

*République Algérienne démocratique et populaire*

*Ministère d'enseignement supérieur et de la recherche scientifique*



*Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen-*



*Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers*

*Département de Biologie*

*Laboratoire Antibiotiques Antifongique : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique*

**MEMOIRE**

Présenté par

**M<sup>elle</sup> MOKHTARI Imène**

En vue de l'obtention du

**Diplôme de MASTER**

En Sciences Biologiques

**Option**

Biochimie Appliquée

**Recherche d'effet inhibiteur des extraits bruts des  
graines de *Trigonella foenum-graecum L* vis à vis  
de l'alpha amylase**

Devant le jury composé de :

**D' DJAZIRI Rabah**

**Professeur**

**Président**

**Univ. Tlemcen**

**D' LAHFA Farid**

**M.C.A**

**Examineur**

**Univ. Tlemcen**

**D' AZZI Rachid**

**M.C.A**

**Promoteur**

**Univ. Tlemcen**

**Année Universitaire : 2016/2017**

## Remerciements

En tout premier lieu, je remercie Allah, tout miséricordieux de m'avoir illuminé le chemin vers le savoir et la science et de m'avoir donné la force et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude au directeur de ce mémoire Monsieur **Azzi R**, Maitre de conférences Classe A au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses conseils judicieux qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je tiens à remercier Monsieur **Djaziri R**, Professeur au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je désire aussi remercier Monsieur **Lahfa F**, Maitre de conférences au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et aussi pour la richesse et la qualité de son enseignement au cours de notre cursus universitaire.

J'exprime également mes sincères remerciements à Madame **Boucherit Atmani Z.**, Professeur au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, directrice du laboratoire Antibiotique Antifongique : Physico-chimique, synthèse et activité biologique, pour ses précieux conseils et ses encouragements.

Je remercie vivement mademoiselle **Abbou Faiza** et **Ouffai Khaoula**, doctorantes en biologie, pour leur aide variée et leur disponibilité. Je vous adresse mon profond respect.

Enfin, mes remerciements s'adressent à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

## *Dédicace*

*J'ai l'immense plaisir de dédier ce travail :*

*A la mémoire de mon père «Abdelali» avec le quel je n'aurais pas le plaisir de partager cet événement, mais qui est et qui demeurera dans mon cœur et à jamais. J'espère que je saurai à la hauteur des valeurs que tu as semé en nous.*

*A ma chère mère «Djamila», en vous je vois la maman combattante, toujours prête à se sacrifier pour le bien-être de ses enfants. Merci pour tout.*

*A mes chères sœurs «Ilhem» et «Amina», qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité et qui m'ont beaucoup aidé pour la réalisation de ce travail. En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.*

*A mon