode pour mesurer la quantité de substances résiduelles non volatilisées, lorsque l'échantillon de drogue est complètement calciné.

Nous avons chauffé au rouge un creuset vide en platine pendant 10 min et nous l'avons laissé refroidir dans un dessiccateur. Puis nous avons mis dans le creuset préalablement taré 1 g de feuilles séchées que, nous avons incinérées au four à moufle à une température de 550°C pendant 4 heures. Après refroidissement dans le dessiccateur, le résidu a été pesé [85].

2.1.4.7.2.2. Calcul

Masse drogue essai = masse avant calcination – tare

Masse cendres = masse après calcination – tare

Le pourcentage des cendres totales est évalué selon la formule [85]:

$$\% \text{ des cendres totales} = \frac{\text{Masse cendre} \times 100}{\text{Masse drogue essai}}$$

2.1.4.7.3. Cendres sulfuriques

C'est une méthode d'évaluation des substances inorganiques de la drogue végétale. Les cendres sulfuriques sont obtenues après une attaque de la drogue par le H₂SO₄. La teneur est déterminée par dosage pondéral des sulfates non volatils, obtenus par calcination de la matière végétale préalablement traitée avec H₂SO₄ dilué à 50 %. Les sulfates résultent de la conversion des sels organiques [85].

2.1.4.7.3.1. Mode opératoire

Nous avons introduit la prise d'essai (1 g) dans un creuset en platine préalablement taré. La prise d'essai est mouillée avec une quantité suffisante de H₂SO₄ (25 ml) dilué au demi et triturée ensuite avec une baguette.

Nous avons placé le creuset dans l'étuve jusqu'à évaporation à sec puis au four jusqu'à obtention des cendres. Ensuite, il a été refroidi dans un dessiccateur et sa masse a été déterminée (P').

2.1.4.7.3.2. Calcul

La masse de cendres sulfuriques de la prise d'essai est : $S = M' - T$

$$\text{La teneur en cendres sulfuriques} = \frac{S \times 100}{M}$$

S = masse de cendres sulfuriques de la prise d'essai.

M = masse en g de la prise d'essai.

T = tare du creuset.

M' = masse en gramme du creuset après calcination.

2.1.4.8. Extraction des huiles essentielles du fenugrec

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à développer une procédure analytique simple et rapide pour extraire les huiles essentielles du fenugrec (*Trigonella foenum-graceum* L.). La méthode choisie est l'extraction par macération (solvant alcoolique).

2.1.4.8.1. Extraction des huiles essentielles du fenugrec par macération

Cette extraction consiste à puiser la matière végétale par un solvant et à chasser le solvant de l'extrait obtenu par évaporation [94].

Ce procédé expérimental s'est réalisé en mettant 20 g de graines broyées du fenugrec dans des ampoules, auxquelles nous avons ajouté 80 ml de solvant « éther diéthylique » (sélectionné pour son affinité vis-à-vis les huiles essentielles) puis nous avons procédé à l'agitation du mélange pendant 3 heures, dans un agitateur de type oscille 12. Ensuite, l'extrait a été filtré et évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif pendant 20 minutes dans le but d'éliminer le solvant. Après nous avons effectué sur l'huile essentielle obtenue une analyse physico-chimique et une analyse par la spectroscopie IR.

2.1.4.8.2. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de la matière végétale utilisée [95]. Il est calculé par la formule :

$$\text{RHE} = \frac{M_h}{M_{mv}} \times 100$$

Où :

- R_{HE} : rendement en huile essentielle.
- M_h : masse de l'huile essentielle en grammes.
- M_{mv} : masse de la matière végétale utilisée en grammes.

2.1.4.8.3. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

2.1.4.8.3.1. Indice de réfraction [95]

L'indice de réfraction d'une huile essentielle, est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux, de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante. Cet indice est calculé par la formule:

$$n = \frac{\sin i}{\sin r}$$

Où :

- n : indice de réfraction.
- sin i : sinus de l'angle d'incidence.
- sin r : sinus de l'angle de réfraction.

2.1.4.8.3.2. Indice de peroxyde [95]

2.1.4.8.3.2.1. Principe

L'indice de peroxyde I_p est le nombre qui exprime en milli-équivalents d'oxygène actif, la quantité contenue dans 100 g de substance.

2.1.4.8.3.2.2. Mode opératoire

Dans une fiole conique de 250 ml à bouchon rodé, nous avons introduit 5 g de l'huile essentielle à examiner. Ensuite, nous avons ajouté 30 ml d'un mélange de 2 volumes de chloroforme et de 3 volumes d'acide acétique glaciale. Après agitation du mélange jusqu'à la dissolution de l'échantillon, nous avons ajouté 0,5 ml de la solution saturée d'iodure de potassium. Enfin, nous avons agité la solution obtenue pendant 1 min à laquelle nous avons ajouté 30 ml d'eau.

Afin de réaliser le titrage, nous avons ajouté lentement le thiosulfate de sodium 0,01 M sans cesser d'agiter énergiquement, jusqu'à ce que la coloration jaune disparaisse. Puis, nous avons ajouté 5 ml de la solution d'amidon et nous avons continué le titrage en agitant énergiquement jusqu'à disparition de la coloration. Après avoir évalué le volume de thiosulfate de sodium 0,01 M consommé (n_1), nous avons effectué un essai à blanc dans les mêmes conditions. Le titrage de l'essai à blanc ne doit pas consommer plus de 0,1 ml de thiosulfate de sodium 0,01 M (n_2).

2.1.4.8.3.2.3. Calcul

L'indice de peroxyde est déterminé par la formule :

$$I_p = \frac{10 \times (n_1 - n_2)}{m}$$

Où :

- I_p : indice de peroxyde.
- n_1 : volume du thiosulfate de sodium 0,01 M utilisé en titrage.
- n_2 : volume du thiosulfate de sodium 0,01 M utilisé en titrage de l'essai à blanc.
- m : prise d'essai.

2.1.4.8.3.3. Indice de saponification [95]

2.1.4.8.3.3.1. Principe

L'indice de saponification I_s est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1 g de substance.

2.1.4.8.3.3.2. Mode opératoire

Dans une fiole de 250 ml de verre borosilicate munie d'un réfrigérant à reflux, nous avons introduit 2 g de l'huile essentielle à examiner. Ensuite, nous avons ajouté 25 ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M et quelques billes de verre. Après, nous avons adapté le réfrigérant et nous avons chauffé à reflux pendant 30 min. Puis, nous avons ajouté 1 ml de la solution de phénolphtaléine et nous avons titré immédiatement par l'acide chlorhydrique 0,5 M. A la fin, nous avons effectué un essai à blanc dans les mêmes conditions.

2.1.4.8.3.3.3. Calcul

Nous avons calculé l'indice de saponification en appliquant :

$$I_s = \frac{28,05 \times (n_1 - n_2)}{m}$$

Où :

- I_s : indice de saponification.
- n_1 : volume d'acide chlorhydrique 0,5 M utilisé en titrage.
- n_2 : volume d'acide chlorhydrique 0,5 M utilisé en titrage de l'essai à blanc.
- m : masse de la substance.

2.1.4.8.3.4. Indice d'iode [95]

2.1.4.8.3.4.1. Principe

L'indice d'iode I_i est le nombre qui exprime en grammes la quantité d'halogène, calculée en iode, susceptible d'être fixée, dans les conditions précisées, par 100 g de substance.

2.1.4.8.3.4.2. Mode opératoire

Dans un erlenmeyer de 250 ml muni d'un bouchon rodé sec ou rincé avec l'acide acétique glacial, nous avons introduit 2 g de l'huile essentielle et nous l'avons dissous dans 15 ml de chloroforme. Après, nous avons fait couler lentement 25 ml de solution de bromure d'iode. Par la suite, nous avons bouché le récipient que nous avons placé à l'obscurité pendant 30 min en agitant fréquemment.

Après addition de 10 ml d'eau, nous avons titré par le thiosulfate de sodium 0,1 M en agitant énergiquement jusqu'à disparition totale de la coloration jaune. Ensuite, nous avons ajouté 5 ml de solution d'amidon et nous avons continué le titrage en agitant énergiquement et en ajoutant, goutte à goutte, le thiosulfate de sodium 0,1 M, jusqu'à disparition de la coloration. Afin de calculer l'indice d'iode, nous avons effectué un essai à blanc dans les mêmes conditions.

2.1.4.8.3.4.3. Calcul

L'indice d'iode est calculé par la formule :

$$I_i = \frac{1,269 \times (n_1 - n_2)}{m}$$

Où :

- I_i : indice d'iode.
- n_1 : volume du thiosulfate de sodium 0,1 M utilisé en titrage.
- n_2 : volume du thiosulfate de sodium 0,1 M utilisé en titrage de l'essai à blanc.
- m : masse de la substance.

2.1.4.8.3.5. Indice d'acide [95]

2.1.4.8.3.5.1. Principe

L'indice d'acide I_A est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 g de substance.

2.1.4.8.3.5.2. Mode opératoire

Nous avons dissous 5 g de l'huile essentielle du fenugrec dans 50 ml d'un mélange à volumes égaux d'éthanol et d'éther. Après dissolution, nous avons titré par l'hydroxyde de potassium 0,1 M. Le titrage est terminé lorsque la couleur rose persiste pendant 15 secondes au moins.

2.1.4.8.3.5.3. Calcul

La formule utilisée pour calculer l'indice d'acide est :

$$IA = \frac{5,610 \times n}{m}$$

Où :

- I_A : indice d'acide.
- n : volume d'hydroxyde de potassium 0,1 M.
- m : prise d'essai.

2.1.4.8.4. Analyse des huiles essentielles du fenugrec

2.1.4.8.4.1. Analyse spectroscopique (spectroscopie infrarouge)

La principale application de la spectroscopie IR est l'analyse fonctionnelle ainsi que la recherche des différents groupements constituant une molécule: analyse qualitative [94].

2.1.4.8.4.2. Interprétation des spectres

Les spectres obtenus par la spectroscopie IR, sont interprétés en se référant aux fréquences d'absorption IR, qui indiquent les différentes corrélations structurales (Appendice C).

2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits alcooliques de *Trigonella foenum-graecum* L.

L'objectif souhaité de cette analyse est de tester une éventuelle activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits alcooliques de l'espèce *Trigonella foenum-graecum* L., en procédant à des tests sur des souches de microorganismes connues.

2.2.1. Matériel biologique

2.2.1.1. Les huiles essentielles utilisées

Les tests sont réalisés avec une huile essentielle récupérée lors de l'extraction par macération alcoolique des graines de la plante de *Trigonella foenum-graecum* L. et une huile essentielle commerciale considérée comme référence caractérisée par une densité égale à 0,90 ; un indice de réfraction égale à 1,479 et un indice d'acide égale à 0,18.

Nous rappelons que l'huile essentielle extraite a été conservée à 22°C, dans des flacons en verre opaque hermétiquement fermés.

2.2.1.2. Les extraits alcooliques utilisés

Les poudres distinctes de la graine et de la feuille de la plante, macèrent séparément dans 20 ml d'éthanol à 96 % pendant 72 heures. Les extraits sont ensuite filtrés et concentrés dans un bain marie à 95°C. Deux solutions de 2 g et de 4 g de poudre sont préparées avec 20 ml d'éthanol.

2.2.1.3. Les souches utilisées

Cette étude a porté sur une gamme de microorganismes comprenant des bactéries Gram positif et Gram négatif, ainsi que des levures. Ces souches microbiennes sont récupérées du laboratoire de microbiologie de l'Unité Antibiotique-SAIDAL (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Souches microbiennes	Références
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 1803
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 6558
<i>Bacillus subtilus</i>	ATCC 6633
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 17933
<i>Sarcina lutea</i>	ATCC 9341
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763

2.2.2. Principe de l'activité antimicrobienne [96]

Il consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis au contact des huiles essentielles et de l'extrait alcoolique des graines et des feuilles par la méthode de diffusion sur gélose.

Des disques absorbants stériles de 9 mm imprégnés de l'huile essentielle et de l'extrait alcoolique, sont déposés sur une gélose inoculée de souches. La diffusion des huiles essentielles dans la gélose permet d'inhiber la croissance des germes tout au tour du disque (zone d'inhibition). Elle est représentée par une zone claire, obtenue après incubation. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition de chacune des souches.

2.2.3. Mode opératoire

2.2.3.1. Préparation de la première couche (couche support)

Les deux milieux de culture dont la gélose nutritive (pour les bactéries) et Sabouraud (pour les levures) ont été dissouts dans un bain-marie à 95°C. Ensuite, dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre, nous avons versé aseptiquement, sous une hotte à flux laminaire stérile, 15 ml de chaque milieu.

2.2.3.2. Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum se fait à partir d'une jeune culture de 18 heures pour les bactéries et de 48 heures pour les levures. Des suspensions troubles sont réalisées en prélevant 4 à 5 colonies bien distinctes, qu'on introduit dans 5 ml d'eau physiologique stérile, puis nous faisons homogénéiser les solutions au vortex.

2.2.3.3. Préparation de la deuxième couche

Nous avons dissous les deux milieux de culture dont la gélose nutritive (pour les bactéries) et Sabouraud (pour les levures), dans un bain marie à 95°C puis nous les avons mis en incubation à 42°C. Ensuite, sous hotte, nous avons coulé le milieu gélose nutritive dans sept (7) flacons, à raison de 40 ml chacun et le milieu Sabouraud dans deux (2) flacons contenant également 40 ml. Après, nous avons inoculé les neuf (9) flacons avec 200 µl de chaque suspension et nous avons agité manuellement.

Après la préparation des milieux inoculés, nous avons déposé rapidement 4 ml de chaque milieu sur la surface de la première couche (couche support) de gélose solidifiée en étalant immédiatement cette dernière.

2.2.3.4. Dépôt des disques

A l'aide d'une pince stérile, nous avons imbibé, selon le cas, un disque stérile de 9 mm de diamètre avec de l'huile essentielle ou de l'extrait éthanolique, jusqu'à imprégnation totale, puis nous l'avons déposé sur la surface du milieu contenant la souche à tester, et nous avons laissé les boîtes de Pétri sur pailleasse pendant 30 minutes pour permettre la diffusion des molécules actives. A la fin, nous avons incubé les boîtes de Pétri à 37°C, pendant 24 heures, pour les bactéries et à 25°C, pendant 48 heures, pour les levures.

2.3. Etude de l'effet hypoglycémiant de *Trigonella foenum-graecum* L.

2.3.1. But

Dans la présente étude, nous testons l'effet de l'extrait aqueux et méthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum* L. sur le taux du glucose sanguin chez des souris normales.

2.3.2. Mode opératoire

2.3.2.1. Matériel végétal

Pour cette étude, nous avons utilisé les graines de *Trigonella foenum-graecum* L. qui ont été préalablement séchées et finement broyées.

2.3.2.2. Préparation des solutions à tester

2.3.2.2.1. Préparation de l'extrait aqueux

Nous avons pesé 25 g de la poudre de graines du fenugrec, qui sont décoctés avec 500 ml d'eau distillée pendant 5 min. La décoction obtenue est ensuite refroidie durant 30 min, et filtrée à deux reprises, à l'aide d'un papier filtre. Dans le but d'éliminer toute trace d'eau, nous avons évaporé le filtra via un évaporateur rotatif. A la fin, nous avons récupéré un résidu de 0,59 g, soit un rendement de 2,36 %.

2.3.2.2.2. Préparation de l'extrait méthanolique

Pour obtenir un extrait méthanolique, nous avons trempé 25 g de la poudre de graines du fenugrec dans 500 ml de méthanol pendant 6 jours. Après, nous avons filtré la solution obtenue deux fois, à l'aide d'un papier filtre, puis nous avons concentré et évaporé le filtra obtenu à l'aide d'un évaporateur rotatif. Après l'évaporation, nous avons obtenu un résidu de 0,82 g, soit un rendement de 3,28 %.

2.3.2.3. Matériel animal

Trente souris albinos de race Swiss, élevées dans l'animalerie de la filiale antibiotique de Médéa, d'un poids corporel unitaire de $20 \text{ g} \pm 2$, préalablement mises à jeun, ont été utilisées. Ces souris ont été par la suite divisées en cinq groupes (A, B, C, D et E) de six sujets chacun.

Les souris appartenant aux groupes B et C ont reçu respectivement une dose de 10 mg/kg et 20 mg/kg de l'extrait aqueux de la plante, tandis que les souris des groupes D et E ont reçu des doses similaires de l'extrait méthanolique de la plante. Les souris du groupe A, considérées comme un lot témoin, ont reçu quant à elles une dose de 0,5 ml d'eau physiologique, par sujet. Les solutions

utilisées ont été administrées par voie orale (intragastrique), à l'aide d'une seringue (Appendice F : figure 2).

2.3.2.4. Mesure du taux de glucose

Après administration des extraits aqueux et méthanolique du fenugrec, nous avons prélevé du sang au niveau de la queue de la souris à des temps différents (0, 1, 2 et 4 h).

Le taux du glucose sanguin est déterminé en utilisant un glucomètre (Smart Scane).

Le taux du glucose au temps 0 h est considéré comme une valeur de contrôle.

2.4. Etude de l'activité anti-inflammatoire de *Trigonella foenum-graecum* L.

2.4.1. Principe

La méthode de l'œdème à la carragénine de WINTER a été utilisée : l'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure d'une souris provoque l'apparition d'un œdème de la région métatarsienne dont on peut ralentir le développement par un médicament anti-inflammatoire préventif [97].

2.4.2. Mode opératoire

2.4.2.1. Matériel animal

L'expérience est réalisée sur des souris issues de l'animalerie de la filiale antibioticale (SAIDAL-MEDEA).

Des souris d'un poids corporel variant entre 20 et 25 g ont été réparties en 9 lots de 6 sujets et soumises à un jeûne de 24 h.

Neuf (9) lots de six (6) souris ont été constitués :

- Un lot témoin blanc recevant de l'eau distillée.
- Un lot témoin de référence (témoin positif) recevant du Diclofénac à la dose de 25 mg/kg.
- Un lot recevant de l'huile alimentaire (huile de tournesol).

- Trois (3) lots recevant de l'huile essentielle du fenugrec extraite aux doses de 40 mg/kg, 80 mg/kg et 120 mg/kg.
- Trois (3) lots tests recevant de l'extrait aqueux des graines du fenugrec aux doses de 40 mg/kg, 80 mg/ kg et 120 mg/ kg.

Le produit de référence (Diclofénac) est injecté par voie intrapéritoniale (Appendice F : figure 3) et les différentes doses des solutions à tester sont administrées par voie orale (intragastrique) à l'aide d'une seringue de gavage (Appendice F: figure 2).

Les doses de l'huile essentielle de la plante, administrées par gavage, sont préparées avec de l'huile alimentaire, tandis que la solution injectée par voie intrapéritoniale est préparée dans de l'eau stérile (Eau Pour Préparation Injectable ou EPPI).

Après que chaque sujet eut reçu sa dose en produits, le diamètre de la patte postérieure gauche est mesuré.

La carragénine (0,02ml) a été injectée une heure après cette administration.

Nous avons ensuite mesuré le diamètre des pattes gauches des souris toutes les heures jusqu'à la sixième heure. La mesure est réalisée à l'aide d'un pied à coulisse (Appendice F: figure 4).

2.4.2.2. Calcul du pourcentage de l'inhibition de l'œdème

L'activité anti-inflammatoire est calculée en pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport à celles constituant le lot témoin.

- *Calcul du pourcentage d'augmentation du diamètre de la patte (PiH)* : soit D_0 le diamètre initial de la patte et D_{ih} le diamètre de la patte de l'énième heure après l'injection de la carragénine. Le pourcentage d'augmentation du diamètre de la patte est :

$$PiH = \frac{(D_{ih} - D_0)}{D_0} \times 100$$

- *Calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (PiI) : soit P₀H le pourcentage moyen d'augmentation du diamètre de la patte du lot témoin blanc et PiH le pourcentage d'augmentation du diamètre de la patte du lot traité à l'énième heure après l'injection de la carragénine.*

$$PiI = \frac{(P_{0H} - PiH)}{P_{0H}} \times 100$$

2.5. Etude de l'activité antipyrétique de *Trigonella foenum-graecum* L.

2.5.1. Principe

Le principe est d'injecter une substance provoquant la fièvre (hyperthermie) par voie sous-cutanée dans la veine marginale du lapin, qui peut être ensuite réduite par les substances antipyrétiques. Dans notre étude, on a utilisé une substance pyrogène à savoir l'endotoxine d'*Escherichia coli*.

2.5.2. Mode opératoire

2.5.2.1. La matière végétale à tester

Le matériel végétal utilisé consiste en un extrait aqueux des graines de *Trigonella foenum-graecum* L., préparé de la même façon que l'extrait utilisé pour le test hypoglycémiant et anti-inflammatoire.

2.5.2.2. Sélection des lapins

La veille du test, nous avons transféré des lapins soumis à jeun à la salle d'analyse des pyrogènes. Nous avons ensuite pesé les lapins et enregistré leur poids sur une fiche avant de les mettre dans des box. Après, nous avons placé des sondes rectales pour chaque lapin, tout en respectant l'ordre numérique de leur emplacement (Appendice G : figure 1), puis nous avons mis en marche la centrale thermométrique automatique afin d'enregistrer les températures à 75 min et à 105 min servant au calcul de la température moyenne pour chaque lapin.

La température moyenne est calculée par la formule :

$$\text{Température moyenne} = \frac{\text{Température à 75 min} + \text{Température à 105 min}}{2}$$

Après avoir relevé les températures enregistrées, nous avons procédé à l'élimination des lapins accusant une variation de température supérieure à 0,2°C (entre la température à 75 min et la température à 105 min) et une température moyenne supérieure à 39,8°C et inférieure à 38°C.

2.5.2.3. Test antipyrétique

L'expérience a été conduite sur 4 lots comportant chacun 3 lapins préalablement triés [93].

Les lots du test sont constitués de:

- Lot 1 (Témoin 1), recevant 3 ml/kg d'eau physiologique.
- Lot 2 (Témoin 2), recevant 1 ml/kg d'endotoxine à 5 EU/ml.
- Lot 3 (Essai 1), recevant 2 ml/kg d'extrait aqueux des graines à 120 mg/kg + 1 ml/kg d'endotoxine à 5 EU/ml.
- Lot 4 (Essai 2), recevant 2 ml/kg de paracétamol à 50 mg/kg + 1 ml/kg d'endotoxine à 5 EU/ml.

L'administration des solutions pour les lots 2, 3 et 4 est réalisée par injection dans la veine marginale de l'oreille du lapin (Appendice G : figure 2), en un temps ne dépassant pas 4 min. Tandis que, pour le lot 1, l'administration de l'eau physiologique est faite par voie intragastrique (par gavage).

On met ensuite la centrale thermométrique en marche pendant 3 heures, au terme desquelles on enregistre la température maximale de chaque lapin.

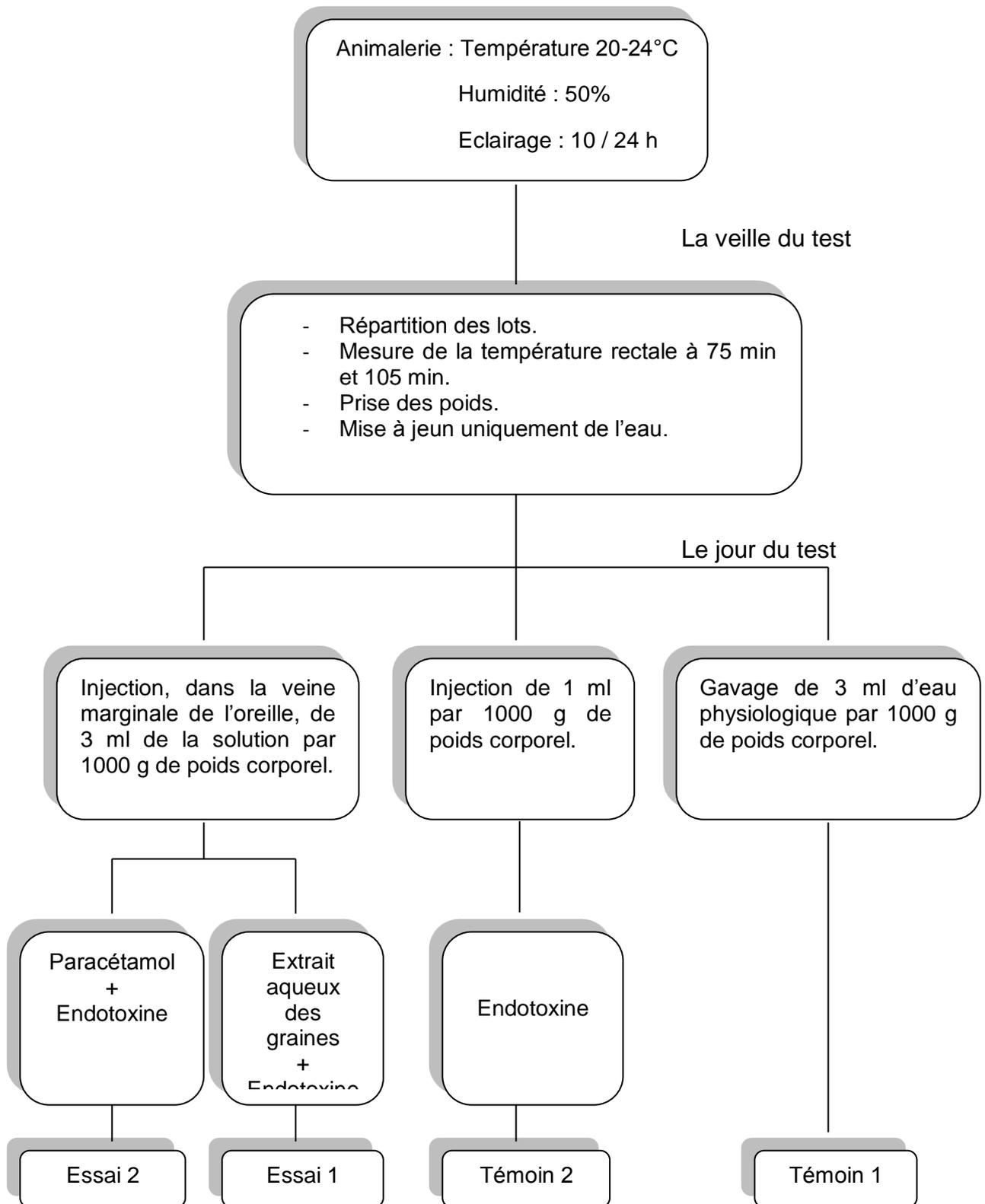


Figure 2.2 : Protocole expérimentale de l'hyperthermie par l'endotoxine à 5EU/ml vis-à-vis de l'extrait aqueux des graines de *Trigonella foenum-graecum* L. et du paracétamol [93].

2.5.2.4. Calcul du pourcentage d'inhibition de l'hyperthermie

Afin d'étudier l'évolution du pourcentage d'inhibition de l'hyperthermie, on applique la méthode :

$$\% \text{ de l'hyperthermie} = \frac{\text{Température moyenne maximale} - \text{Température moyenne}}{2} \times 100$$

Donc, le pourcentage d'inhibition de l'hyperthermie sera calculé par la formule :

$$\% \text{ d'inhibition de l'hyperthermie} = 100 - \% \text{ de l'hyperthermie}$$

2.6. Aptitude à la callogenèse de *Trigonella foenum-graecum* L.

2.6.1. Matériel végétal

Dans notre travail, nous avons utilisé les graines du fenugrec qui sont à l'origine des plantules qui ont servi à l'obtention des explants. L'expérimentation de la culture *in vitro* a été réalisée dans le laboratoire d'amélioration des plantes du département d'Agronomie de l'Université de Blida.

2.6.2. Explants utilisés

Les explants mis en culture sont constitués de fragments de feuilles cotylédonaire, de racines et d'hypocotyles. L'âge des vitro-semis prélevés varie de 7 à 12 jours.

2.6.3. Mode d'obtention des plantules

2.6.3.1. Germination des graines

Les graines utilisées sont stérilisées au préalable. La germination d'une graine est définie comme étant la somme des événements qui commencent avec l'imbibition et se terminent par l'émergence d'une partie de l'embryon,

généralement la radicule, à travers les tissus qui l'entourent [98]. Dès lors, plusieurs facteurs influençant la germination sont étudiés.

2.6.3.1.1 Effet du prétraitement

Afin de savoir si les semences du fenugrec présentent un certain degré de dormance et si un prétraitement des graines peut influencer ou améliorer les aptitudes germinatives des graines, nous leur avons fait subir deux prétraitements :

- Un lot de graines est mis à imbiber dans l'eau distillée pendant 24 h à une température ambiante de 22°C.
- Le second lot séjourne pendant 24 h au réfrigérateur à 4°C. Suite à cette opération, les graines sont mises à germer dans une étuve à une température de 22°C.

2.6.3.1.2. Effet de la lumière

L'essai a pour but de montrer si les graines du fenugrec sont photosensibles ou non. Un test de germination est réalisé sous deux conditions d'éclairement : à la lumière et à l'obscurité.

Les graines sont placées dans des boîtes de Pétri tapissées de papier filtre imbibé d'eau distillée, à raison de 20 graines par boîte. Elles sont placées soit à l'obscurité totale dans une étuve, soit exposées à une photopériode de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité. Dans les deux cas, la température est maintenue à 22°C.

2.6.4. Technique de la culture *in vitro*

2.6.4.1. Désinfection du matériel végétal

2.6.4.1.1. Les graines

Les graines du fenugrec sont trempées dans une solution d'éthanol à 75 % pendant 2 min. Elles sont ensuite immergées dans l'hypochlorite de calcium à 6 % pendant 10 min. A l'échéance de cette dernière étape, elles sont rincées à l'eau distillée stérilisée, 4 fois, afin d'éliminer toute trace de produit désinfectant.

2.6.4.1.2. Les explants

Les explants des feuilles cotylédonaire, de racines et d'hypocotyles issus des plantules cultivées *in vitro*, sont découpés stérilement sous hotte en fragments d'environ 1 cm de longueur et mis directement en culture. Le prélèvement à partir des plantules aseptiques permet d'éviter le risque d'avoir des lésions en désinfectant les explants [99].

2.6.4.2. Stérilisation de la hotte

Les manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire horizontal. La hotte est nettoyée avec de l'alcool à 70° et désinfectée à l'aide d'une lampe UV (située au plafond de la hotte).

2.6.4.3. Stérilisation des milieux de culture

Les milieux de culture distribués dans des tubes, sont stérilisés à l'autoclave à 120°C, sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes.

2.6.4.4. Préparation des milieux de culture

Le milieu de culture de base utilisé est celui de MURASHIGE et SKOOG (MS) [100], composé de :

- ❖ Sels minéraux (Tableau 2.3)
 - Les macroéléments MS
 - Les microéléments MS
 - Le Fer –EDTA
- ❖ Vitamines de Morel (Tableau 2.4)
- ❖ Source de carbone : saccharose (20 g/l)

Le milieu MS est solidifié par l'addition de l'agar-agar à raison de 8 g/l après ajustement de pH à 5,7 à l'aide d'une solution de NaOH (0,1 N) ou de HCl (0,1 N) selon le milieu, qu'il soit acide ou basique.

Tableau 2.3 : Compositions des solutions minérales de MS [71].

Solutions	Composés	Concentrations (mg/l)
Macroéléments MS	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	KH ₂ PO ₄	170
	CaCl ₄ , 2H ₂ O	440
	MgSO ₄ , 2H ₂ O	370
Microéléments MS	MnSO ₄ , 4H ₂ O	16,9
	H ₃ BO ₃	6,2
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,6
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025
Fer-EDTA	FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,8
	Na ₂ EDTA	37,3

Tableau 2.4 : Solution vitaminique de MOREL (1952) en mg pour 100 ml [71].

Vitamines	Concentrations (mg/100 ml)
Acide nicotinique	1
Pyridoxine (vitamine B6)	1
Thiamine (vitamine B1)	1
Pantothénate de Calcium	1
Biotine	0,01
Méso-inositol	100

❖ Les régulateurs de croissance

SKOOG et MILLER (1957) [101] furent les premiers à mettre en évidence le rôle de l'équilibre auxine/cytokinine exogène dans l'orientation de l'organogenèse *in vitro*. Les effets généraux de cet équilibre, donne selon la valeur, le rapport hormonale des organogenèses différentes (Figure 2.3).

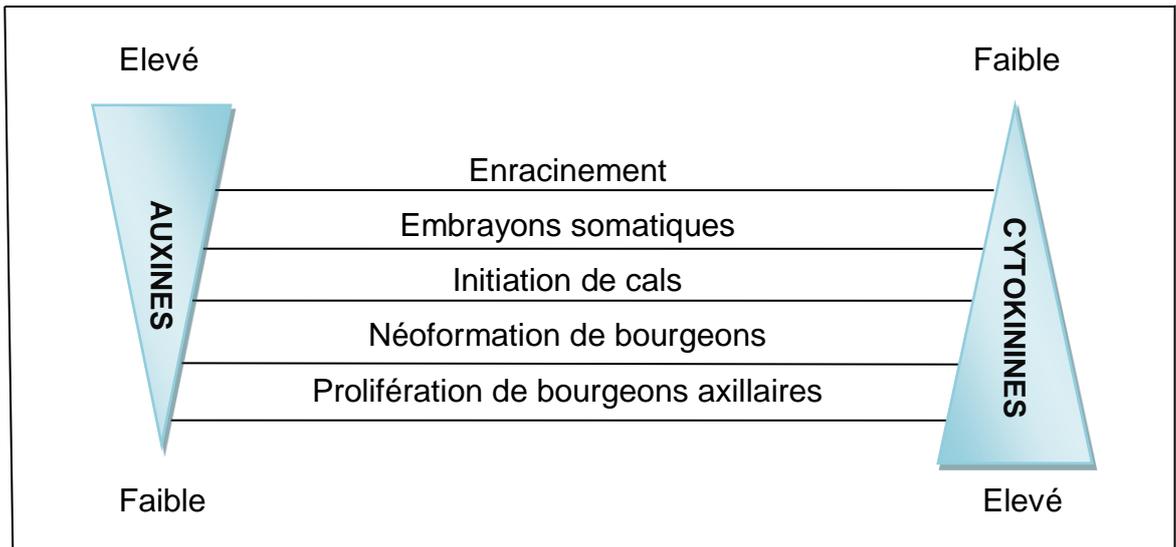


Figure 2.3 : Types d'organogenèse contrôlés par les concentrations relatives d'auxine et de cytokinine [102].

2.6.4.5. Mise en culture du matériel végétal

Toutes les opérations de mise en culture se font sur du papier filtre stérilisé à proximité d'une flamme, qui sert aussi au flamage des instruments de dissection.

L'introduction du matériel végétal en culture primaire s'effectue toujours de façon individuelle (un explant par tube) afin d'écartier rapidement tout explant infecté.

2.6.4.5.1. Culture des graines

Pour éviter les contaminations, nous avons mis en culture nos graines sur un milieu gélosé, à raison d'une graine par tube.

2.6.4.5.2. Culture des explants provenant des vitro-semis

La plantule issue de graine est découpée de manière à séparer la racine, l'hypocotyle et les feuilles cotylédonaire s. Ensuite, chaque type d'organe est fragmenté. Les explants ne dépassant pas en général 1 cm sont déposés stérilement sur le milieu de culture en position couchée.

2.6.4.5.3. Conditions de culture

Après ensemencement, les tubes sont placés dans un phytotron, à une température de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ en conditions photopériodiques de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité.

2.6.5. Aptitude à la callogenèse

Lors de nos essais, nous avons testé l'effet de plusieurs facteurs sur l'aptitude à la callogenèse des différents organes du fenugrec, dans le but de définir les conditions optimales de la callogenèse de cette plante.

Le suivi de la callogenèse porte à la fois sur la détermination du taux d'explants callogènes, l'estimation quantitative de cals formés (poids frais et poids sec) et la description des caractéristiques morphologiques des cals (texture et couleur).

2.6.5.1. Effet de la composition hormonale du milieu

L'objectif de cette étape est de définir un milieu de culture adéquat permettant une prolifération cellulaire optimale à partir de différents explants de la plante. A cette fin, nous avons étudié l'influence de la composition hormonale sur la capacité callogène des organes du fenugrec.

Les régulateurs de croissance testés sont les auxines, représentées par le 2,4-D et l'ANA et les cytokinines, représentées par la BAP et la kinétine. Ils sont apportés seuls ou combinés, à différentes doses (Tableau 2.5).

Tableau 2.5 : Régulateurs de croissance utilisés lors de l'expérimentation.

Milieux de culture utilisés	Milieux de culture de base MS additionnés de :			
	Auxines (mg/l)		Cytokinines (mg/l)	
	ANA	2,4-D	BAP	KIN
M1	1	-	-	-
M2	-	1	-	-
M3	-	-	1	-
M4	0,6	-	0,4	-
M5	0,2	-	0,3	0,3
M6	0,3	-	0,8	0,8
M7	-	3	0,1	-
M8	-	0,1	3	-
M9	-	0,1	0,5	-

2.6.5.2. Effet de la fragmentation de l'explant sur la callogenèse

Après avoir déterminé le meilleur callogène, nous avons étudié l'effet de la fragmentation de cet explant.

Pour cela, nous avons fragmenté l'hypocotyle en 3 parties: apicale, médiane et basale, que nous avons utilisé sur les six milieux de culture (M4, M5, M6, M7, M8 et M9).

2.6.5.3. Effet du repiquage

Le transfert ou le repiquage sur milieu frais devient obligatoire, quand le cal séjourne plus de trois semaines sur le même milieu. Ce dernier s'appauvrit en éléments nutritifs et les cultures risquent de dépérir.

Les cals d'hypocotyles obtenus précédemment sur le milieu M8 (0,1 mg/l de 2,4-D + 3 mg/l de BAP), sont transférés sur le même milieu MS.

Après quatre semaines de culture, le lot de cal a été divisé en deux :

- Le premier lot est maintenu sur le même milieu sans repiquage, c'est-à-dire sans renouvellement du milieu de culture.
- Le deuxième lot est transféré sur milieu frais, après une fragmentation des cals, dont les fragments pèsent 200 mg environ.

2.6.6. Evaluation des résultats

Les observations tant qualitatives que quantitatives sont réalisées quotidiennement en début de culture, afin d'isoler les cultures infestées, puis tous les 3 à 4 jours, pour suivre l'évolution des explants.

Pour chaque traitement plusieurs paramètres sont considérés :

2.6.6.1. Test de germination

Durant cinq jours, à la même heure, nous avons compté le nombre de graines germées. Au cinquième jour, conformément à la méthode suggérée par SPYROPOULOS (1986) [103], nous avons considéré que toutes les graines qui ont germé viables. Les paramètres retenus pour exprimer la germination sont :

2.6.6.1.1. La faculté germinative

Elle correspond au taux maximal de germination obtenu dans des conditions bien définies.

2.6.6.1.2. La vitesse de germination

Nous avons utilisé la méthode suggérée par MCKERSIE et *al.*, en 1981 *in* NACHI (1989) [64].

$$\text{Vitesse de germination} = N1 + \frac{N2}{2} + \frac{N3}{3} + \dots + \frac{Nn}{n}$$

Où :

N1 : représente le nombre de graines germées le premier jour.

N2 : représente le nombre de graines germées le deuxième jour.

Nn : représente le nombre de graines germées l'énème jour.

2.6.6.1.3. Courbe de germination

Celle-ci représente l'évolution des pourcentages cumulés en fonction du temps [104].

2.6.6.2. Cas de la callogenèse

L'importance de callogenèse a été évaluée de deux manières ; quantitativement (poids de la matière fraîche et sèche) et qualitativement (texture et couleur).

La callogenèse est exprimée en pourcentage d'explants callogènes pendant une durée d'exposition de 4 semaines sur le milieu de culture. En plus de la texture et de la coloration des cals qui seront décrites, l'évolution de la matière fraîche et sèche sera également suivie au cours du temps. Les cals obtenus sont prélevés et pesés individuellement, alors que la teneur en matière sèche est évaluée après le passage des cals à l'étuve à une température de 65°C pendant 24 heures.

2.6.7. Analyse statistique

Pour l'analyse des données, on a eu recours à l'analyse de la variance.

2.6.8. Analyse physico-chimique des cals

Après avoir déterminé le milieu de culture convenable pour l'aptitude à la callogenèse, les cals séchés obtenus à partir des explants de racines, de feuilles cotylédonaire et d'hypocotyles ont fait l'objet d'une analyse physico-chimique, afin de confirmer l'existence ou l'inexistence de certains métabolites et de déterminer leur teneur.

Pour cette partie de l'étude, nous avons réalisé une analyse quantitative en déterminant la teneur des cals séchés à l'étuve à 20°C, en phénols totaux, tanins condensés et en cendres totales ainsi que la quantité des flavonoïdes par 1000 mg de poudre de cals.

Le mode opératoire utilisé pour chaque dosage est le même que le mode suivi pour déterminer la teneur de ces métabolites chez les graines et les feuilles de la plante entière du fenugrec.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Composition chimique du fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.)

3.1.1. Terpénoïdes

Les plaques du CCM révélées montrent des bandes brunes ($R_f = 0,50$) pour les graines et des bandes jaune brunâtres ($R_f = 0,63$) pour les feuilles, ce qui indique l'existence de terpénoïdes (Figure 3.1). Des résultats similaires ont été obtenus avec *Thymelaea lythroides* pour la détection des terpénoïdes par CCM [85].

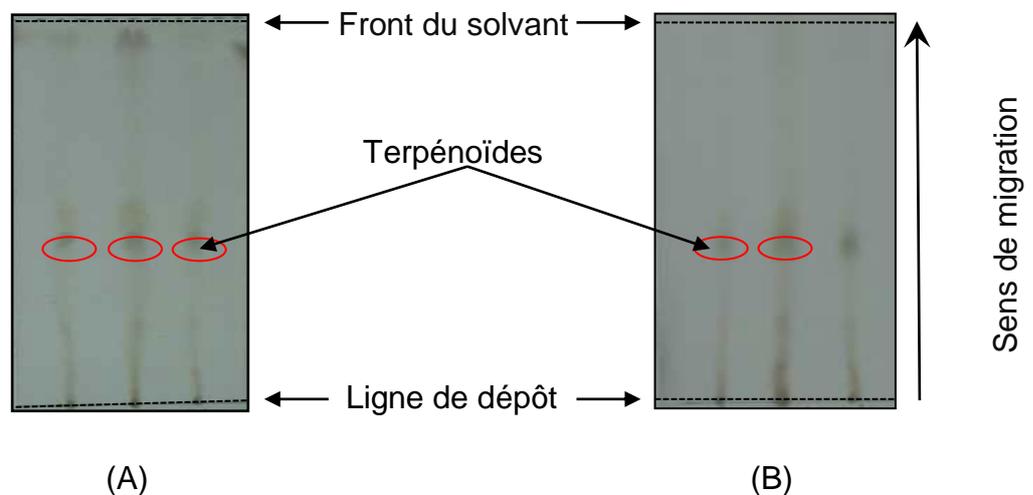


Figure 3.1 : Plaques CCM après révélation au chlorure d'antimoine ($SbCl_3$)
(A : feuilles ; B : graines).

3.1.2. Alcaloïdes

Le réactif de Dragendorff n'a donné aucune coloration pour l'extrait méthanolique des feuilles, tandis que pour l'extrait des graines, ce réactif a donné sur les plaques de CCM deux bandes majeurs ($R_f = 0,69$ et $R_f = 0,73$) d'une coloration orange-brune (Figure 3.2).

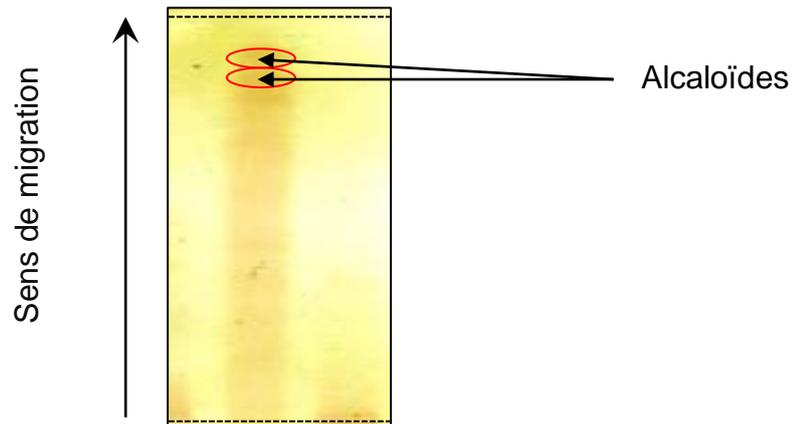


Figure 3.2 : Plaque CCM après révélation au réactif de Dragendorff pour l'extrait méthanolique des graines.

Pour le test d'iodoplatinate, la révélation des chromatogrammes à 360 nm a permis d'observer des bande majeur ($R_f = 0,57$) de coloration bleu marron pour les graines uniquement (Figure 3.3).

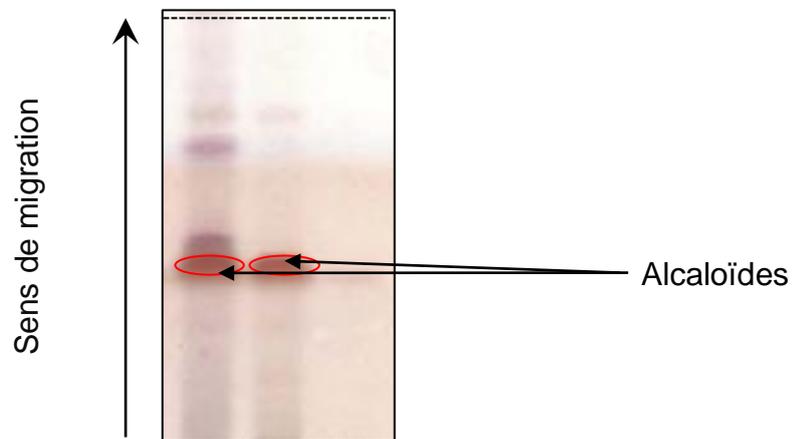


Figure 3.3 : Plaque CCM après révélation au réactif d'iodoplatinate pour l'extrait méthanolique des graines.

Pour le test de Mayer, un précipité jaune a été observé, pour l'extrait de graines. Par contre, ce test n'a pas permis de mettre en évidence l'existence d'alcaloïdes dans les feuilles.

Une analyse phytochimique réalisée par DJABOU (2005) [105], sur *Sumbucus nigra* L. a démontré la présence des alcaloïdes au niveau des feuilles et des baies avec des R_f similaires à ceux trouvés pour les graines du fenugrec étudié.

Certains alcaloïdes sont des médicaments connus aux vertus thérapeutiques avérées. C'est le cas d'un dérivé de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) employé pour traiter certains types de cancer. D'autres alcaloïdes, comme l'atropine, présente dans la belladone (*Atropa belladonna*), ont une action directe sur le corps : activité sédatrice et effets sur les troubles nerveux dont la maladie de Parkinson [55].

D'après KARSTEN (1966) [62], les graines du fenugrec renferment deux alcaloïdes connus sous le nom de trigonelline (0,13 %) et de choline (0,05 %). La trigonelline est un alcaloïde qui empêche l'installation de la bactérie *Streptococcus mutans* sur les dents, ce qui limite la carie dentaire. Une étude réalisée par BRAY et al., en 1988 [106], portant sur les effets produits par des stress salins sur une clone de vitro-plants de l'hybride *Populus trichocarpa* x deltoïdes a démontré l'accumulation de la trigonelline en réponse au NaCl. Cette substance est également rencontrée en quantité non négligeable dans les bourgeons prélevés en peupleraie durant le repos hivernal alors qu'elle est absente en période d'activité.

Quant à la choline, elle a principalement trois rôles dans l'organisme : c'est un constituant de base des phosphatidylcholines, de l'acétylcholine et sert de précurseur à la bétaine [63].

3.1.3. Saponosides

L'indice de mousse des graines du fenugrec est de 500, alors qu'il est inférieur à 100 pour les feuilles (Tableau 3.1). Ces valeurs montrent que les graines de *Trigonella foenum-graecum* L. renferment des quantités appréciables en saponines, tandis que les feuilles n'en renferment pratiquement pas.

Tableau 3.1 : Indice de mousse de *Trigonella foenum-graecum* L. comparé à celui de *Saponaria officinalis* [107] et de *Spergularia rubra* L. [108] appartenant à la famille des Caryophyllacées.

Espèce	<i>Saponaria officinalis</i>	<i>Spergularia rubra</i> L.	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	
			Graines	Feuilles
Indice de mousse	395	600	500	45

Concernant l'analyse chromatographique, la révélation des plaques CCM à la vanilline sulfurique donne une coloration jaune brunâtre, témoignant de la nature stéroïdique des saponosides chez les graines et les feuilles du fenugrec (Figure 3.4). Ce type de saponines a été révélé chez *Sambucus nigra* L. [105].

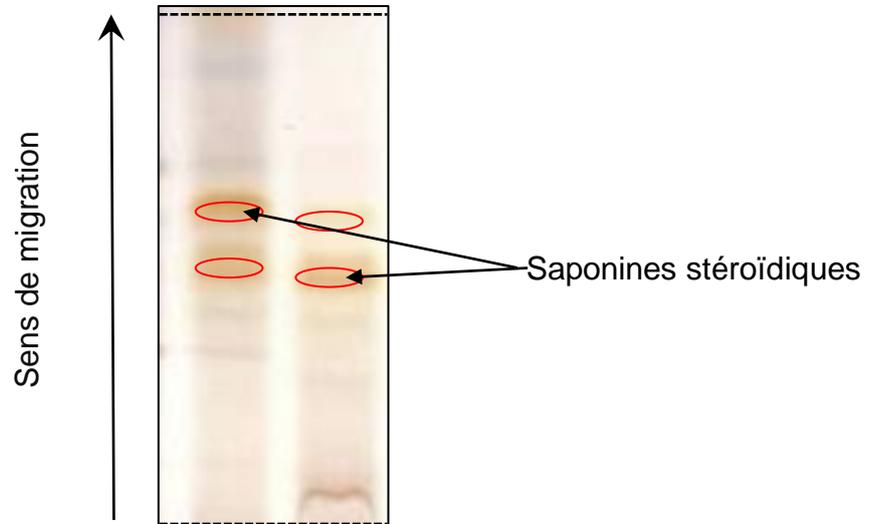


Figure 3.4 : Plaques CCM après révélation à la vanilline sulfurique pour les extraits méthanoliques des graines.

Les saponines existent sous deux formes : les stéroïdes et les triterpénoïdes. La structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (œstrogène, cortisone), et de nombreuses plantes qui en contiennent ont un effet sur l'activité hormonale. L'igname sauvage (*Dioscorea villosa*) contient des saponines stéroïdiques, à partir desquels on synthétise la pilule contraceptive. Les saponines triterpénoïdes, contenues dans la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) et la primevère (*Primula veris*), ont une activité hormonale moindre. Elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments [55].

La présence de saponines reste un caractère commun à de nombreux genres appartenant à la famille des Caryophyllacées [109]. A titre d'exemple, on cite l'*Arenaria filicaulis* chez qui deux triterpènes saponines ont été récemment découverts [110], *Saponaria officinalis* dont les teneurs en saponines sont remarquables avec un indice de mousse de 395 [107] et *Spergularia rubra* L. avec un indice de mousse de 600 [108].

L'espèce *Trigonella foenum-graecum* L. renferme 0,6 à 1,7 % de saponines stéroïdiques, regroupant majoritairement la diosgénine et la yamogénine. En plus, elle contient la tigogénine, la néotigogénine, la gitogénine, la néogitogénine, la smilagénine, la sarsasapogénine, la yuccagénine [111], le fenugreekine [112] et les trigofenosides A-G [113].

3.1.4. Coumarines

Après révélation par la potasse alcoolique 5% et visualisation sous UV, des fluorescences jaunâtres sont observées en faveur de l'existence de coumarines au niveau des graines (Figure 3.5). Cette fluorescence jaunâtre a été observée chez *Sambucus nigra* L. [105].

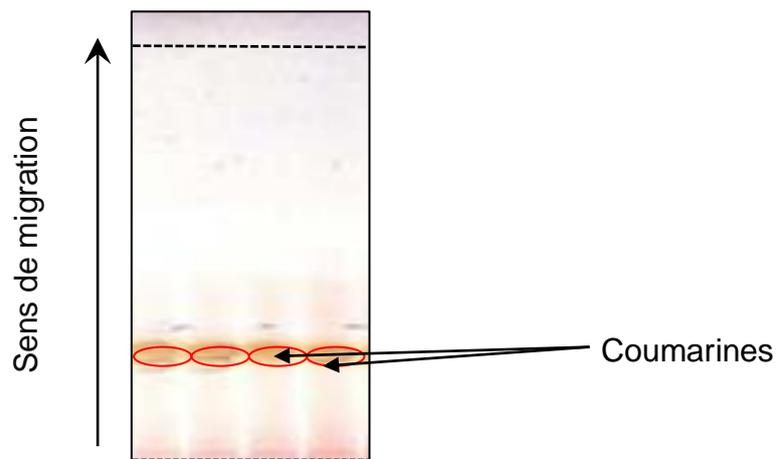


Figure 3.5 : Plaques CCM après révélation à la potasse alcoolique 5 % pour l'extrait chloroformique des graines.

Selon BRUNETON (1999), les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines du mélilot (*Melilotus officinalis*) et du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum*) contribuent à fluidifier le sang, alors que les furanocoumarines comme le bergaptène, contenu dans le céleri (*Apium graveolens*), soignent les affections cutanées.

3.1.5. Teneur en protéines brutes

D'après les résultats enregistrés (Tableau 3.2), nous constatons que les graines ont une teneur en azote égale à 20,76 % alors que les feuilles ne

représentent que 11,53 %. Il ressort que les graines du fenugrec sont plus riches en protéines que les feuilles.

Selon MODGIL et MEHTA (1997) [114], la qualité des protéines subit un changement, probablement avec une diminution de la composition en méthionine et une augmentation de l'acide urique et de l'azote non protéique, ce qui rend les graines impropres à la consommation humaine.

Selon GAIN (1987) [115], les légumineuses ont généralement une teneur en protéines (azote) en moyenne deux fois supérieure aux graminées (céréales). En plus, le fenugrec est une source de protéine de haute qualité et peu coûteuse.

Tableau 3.2 : Teneur en protéines brutes des graines et des feuilles du fenugrec.

Echantillons	Teneur en azote %
Graines	20,76
Feuilles	11,53

3.1.6. Teneur en composés phénoliques

3.1.6.1. Teneur en phénols et en tanins

Le dosage des composés phénoliques effectué sur les graines et les feuilles de *Trigonella foenum-graecum* L. montre une diminution de la teneur en phénols totaux, en tanins condensés et en tanins hydrolysables pour les graines en comparaison avec les feuilles qui représentent des taux de phénols totaux très élevés (Tableau 3.3).

Les tanins sont des composés phénoliques présents dans les végétaux sous forme de polymères, ayant des structures plus ou moins complexes, ils permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections.

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure [116].

Les tanins hydrolysés sont essentiellement localisés dans les dicotylédones des angiospermes. Ils constituent des formes désoxydées des acides phénoliques

simples, comme l'acide gallique (gallotannine) et sa forme dimère, l'acide hexahydroxydiphédmique (ellagitannine), qui s'agglomère généralement avec le D-glucose [117].

Selon SWANT (1979) [118], les tanins ont une action précipitante puissante sur les protéines, même si cette action varie suivant les types de tanins.

En général, les tanins sont considérés comme la défense quantitative idéale pour plusieurs espèces ligneuses. Leur importance écologique comme défense effective contre les herbivores, en précipitant les protéines, a été clairement démontrée par plusieurs travaux [119] ; [120] ; [121] ; [122].

Tableau 3.3 : Teneur en composés phénoliques des graines et des feuilles du fenugrec.

Taux (%) Echantillon	Phénols totaux	Tanins condensés	Tanins hydrolysables
Graines	11,30	1,26	2,35
Feuilles	18,65	3,67	8,24

3.1.6.2. Teneur en flavonoïdes totaux

La courbe d'étalonnage des différentes concentrations (Figure 3.6) et les densités optiques de ces dernières (Tableau 3.4), nous ont permis de déterminer la teneur des flavonoïdes totaux des graines et des feuilles du fenugrec.

L'équation de la courbe d'étalonnage, $y = 2,572x - 0,088$, nous a permis de déterminer la valeur de la concentration en flavonoïdes des graines et des feuilles de la plante du fenugrec.

La quantité des flavonoïdes totaux dans 1000 mg de la poudre des graines et des feuilles de *Trigonella foenum-graecum* L. est respectivement 26,43 et 33,75 mg (Tableau 3.5).

Les résultats obtenus montrent que les feuilles du fenugrec sont plus riches en flavonoïdes que leurs graines.

Les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques qui sont responsables, dans la plupart des plantes, des colorations des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, d'autres ont des effets protecteurs sur le foie.

Des flavonoïdes comme l'héspéridine et la rutine, présentes dans plusieurs plantes, dont le sarrasin (*Fagopyrum esculentum*) et le citronnier (*Citrus limon*), renforcent les parois capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins. Les isoflavones, que l'on trouve par exemple dans le trèfle rouge (*Trifolium pratense*), à effets oestrogéniques, sont efficaces dans le traitement des troubles liés à la ménopause [66] ; [123].

Selon VARSHNEY et SHARMA (1966) [59] et WAGNER et *al.*, (1973) [124], les graines de la plante du fenugrec contiennent : lutéoline, quercétine (quercétine-3-O-rhamnoside), vitexine (8-C- β -D-glucosyle 5,7,4'-trihydroxyflavone), vitexine-7-O-glucoside (afroside), arabinoside d'orientine ou d'isoorientine (8-C-/6-C- β -D-glucosyle-arabinosyle-5,7,3',4'-tétrahydroxyflavone), isovitexine (saponarétine), isoorientine (6-C-glucosyle-lutéoline), vicenine-1 (6-C- β -D-xylopyranosyle-8-C- β -D-glucopyranosyle-apigenine) et le vicenine-2 (6,8-C- β -D-diglycosylapigenine).

En outre, selon KHURANA et *al.*, (1982) [125] et PARMAR et *al.*, (1984) [126], la scopolétine, l'acide chlorogénique, caféique et *p*-coumarique ont été trouvés dans les racines, les pousses et les gousses de la plante. La scopolétine et le lignane-schisandrine ont été trouvés dans les feuilles et les tiges.

D'après KHURANA et *al.*, (1982) [125], l'hymécromone (4-méthyle-7-acétoxycoumarine) a été isolé d'un extrait de la plante entière. Les tiges contiennent, en exception l'hymécromone, l'acide (E)-3-(4-hydroxyphényle)-2-propénoïque, l'acide *p*-coumarique et trigoforine (3,4,7-triméthylcoumarine). Aussi, le composé trigocoumarine a été isolé de la plante entière dont la structure a été assignée pour la première fois comme 3-(éthoxycarbonyl) méthyle-4-méthyle-5,8-diméthoxycoumarin. La structure a été ensuite révisée et le composé a été assigné comme 3-(éthoxycarbonyl) méthyle-4-méthyle-7-8-diméthoxycoumarine).

Tableau 3.4 : Absorbance des différentes concentrations en acide gallique.

Numéro de tubes	Témoïn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Quantité d'acide gallique (mg)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Absorbance	0	0,182	0,365	0,769	0,911	1,311	1,345	1,704	1,841	2,308	2,523

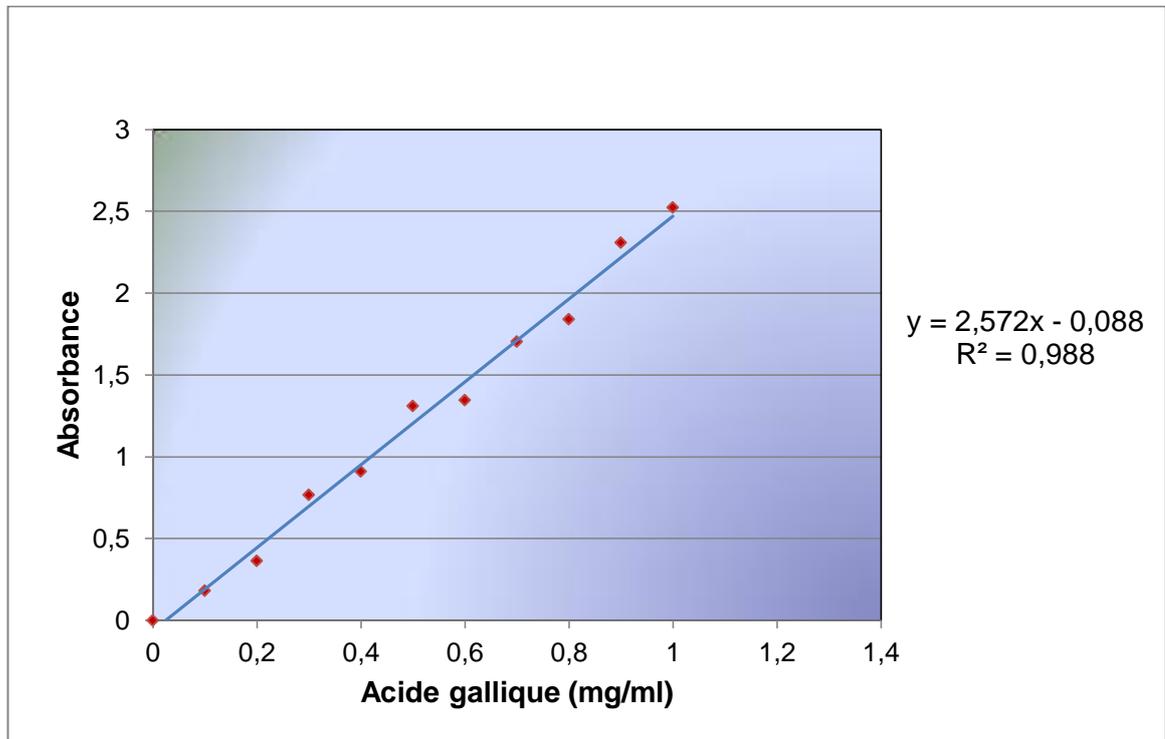


Figure 3.6 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Tableau 3.5 : Quantité des flavonoïdes totaux dans 1000 mg de poudre des graines et des feuilles du fenugrec.

Echantillons	Absorbance	Quantité des flavonoïdes (mg)
Graines	0,5918	26,43
Feuilles	0,7147	33,75

3.1.7. Teneur en cendres

Après élimination des constituants carboniques par une calcination totale d'une prise d'essai de 1 g de poudre végétale, nous avons remarqué que les

cendres totales obtenues sont de couleur claire et représentent chez *Trigonella foenum-graecum* L. une teneur de 10,94 %. En outre, la teneur en cendres sulfuriques est de 12,17 %, cette valeur est légèrement élevée, ce qui peut se justifier par une richesse en éléments minéraux de la poudre (Tableau 3.6).

Tableau 3.6 : Pourcentage des cendres dans la poudre des feuilles de *Trigonella foenum-graecum* L.

	Tare (g)	Masse avant calcination (g)	Masse après calcination (g)	Masse drogue essai (g)	Masse cendre (g)	% cendres
Cendres totales	16,3248	17,3252	16,4342	1,0004	0,1094	10,94
Cendres sulfuriques	17,1604	18,1606	17,2821	1,0002	0,1217	12,17

3.1.8. Caractérisation de l'huile essentielle de *Trigonella foenum-graecum* L. (fenugrec)

L'extraction, par macération alcoolique, de l'huile essentielle du fenugrec a durée 3 heures pour chaque 20 g de poudre de graines en donnant un rendement de 1,03 %.

Cette huile essentielle présente la propriété d'être un liquide visqueux d'une couleur jaune brunâtre (Figure 3.7) et d'une odeur rappelant celle du céleri ou de la livèche.



Figure 3.7. L'huile essentielle de *Trigonella foenum-graecum* L. extraite des graines.

3.1.8.1. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle du fenugrec

Vu le manque d'information sur l'huile issue du fenugrec, nous nous sommes orientés vers la comparaison des caractères physico-chimiques de l'huile essentielle du fenugrec étudié et l'huile essentielle du fenugrec commerciale.

Après analyse des résultats obtenus, il apparaît que les caractéristiques physico-chimiques de l'huile extraite (EH1) sont très proches de celles de l'huile commerciale (EH2) prise comme référence dans notre étude (Tableau 3.7).

Tableau 3.7 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle du fenugrec.

Caractères physico-chimiques		Densité	Indice de réfraction	Indice de peroxyde	Indice de saponification	Indice d'iode	Indice d'acide
Résultats obtenus	HE1	0,89	1,474	12	200,55	135	0,15
	HE2	0,90	1,479	12,7	201,00	139	0,18

HE1 : huile essentielle du fenugrec extraite.

HE2 : huile essentielle du fenugrec commerciale.

3.1.8.2. Analyse spectroscopique de l'huile essentielle du fenugrec par infrarouge (IR)

L'analyse des deux huiles essentielles par la spectroscopie IR, nous a permis d'aboutir aux spectres représentés dans la figure 3.8 et la figure 3.9.

Le spectre de l'huile essentielle extraite (Figure 3.8) a la même allure que le spectre de l'huile commerciale de l'Egypte, utilisée comme standard (Figure 3.9). Ceci nous a permis de déduire, une analogie en matière d'interprétation des spectres.

La technique de la spectroscopie IR nous a permis de déterminer certains groupes constitutifs de l'huile essentielle du fenugrec (Tableau 3.8). Les deux chromatogrammes figure 3.8 et figure 3.9 ont démontré que l'extrait du fenugrec contient plusieurs composés dont la concentration diffère de l'un à l'autre.

MEBAZAA *et al.*, [127], en travaillant sur le fenugrec de la Tunisie, ont démontré que le sotolone (3-hydroxy-4,5-diméthyl-2(5H)-furanone), qui est une cétone, a été établi comme le principal composé responsable de la forte odeur caractéristique de l'huile du fenugrec. Les précurseurs de cette molécule au niveau de la graine sont suspectés pour être le 4-hydroxyisoleucine, qui est l'acide aminé majeur présent et qui diminue pendant la germination, ainsi que son lactone (3-amino-4,5-diméthyl-3,4-dihydro-2(5H)-furanone). En plus du sotolone, ils ont révélé la présence d'aldéhydes (2-méthyle-2-buténal, 5-méthylfurfural, 2-butyl-2-octénal), des phénols (*p*-vinylguaiacol, eugénol, bis-1,1-diméthyléthyl-phénol, phénol), des monoterpènes (limonène, dihydroactinidiolide, *p*-cymène) et des sesquiterpènes (α -muurolène, *cis*-calmenène, 1-*epi*-cubénol, α -copaène, γ -cadinène).

La présence de ces groupes structuraux dans notre huile confirme la bonne qualité de l'huile du fenugrec extraite à l'aide du solvant organique (éther diéthylique).

Tableau 3.8 : Différents groupements structuraux de l'huile essentielle du fenugrec.

Bandes (Cm-1)	Corrélation structurale
2850 – 3000	Groupe alcane C – H aromatique
1450- 1470	} Groupe alcane CH ₂ et CH ₃
1370- 1380	
720 – 725	
1743	Cétone cyclopentanone C = O
1300 – 1000	Esters C – O
1100 – 1200	ArOH (phénols)
1725 - 1745	Aldéhydes
200 – 500	Halogénure d'alkyles C – I

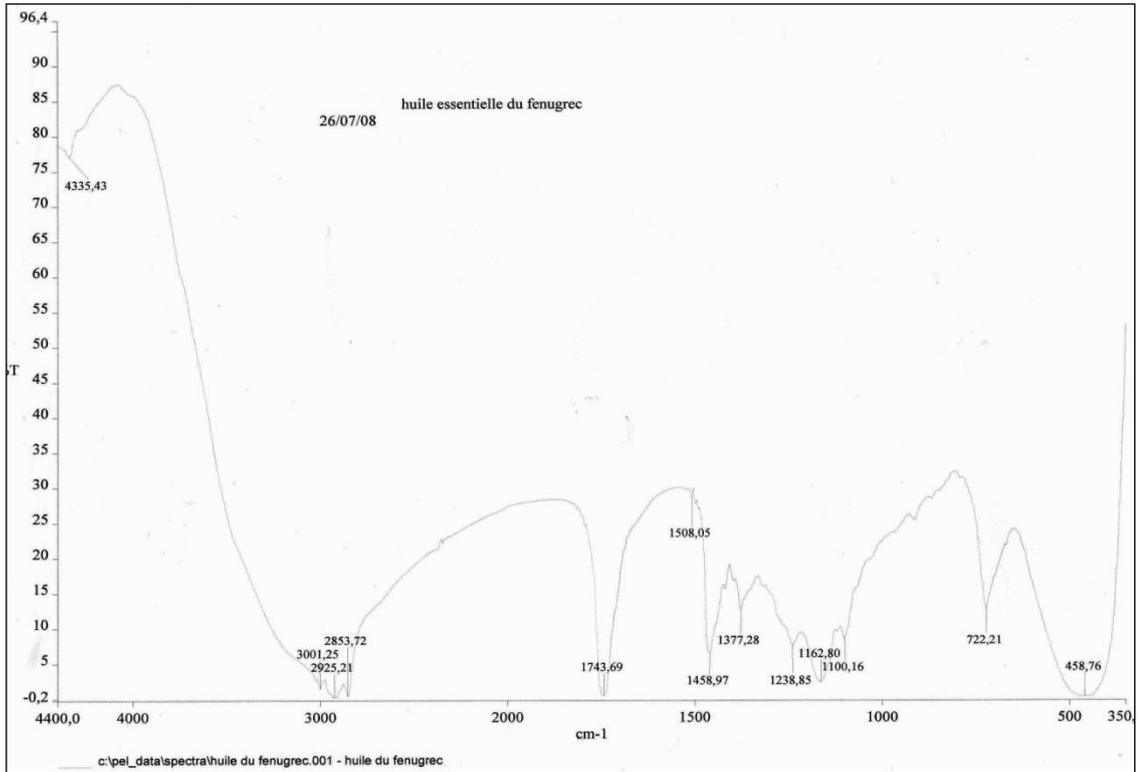


Figure 3.8 : Spectre infra rouge de l'huile essentielle extraite du fenugrec de l'Algérie.

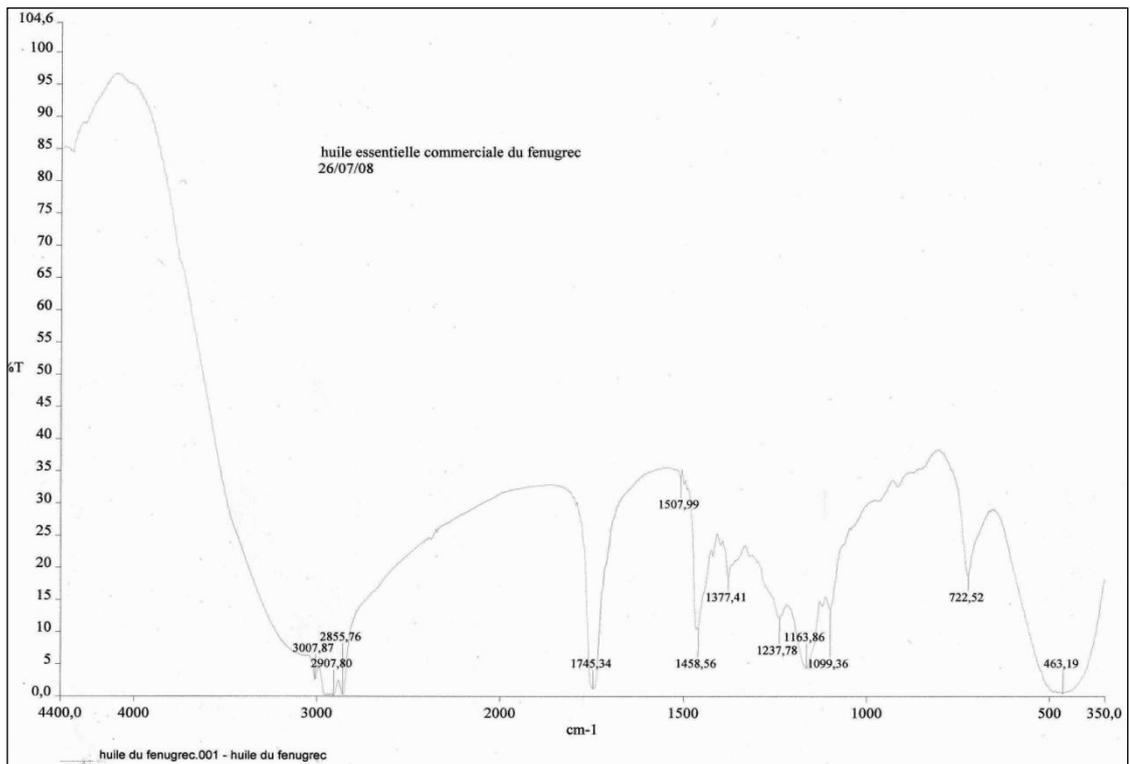


Figure 3.9 : Spectre infra rouge de l'huile commerciale du fenugrec de l'Egypte.

3.2. Analyse microbiologique

Nous constatons que l'extrait éthanolique et l'huile essentielle du fenugrec de Tamanrasset (*Trigonella foenum-graecum* L.) ainsi que l'huile commerciale de l'Égypte ne présentent aucune activité antimicrobienne vis-à-vis les microorganismes testés, comme le montre le tableau 3.9 et la figure 3.10.

Il en ressort de cette analyse microbiologique que le fenugrec étudié (*Trigonella foenum-graecum* L.) ne possède aucun pouvoir antimicrobien.

Tableau 3.9 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et des extraits éthanoliques de l'espèce *Trigonella foenum-graecum* L.

	Huile essentielle de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.		Extrait éthanolique de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	
	Huile extraite des graines	Huile commerciale	Graines	Feuilles
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Sarcina lutea</i>	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiea</i>	-	-	-	-

(-) : absence de la zone d'inhibition.

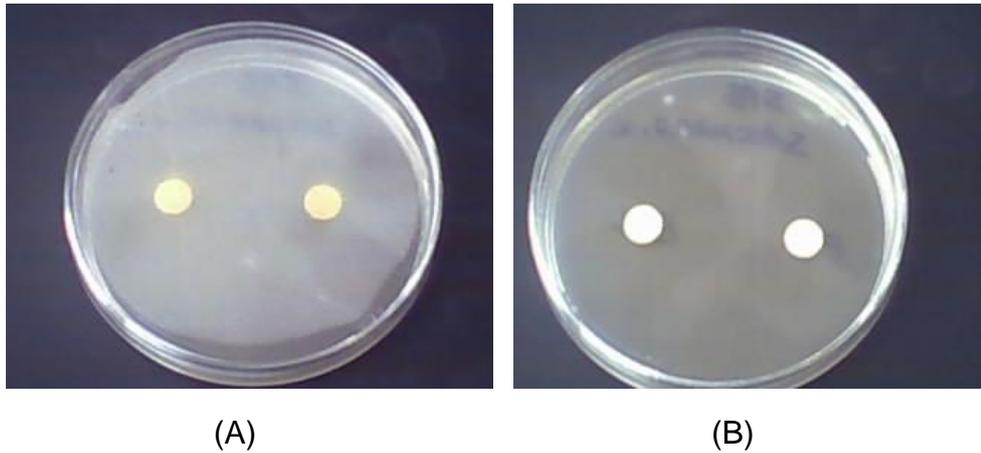


Figure 3.10 : Absence de zones d'inhibition

(A : huile essentielle du fenugrec ; B : extrait alcoolique du fenugrec).

3.3. Etude de l'activité hypoglycémiante

3.3.1. Taux du glucose du lot témoin (eau physiologique)

Chez les souris du groupe A, le taux du glucose (à 0 h) est de 73,5 mg/dl.

D'après les résultats enregistrés, on constate que l'administration orale de l'eau physiologique n'a pas un effet significatif (Tableau 3.10).

Tableau 3.10 : Taux du glucose sanguin des souris normales après administration de l'eau physiologique.

Groupe	Voie	n	Taux du glucose sanguin (mg/dl)			
			0h	1h	2h	4h
A	Orale	1	75	74	72	69
		2	81	79	77	73
		3	70	69	67	64
		4	71	69	68	65
		5	74	72	70	67
		6	70	68	67	64
Moyenne			73,50	71,83	70,17	67,00
Ecart-type			4,2308	4,1673	3,8686	3,5213

3.3.2. Effet hypoglycémiant de l'extrait aqueux des graines de *Trigonella foenum-graecum* L. (fenugrec)

Dans notre étude, les taux moyens du glucose initial (à 0 h) chez les souris du groupe B et C sont respectivement 69,83 mg/dl et 74 mg/dl (Figure 3.11).

L'administration orale de l'extrait aqueux de l'espèce *Trigonella foenum-graecum* L. à une dose, respectivement de 10 mg/kg et 20 mg/kg, produit un effet hypoglycémiant significatif après 1h, 2h et 4h (Figure 3.11).

L'étude statistique (Appendice I), révèle l'absence de différence significative entre les glycémies des différents lots traités par l'extrait aqueux ($p > 0,05$). Par contre on note une différence significative entre le lot témoin et les lots traités ($p < 0,05$).

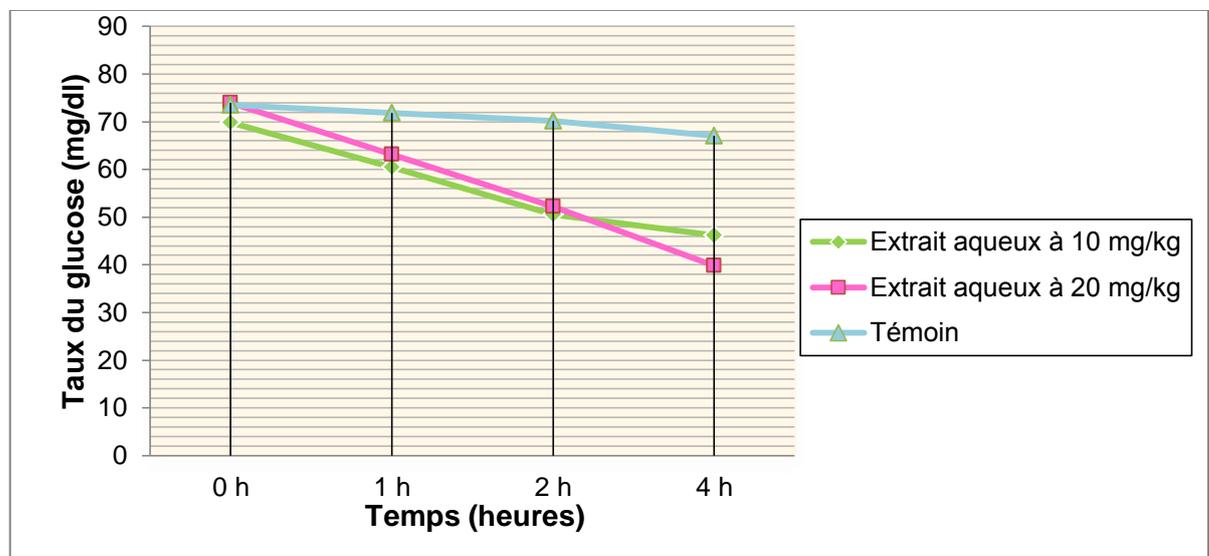


Figure 3.11 : Courbes du taux du glucose sanguin en fonction du temps et des doses de l'extrait aqueux des graines du fenugrec.

3.3.3. Effet hypoglycémiant de l'extrait méthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum* L.

Dans cette partie de notre étude, les taux moyens du glucose (à 0 h) chez les souris du groupe D et E sont respectivement 79,5 et 75,16 mg/dl (Figure 3.12).

L'administration orale de l'extrait méthanolique de l'espèce *Trigonella foenum-graecum* L. à une dose de 10 mg/kg ne produit pas un effet significatif.

Tandis que la dose de 20 mg/kg engendre un effet hypoglycémiant significatif après 1h, 2h et 4h (Figure 3.12).

L'étude statistique (Appendice I), révèle une différence significative de la glycémie entre les lots traités par l'extrait méthanolique à 10 mg/kg et ceux traités par l'extrait méthanolique à 20 mg/kg.

En accord avec la littérature de *Trigonella foenum-graecum* L. (fenugrec), cette plante est connue depuis longtemps pour ces propriétés antidiabétiques.

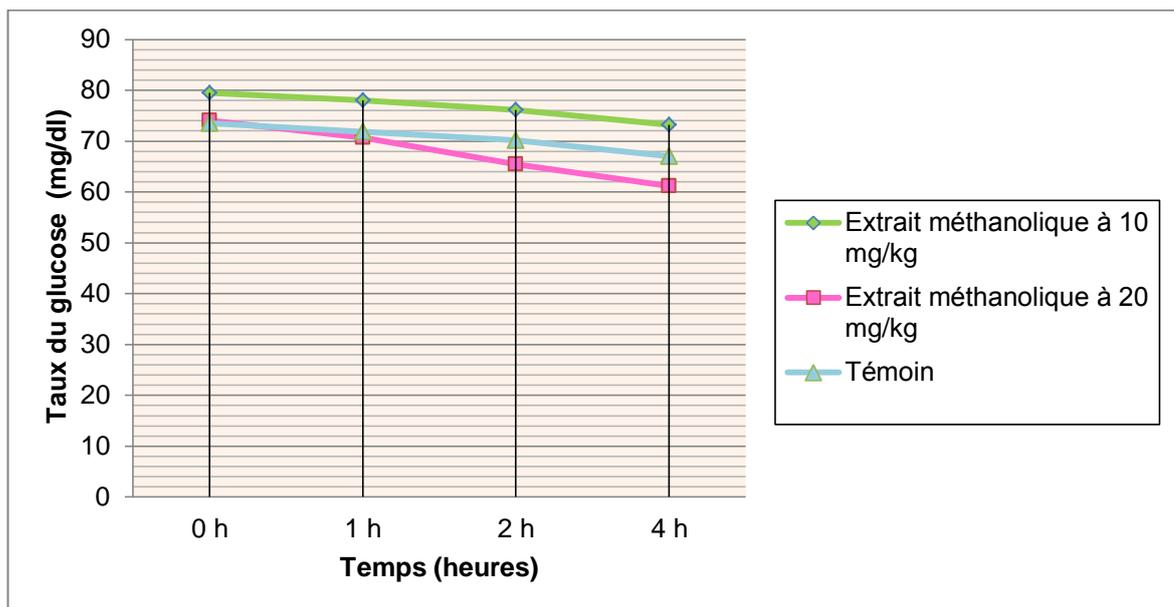


Figure 3.12 : Courbes du taux du glucose sanguin en fonction du temps et des doses de l'extrait méthanolique des graines du fenugrec.

Notre étude montre que l'effet de l'extrait aqueux des graines du fenugrec à des doses de 10 mg/kg et 20 mg/kg est plus remarquable que celui de l'extrait méthanolique à des doses similaires. Ceci peut être dû à la nature des substances responsables de l'activité hypoglycémiante qui sont probablement plus solubles dans l'eau que dans le méthanol.

En accord avec ces résultats, il est possible que les doses (10 et 20 mg/kg) de l'extrait aqueux et la dose (20 mg/kg) de l'extrait méthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum* L. utilisées dans notre expérimentation, soient très faibles pour provoquer un effet considérable sur le taux du glucose sanguin de 1 h à 4 h.

Nos résultats expérimentaux sont en accord avec ceux annoncés par TAYYABA et *al.*, (2001) sur le fenugrec du Pakistan [128]. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'extrait aqueux des feuilles de *Sclerocarya birrea* chez des lapins en état d'hyperglycémie [129]. De plus, les résultats de l'étude de SHARMA et *al.*, en 1996, concluent l'utilité des graines du fenugrec dans la gestion du diabète [130].

En outre, diverses avancées pharmacologiques ont été réalisées sur les graines de *Trigonella foenum-graecum* L. Des équipes montpelliéraines ont mis en évidence que ces graines contenaient un acide aminé non conventionnel qui est le 4-hydroxyisoleucine, aux propriétés insulino-stimulantes particulièrement intéressantes. Cette molécule, qui n'existe ni chez l'homme, ni chez l'animal, et dont les propriétés insulino-stimulantes ont été mises en évidence dès 1991, a fait l'objet de plusieurs dépôts de brevet internationaux. En effet, le 4-hydroxyisoleucine, en agissant sur la cellule β pancréatique, stimule la sécrétion d'insuline uniquement lorsque la concentration en glucose du milieu augmente. Il permet ainsi d'éviter les accidents hypoglycémiques observés lors de la prise des sulfonylurées [131].

D'après FAZLI et HARDMAN (1971) [132] et MARLES et FARNSWORTH (1995) [133], certains composés chimiques de la plante du fenugrec, y compris les alcaloïdes, les saponines et les stéroïdes, ont aussi un effet sur l'activité hypoglycémiant de cette plante. Il y a très probablement un « effet fibre » compte tenu de la richesse des graines du fenugrec en fibres solubles et insolubles, car un extrait dégomme du fenugrec ne présente aucun effet sur la glycémie. Les fibres solubles de type gommes sont riches en galactomannanes, qui forment un gel visqueux pouvant moduler l'absorption du glucose et donc améliorer la tolérance au glucose des patients diabétiques. En revanche, les fibres ne peuvent pas expliquer l'effet hypoglycémiant du fenugrec.

D'autres travaux ont été réalisés dans le but d'évaluer l'effet des graines du *Trigonella foenum-graecum* L. sur le contrôle de la glycémie chez des patients non insulino-dépendant (diabète type 2), les résultats obtenus ont montré que la poudre des graines du fenugrec a eu une influence sur le taux du glucose sanguin chez ces malades récemment diagnostiqués, mais ces données restent toujours à

confirmer. Parmi ces études, on cite celle de SHARMA et *al.*, (1996) [130], RAGHURAM et *al.*, (1994) [134] et GUPTA et *al.*, (2001) [135].

3.4. Effet anti-inflammatoire

L'inhibition induite par le Diclofénac à la dose de 25 mg/kg a été maximale à la cinquième heure suivant l'administration de la carragénine. L'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux ont la même cinétique d'action que celle du Diclofénac (Figures 3.13, 3.14, 3.15).

Le maxima des pourcentages d'inhibition de l'œdème par l'huile essentielle ont été de 39,50 %, 55,41 % et 72,59 % respectivement aux doses de 40 mg/kg, 80 mg/kg et 120 mg/kg. Par contre le pourcentage d'inhibition du Diclofénac à la dose de 25 mg/kg a été de 71,56 % (Figure 3.13). L'huile essentielle à 120 mg/kg a un pouvoir anti-inflammatoire légèrement supérieur à celui du Diclofénac (Figure 3.15).

L'étude statistique (Appendice I) révèle l'absence d'une différence significative entre l'effet des deux substances ($p > 0,05$).

Par ailleurs, les pourcentages maximaux d'inhibition de l'œdème avec l'extrait aqueux ont été de 37,32 %, 62,77 % et 80,59 % respectivement aux doses de 40 mg/kg, 80 mg/kg et 120 mg/kg (Figure 3.14). D'après ces pourcentages, on constate que l'extrait aqueux à 120 mg/kg a montré une activité anti-inflammatoire nettement supérieure à celle du Diclofénac (Figure 3.15).

Le test ANOVA (Appendice I) démontre une différence significative entre l'effet des deux substances ($p < 0,05$).

Ces résultats sont similaires à de nombreux travaux sur les feuilles de *Syzygium guineense* [136], sur des écorces de racines de *Calotropis procera* Ait. [137] et des feuilles de *Trigonella foenum-graecum* L. de l'Iran [138].

Les DI_{50} ont été de 59,93 mg/kg pour l'extrait aqueux et de 66,40 mg/kg pour l'huile essentielle (Figure 3.16). Ces valeurs révèlent que l'extrait aqueux des graines du fenugrec possède une activité anti-inflammatoire significative.

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux peut s'expliquer, en partie, par la présence dans les graines de *Trigonella foenum-graecum* L., de composés polyphénoliques comme les tanins et les flavonoïdes et aussi la présence des alcaloïdes [12].

Ces composés chimiques ont été révélés par la spectrométrie et la chromatographie sur couche mince.

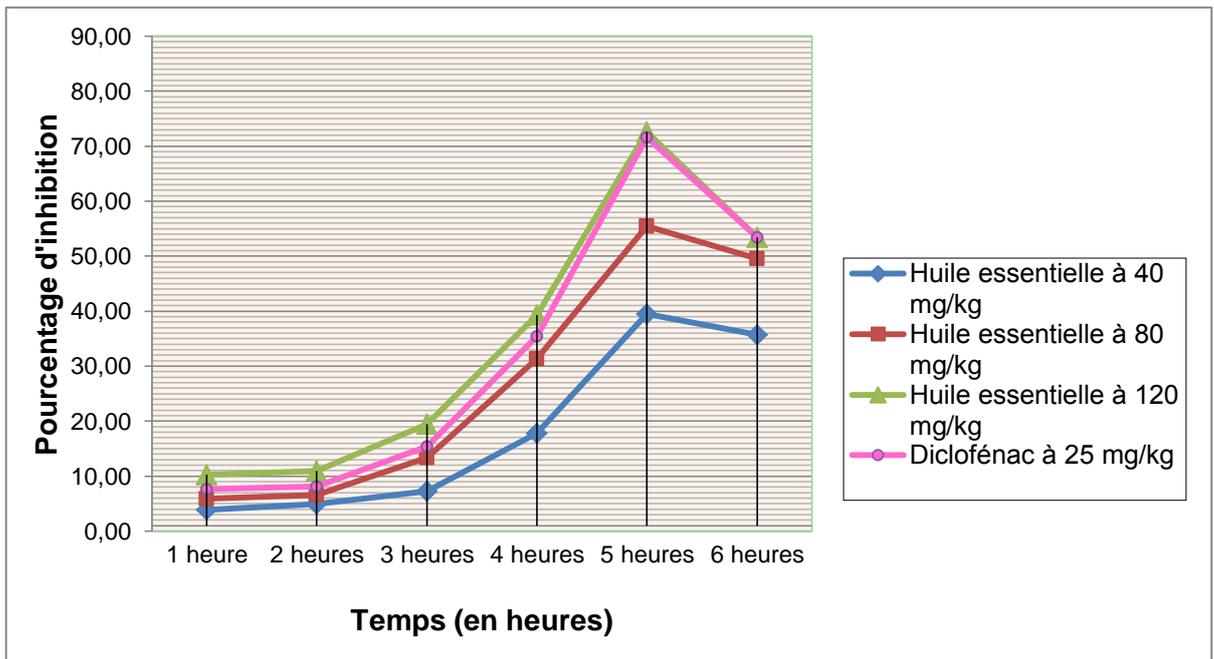


Figure 3.13 : Courbes des pourcentages d'inhibition de l'œdème en fonction du temps et des doses avec l'huile essentielle du fenugrec.

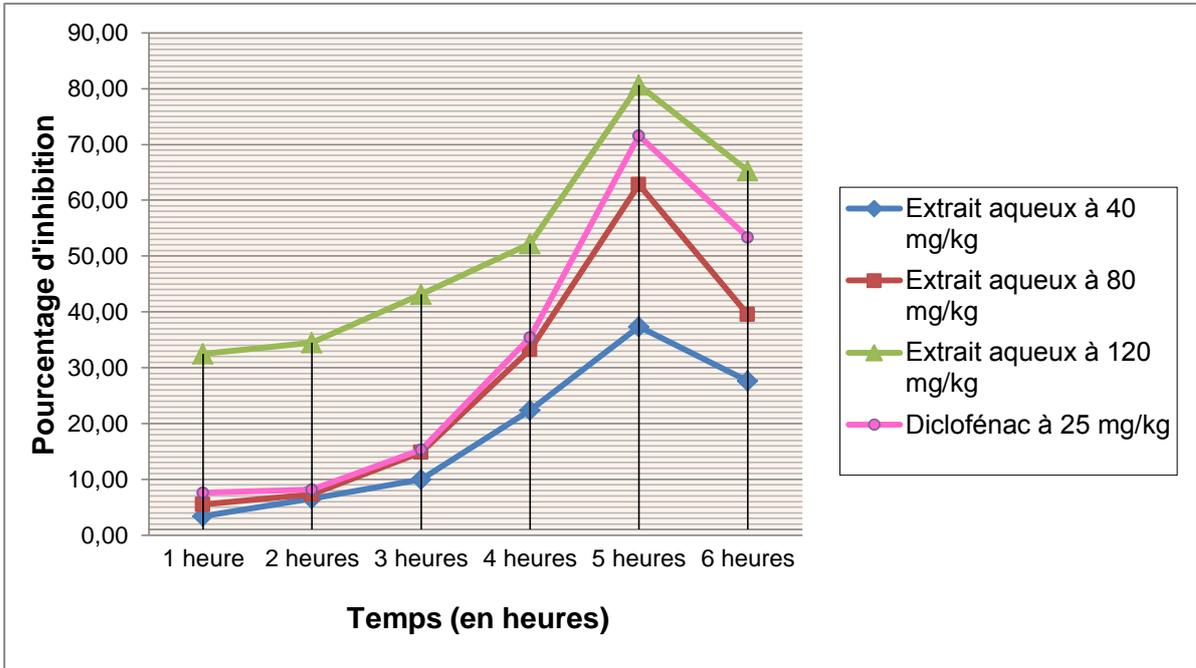


Figure 3.14 : Courbes des pourcentages d'inhibition de l'œdème en fonction du temps et des doses avec l'extrait aqueux du fenugrec.

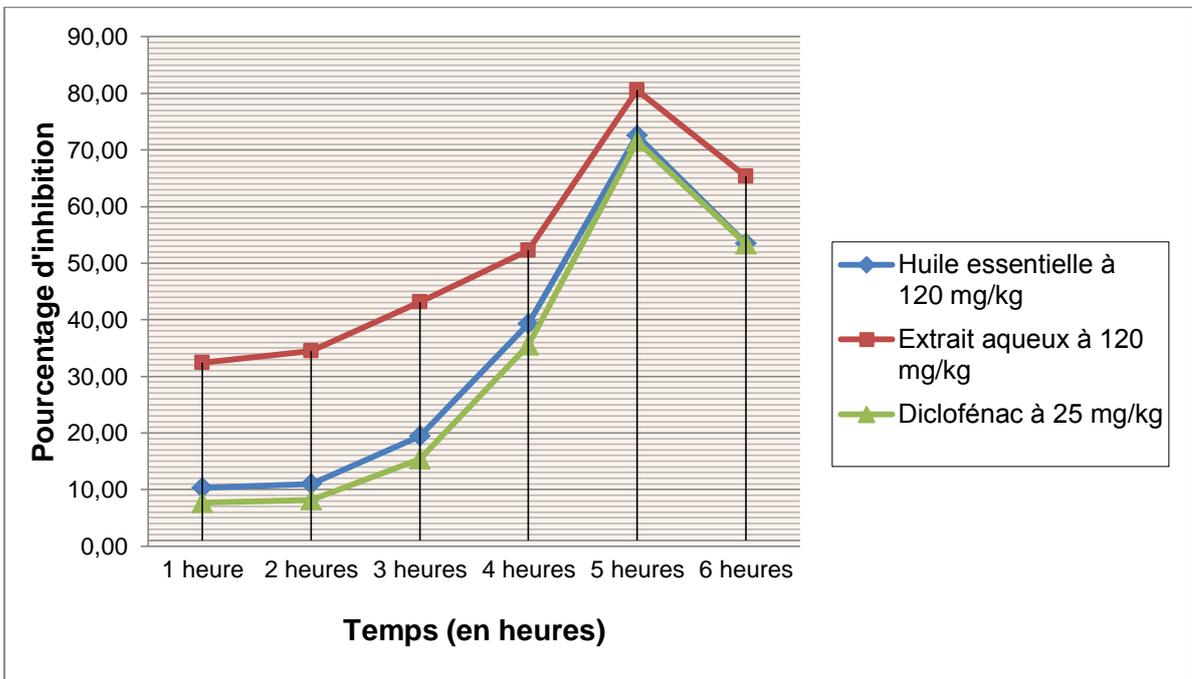


Figure 3.15 : Courbes d'évolution des pourcentages d'inhibition de l'œdème en fonction du temps et des fortes doses comparativement au Diclofénac.

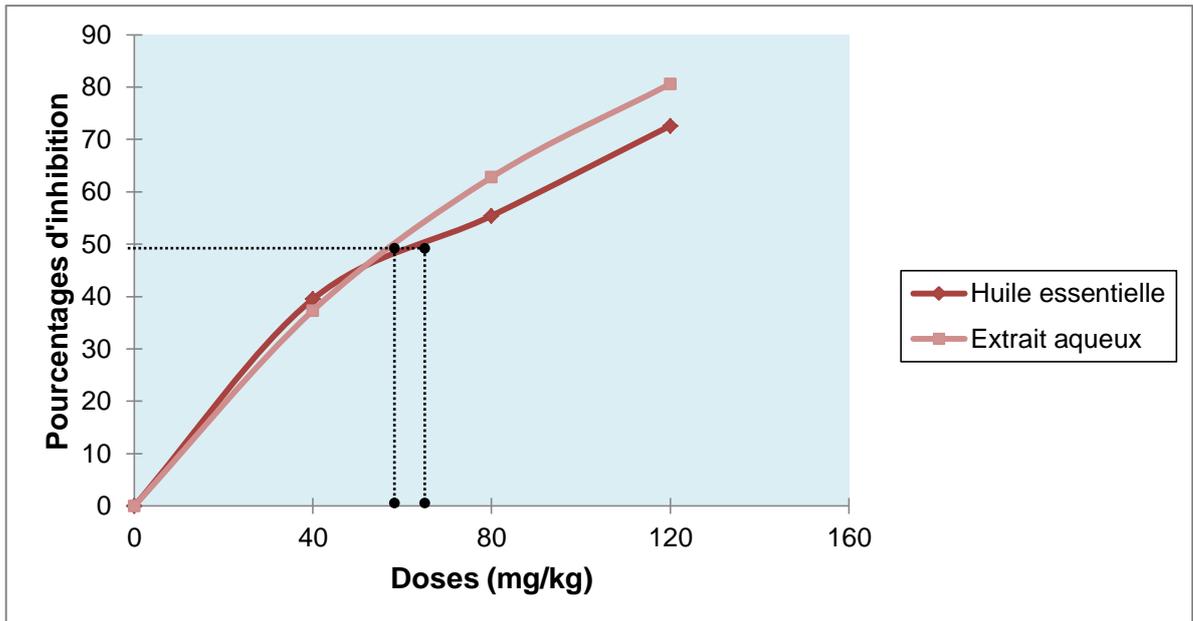


Figure 3.16 : Dose inhibitrice de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux du fenugrec à la cinquième heure.

3.5. Effet antipyrétique du fenugrec

3.5.1. Evolution des températures moyennes avant et après traitement

On constate que dans les mêmes conditions opératoires, l'administration de l'extrait aqueux des graines pour le lot 3 et du paracétamol pour le lot 4 induit une inhibition progressive de l'hyperthermie, dont on remarque que la température maximale est proche ou égale à la température moyenne enregistrée avant l'injection, comme l'indique le tableau 3.11 et la figure 3.17.

Par contre, chez les sujets du lot 2 recevant uniquement de l'endotoxine, la température maximale est fortement supérieure à la température moyenne avant l'injection et donc les lapins deviennent fébriles.

Tableau 3.11 : Evolution des températures moyennes enregistrées avant et après traitement par l'extrait aqueux des graines et par le paracétamol.

	Température moyenne avant injection	Température maximale moyenne après injection
Lot 1 (Témoin 1)	38,9	38,9
Lot 2 (Témoin 2)	39,0	41,9
Lot 3 (Essai 1)	39,0	39,2
Lot 4 (Essai 2)	39,0	39,1

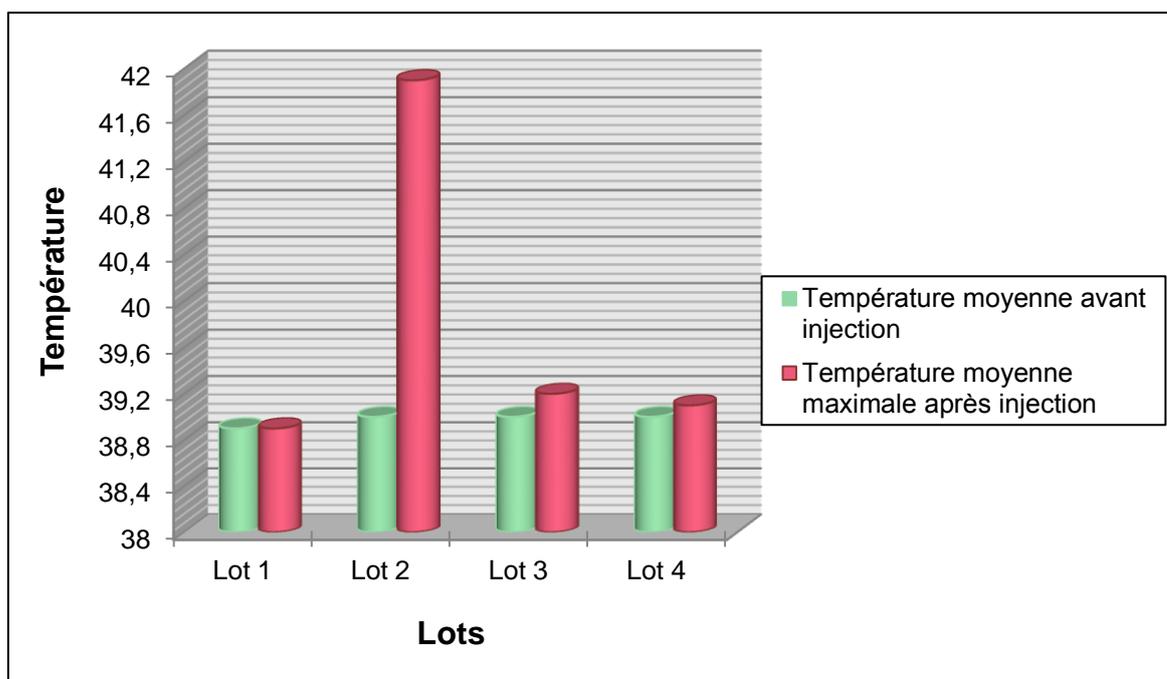


Figure 3.17 : Evolution des températures moyennes avant et après le traitement.

3.5.2. Pourcentage d'inhibition de l'hyperthermie

Pour valoriser l'effet antipyrétique de l'extrait aqueux des graines, on a calculé le pourcentage d'inhibition de l'hyperthermie chez les lapins après le traitement.

On remarque que le pourcentage d'inhibition de l'hyperthermie des lapins traités par l'extrait aqueux des graines est proche de celui enregistré chez les lapins traités par le paracétamol. Ce qui permet d'affirmer que les graines du fenugrec ont un effet antipyrétique remarquable (Tableau 3.12).

Ces résultats sont proches des travaux effectués par AHMADIANI et *al.*, (2001) [138] sur les feuilles de *Trigonella foenum-graecum* L. de l'Iran .

Par référence à l'étude phytochimique que nous avons réalisé sur les graines du fenugrec, il semble que l'effet antipyrétique de cette plante est probablement dû à la présence des alcaloïdes et des composés phénoliques.

La grande variété des composés phénoliques en composé simple comme l'acide salicylique : molécule donnant par la suite l'aspirine, et en substances plus complexes peut expliquer l'activité antipyrétique des phénols [55].

Tableau 3.12 : Pourcentages d'inhibition de l'hyperthermie chez les lapins traités.

% d'inhibition de l'hyperthermie chez les lapins traités par l'extrait aqueux des graines	% d'inhibition de l'hyperthermie chez les lapins traités par le paracétamol
90	95

3.6. Culture *in vitro* du fenugrec

3.6.1. Etude de la germination de la graine du fenugrec

3.6.1.1. Germination des graines du fenugrec *in situ*

3.6.1.1.1. Faculté germinative

Les graines du fenugrec ont toutes germé au bout de deux jours, dans la majorité des lots testés. Nous avons constaté que tous les lots testés avaient les mêmes réponses, c'est-à-dire une faculté germinative comprise entre 97,5 % et 100 % (Tableau 3.13). Cependant, nous avons noté une légère amélioration de la faculté germinative des graines traitées par le froid. Mais cette amélioration n'est pas significative et les graines du fenugrec germent avec une rapidité impressionnante.

La germination de la graine du fenugrec n'est apparemment pas photosensible puisque le taux de germination reste important aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité (Tableau 3.13).

Tableau 3.13 : Faculté germinative (%) des graines du fenugrec cultivées *in situ* à l'obscurité (O) et à la photopériode (L).

Jours	J1		J2		J3		J4		J5	
	O	L								
Taux de germination	0%	0%	97,5%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

La faculté germinative ne donne qu'une idée incomplète de l'aptitude à la germination [104], nous avons jugé utile, l'analyse de la vitesse de germination du fenugrec.

3.6.1.1.2. Vitesse de germination

Les graines du fenugrec ont une importante vitesse de germination, quels que soient les prétraitements qu'elles subissent [103] ; [139].

En effet, les graines des deux lots testés (à la lumière et à l'obscurité) ont une vitesse de germination élevée. Le maximum observé est de 51,33 graines germées/jour à la lumière et de 50,83 graines germées/jour à l'obscurité.

3.6.1.1.3. Courbes de germination

Les courbes de germination sont le moyen le mieux indiqué pour décrire la germination [104]. Les courbes obtenues (Figure 3.18) délimitent les trois phases :

Phase 1 : le temps de latence est de 24 heures.

Phase 2 : le temps de la phase active est très court (1 jour à la lumière et 2 jours à l'obscurité).

Phase 3 : le temps de cette phase dépend de la durée du test de germination (5 jours).

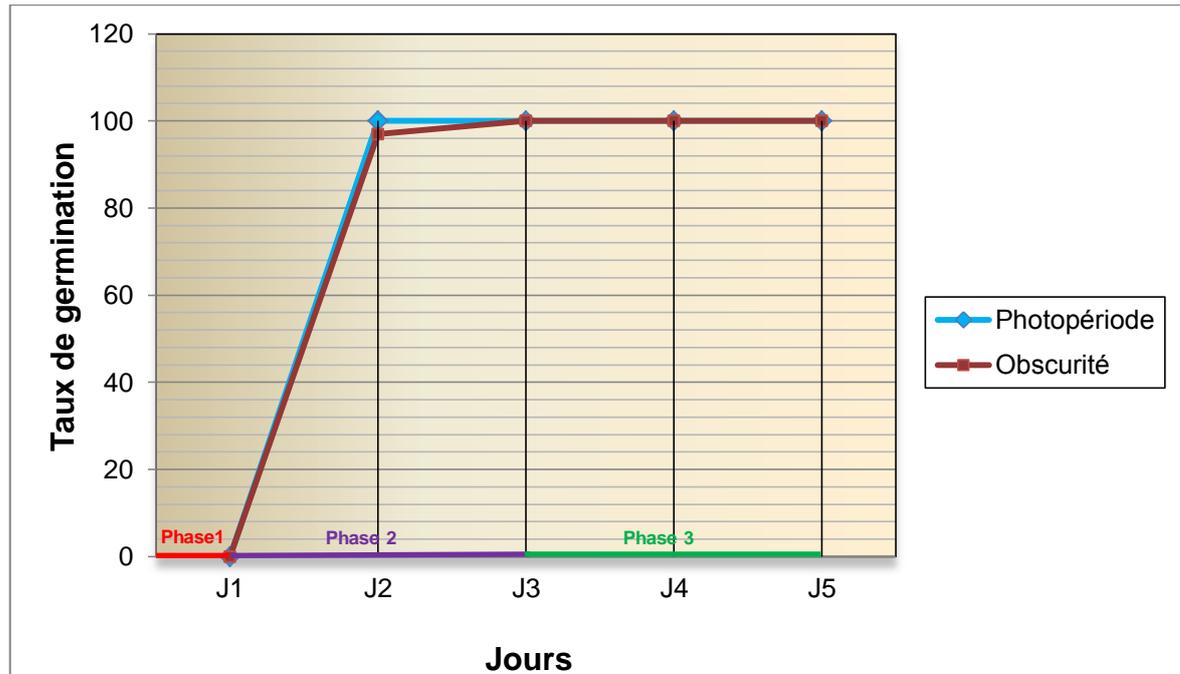


Figure 3.18 : Courbes de germination des graines du fenugrec cultivées *in situ*.

3.6.1.2. Germination des graines du fenugrec *in vitro*

Après désinfection des graines avec l'hypochlorite de calcium à 6 %, pendant 10 min, nous avons obtenu un pourcentage de contamination très faible (4,59 %).

3.6.1.2.1. Faculté germinative

En effet, 24 heures après la mise en germination, nous avons relevé une percée de la radicule dans la majorité des graines. Le taux de germination calculé est de 95 % à la lumière et de 92,5 % à l'obscurité, lequel après 48 heures atteint 100 % dans les deux lots (Tableau 3.14).

Tableau 3.14 : Faculté germinative (%) des graines du fenugrec cultivées *in vitro* à l'obscurité (O) et à la photopériode (L).

Jours	J1		J2		J3		J4		J5	
	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L
Taux de germination	0%	0%	92,5%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

3.6.1.2.2. Vitesse de germination

La vitesse de germination évaluée sur 40 graines pour chaque test est très importante, elle est de 50,33 graines germées/jour à la lumière et de 43,66 graines germées / jour à l'obscurité.

3.6.1.2.3 Courbes de germination

Les courbes de germination donnent une idée complète sur l'évolution de la germination d'un lot de semence placé dans des conditions choisies. L'allure des courbes que nous avons obtenues est pratiquement identique à celles obtenues *in situ*.

Le temps de latence (phase 1) est de 24 heures pour les deux lots testés. En plus, la durée de la phase active (phase 2) est de 48 heures pour les deux lots tandis que la phase lente (phase 3), comme nous l'avons mentionné, ne dépend que de la durée du test de germination (Figure 3.19).

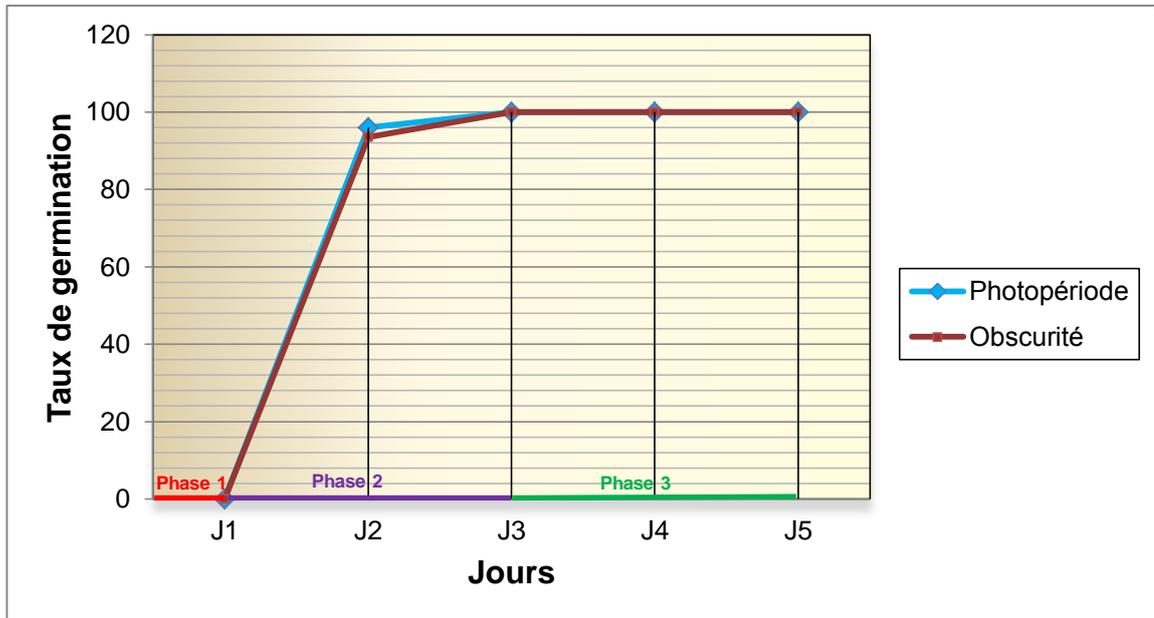


Figure 3.19 : Courbes de germination des graines du fenugrec cultivées *in vitro*.

3.6.2. Croissance et développement des plantules

La croissance se poursuit de façon presque homogène pour toutes les plantules cultivées *in vitro* sur milieu MS. Des mesures de croissance sont réalisées régulièrement sur 15 plantules prises au hasard. La moyenne de l'allongement est prise en considération.

Les résultats obtenus après 10 jours de culture montrent que la croissance et le développement des plantules du fenugrec sont très rapides et très importants (Figure 3.20) et (Figure 3.21).



Figure 3.20 : Vitro-semis obtenus après 10 jours de culture.

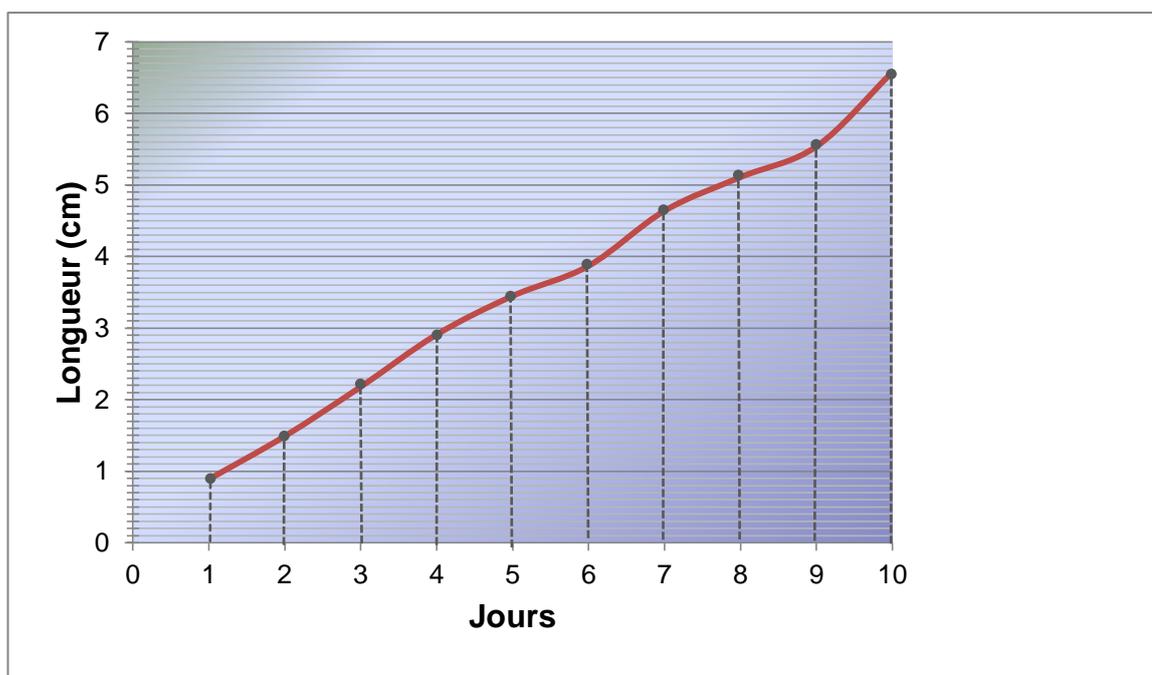


Figure 3.21 : Courbe de croissance et de développement des plantules après 10 jours de culture *in vitro*.

3.6.3. Aptitude à la callogenèse

Lors de nos essais, nous avons testé l'effet de plusieurs facteurs sur l'aptitude à la callogenèse des différents organes du fenugrec, dans le but de définir les conditions optimales de la callogenèse de cette plante.

Le suivi de la callogenèse porte à la fois sur la détermination du taux d'explants callogènes, l'estimation quantitative de cals formés (poids frais et poids sec) et la description des caractéristiques morphologiques des cals (texture et couleur).

3.6.3.1. Effet de la composition hormonale du milieu

Chez tous les explants mis en culture, la callogenèse se manifeste au cours de la deuxième semaine, au niveau des parties sectionnées des explants, pour la plupart des conditions testées. Par la suite, et après quatre semaines exactement, les proliférations cellulaires recouvrent toute la surface de l'explant. De plus, on note que l'absence totale des régulateurs de croissance a un effet négatif sur l'induction de la callogenèse (Figure 3.22).

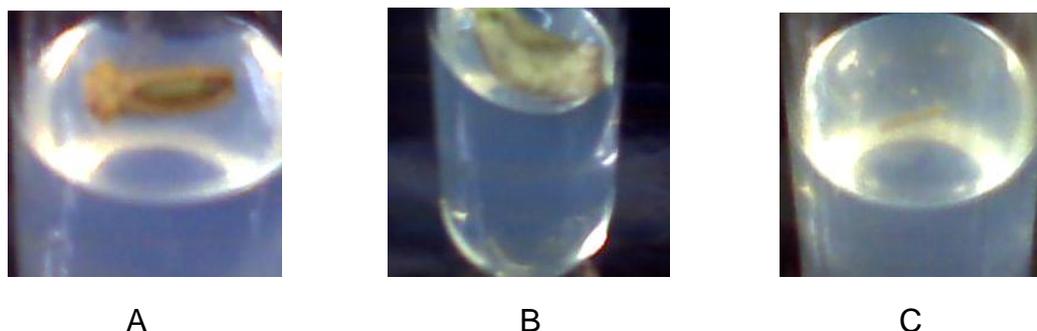


Figure 3.22 : Absence de formation des cals sur les fragments mis en culture sur un milieu MS sans régulateurs de croissance (A : hypocotyle ; B : feuille ; C : racine).

3.6.3.1.1. Effet des auxines et des cytokinines seules

De manière générale, on a constaté que l'utilisation des auxines seules dans les milieux d'induction s'est révélée moins efficace à la callogenèse, quelque soit le type d'explant utilisé. Cependant, l'usage d'ANA (M1) comparé au 2,4-D (M2) est plus favorable (Tableau 3.15) et (Figure 3.23).

L'apport des cytokinines seules, dans le milieu d'induction, s'est révélé plus efficace par rapport aux auxines. Elles ont permis l'obtention de gros cals d'un poids frais oscillant entre 0,39 g et 0,45 g, après quatre semaines de culture (Tableau 3.15) et (Figure 3.24).

Tableau 3.15: Effet de l'apport des auxines et des cytokinines seules sur le poids frais des cals.

Milieu de culture additionné de :		Moyenne des poids frais des cals obtenus à partir de :		
		Hypocotyles	Feuilles	Racines
auxines	ANA = 1mg/l	0,2853 g	0,2512 g	0,1810 g
	2-4D = 1 mg/l	0,2140 g	0,1735 g	0,1023 g
Cytokinines	BAP = 1 mg/l	0,4213 g	0,3737 g	0,2960 g



Figure 3.23 : Callogenèse sur fragments d'hypocotyle après 4 semaines de culture sur le milieu MS contenant (A : 1 mg/l de 2,4-D ; B : 1mg/l d'ANA).

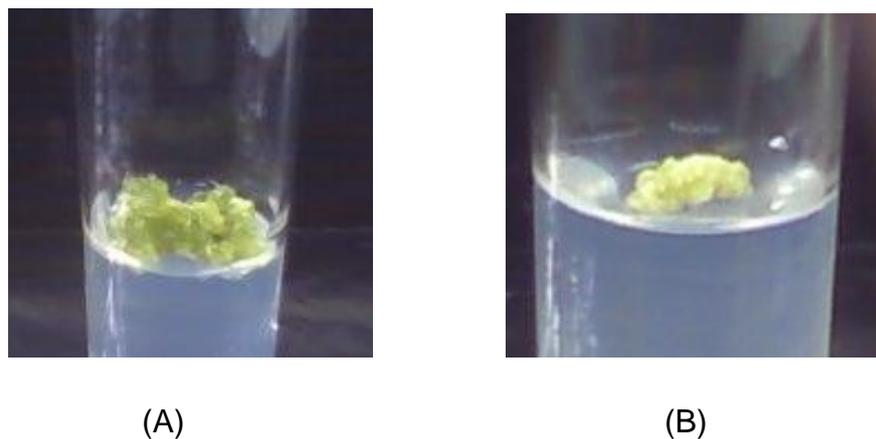


Figure 3.24 : Callogenèse sur fragments d'hypocotyle après 4 semaines de culture sur le milieu MS contenant (A : 1 mg/l de BAP ; B : 1 mg/l d'ANA).

3.6.3.1.2. Action de la combinaison auxines-cytokinines

Les résultats représentant l'influence de la nature et de la concentration des régulateurs de croissance sur l'aptitude à la callogenèse d'explants montrent clairement que l'apport combiné des auxines et cytokinines ne peut être que bénéfique et plus efficace, que l'apport des auxines et des cytokinines séparées et est, par conséquent, très stimulant pour la callogenèse.

3.6.3.1.2.1. Taux de callogenèse

L'aptitude à la callogenèse des racines est faible par rapport à celle des feuilles et des hypocotyles (Figure 3.25).

En effet, la callogenèse a été induite sur l'ensemble des milieux testés, mais à des degrés différents.

Près de 100 % des explants de feuilles et d'hypocotyles cultivés sur les milieux M4 (0,6 mg/l ANA + 0,4 mg/l BAP), M6 (0,3 mg/l ANA + 0,8 mg/l BAP + 0,8 mg/l KIN), M8 (0,1 mg/l 2,4-D + 3 mg/l BAP) et M9 (0,1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) développent des cals. Cependant, pour les milieux M5 (0,2 mg/l ANA + 0,3 mg/l BAP + 0,3 mg/l KIN) et M7 (3 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BAP), les taux de callogenèse enregistrés sont respectivement de 95,83 % et de 90,28 % pour les feuilles et 98,05 % et 95 % pour l'hypocotyle (Figure 3.25).

Ainsi, nous retenons les milieux M4, M6, M8 et M9 qui donnent le meilleur développement de cal en les comparant avec les milieux M5 et M7.

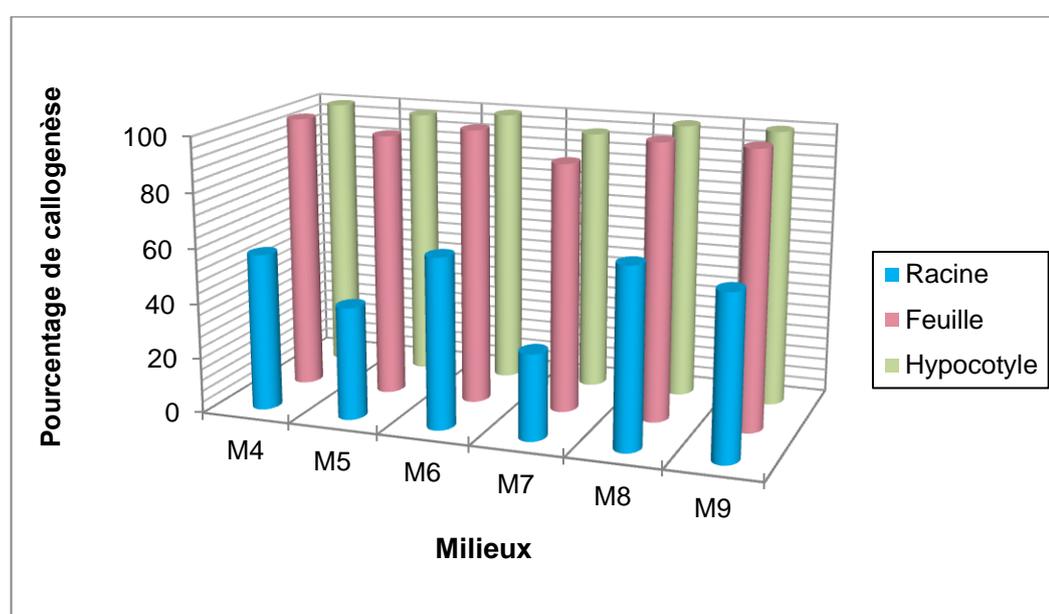


Figure 3.25 : Effet de la composition hormonale sur le taux de callogenèse des explants en milieu MS après 4 semaines de la culture.

3.6.3.1.2.2. Croissance des cals en poids frais et sec

L'analyse de la variance à un critère de classification, effectuée sur les poids frais et sec obtenus après quatre semaines de culture a révélé une différence très significative entre les milieux utilisés (Appendice I).

Le milieu M8 (0,1 mg/l de 2,4-D + 3 mg/l de BAP) est le siège d'une prolifération cellulaire plus intense, par rapport aux autres milieux (Figure 3.26) et (Figure 3.27).

Les cals obtenus avec l'hypocotyle présentent les poids frais et sec les plus élevés, sur tous les milieux testés. Les poids frais et sec des cals issus des feuilles sont aussi nettement plus élevés que les poids des cals issus des racines, quelque soit le milieu testé.

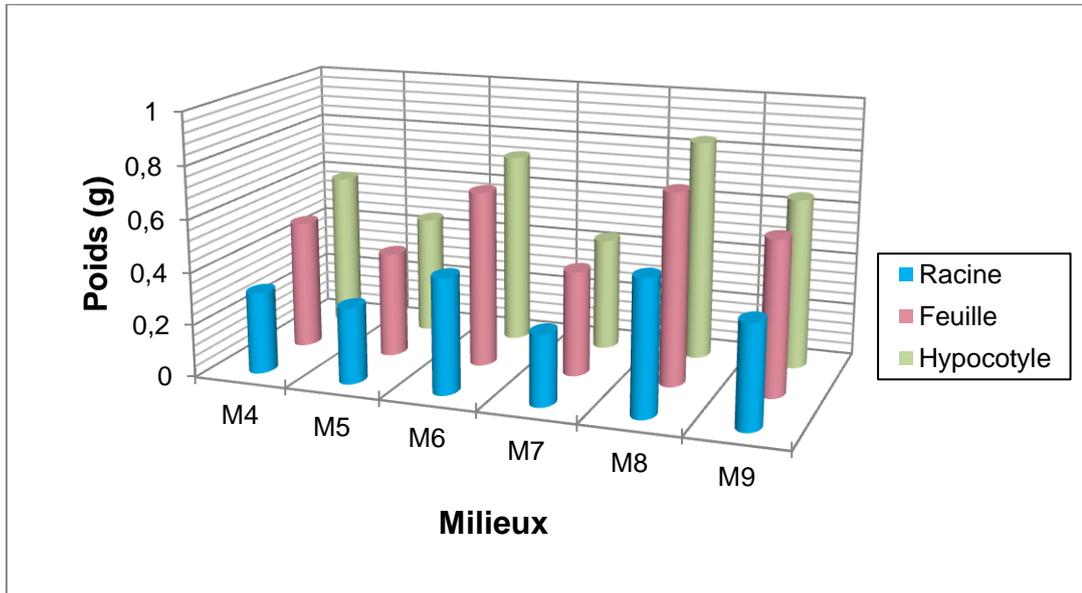


Figure 3.26 : Effet de la composition hormonale sur la croissance des cals en poids frais après 4 semaines de culture.

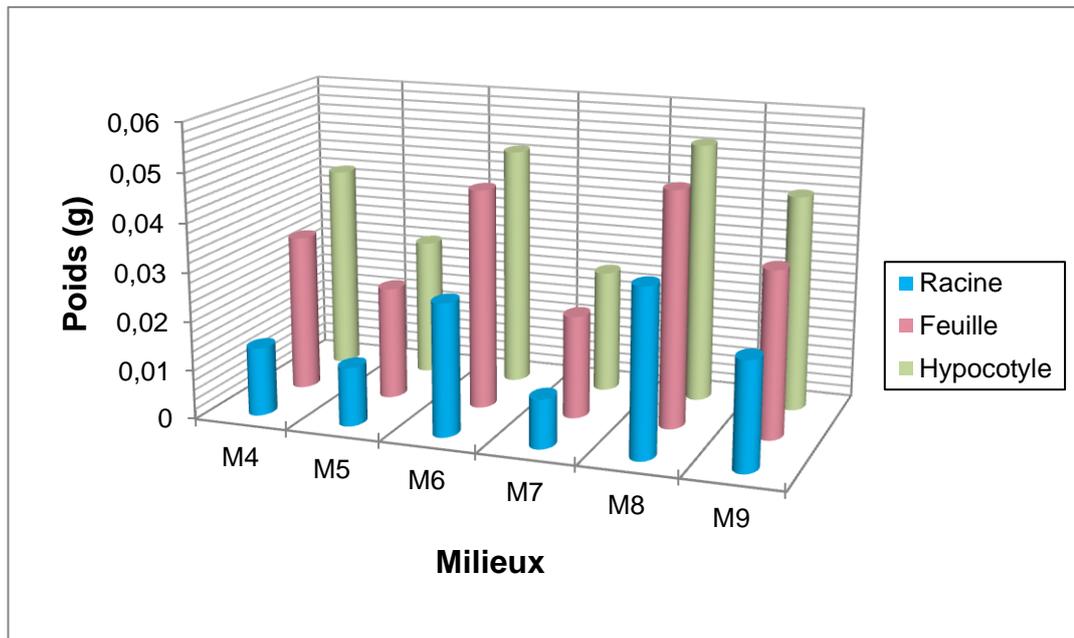


Figure 3.27 : Effet de la composition hormonale sur la croissance des cals en poids sec après 4 semaines de culture.

3.6.3.2. Effet de la fragmentation de l'explant sur la callogenèse

La comparaison des taux de callogenèse des trois parties de l'hypocotyle n'a pas révélé une différence significative entre eux. Les taux de callogenèse sont à 100 % pour les trois parties de l'hypocotyle pour la plupart des milieux de culture utilisés. Cependant, la partie apicale cultivée sur milieu M5 et M6 ainsi que la partie basale cultivée sur milieu M5 présentent respectivement des pourcentages de callogenèse de 80 %, 86 % et 85 % (Figure 3.28).

Il ressort donc, que la fragmentation de l'hypocotyle en 3 parties n'influe pas sur le taux de callogenèse.

Les meilleurs poids de cals obtenus, sont ceux donnés par la partie basale de l'hypocotyle, et ceci quelque soit le milieu de culture utilisé. La valeur la plus haute de poids frais atteinte est de 0,83 g et le poids sec est de 0,055 g pour le milieu M8. Les parties médiane et apicale ont aussi donné des poids significatifs, mais restent toujours moins importants que ceux de la partie basale (Figure 3.29) et (Figure 3.30).

Ainsi, l'analyse de la variance a révélé une différence significative entre les poids des cals issus des trois parties dont l'apicale, la médiane et la basale (Appendice I).

Nous retiendrons donc, la partie basale comme meilleur explant, donnant les plus gros cals.

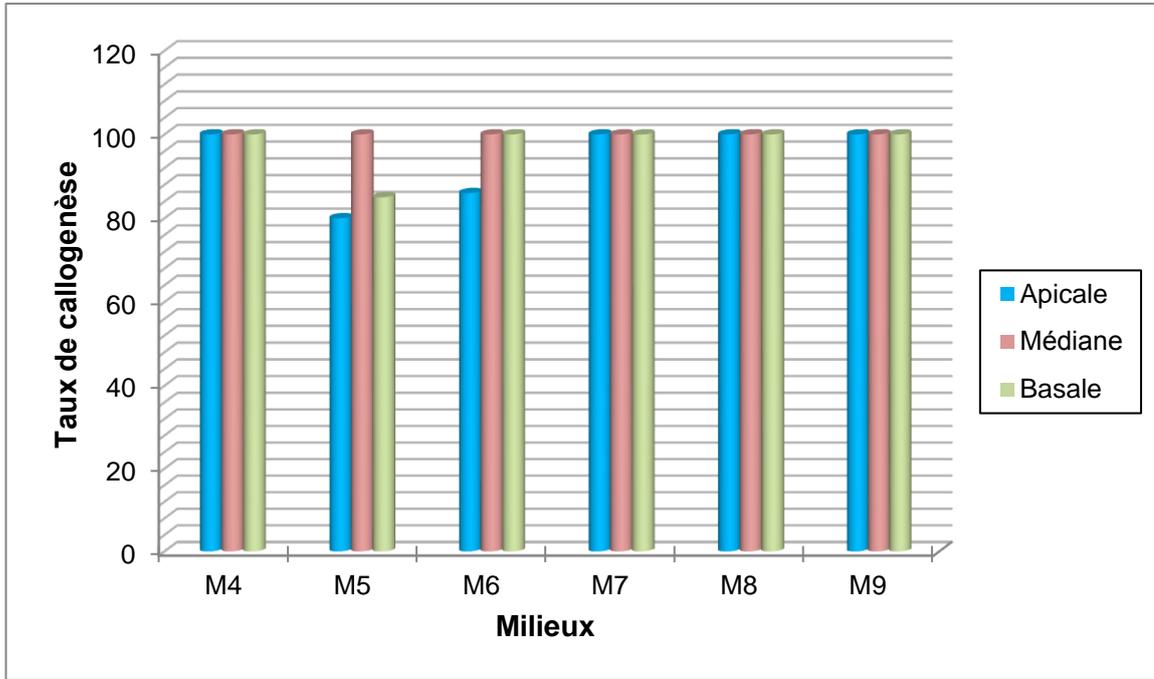


Figure 3.28 : Effet de la fragmentation de l'hypocotyle sur le taux de callogénèse après 4 semaines de culture.

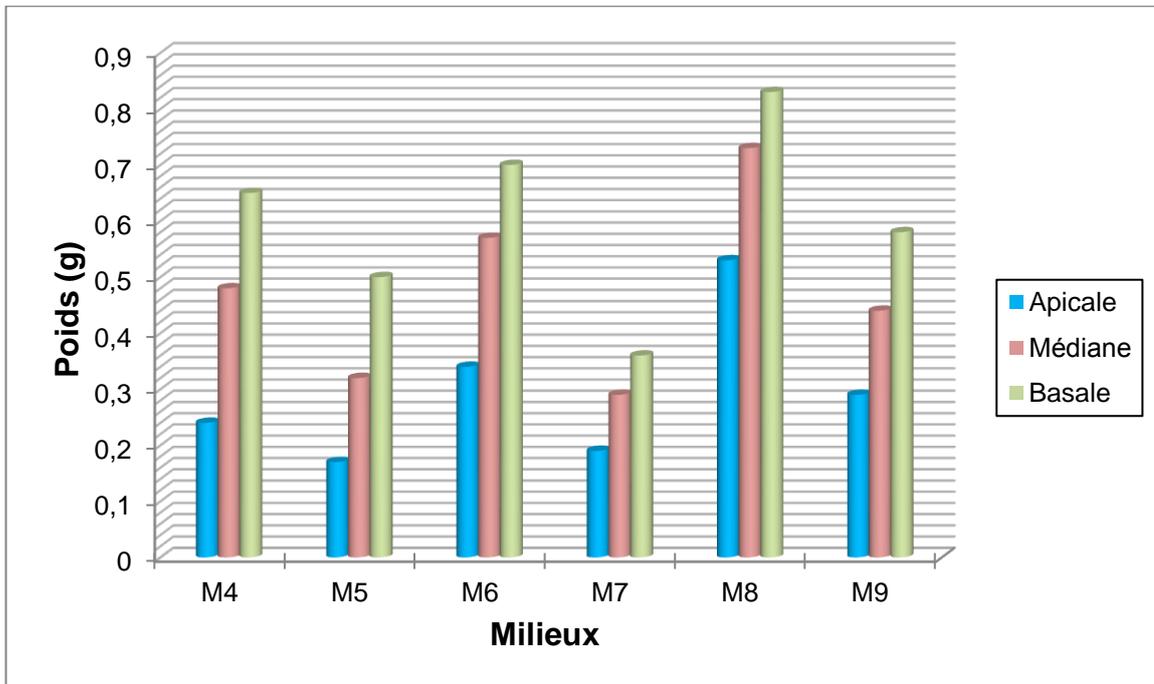


Figure 3.29 : Effet de la fragmentation de l'hypocotyle sur la croissance des cals en poids frais après 4 semaines de culture.

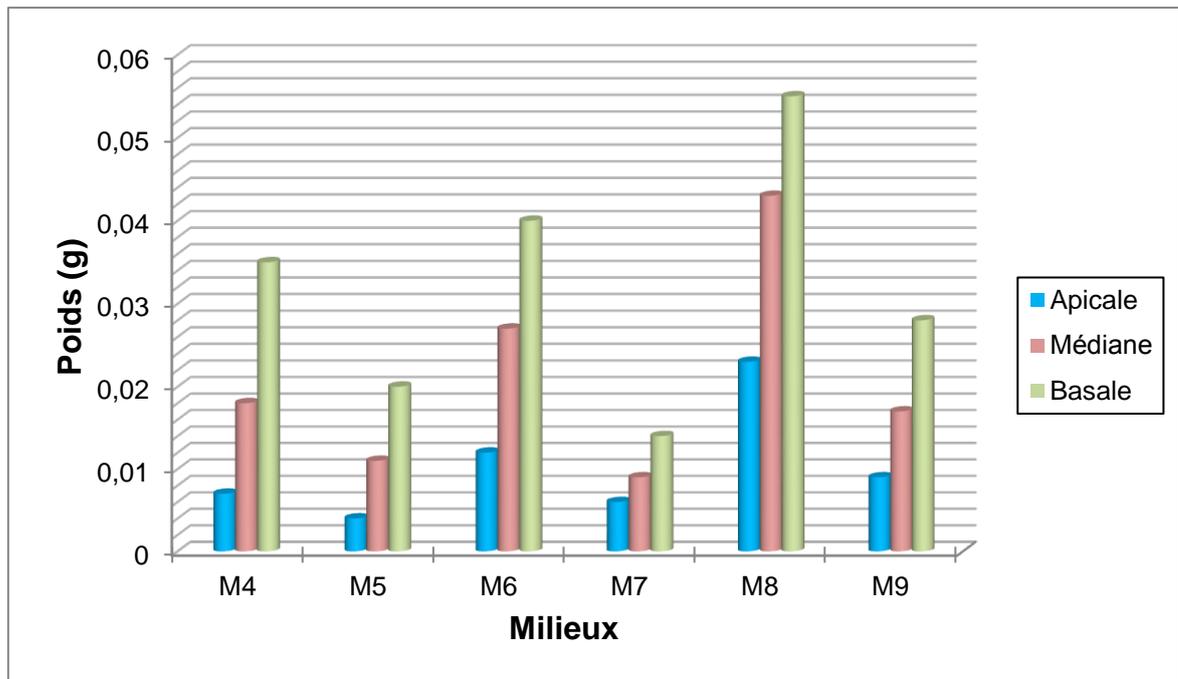


Figure 3.30 : Effet de la fragmentation de l'hypocotyle sur la croissance des cals en poids sec après 4 semaines de culture.

3.6.3.3. Effet du repiquage

Les meilleures proliférations apparaissent sur les cals ayant subi un repiquage. L'amélioration est très importante car le poids de chaque fragment de cal passe de 200 mg à 500 mg durant quatre semaines. Les calculs montrent que chaque cal de 600 mg pourra donner, après fragmentation et repiquage, un poids frais égal à 1500 mg après 8 semaines de culture (Tableau 3.16). Cependant, les cals qui n'ont pas subi de repiquage, l'amélioration de la matière fraîche est beaucoup moins importante. Le poids frais moyen obtenu est de 860 mg (Tableau 3.16) et finissent, après deux mois, par une nécrose qui est probablement due à l'épuisement du milieu nutritif, qui n'est pas renouvelé (Figure 3.31). Par contre, la fragmentation et le repiquage des cals sur milieu frais permettent le maintien de la callogenèse (Figure 3.31).

Pour l'entretien à long terme d'une culture et d'une masse de cal importante, il est indispensable de transférer sur milieu frais et de fragmenter les cals toutes les 3 ou 4 semaines afin de favoriser l'apparition de nouvelles proliférations cellulaires.

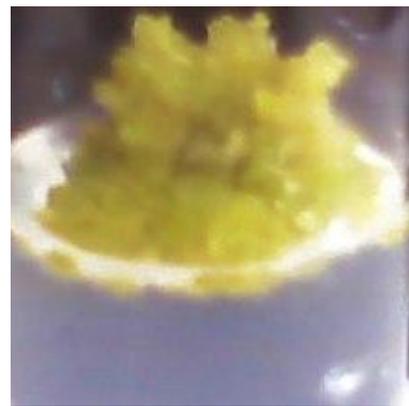
Tableau 3.16 : Effet du repiquage sur la croissance des cals.

Temps de culture Cals	Poids frais moyen des cals âgés de 4 semaines après l'introduction primaire	Poids frais moyen des cals âgés de 8 semaines après l'introduction primaire
Cals non repiqués entiers	600 mg	860 mg
Cals repiqués fragmentés	600 mg	1500 mg

Detailed description of the table: The table shows the effect of subculturing on callus growth. For 'Cals non repiqués entiers', the weight increases from 600 mg at 4 weeks to 860 mg at 8 weeks. For 'Cals repiqués fragmentés', a 600 mg sample is divided into three 200 mg fragments. Each fragment grows to 500 mg by 8 weeks, resulting in a total weight of 1500 mg. Arrows and brackets in the original image illustrate this fragmentation and growth process.



(A)



(B)

Figure 3.31 : Effet du repiquage sur la croissance des cals

(A : cal non repiqué pendant 8 semaines de culture, arrêt de prolifération cellulaire et début de nécrose ; B : cal après repiquage et fragmentation).

3.6.4. Description des cals obtenus

Les cals obtenus avec les différents explants ont des aspects différents :

3.6.4.1. Cals mous

Les cals que nous qualifions mous sont les moins fréquents. Ils témoignent de l'aptitude à la callogenèse la plus faible (Figure 3.32).



Figure 3.32 : Cals mous obtenus à partir de l'hypocotyle cultivé *in vitro* (A: cal mous vert pâle ; B: cal mous vert).

3.6.4.2. Cals friables

Les cals friables sont les formations les plus fréquemment obtenues en culture de tissus du fenugrec. Ils sont facilement identifiables, de couleur chlorophyllienne ou jaune (Figure 3.33). Ce sont des cals très hydratés, leur teneur en eau dépasse 90 % de leur poids frais et ont une importante croissance.

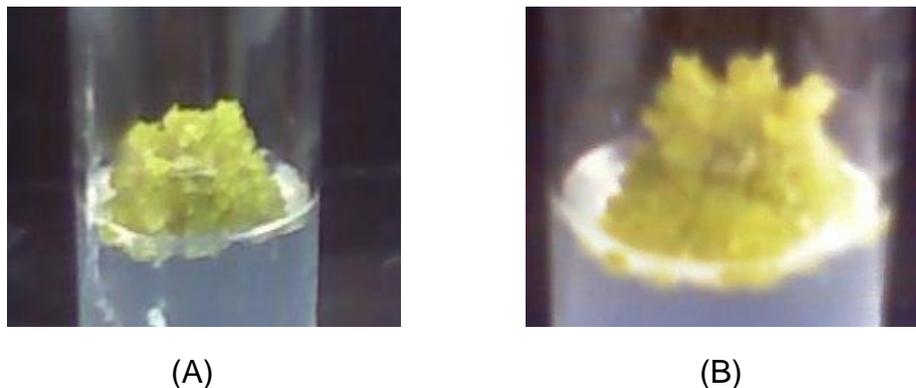


Figure 3.33 : Cals friables obtenus à partir de l'hypocotyle cultivés *in vitro* (A: cal friable chlorophyllien ; B: cal friable jaune).

3.6.4.3. Cals compacts

Les cals de ce dernier type sont moins fréquents que les cals friables. Ils se distinguent de ces derniers, par leur couleur chlorophyllienne et leur structure compacte (Figure 3.34).

Ils sont constitués de replis et des invaginations conduisant à la formation de nombreux nodules serrés, de taille variable, leur croissance est plus faible que celle des cals friables.



Figure 3.34. Cal compact chlorophyllien avec nodules obtenu à partir des feuilles cotylédonaire cultivées *in vitro*.

3.6.5. Caractère généraux de la callogenèse

Les conditions de culture *in vitro* jouent un rôle très important sur le taux de la callogenèse et la croissance des cals issus des explants du fenugrec.

Les cals obtenus diffèrent selon les milieux et les explants employés.

On constate que l'utilisation des milieux contenant les auxines seules, permet la production de cals de nature mous sur toute la surface de l'explant, par contre les milieux contenant les cytokinines seules donnent naissance à une prolifération cellulaire de nature friable, avec tous les types d'explant : hypocotyles, feuilles cotylédonaire et racines.

Les explants s'initiant sur les milieux contenant une combinaison entre 2,4-D et BAP stimulent la formation de cals de nature compacte nodulaire, alors que la combinaison entre l'ANA et la BAP ou la kinétine induit une callogenèse de nature friable (Tableau 3.17). Par ailleurs, les fragments d'hypocotyles et de racines développent des cals d'aspect friable granuleux. Quant aux cals issus des fragments de feuilles, ils présentent un aspect compact noduleux.

Concernant les facteurs de croissance, le fenugrec présente des réponses avec la majorité des combinaisons testées. On constate que la composition hormonale du milieu influence considérablement sur la croissance des cals (poids frais et sec) et sur leur nature, leur couleur et leur texture. Ainsi l'usage des auxines seules dans le milieu de culture s'est révélé moins efficace pour l'induction d'une importante callogenèse sur l'ensemble des explants testés. Par contre, l'adjonction des auxines en présence de cytokinines ou l'emploi des

cytokinines seules dans les milieux de cultures stimule fortement la callogenèse. Des résultats similaires ont été obtenus sur d'autres espèces telles que : le tabac [140], *Ranunculus asiaticus* L. [141], *Lycopodiella inundata* L. [142] et *Scorpiurus* [143].

Au vu des résultats obtenus, on peut confirmer qu'une auxine combinée avec une cytokinine est indispensable pour l'induction d'une bonne croissance de cals. La combinaison de ces hormones favorise également une callogenèse importante chez plusieurs espèces. A titre d'exemple, on cite : *Thalictrum urbaini* [144], *Trigonella foenum-graecum* L. [145] et *Aconitum heterophyllum* [146]. Par contre, chez les céréales la présence du 2,4-D seul est la plus efficace pour l'induction de la callogenèse [147] ; [148].

Par ailleurs, il est utile de rappeler que, dans notre expérimentation, en présence du 2,4-D associé à une cytokinine (BAP ou KIN), la croissance des cals est davantage améliorée. Les mêmes résultats ont été trouvés pour *Scorpiurus* [143] *Nigella sativa* [149] et *Scilla siberica* [150].

D'après LUTZ (1985) [151], l'initiation de la callogenèse semble être due au bouleversement du comportement des explants. Elle est essentiellement liée aux coupures des corrélations entre l'explant et la plante mère, ainsi qu'à son nouvel environnement. En outre, il est admis généralement que la formation des cals est due à la division cellulaire et à l'agrandissement des cellules. Les auxines augmentent la taille des cellules et les cytokinines stimulent la division cellulaire des tissus. L'induction d'une formation normale des cals requiert ainsi la présence simultanée d'auxines et cytokinines [152].

On peut conclure que la morphologie des cals obtenus dépend du milieu de leur culture.

L'importance de la callogenèse ne dépend pas seulement de la nature des régulateurs de croissance, comme nous venons de le voir, mais aussi de leur concentration. Les résultats de notre étude montrent qu'il suffit d'ajouter de faibles doses de 2,4-D ou de l'ANA (0,1 mg/l à 3 mg/l) combinées également à de faibles doses de cytokinines (0,1 mg/l à 3 mg/l) pour la déclencher.

En plus, la nature de l'explant peut avoir une incidence considérable sur la callogenèse. En effet, le fenugrec manifeste, en culture *in vitro*, de remarquables propriétés callogènes. Des proliférations importantes ont été obtenues à partir des trois explants testés : hypocotyles, feuilles et racines. Cependant, le suivi de la croissance des cals nous a permis de mettre en évidence l'effet de la nature de l'explant sur la callogenèse. Ainsi, le poids moyen de la matière fraîche des cals issus d'explants d'hypocotyles et de feuilles est le plus élevé par rapport à celui des cals issus des racines, dans tous les milieux testés. Des résultats similaires ont été déjà rapportés par CHAUDHURI (2002) [150] avec *Scilla siberica*. Par contre, HAMDANI (2001) [143] et GUPTA (1974) [153] ont obtenu des résultats contradictoires.

La couleur et la texture des cals sont également influencées par la nature et la concentration des régulateurs de croissance. En effet, on constate à titre d'exemple, que les cals induits sur des milieux contenant le 2,4-D, sont généralement de texture compacte, nodulaire, globulaire et de coloration vert foncé. Pour les autres combinaisons hormonales contenant de l'ANA, les cals sont de texture friable et de coloration vert pâle. Par ailleurs, l'utilisation des auxines ou cytokinines seules stimule la formation de cals mous ou friables (Tableau 3.17). Nos résultats sont similaires à ceux de WOONG YOUNG SOH (1998) [154] qui a obtenu des cals compacts sur les fragments d'hypocotyles de *Vigna unguiculata* L. sur le milieu MS additionné de 0,4 mg/l de 2,4-D et 0,2 mg/l de KIN. Ce même auteur a obtenu des cals friables en combinant l'ANA avec la BAP. Nos résultats sont également en accord avec ceux de ATMANE (2000) [142] sur les explants de *Lycopodiella inundata* L.

Tableau 3.17 : Effet des milieux de culture sur la nature et l'aspect des cals.

Milieux de culture MS additionné de :	Couleur des cals	Texture des cals	Taille des cals
1) ANA = 1 mg/l.	Vert	Mous	++
2) 2,4-D = 1 mg/l.	Vert pâle	Mous	+
3) BAP = 1 mg/l.	Vert	Friable	+++
4) ANA = 0,6 mg/l + BAP = 0,4 mg/l	Vert pâle	Friable	+++
5) ANA = 0,2 mg/l + BAP = 0,3 mg/l + KIN = 0,3 mg/l.	Vert pâle	Friable/granuleux	+++
6) ANA = 0,3 mg/l + BAP = 0,8 mg/l + KIN = 0,8 mg/l.	Vert pâle	Friable/granuleux	+++
7) 2,4-D = 3 mg/l + BAP = 0,1 mg/l.	Vert	Compact	++
8) 2,4-D = 0,1 mg/l + BAP = 3 mg/l.	Vert	Compact	+++
9) 2,4-D = 0,1 mg/l + BAP = 0,5 mg/l.	vert	Compact	++

(+ faible, ++ moyenne, +++ importante)

3.6.6. Phytochimie des cals

Le screening phytochimique a été effectué sur des cals séchés de *Trigonella foenum-graecum* L.

Comparativement aux teneurs en phénols totaux, en tanins condensés, en cendres totales et à la quantité des flavonoïdes totaux déterminés au niveau des graines et des feuilles de *Trigonella foenum-graecum* L. prélevées *in situ*, on constate que les cals séchés des hypocotyles, des feuilles cotylédonaires et des racines contiennent ces métabolites à des proportions relativement proches (Tableau 3.18).

Donc, on peut dire que les cals du fenugrec sont riches en substances organiques et minérales.

Ces résultats sont contradictoires avec ceux trouvés par ONCINA et *al.*, (2000) [155], en étudiant la bioproduction de la diosgénine, qui est un métabolite secondaire, au niveau des cals de *Trigonella foenum-graecum* L. Son expérience a montré que les taux de la diosgénine accumulée durant 45 jours (production

maximale) dans les cals des feuilles, des tiges et des racines représentent respectivement 22 %, 10 % et 27% des taux détectés au niveau des organes correspondant de la plante-mère pendant 45 jours.

Tableau 3.18. Teneurs en phénols totaux, en tanins condensés, en cendres totales et flavonoïdes totaux au niveau des cals de *Trigonella foenum-graecum* L.

Teneurs	Plante du fenugrec		Cals formés		
	Graines	Feuilles	Hypocotyles	Feuilles	Racines
Phénols totaux (%)	11,30	18,65	5,15	9,87	6,56
Tanins condensés (%)	1,26	3,67	0,48	0,92	0,17
Cendres totales (%)	/	10,94	4,43	6,81	3,12
Flavonoïdes totaux (mg)	26,31	30,94	17,56	20,29	11,49

CONCLUSION

L'examen phytochimique que nous avons effectué est indispensable, car il nous permet de connaître et de confirmer l'existence des différentes familles de composés chimiques dans les différentes parties de la plante, comme il a été indiqué en bibliographie.

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de mettre en évidence la présence des coumarines, des saponosides, des terpénoïdes, des alcaloïdes, des protéines, des composés phénoliques, des cendres et de l'huile essentielle chez le fenugrec.

Ce screening chimique est suivi de plusieurs extractions réalisées sur les graines et les feuilles en employant des solvants de polarité différente comme le méthanol, le chloroforme, l'hexane, l'éther de pétrole, l'acide sulfurique, l'acétone et l'éther diéthylique.

Les extraits obtenus sont ensuite analysés par les méthodes spectroscopique et chromatographique. Malheureusement, la caractérisation des échantillons purs de flavonoïdes et de terpénoïdes n'a pu être réalisée par la HPLC pour cause de la non-solubilité des échantillons dans les solvants utilisés.

L'effet antimicrobien de *Trigonella foenum-graecum* L., se révèle inexistant sur la totalité des souches testées.

Les extraits des plantes sont en général utilisés à l'état brut. C'est pourquoi nous avons utilisé des doses élevées pour nos tests pharmacologiques comparativement aux produits de référence.

L'étude de la propriété hypoglycémiant des graines du fenugrec sur des souris normales, révèle que l'extrait aqueux produit un effet plus significatif sur le taux du glucose sanguin que l'extrait méthanolique. Ce qui démontre également que cette propriété thérapeutique du fenugrec sur le plan de l'efficacité, diffère selon la nature de la solution préparée. Ce résultat est en accord avec la littérature.

Quant à l'étude anti-inflammatoire, nos résultats montrent fortement que l'extrait aqueux de la graine de *Trigonella foenum-graecum* L. à une dose de 120 mg/kg, possède une forte activité anti-inflammatoire qui a pu inhiber l'inflammation de la patte de la souris provoquée par la carragénine à la cinquième heure. En outre, cet extrait s'est montré plus actif que le Diclofénac et l'huile essentielle extraite du fenugrec à une dose de 120 mg/kg, sur l'œdème.

Nous avons aussi confirmé les effets antipyrétiques de l'extrait aqueux des graines à une dose de 120 mg/kg sur les lapins. Comme il a été montré, l'extrait aqueux des graines et le paracétamol ont réduit considérablement l'hyperthermie induite par l'endotoxine.

Au terme de cette étude, nous pouvons conclure que *Trigonella foenum-graecum* L. ou fenugrec est une plante à haut potentiel thérapeutique puisqu'elle contient de nombreuses molécules bioactives. Elle ne présente aucune toxicité même à des concentrations élevées. Cette plante mériterait des études approfondies, voire des analyses moléculaires et cliniques dans des recherches à venir.

Par ailleurs, notre étude sur la callogenèse a porté sur l'influence de quelques facteurs à savoir, la composition hormonale du milieu de culture, la nature des explants (hypocotyle, feuille et racine), la fragmentation de l'explant de l'hypocotyle (basale, médiane et apicale) et le repiquage des cals.

De l'ensemble des résultats obtenus au cours de notre expérimentation, nous avons pu montrer que le fenugrec est une plante médicinale qui a manifesté des propriétés callogènes. Ces mêmes résultats confirment l'importance à accorder à l'adjonction hormonale au végétal introduit *in vitro*.

Chez le fenugrec, les essais révèlent que le milieu de culture approprié est celui de MURASHIGE et SKOOG (1962) auquel est additionnée une combinaison auxine/cytokinine (0,1 mg/l 2,4-D + 3 mg/l BAP). Ce milieu peut alors constituer une excellente base de départ dans la recherche d'un milieu optimal satisfaisant les exigences du fenugrec.

Il convient de signaler également que beaucoup de cals à proliférations chlorophylliennes ont été obtenus après un temps minimal de culture des explants primaires de quatre semaines.

La variation des conditions de la mise en culture des explants, a permis l'obtention de plusieurs types de cals, d'aspect et de couleur différents. On a obtenu selon les conditions, des cals friables, des cals compacts et des cals mous de couleur vert pâle, vert foncé et jaune.

Ces cals soumis, après séchage, à un test phytochimique révèlent la présence des substances minérale et organique.

Ainsi, la culture *in vitro* permet d'obtenir un matériel végétal exempt de contaminations et disponible tout au long de l'année contrairement aux plantes cultivées *in situ*. En plus, la culture et l'entretien de cal pendant toute l'année, peuvent mettre à la disposition de l'industrie pharmaceutique et même alimentaire, une masse de molécules bioactives importante et disponible pendant toute l'année par rapport au végétal issu de l'*in situ*, qui a une durée de vie limitée.

Parmi ces molécules, on peut citer les composés phénoliques qui possèdent des propriétés thérapeutiques diverses, tels que : les tanins qui ont un effet antioxydant, les flavonoïdes à effet anti-tumorale, anti-carcinogène, anti-inflammatoire et diurétique et les phénols qui possèdent un effet antibactérien, antifongique et antioxydant.

APPENDICE A
LISTE DES ABREVIATIONS

ANA	: Acide naphtalène acétique.
BAP	: 6-Benzyladénine.
CCM	: Chromatographie sur couche mince.
HCl	: Acide chlorhydrique.
HE	: Huile essentielle.
KIN	: Kinétine ou 6-Furfuryladénine.
M	: Molaire.
MS	: Milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962).
NaOH	: Soude.
v	: Volume.
2,4-D	: Acide chlorophénoxyacétique.

APPENDICE B

METHODES PHYSICO-CHIMIQUES UTILISEES

1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Utilisées à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis.

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium Silicagel 60 F254 (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire, tertiaire ou quaternaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

La rétention des différentes substances à analyser dépend d'une part de leur nature, de leur taille, de leur structure et de leur polarité et d'autre part, de la polarité de la phase mobile et de l'activité de la phase stationnaire.

Chaque substance possède un facteur de rétention (R_f) dans un système donné. La valeur de R_f est donnée par le rapport de la distance parcourue par la substance sur celle parcourue par le front de l'éluant.

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 366 nm), avant et, dans certains cas, après révélation par les réactifs appropriés.

2. Spectrométrie Ultraviolet (UV)

Les spectres UV des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre de type Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 20, double faisceau permettant des lectures directes contre témoin. Les mesures se font dans des cuves de quartz à trajet optique de 1 cm.

3. Spectroscopie Infra-rouge (IR)

Les spectres infra-rouge des molécules ont été réalisés au moyen d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer Paragon 1000 FT-IR dans des pastilles de KBr.

APPENDICE C

FREQUENCES D'ABSORPTION IR (Chimie SPE PC1 – POINCARE, 2007)

Classe	Cm ⁻¹	Intensité	Assignment		
1. Alcanes	2850 – 3000	Forte	C - H stretch		
	1450 – 1470	Forte	CH ₂ et CH ₃ (bending)		
	1370 – 1380	Forte			
	720 – 725	Medium			
2. Alcènes	(a) RCH = CH ₂	3080 – 3140	Medium	= C – H stretch	
		1800 – 1860	Medium	Harmoniques	
		1645	Medium	C = C stretch	
		990 910	Forte Forte	C – H (out-of-plane bending)	
	(b) R ₂ C = CH ₂	3080 – 3140	Medium	= C – H stretch	
		1750 – 1800	Medium	Harmoniques	
		1650	Medium	C = C stretch	
		890	Forte	C – H oop bending	
	(c) Cis-RCH=CHR	3020	Faible	= C – H stretch	
		1660	Faible	C = C stretch	
		675 – 725	Medium	C – H oop bending	
	(d) trans – RCH=CHR	3020	Faible	= C-H stretch	
		1675	Faible	C = C stretch	
		970	Forte	C – H oop bending	
	(e) R ₂ C = CHR	3020	Faible	= C – H stretch	
		1670	Faible	C = C stretch	
	(f) R ₂ C = CR ₂	790 – 840	Forte	C – H oop bending	
		1670	Très faible	C = C stretch	
	3. Alcynes	(a) RC = CH	3300	Forte	= C – H stretch
			2001 – 2140	Medium	C = C stretch
600 – 700			Forte	C = C – H bending	
(b) RC = CR		2190 – 2260	Très faible	C = C stretch	

4. Halogénures d'alkyles			
(a) R – F	1000 – 1350	Forte	C – F stretch
(b) R – Cl	750 – 850	Forte	C – Cl stretch
(c) R – Br	500 – 680	Forte	C – Br stretch
(d) R – I	200 - 500	Forte	C – I stretch
5. Nitriles	2250	Faible - medium	C = N stretch
6. Alcools			
(a) RCH ₂ OH	3600	Variable	Free O – H stretch
	3400	Forte	Bonded O - H stretch
	1050	Forte	C – O stretch
(b) R ₂ CHOH	3600	Variable	Free O – H stretch
	3400	Forte	Bonded O – H stretch
	1150	Forte	C – O stretch
(c) R ₃ COH	3600	Variable	Free O – H stretch
	3400	Forte	Bonded O – H stretch
	1200	Forte	C – O stretch
(d) ArOH (phénols)	3600	Variable	Free O – H stretch
	3400	Forte	Bonded O – H stretch
	1100 -1200	Forte	C – O stretch
7. Ethers	1070 - 1150	Forte	C – O stretch
8. Aldéhydes	1725 - 1745	Forte	C = O stretch
9. Cétones			
(a) Acyclique	1715	Forte	C = O stretch
(b) Cyclopropanone	1850	Forte	C = O stretch
(c) Cyclobutanone	1780	Forte	C = O stretch
(d) Cyclopentanone	1743	Forte	C = O stretch
(e) Cyclohexanone	1715	Forte	C = O stretch

(f) Cycloheptanone	1705	Forte	C = O stretch
10. Acides carboxyliques	3300 – 2500	Forte	O – H stretch
	1730 – 1700	Forte	C = O stretch
	1320 – 1210	Forte	C – O stretch
11. Esters	1735	Forte	C = O stretch
	1300 - 1000	Forte	C – O stretch
12. Amides	3500 – 3100 (CONH) (2 bandes pour CONH ₂)	Forte	N – H stretch
	1670 – 1640	Forte	C = O stretch
	1640 - 1550	Medium	N – H bending
13. Anhydrides d'acides	1830 – 1800 (2 bandes)	Forte	C = O stretch
	1300 – 900	Forte	C – O stretch
14. Amines	3500 – 3300 (1 pour R ₂ NH, 2 bandes pour RNH ₂ , 0 pour R ₃ N)	Medium	N – H stretch
	1350 – 1000	Faible	C – N stretch
	1640 – 1560 et 800	Faible	N – H bending

APPENDICE D
APPAREILLAGE



Four à moufle



Spectrophotomètre IR



Spectrophotomètre UV



Centrale thermométrique



Evaporateur rotatif



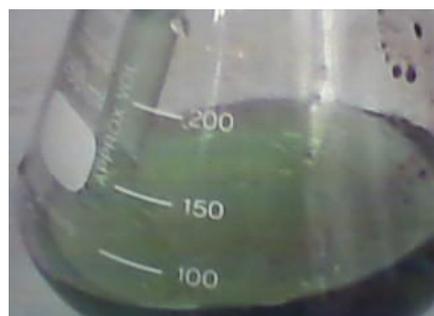
Agitateur (oscille 12)

APPENDICE E

PHOTOS DU MODE OPERATOIRE DE LA METHODE DETERMINANT LA TENEUR EN PROTEINES



Minéralisation



Distillation et titrage

APPENDICE F

PHOTOS DE L'ETUDE ANTI-INFLAMMATOIRE DE *Trigonella foenum-graecum* L.



Figure 1: Souris NMRI (originale 2008).



Figure 2: Administration par voie orale (voie intragastrique).



Figure 3: Administration par voie intrapéritoniale.



Figure 4: Mesure du diamètre de la patte postérieure de la souris.

APPENDICE G

PHOTOS DE L'ETUDE ANTIPYRETIQUE DE *Trigonella foenum-graecum* L.



Figure 1: Lapins sélectionnés (original 2008).



Figure 2: Administration de la solution par injection dans la veine marginale de l'oreille du lapin.



A

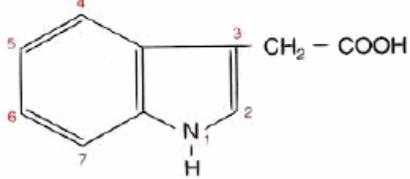
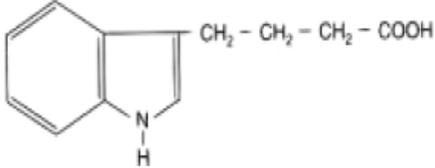
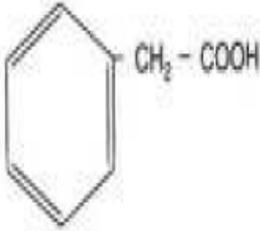
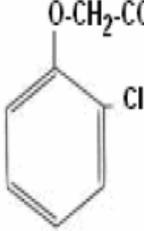
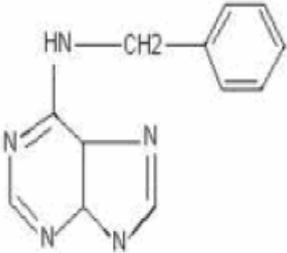
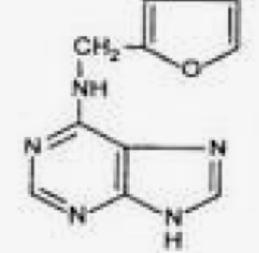
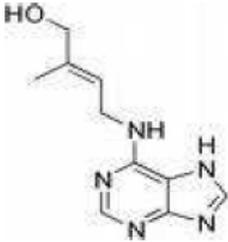
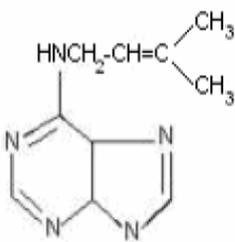


B

Figure 3: Lecture de la température après 3 heures de l'administration des solutions à tester (A : extrait aqueux du fenugrec ; B : endotoxine).

APPENDICE H

STRUCTURE CHIMIQUE DES HORMONES DE CROISSANCE

Les auxines	
 <p>Acide indole 3- acétique (AIA)</p>	 <p>Acide indole butyrique (AIB)</p>
 <p>Acide naphthalène acétique (ANA)</p>	 <p>Acide 2-4 dichlorophénoxyacétique (2- 4D)</p>
Les cytokinines	
 <p>6-Benzyl aminopurine (BAP)</p>	 <p>Kinéline</p>
 <p>Zéatine</p>	 <p>Isopentenylaminopurine</p>

APPENDICE I

ETUDE STATISTIQUE

1. Etude statistique de l'effet hypoglycémiant

Tableau 1 : Taux du glucose sanguin des souris normales après administration de l'eau physiologique.

Groupe	Voie	n	Taux du glucose sanguin (mg/dl)			
			0h	1h	2h	4h
A	Orale	1	75	74	72	69
		2	81	79	77	73
		3	70	69	67	64
		4	71	69	68	65
		5	74	72	70	67
		6	70	68	67	64
Moyenne Ecart-type			73,50 04,23	71,83 04,17	70,16 03,87	67,00 03,52

Tableau 2 : Taux du glucose sanguin des souris normales après administration de l'extrait aqueux des graines du fenugrec à des doses de 10 mg/kg et 20 mg/kg.

Groupe	Voie	Dose (mg/ml)	N° de l'animal	Taux du glucose sanguin (mg/dl)			
				0 h	1 h	2 h	4 h
B	Orale	10	1	70	60	51	47
			2	68	61	53	45
			3	72	59	47	44
			4	69	60	53	50
			5	70	62	49	44
			6	70	61	50	47
Moyenne Ecart-type				69,83 01,33	60,50 01,05	50,50 02,35	46,16 02,32
C	Orale	20	1	80	64	53	40
			2	75	70	59	47
			3	81	66	55	42
			4	69	59	49	38
			5	70	60	49	36
			6	69	60	48	36
Moyenne Ecart-type				74 05,51	63,16 04,30	52,16 04,31	39,83 04,21

Tableau 3 : Taux du glucose sanguin des souris normales après administration de l'extrait méthanolique des graines du fenugrec à des doses de 10 mg/kg et 20 mg/kg.

Groupe	Voie	Dose (mg/ml)	N° de l'animal	Taux du glucose sanguin (mg/dl)			
				0 h	1 h	2 h	4 h
D	Orale	10	1	83	82	80	77
			2	79	77	76	74
			3	78	77	75	72
			4	81	79	77	74
			5	79	77	75	72
			6	77	76	74	70
Moyenne				79,50	78,00	76,16	73,16
Ecart-type				02,17	02,19	02,14	02,40
E	Orale	20	1	75	71	67	61
			2	79	75	70	65
			3	80	75	69	64
			4	73	69	64	60
			5	74	69	63	60
			6	70	65	60	57
Moyenne				75,16	70,66	65,50	61,16
Ecart-type				03,76	03,88	03,83	02,93

✓ Comparaison entre les lots traités par l'extrait aqueux

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupe	0,5832	1	0,5832	0,0035	0,9543	5,9873
A l'intérieur des groupes	981,2089	6	163,5348			

✓ Comparaison entre les lots traités par l'extrait méthanolique

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupe	147,4044	1	147,4044	6,6163	0,0422	5,9873
A l'intérieur des groupes	133,6723	6	22,2787			

✓ Comparaison entre le lot témoin et les lots traités par l'extrait aqueux.

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre groupe	494,1726	2	247,0863	2,2142	0,1651	4,2564
A l'intérieur des groupes	1004,2834	9	111,5870			

✓ Comparaison entre le lot témoin et les lots traités par l'extrait méthanolique.

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre groupe	155,9487	2	77,9743	4,4771	0,0447	4,2565
A l'intérieur des groupes	156,7468	9	17,4163			

2. Etude statistique de l'effet anti-inflammatoire

D_0 : diamètre de la patte avant injection de la carragénine (mm).

Dih : diamètre de la patte à l'ième heure après injection de la carragénine (mm).

Tableau 1 : Diamètre des pattes gauches du lot témoin.

N° souris	D₀	D1h	D2h	D3h	D4h	D5h	D6h
1	2,34	3,46	3,54	3,82	4,26	4,08	3,98
2	2,28	3,30	3,46	3,68	4,02	3,70	3,62
3	2,16	3,14	3,22	3,56	3,88	3,70	3,54
4	2,28	3,38	3,52	3,76	4,10	4,02	3,94
5	2,24	3,34	3,40	3,68	3,98	3,44	3,32
6	2,22	3,30	3,36	3,78	4,00	3,58	3,38
Moyenne	2,25	3,32	3,42	3,71	4,04	3,75	3,63
Ecart-type	0,0615	0,1065	0,1182	0,0935	0,1289	0,2496	0,2776

Tableau 2 : Pourcentage d'augmentation du diamètre des pattes gauches du lot témoin.

N° souris	Poids (g)	P1h	P2h	P3h	P4h	P5h	P6h
1	24	47,86	51,28	63,25	82,05	74,36	70,14
2	21	44,74	51,75	61,40	76,32	62,28	58,77
3	20	45,37	49,07	64,81	79,63	71,30	63,39
4	21	48,25	54,39	64,91	79,82	76,32	72,81
5	23	49,11	51,79	64,29	77,68	53,57	48,21
6	22	48,65	51,35	70,27	80,18	61,26	52,25
Moyenne	21,83	47,33	51,61	64,82	79,28	66,52	60,93
Ecart-type	1,4719	1,8214	1,6975	2,9716	2,0109	8,8735	9,7346

Tableau 3 : Diamètre des pattes gauches du lot de référence (Diclofénac à 25 mg/kg).

N° souris	D ₀	D1h	D2h	D3h	D4h	D5h	D6h
1	2,12	3,02	3,06	3,32	3,14	2,72	2,94
2	2,22	3,22	3,28	3,48	3,40	2,66	3,12
3	2,08	3,04	3,08	3,24	3,18	2,46	2,98
4	2,24	3,22	3,24	3,38	3,28	2,70	2,82
5	2,18	3,08	3,24	3,36	3,32	2,52	2,46
6	2,20	3,16	3,41	3,64	3,36	2,44	2,40
Moyenne	2,17	3,12	3,22	3,40	3,28	2,58	2,79
Ecart-type	0,0615	0,0889	0,1309	0,1399	0,1019	0,1248	0,2930

Tableau 4 : Pourcentage d'augmentation du diamètre des pattes du lot de référence (Diclofénac à 25 mg/kg).

N° souris	Poids (g)	P1h	P2h	P3h	P4h	P5h	P6h
1	21	42,45	44,34	56,60	48,11	28,30	38,70
2	25	45,05	47,75	56,75	54,56	19,82	40,54
3	23	46,15	48,08	55,77	52,88	18,27	43,27
4	22	43,75	44,64	50,89	46,43	20,54	25,89
5	20	41,28	48,62	54,13	52,29	15,60	12,84
6	20	43,64	50,91	55,00	52,73	10,91	09,09
Moyenne	21,83	43,72	47,39	54,86	51,17	18,91	28,39
Ecart-type	1,9407	1,7462	2,5049	2,1790	3,1602	5,7796	14,8045

Tableau 5 : Diamètre des pattes du lot 3 (huile alimentaire).

N° souris	D ₀	D1h	D2h	D3h	D4h	D5h	D6h
1	2,20	3,08	3,10	3,96	4,26	4,18	3,82
2	2,24	3,06	3,18	3,54	4,00	3,84	3,58
3	2,26	3,30	3,54	3,74	3,82	3,52	3,36
4	2,24	3,36	3,38	3,46	3,66	3,44	3,28
5	2,26	3,10	3,30	3,72	3,82	3,62	3,32
6	2,21	3,24	3,28	3,66	3,86	3,70	3,52
Moyenne	2,24	3,19	3,30	3,68	3,90	3,72	3,48
Ecart-type	0,0250	0,1269	0,1540	0,1743	0,2056	0,2663	0,2035

Tableau 6 : Pourcentage d'augmentation du diamètre des pattes du lot 3 (huile alimentaire).

N° souris	Poids (g)	P1H	P2h	P3h	P4h	P5h	P6h
1	20	40,00	40,91	80,00	93,64	90,00	73,64
2	22	36,61	41,96	58,04	78,57	71,43	59,82
3	22	46,02	56,64	65,49	69,03	55,75	48,67
4	22	50,00	50,89	54,46	63,39	53,57	46,43
5	25	37,17	46,02	64,60	69,03	60,18	46,90
6	20	46,61	48,42	65,61	74,66	67,42	59,28
Moyenne	21,83	42,74	47,47	64,70	74,72	66,40	55,80
Ecart-type	1,8348	5,5597	5,8682	8,7722	10,6387	13,4165	10,6243

Tableau 7 : Diamètre des pattes du lot 6 (huile essentielle à 120 mg/kg).

N° souris	D ₀	D1h	D2h	D3h	D4h	D5h	D6h
1	2,24	3,22	3,26	3,40	3,34	2,72	3,08
2	2,10	2,94	3,00	3,06	3,04	2,46	2,68
3	2,04	2,92	2,94	3,08	2,78	2,34	2,52
4	2,18	3,10	3,24	3,34	3,26	2,64	2,92
5	2,24	3,18	3,26	3,48	3,34	2,82	2,94
6	2,20	3,16	3,28	3,44	3,40	2,40	2,56
Moyenne	2,17	3,09	3,16	3,30	3,19	2,56	2,78
Ecart-type	0,0806	0,1275	0,1514	0,1841	0,2385	0,1915	0,2285

Tableau 8 : Pourcentage d'augmentation du diamètre des pattes du lot 6 (huile essentielle à 120 mg/kg).

N° souris	Poids (g)	P1h	P2h	P3h	P4h	P5h	P6h
1	22	43,75	45,54	51,79	49,11	21,43	37,50
2	23	40,00	42,86	45,71	44,76	17,14	27,62
3	22	43,14	44,12	50,98	41,18	14,71	23,53
4	20	42,20	48,62	53,21	49,54	21,10	33,94
5	21	41,96	45,56	55,36	49,11	25,89	31,25
6	22	43,64	49,10	56,36	54,55	09,09	16,36
Moyenne	21,67	42,45	45,97	52,24	48,04	18,23	28,37
Ecart-type	1,0327	1,4062	2,4603	3,7968	4,5768	5,9037	7,6276

Tableau 9 : Diamètre des pattes du lot 9 (extrait aqueux à 120 mg/kg).

N° souris	D ₀	D1h	D2h	D3h	D4h	D5h	D6h
1	2,26	2,80	2,88	2,90	2,90	2,36	2,42
2	2,18	2,70	2,72	2,80	2,72	2,26	2,36
3	2,24	3,10	3,10	3,18	3,34	2,72	2,98
4	2,10	3,02	3,14	3,22	3,22	2,60	2,90
5	2,24	2,86	2,92	2,98	3,04	2,54	2,62
6	2,22	2,92	2,94	3,02	3,02	2,56	2,74
Moyenne	2,21	2,90	2,95	3,02	3,04	2,51	2,67
Ecart-type	0,0588	0,1458	0,1532	0,1612	0,2212	0,1676	0,2509

Tableau 10 : Pourcentage d'augmentation du diamètre des pattes du lot 9 (extrait aqueux à 120 mg/kg).

N° souris	Poids (g)	P1h	P2h	P3h	P4h	P5h	P6h
1	24	26,55	27,43	28,32	28,32	04,42	07,08
2	24	23,85	24,77	28,44	24,77	03,67	08,26
3	23	38,39	38,39	41,96	49,11	21,43	33,04
4	20	43,81	49,52	53,33	53,33	19,23	38,10
5	21	27,68	30,36	33,04	35,71	13,39	16,96
6	23	31,53	32,43	36,04	36,04	15,32	23,42
Moyenne	22,50	31,97	33,82	36,85	37,88	12,91	21,14
Ecart-type	1,6431	7,6851	8,9890	9,5536	11,2798	7,4300	12,7710

Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème en fonction du temps et des fortes doses des solutions à tester et du Diclofénac.

	1 H	2 H	3 H	4 H	5 H	6 H
Huile essentielle à 120 mg/kg	10,31%	10,93%	19,41%	39,27%	72,59%	53,44%
Macéré aqueux à 120 mg/kg	32,45%	34,47%	43,13%	52,22%	80,59%	65,30%
Diclofénac à 25 mg/kg	07,63%	08,17%	15,38%	35,46%	71,56%	53,41%

✓ Comparaison entre les lots Diclofénac et huile essentielle à 120 mg/kg.

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre groupe	0,0012	1	0,0012	0,0458	0,8346	4,9646
A l'intérieur des groupes	0,2614	10	0,0261			

✓ Comparaison entre les lots : Diclofénac et l'extrait aqueux à 120 mg/kg.

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre groupe	0,0176	1	0,0176	0,8071	0,3900	4,9646
A l'intérieur des groupes	0,2184	10	0,0218			

- ✓ Comparaison entre les lots : huile essentielle à 120 mg/kg et extrait aqueux à 120 mg/kg.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupe	0,0096	1	0,0096	0,2972	0,5975	4,9646
A l'intérieur des groupes	0,3240	10	0,0324			

3. Etude statistique de l'effet antipyrétique

Table de la loi de Student

Cette table donne les fractales de la loi de Student à degrés de liberté (ddl) :
valeur t ayant la probabilité α d'être dépassée en valeur absolue :

$$P(-t < T < t) = 1 - \alpha$$

$$\text{Ou : } P(T < -t) = \alpha/2 = P(T > t)$$

α bilatéral	1 - α / 2 (unilatéral)	ddl (degré de liberté)
-------------	------------------------	------------------------

	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.02
	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9	0.95	0.957	0.99
1	0.1584	0.3249	0.5095	0.7265	1	1.3764	1.9626	3.0777	6.3137	12.706	31.821
2	0.1421	0.2887	0.4447	0.6172	0.8165	1.0607	1.3862	1.8856	2.92	4.3027	6.9645
3	0.1366	0.2767	0.4242	0.5844	0.7649	0.9785	1.2498	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407
4	0.1338	0.2707	0.4142	0.5686	0.7407	0.941	1.1896	1.5332	2.1318	2.7765	3.7469
5	0.1322	0.2672	0.4082	0.5594	0.7267	0.9195	1.1558	1.4759	2.015	2.5706	3.3649
6	0.1311	0.2648	0.4043	0.5534	0.7176	0.9057	1.1342	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427
7	0.1303	0.2632	0.4015	0.5491	0.7111	0.896	1.1192	1.4149	1.8946	2.3646	2.9979
8	0.1297	0.2619	0.3995	0.5459	0.7064	0.8889	1.1081	1.3968	1.8595	2.306	2.8965
9	0.1293	0.261	0.3979	0.5435	0.7027	0.8834	1.0997	1.383	1.8331	2.2622	2.8214
10	0.1289	0.2602	0.3966	0.5415	0.6998	0.8791	1.0931	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638
11	0.1286	0.2596	0.3956	0.5399	0.6974	0.8755	1.0877	1.3634	1.7959	2.201	2.7181
12	0.1238	0.259	0.3947	0.5386	0.6955	0.8726	1.0832	1.3562	1.7823	2.1788	2.681
13	0.1281	0.2586	0.394	0.5375	0.6938	0.8702	1.0795	1.3502	1.7709	2.1604	2.6503

❖ Calcul du "t" pour le lot 2 (endotoxine à 5EU/ml):

$$m_1 = 38,93$$

$$m_2 = 41,9$$

$$\sigma_1 = 0,2309$$

$$\sigma_2 = 0,5568$$

On calcule la variance intermédiaire S^2_{int} :

$$S^2_{int} = \frac{(3 \times 0,0533) + (3 \times 0,31)}{(3+3)-2} \implies S^2_{int} = 0,2725$$

$$t = \frac{|38,93 - 41,90|}{0,522 \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} \implies t = 6,9692$$

Le degré de liberté $ddl = n_1 + n_2 - 2 = (3 + 3) - 2 = 4$.

A partir de la table de la loi de Student on a "t" théorique = 2,7765, avec un risque d'erreur $\alpha = 0,05$.

"t" calculé = 6,9692 > "t" théorique = 2,7765, d'où la variation de la température entre avant et après l'injection de l'endotoxine à 5 EU/ml est significative.

❖ Calcul du "t" pour le lot 3 (extrait aqueux à 120 mg/kg):

$$m_1 = 39,03$$

$$m_2 = 39,17$$

$$\sigma_1 = 0,3512$$

$$\sigma_2 = 0,3055$$

On calcule la variance intermédiaire S^2_{int} :

$$S^2_{int} = \frac{(3 \times 0,1233) + (3 \times 0,0933)}{(3+3)-2} \implies S^2_{int} = 0,1624$$

$$t = \frac{|39,03 - 39,17|}{0,403 \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} \implies t = 0,4255$$

Le degré de liberté $ddl = n_1 + n_2 - 2 = (3 + 3) - 2 = 4$.

"t" calculé = 0,4255 < "t" théorique = 2,7765, d'où la variation de la température entre avant et après l'injection de l'extrait aqueux à 120 mg/kg n'est pas significative.

❖ Calcul du "t" pour le lot 4 (paracétamol à 50 mg/kg):

$$m_1 = 39,03$$

$$m_2 = 39,1$$

$$\sigma_1 = 0,2517$$

$$\sigma_2 = 0,2646$$

On calcule la variance intermédiaire S^2_{int} :

$$S^2_{int} = \frac{(3 \times 0,0633) + (3 \times 0,07)}{(3+3)-2} \Rightarrow S^2_{int} = 0,10$$

$$t = \frac{|39,03 - 39,1|}{0,3162 \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} \Rightarrow t = 0,2712$$

Le degré de liberté $ddl = n_1 + n_2 - 2 = (3 + 3) - 2 = 4$.

"t" calculé = 0,2712 < "t" théorique = 2,7765, d'où la variation de la température entre avant et après l'injection de l'extrait aqueux à 120 mg/kg n'est pas significative.

4. Etude statistique de la callogenèse du fenugrec

Tableau 1 : Effet de la composition hormonale sur le poids frais des cals.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupe	0,4423	5	0,0871	8,4654	0,5720	2,6204
A l'intérieur des groupes	0,2571	24	0,0102			

Tableau 2 : Effet de la composition hormonale sur le poids sec des cals.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupe	0,0034	5	0,0006	8,3412	0,6178	2,6417
A l'intérieur des groupes	0,0005	24	2,3481			

Tableau 3 : Effet de la fragmentation de l'explant de l'hypocotyle sur le poids frais des cals.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupe	3,7404	2	1,8772	17,4807	0,5823	3,6833
A l'intérieur des groupes	1,6074	15	0,1001			

Tableau 4 : Effet de la fragmentation de l'explant de l'hypocotyle sur le poids sec des cals.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupe	0,0487	2	0,0010	17,0172	0,6720	3,6833
A l'intérieur des groupes	0,0018	15	1,9421			

APPENDICE J

GLOSSAIRE

Antibiotique: c'est une substance chimique produite par des micro-organismes ayant le pouvoir d'entraver la croissance des bactéries ou d'autres micro-organismes.

Antiphlogistique: c'est une substance qui combat l'inflammation (*phlox, phlogos* : flamme).

Antipyrétique: c'est une substance qui abaisse l'excès de température sans agir sur la température normale.

Antiseptique: c'est une substance qui empêche la prolifération des germes pathogènes à l'intérieur de l'organisme ou sa surface.

Cal: c'est un tissu de néoformation produit par l'explant initial ou à la suite du repiquage successif. Sa formation résulte à la fois de la levée d'inhibition consécutive à la séparation de l'explant et de l'action excitatrice des substances trophiques (milieu minéral, sucres ...) et des régulateurs de croissance (auxines, cytokinines, etc.) du milieu de culture.

Le cal peut être localisé au niveau des blessures ou s'étend à des régions indemnes. Sa croissance peut être indéfinie au cours des repiquages. Il peut être homogène ou hétérogène, son hétérogénéité est soit initiale, provenant de l'hétérogénéité des tissus de l'explant, soit secondaire. Le cal peut être à croissance active ou lente, homogène ou nodulaire, plus ou moins dissocié ou compact, incolore ou plus rarement chlorophyllien ou anthocyane.

Calice: c'est l'enveloppe extérieure d'une fleur, formée des sépales, libres ou soudés, généralement de couleur verte, très rarement colorés.

Callogenèse: c'est la néoformation d'un cal.

Capsule: c'est un fruit sec déhiscent formé de carpelles soudés, à une ou plusieurs loges, s'ouvrant par deux ou plusieurs valves, ou par des pores.

Carpelle: c'est l'organe reproducteur femelle de la fleur, formé d'un ovaire contenant le ou les ovules, et d'un stigmate.

Diurétique: c'est une substance qui augmente la production d'urine. Certaines sont utilisées comme médicaments : elles inhibent la réabsorption des ions sodium et donc de l'eau par le rein. Les autres sont qualifiées de substances à effet diurétique tels que la Théobromine, la Théophylline, la Caféine et l'Alcool.

Drogues végétales: ce sont des substances issues de plantes fraîches ou desséchées, utilisées à des fins thérapeutiques.

Explant: c'est un fragment d'organisme (apex, organe, fragment d'organe ou fragment tissulaire) excisé et éventuellement mis en culture *in vitro*.

Insuline: c'est une hormone normalement sécrétée, et libérée par le pancréas. Quand nous mangeons, l'organisme convertit les sucres complexes de notre alimentation en sucre simple, le glucose qui est la principale source d'énergie. Lorsque le glucose est disponible dans le sang, il doit entrer dans les cellules pour servir à la production d'énergie pour leur bon fonctionnement. C'est là qu'intervient l'insuline. Elle joue un rôle majeur dans la captation et l'utilisation du glucose par les cellules. Plus il y a de glucose dans le sang, plus le pancréas sécrète l'insuline. Grâce à cette adaptation de la sécrétion d'insuline, le taux du glucose dans le sang ou glycémie reste constant. L'insuline permet ainsi à l'organisme de bien utiliser le sucre, le «carburant» indispensable au fonctionnement de nos cellules.

Légumineuses : (littéralement : légume dont le fruit est une gousse) représentent 1/12^{ème} des plantes à fleurs, soit plus de 18 000 espèces connues. La très grande majorité d'entre elles est capable d'entrer en symbiose avec des bactéries du sol, principalement du genre rhizobium.

Médicaments à base de plantes: ce sont des médicaments dont les principes actifs sont exclusivement des drogues végétales et/ou des préparations à base de drogues végétales.

Néoformation: c'est la formation de structures nouvelles : tissus, méristèmes. La néoformation est l'aboutissement d'une dédifférenciation.

Plantes médicinales: ce sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses.

Principe actif: c'est la molécule qui dans un médicament ou dans une plante possède un effet thérapeutique. Cette substance est, la plupart du temps, en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients.

Sulfonylurées: (Glyburide, Glypizide, Glimepiride, Glibenclamide, tolbutamide, chlorpropamide) favorisent la sécrétion d'insuline par action sur les récepteurs aux sulfonylurées. Ils abaissent la néoglucogénèse hépatique, mais ils augmentent la lipogénèse. Les effets secondaires attendus des sulfonylurées sont : l'hypoglycémie, la surcharge pondérale, une pathologie cardiovasculaire ischémiant et l'accélération de l'apoptose des cellules β de Langerhans.

Totipotence cellulaire: c'est l'aptitude des cellules à exprimer la totalité des potentialités du génome. Cette aptitude se révèle dans les cas d'embryogenèse somatique.

Vulnérable : En médecine et en pharmacie qui aide à la guérison des blessures.

REFERENCES

1. Iserin, P., "Encyclopédie de plantes médicinales : identifications, préparations et soins", Bordos : Larousse, (1996), 336 p.
2. Verdrager, J., "Ces médicaments qui nous viennent des plantes", Ed., Maloine S.A., (1978), 151 p.
3. Fernandez, M., "De quelques plantes dites médicinales et de leurs fonctions", Editions Aenigma, (2003), 268 p.
4. Schawenberg, P., Paris, F., "Guide des plantes médicinales : analyse, description et utilisation de 400 plantes", Paris, Delachaux et Niestlé, 3^{ème} édition, (1997), 396 p.
5. Vonarburg, B., "Plantes médicinales au rythme des saisons", Zurich, Silva, (1981), 120-125.
6. Vigneau, C., "Plantes médicinales : Thérapeutique – Toxicité", Ed., Masson, (1985), 410 p.
7. "Plantes médicinales du Maroc : Usage et toxicité", Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, bp 6202, Rabat-institut, Maroc, (2000), 137-142.
8. Lavery, S. P., "Guide du bien-être : Aromathérapie", Cologne, Könnemann, (1999), 58 p.
9. Thurzova, L., "Les plantes – santé qui poussent autour de nous", Bordos, (1981), 268 p.
10. Valnet, J., "Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes", 5^{ème} édition : Maloine SA éditeurs, Paris, (1983), 245 p.
11. Valnet, J., "Aromathérapie, traitement des maladies par les essences", Ed., Maloine, Paris, (1984), 544 p.
12. Debuigue, G., "Larousse des plantes qui guérissent", Librairie Larousse, (1984), 5 - 17.
13. Leclerc, H., "Précis de phytothérapie", Ed., Masson, (1983), 170 p.
14. Bianchini, F., Corbetta, F., "Atlas des plantes médicinales", Paris, Fernand Nathan Edite, (1975), 231 p.
15. Bruneton, J., "Pharmacognosie, plantes médicinales", 2^{ème} édition, Ed., Lavoisier, Paris, (1993), 464 p.
16. Elabed, D., Kambouche, N., "Les huiles essentielles", Ed., Dar El Gharb, Oran, Algérie, (2003), 91 p.
17. Dubourg, M.J., "Plantes médicinales. Aromathérapie", 10^{ème} édition, Ed., Librairie-Gründ, Paris, (1992), 223 p.

18. Seguin, E., GUESTEM, A., Parism., Ovecchiami., "Le prédateur en pharmacie : botanique, pharmacognosie, phytothérapie-homéopathie", Ed., Technologie & Documentation, (2001), 446 p.
19. Bernard, T., Perineau, F., Bravo, P., Delmas, M., Garset, A., "Information chimie", n° 298, (octobre 1998), 179 - 183.
20. Richter, G., Reymonde, G., "Métabolites des végétaux : physiologie et biologie", Ed., Presses polytechniques et universitaires romandes, Paris, (1993), 199 p.
21. Azoudj, S., "Valorisation des huiles essentielles de quelques espèces de Origanum et Thymus spontanées en Algérie", Thèse Ing., INES, Blida, (1999), 68 p.
22. Sallé, J.L., "Les huiles essentielles", Frison Roche, Paris, (1991), 5 - 49.
23. Gaucher, I., "Projet génie agro-alimentaire, industrie alimentaire et biologique", <http://www.erso.wanadoo-fr/JI/GIA/GIAindex.-html>, (2001).
24. Boumghar, M.Y., "Techniques d'extraction aux espèces forestières ; le cèdre du Djurdjura : contribution à l'étude analytique de l'huile essentielle", Mémoire de Magister, E.N.P, Alger, (1989), 124 p.
25. Richard, H., Loo, A., "La fabrication des extraits : extraction par le dioxyde de carbone, *in* Epices et Aromates", Technique & Documentation, Ed., Lavoisier, Paris, (1992), 214 p.
26. "Les médecines de la nature : 200 plantes pour se soigner", Sélection du Reader's Digest., Paris, (2003), 99 - 100.
27. Foury, A., "Les légumineuses fourragères au Maroc", Service Eech., Agron., Ed., Rabat, (1954), 656 p.
28. Baccou, J.C., "Le fenugrec, son intérêt comme source de sapogénines stéroïdiques, de protéines et d'huiles. Essai de valorisation", Thèse Doc., Sci., Agro., Univer., Montpellier 2, France, (1984), 432 p.
29. Lechevalier, A., "Les productions végétales du Sahara et de ses confins nord et sud passé, présent et avenir", Revue de botanique appliquée et d'agriculture tropicale 12^{ème} année, (sept-oct., 1932), 133 - 134.
30. Battandier, J.A., Trabut, L., "Flore de l'Algérie Dicotylédones. Imp., Typographie. Adolphe Jourdan", Alger, (1890), 225 p.
31. Duke, A.J., "Handbook of Legumes of World Economic Importance", Plenum Press, New York and London, (1986), 867 p.
32. Villax, E.J., "La culture des plantes fourragères dans la région méditerranée occidentale", INRA, Rabat, (1963), 441 p.
33. Lapeyronie, A., "Les productions fourragères méditerranéennes", Ed., Maisonneuve et Larousse, Ed., Paris, (1982), 425 p.

34. Maire, R., "Etude sur la flore et la végétation du Sahara central", (mission du Hoggar), Mémoire de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du Nord, V. 15, n°3, (1933), 122 - 123.
35. Sitouh, M., "Principales plantes sahariennes", Ann., INA., El Harrach, Algérie, T2, 12(1), (1988), 210 - 215.
36. Ozenda, P., "Flore du Sahara", 2^{ème} édition CNRS, Paris, (1977), 622 p.
37. Quezel, P., Santa, S., "Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales", Ed., CNRS, T1 & T2, Paris, (1962), 565 p.
38. Bonnier, G., "Flore complète de France, Suisse et Belgique", Ed., Lebesgue et Cte, T3, Bruxelles, (1927), 1264 p.
39. Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., "Flore Europeae. Rosaceae to Umbelliferae", Cambridge, Univ., Press (2), (1969), 454 p.
40. Davis, P.H., "Flore of Turkey and the East Aegean Islands", Ed., Rech Scriben, Tome 3, (1969), 627 p.
41. Rosengarten, F., "The Book of Spices", Livingston, Wynnewood, Penns., USA. (1969), 745 p.
42. http://www.uni-graz.at/~katzer/engl/Trig_cae.html.
43. http://fr.wikipedia.org/wiki/Fenugrec#Caract.C3.A9ristiques_botaniques.
44. Rouk, H.F., Mangesha, H., "Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Its relationship, geography and economic importance", Exper. Stat. Bull. V. 9, n°20, Imper. Ethiopian College of Agric. and Mech. Arts, (1963), 21 - 29.
45. Fazli, F.R.Y., Hardman, R., "The spice fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Its commercial varieties of seed as a source of diosgenin", *Trop. Sci.*, 10, (1968), 66 - 78.
46. Volax J., Stodola, J., "Les plantes médicinales – 256 illustrations en couleurs", GRÜND Illustration de FRANTISEK SEVERA, (1983), 633 p.
47. "Plantes condimentaires", Ministère de l'agriculture et de la pêche, Direction de développement de la production végétale, Algérie, (1987), 8 – 27.
48. "L.A.B.C. des plantes : Guide pratique de phytothérapie", Ed., Romart, France, (1997), 64 p.
49. Mahmoudi, Y., "Les plantes médicinales dans le jardin prophétique", Ed., Liban, (1990), 447 p.
50. Benmohamed, A., "Etude du comportement de quelques populations algériennes de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) cultivées à El Harrach : Analyse biométrique, cytogénétique et électrophorèse", Mémoire Mag., INA., El Harrach, Algérie, (1998), 306 p.

51. Cabaret, J., "167 plantes pour soigner les animaux, phytothérapie vétérinaire", Paris, (1986), 192 p.
52. Ribes, G., Sauvaire, Y., Da-Costa, C., Baccou, J.C., "Antidiabetic effects of subfractions from fenugreek seeds in diabetic dogs", *Proceedings of Society for Experimental Biologie and Medecine*, USA, 182 (2), (1986), 159 - 166.
53. Baba Aissa, F., "Encyclopédie des plantes utiles (Flores d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'orient et d'occident)", Edition EDAS-Librairie Modernes- Rouiba, (2000), 97 p.
54. Perrot, E.M., "Matière première usuelle du règne végétal", Thérapeutique, Hygiène, Industrie, T2, (1944), 343 p.
55. Iserin, P., "Larousse Encyclopédie des plantes médicinales", Ed., Larousse, (2001), 256 p.
56. Schuette, H.A., Cowley, M.A., Muller, M.M., "Fengreek seed oil", Oil and soap, XVII (6), (1940), 122 p.
57. Sauvaire, Y., Baccou, J.C., "Perfectionnement dans l'extraction des spogénines stéroïdiques. Valorisation des sous-produits", *Cloydia*, 41 (6), (1978), 588 p.
58. Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D., "Herbal Medicines", 3rd Ed., Pharmaceutical Press, Imprint of RPS Publishing, London, (2007), 721 p.
59. Varshney, I.P., Sharma, S.C., "Saponins and sapogenins. XXXII. *Trigonella foenum-graecum* seeds", *J. Indian Chem. Soc.*, 43(8), (1966), 64 - 79.
60. Bruneton, J., "Pharmacognosy : phytochemistry and medicinal plants", 3^{ème} édition, Ed., Lavoisier, Paris, (1999), 1119 p.
61. Guignard, J.L., "Biochimie végétale", 2^{ème} édition, Paris, Masson, (2000), 281 p.
62. Karsten, V., "Kirninartige Wirking-Von. Trigonelli in vergil", *Bungstest, nature-Wissenschaften*, Dentsh 53, n°9, (1966), 232 - 245.
63. Marion, L., "In the alkaloids", Ed., R.M.F. Manske et H.L., Hobies (Académie press Ing., New York), (1950), 186 p.
64. Nachi, N., "Etude du comportement de quelques populations du fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) de différentes provenances", Thèse Ing., INA., El Harrach, Algérie, (1998), 104 p.
65. Sauvaire, Y., Baccou, J.C., Kobrehel, L., "Solubilisation and caractérisation of fenugreek seed proteines", *J. Agric. Food chem.*, 32, n°1, (1984), 121 - 125.
66. Igor Passi, L.B., "Etude des activités biologiques de Fagara zanthoxylo (Rutaceae)", Thèse Pharmacie, Bamako, (2002), 133 p.

67. Teoule, E., "Biotechnologie et amélioration des plantes", Ed., Rech Scriben, (1988), 724 p.
68. Nozeran, R., "L'expression de la variabilité dans les cultures d'organes", *Bull. Soc. Bot. Fr.* 132 Actuel., (1985), 11 - 21.
69. Cornu, D., "Forêt de la gélose à la terre", *Biofutur*, n°131, (1994), 25 - 31.
70. Beauchesne, G., "L'histoire et les fondements de la culture *in vitro*", (1989), 1 - 5.
71. Zryd, J.P., "Culture de cellules, tissus et organes végétaux », Fondements théoriques et utilisations pratiques, Ed., Presses Polytechnique Romandes Suisse, (1988), 308 p.
72. Demarly, Y., "L'épigénique", *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 132, Actual, (1985), 79 - 94.
73. Bigot, C., "Apport de la culture *in vitro* dans le contrôle de la néoformation", In cinquantenaire de la culture *in vitro*, Ed., INRA, Paris, (1990), 302 p.
74. Margara, J., "Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse", Ed., Versailles, (1982), 262 p.
75. Bigot, C., "Multiplication végétative *in vitro* par néoformation de bourgeons et d'embryons somatiques", In Margara, J. : Bases de la multiplication végétative, Ed., INRA, Paris, (1988), 262 p.
76. Chagvardiff, P., "L'utilisation de la variabilité exprimée spontanément en culture, en vue de l'amélioration des plantes", *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 132, Actual, (1985), 97 - 103.
77. Meulmans, M., "Extension de la variabilité chez les plantes cultivées par exploitation de la variabilité somaclonale", *Bull. Rech. Agronomique de Gembloux*, 19, (1984), 61 - 80.
78. Aitchison, P.A., Macleod, A.J., Yeoman, M.M., "Callus establishment", In *plant tissue and cell culture*, Botanical monographs, V.11, Edit By STREET H.E., Ed., Black well scientific publications, second edition, (1977), 467 p.
79. Asselin De Beauville, M., "Etude de la morphologie des cals obtenus par androgenèse *in vitro* et de leur aptitude à régénérer des plantes chez *Oryza sativa* L.", In *Agronomie tropicale*, XXXV-2, Paris, (1990), 170 - 177.
80. Jalouzot, R., Boccon, J., "Les biotechnologies en horticulture. Possibilités et perspectives », 91 – 127, In Auge, R., "La culture *in vitro* et ses applications horticoles", Ed., Lavoisier, Paris, (1989), 225 p.
81. Yeoman, M., "Plant cell culture technology, botanical monographs", Ed., Black Well scientific publications, (1986), 151 p.
82. "Biotechnologie et amélioration génétique des arbres forestiers", Ed., ICRAF, Le moniteur de la biotechnologie et du développement, n°15, (1993), 91 p.

83. Aren, P., "Stratégies d'obtention de souche végétales à haute capacité de production de métabolites, colloque de bioproduction de métabolites par culture de cellules végétales", Coll. CPE & INRA, Paris, (1988), 6 - 23.
84. Al-Yahya, M.A., "Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of Saudi Arabia", *Fitoterapia*, 57(3), (1986), 179 - 182.
85. Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc., Gmira, N., "Screening phytochimique d'une endémique libéro-marocaine *Thymelaea lythroides*", *Bull. Soc. Pharm*, V. 142, Bordeaux, (2003), 61 - 78.
86. Kjeldhal, J., "Neue Method zur Bestimmung des Stickstoffs in organischem körpen", *Z. Anal. Chem.* 22, (1883), 366 - 382.
87. Kassemi, N., "Relation entre un insecte phytophage et sa principale plante hôte : cas de la bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus*) », Mémoire de Magister en écologie animale, Université de Tlemcen, Algérie, (2005), 107 p.
88. Merghem, R., "Les facteurs anti-nutritionnels (FAN) phénoliques de *Pisum sativum*. L et de *Vicia faba* (Légumineuse): aspects structuraux génétiques et phénoliques", Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon I, France, (1995), 451 p.
89. Swain, T. Hillis, W.E., "The phenolics constituents of prunus domestica -I- the quantitative analysis of phenolics constituents", *Journal of the science of food and agriculture*: 10, (1959), 13 - 29.
90. Price, M.L., Vanscoyoc, S., Butler, G., "Article evaluation of vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain », *J. Agric. Food. Chem.* 26, (1978), 210 -218
91. Mole, S., Waterman, P.G., "A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. II. Techniques for biochemically defining tannins. *Oecologia*", 72, (1987), 148 - 156.
92. Wollenweber, P., "Occurrence of flavonoïds aglycone in medicinal plants. In: Plant flavonoids in biology and medicinal proprieties". E. Cody, J.B., Middleton Jr. & A., Beretz (eds), Alan Riss, New York, (1988), 156 p.
93. "Pharmacopée européenne", 4^{ème} édition, Strasbourg, Conseil d'Europe, (2002), 2060 p.
94. "LABO: Guide pratique du laboratoire de chimie", 4/ Méthode d'analyse, Edition Delta & Spes S.A., CH-1026 Denges, (1984), 548 p.
95. "The United States Pharmacopoeia XXIII", Rockville, MD, US Pharmacopeial Convention, (2002), 2311 p.
96. Delarres, C., "Microbiologie pratique pour le laboratoire", Edition Technologie et Documentation, Lavoisier, (2007), 476 p.

97. Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., "Carragenine-induced oedema in ind-paw of rat as an assay for anti-inflammatory drug". *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 141, (1963), 369 - 373.
98. Bewley, J.D., "Seed germination and dormancy", *The Plant Cell* 9: (1997), 1055 -1066.
99. Gautheret, R.J., "La culture des tissus végétaux", Technique et réalisation, Faculté des sciences de Paris, Ed., MASSON & Cie, (1959), 863 p.
100. Murashige, T., Skoog, F., "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *physiol., Plant* 15, (1962), 473 - 497.
101. Skoog, F., Miller, C.O., "Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro", *Symp. Soc. Exp. Boil.*, (1957), 118 - 130.
102. Tourte, Y., "Génie génétique et biotechnologie", Edition Dunod, Paris, (2002), 341 p.
103. Spyropoulos, C.G., "Osmoregulation, growth and sucrose accumulation in germinated *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed treated with polyethylene glycol", *Physiol. Plant.*, 68, (1986), 129 - 135.
104. Mazliak, P., "Croissance et développement", Physiologie végétale II, Paris, Hermann, (1982), 465 p.
105. Djabou, N., "*Sumbucus nigra* L., une plante de la pharmacopée traditionnelle Nord africaine", Mémoire de Magister en chimie, Université Abou Bekr BELKAID, Tlemcen, Algérie, (2006), 132 p.
106. Bray, L., Carlqui, D., Gloux, K., Le Rudulier, D., "Variations de la teneur en trigonelline associée au stress salin et à la dormance hivernale chez *Populus trichocarpa* x *deltoïdes*", *Annales de recherches sylvicoles*, (1988), 133 – 147.
107. Foungebe, J.S., Tillequin, F., Paris, M., Jacquemin, H., Paris, R.R., "Sur une Pipéracée de Guyane, le *Piper marginatum*", *Annales pharmaceutiques françaises*, V. 34, n° 9 - 10, (1976), 339 - 343.
108. Kebbas, S., "Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs d'une plante à caractères thérapeutiques, *Spergularia ruba* L. et effet antibactérien", Mémoire de Magister, Uni., Saad DAHLEB, Blida, Algérie, (2009), 186 p.
109. Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J., Eddouks, M., "Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco", *Journal of Ethnopharmacology*. V. 77, (2001), 175 - 182.
110. Hesham, S., Soliman, M. Hani, M., Elgamal, A., Simon, A., Toth, G., Horvath, G., Duddeck, H., "A new gypsogenin saponin from *Arenaria fillicaulis*", *Journal of natural products*, n° 62, (1999), 885 - 888.

111. Gupta, R.K., "Minor steroidal sapogenins from fenugreek seeds, *Trigonella foenum-graecum* L.", *Journal. Nat. Prod.*, 49: (1986), 1153 - 1159.
112. Ghosal, S., "Fenugreekine, a new steroidal sapogenin-peptide ester of *Trigonella foenum-graecum* L.", *Phytochemistry* 13: (1974), 2247 - 2251.
113. Gupta, R.K. "Two furostanol saponins from *Trigonella foenum-graecum* L.", *Phytochemistry* 25: (1986), 2205 - 2207.
114. Modgil, R. Mehta, U., "Effect of infestation (*Collosobruchus chinensis* L.) of chick peas (Bengal gram) on biological utilization of proteins", *Nahrung* 41: (1997), 236 - 238.
115. Gain, E., "La germination des graines de légumineuses habitées par les bruches", C.R.AC.SC., 125, Paris, (1987), 280 p.
116. Ruckebusch, Y., "Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animales", 2^{ème} Edit., Maloine S.A. Paris, (1981), 745 p.
117. Haslam, E., "Vegetable tannins", In (Conn, E.E.Ed.): The Biochemistry of Plants, V.7, New York: Academic Press, (1981), 544 p.
118. Swant, T., "Tannins and lignins", In (G.A. Rosenthal and D.H. Janzen, Eds.) Herbivores, New York: Academic Press, (1979), 682 p.
119. Feeny, P.P., "Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillar", *Ecology*, 51: (1970), 565 - 581.
120. Chan, B.G., Waiss, A.C., Lukefahr, M., "Condensed tannin, an antibiotic chemical from *Gossypium hirsutum*", *Journal of Insect Physiology*, 24: (1978), 113 - 118.
121. Bernays, E.A., Chamberlain, D.J., Leather, E.M., "Tolerance of acridids to ingested condensed tannin", *Journal of Chemical Ecology*, 7: (1981), 247 - 256.
122. Waterman, P.G., Mbi, C.N., Kckey, D.B., Gartlan, J.S., "African rainforest vegetation and rumen microbes: phenolic compounds and nutrients as correlates of digestibility". *Oecologia*, 47: (1980), 22 - 33.
123. Paris, M., Hurabielle, M., "Abrégé de matière médicale: Pharmacognosie", Tome I, Masson, Paris, (1981), 457 p.
124. Wagner, H., Iyengar, M.A., Hörhammer, L., "Vicenin-1 and -2 in the seeds of *Trigonella foenum-graecum* Linn", *Phytochemistry*, 12: (1973), 254 - 261.
125. Khurana, S.K., Krishnamoorthy, V., Parmar, V.S., Sanduja, R., Chawla, H. L., "3,4,7-trimethylcoumarin from *Trigonella foenum-graecum* stems", *Phytochemistry*, 21: (1982), 214 - 218.
126. Parmar, V.S., Singh S., Rathore J.S., "A structure revision of trigocoumarin", *J. Chem. Res. Synop.*, 11: (1984), 378 - 386.

127. Mebazaa, R., Mahmoudi, A., Fouchet, M., Dos Santos, M., Kamissoko, F., Nafti, A.H, Ben Cheikh, R., Rega, B., Camel, V., "Characterisation of volatile compounds in Tunisian fenugreek seeds", *Food Chemistry*, Elsevier, 10 : (2008), 611 - 623.
128. Tayyaba, Z., Nazrul Hasnain, S., Hasan, S.K., "Evaluation of the oral hypoglycaemic effect of *Trigonella foenum-graecum* L. (methi) in normal mice", *Journal of ethnopharmacology*, 75: (2001), 191 - 195.
129. KEITA, A., MARIKO, E., HAIDARA, T.K., "Etude de l'activité hypoglycémisante des feuilles de *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae)", *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 12: (1998), 16 - 25.
130. Sharma, R.D., Sarkar, A., Hazra, D.K., "Use of fenugreek seed powder in the management of non-insulin dependent diabetes mellitus", *Nutr Res*, 16: (1996), 1331 - 1339.
131. Hatanaka, S.I., "Amino acids from mushrooms", In W. Herz, G.W. Kirby, R.E. Moore, W. Steglich and Ch. Tamm (eds), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag, Wien, New York, (1992), 14 - 16.
132. Fazli, F.R.Y., Hardman, R., "Isolation and characterization of steriods and other constituent from *Trigonella foenum-graecum*", *Phytochemistry*, 10: (1971), 249 -258.
133. Marles, R.J., Farnsworth, N.R., "Antidiabetic plants and their active constituents. Phytomedicine", 2: (1995), 137 - 189.
134. Raghuram, T.C., Sharma, R.D., Sivakumar, B., "Effect of fenugreek seeds on intravenous glucose disposition in non-insulin dependent diabetic patients", *Phytother Res*, 8: (1994), 83 - 86.
135. Gupta, A., Gupta, R., Lal, B., "Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: a double blind placebo controlled study", *J. Assoc. Physicians. India*, 49: (2001), 1057 - 1061.
136. Amadou, D., "Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (Myrtaceae)", Diplôme d'Etat, Université de BAMAKO, Mali, (2005), 100 p.
137. Nikiema, W.P.R., "Propriétés pharmaco-chimiques de *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) récolte au Mali : Etude préclinique des effets anti-inflammatoires et antimicrobiens des extraits des écorces de racines", Diplôme d'Etat, Université de BAMAKO, Mali, (2005), 162 p.
138. Ahmadiani, A., Javan, M., Semnanian, S., Barat, E., Kamalinejad, M., "Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaves extract in the rat", *Journal of Ethnopharmacology*, 75: (2001), 283 - 286.
139. Ouafi, M.S., "Contribution à la connaissance d'une plante médicinale : le fenugrec (Helba) (*Trigonella foenum-graecum* L.) – Ontogénèse de

- l'appareil conducteur", Mémoire D.E.S., Univ., U.S.T.H.B., Algérie, (1983), 56 p.
140. Nitsch, J.P., Lance-Nougarede, A., "L'action conjuguée des auxines et cytokinines sur les cellules de moelle de tabac : étude physiologique et microscopie électronique", *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.*, 13 : (1967), 81 - 118.
 141. Beruto, M., Debergh, P.C., "Callus growth and somatic embryogenesis in thalamus tissue of *Ranunculus asiaticus* L. cultivated *in vitro*: cytokinin effect and phenol metabolism *in vitro*", *Cell. Dev. Biol. Plant.*, 32 : (1996), 154 - 160.
 142. Atmane, N., Blervacq, A.S., Michaux-Ferriere, N., Vasseur, J., "Histological analysis of indirect somatic embryogenesis in the *Lycopodiella inundata* L. Holub (pteridophytes)", *Scientia Horticulturae*, 8(2), (2000), 179 - 192.
 143. Hamdani, F.T., "Essai de régénération de plantes entières chez le genre *Scorpiurus* via l'organogenèse et l'embryogenèse somatique", Thèse, Université Hassiba BEN BOUALI de Chlef, Algérie, (2001), 99 p.
 144. Yang, Y.W., Chang, W.C., "Embryoid formation and subsequent plantlet regeneration from callus culture of *Thalictrum urbaini* hayata (Ranunculaceae)", *Z. Pflanzenphysiol.*, 97, (1980), 19 - 24.
 145. Fergani, K., Ikouirene, N., "Le fenugrec (Holba) : *Trigonella foenum-graecum* L. en culture *in vitro*", Mémoire D.E.S. Uni. U.S.T.H.B., Algérie, (1987), 46 p.
 146. Giri, A., Ahuja, P.S., Kumar, A., "Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Aconitum heterophyllum* wall", *Plant Cell Tissus Organ Cult.* 32: (1988), 213 - 218.
 147. Espen, S., George, L., "High frequency plant regeneration through somatic embryogenesis in finger millet (*Eleusine coracana*)", *Plant Sci*, 61: (1989), 127 - 130.
 148. Vishnoi, R.K., Kothari, S.L., "Somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in immature inflorescence culture of *setaria italica* L.", *Beauv. Cereal Res. Commun.*, 24: (1996), 291 - 297.
 149. Youssef, A.A., Rady S.A., Ghanem., "Growth and some primary products in callus cultures of *Nigella sativa* as influenced by various cultural conditions and salt stress", *Phytoterapia* IXIX (4), (1998), 329 - 336.
 150. Chaudhuri, D., Sen., "*in vitro* response of *Scilla siberica*", *Scientia Horticulturae*, 95 (1-2), (2002), 51 - 62.
 151. Lutz, A., "L'expression de la variabilité morphologique après régénération dans les cultures de tissues et de cellules", Bulletin Scientifique botanique 132, France, (1985), 35 - 50.

152. Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqmard, A., Murray, A.H., "Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-Type cyclin", *Science*, 283: (1999), 1541 - 1544.
153. Gupta, K.G., "Influence of auxines on growth and cytohistology of fenugreek cell", *Cytobios.*, V.35, n°9, (1974), 103 - 107.
154. Woong-Young Soh., Pli-Soi., Duck-Yee Cho., "Effectes of cytokinin on adventitious root formation in callus cultures of *Vigna unguiculata* L. Walp", *Scientia Horticulturae.*, 65 (3), (1998), 241 - 250.
155. Oncina, R., Botia, J. M., Del Rio, J. A., Ortuño, A. "Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L.", *Food chemistry*, V.70, n°15, (2000), 489 - 492.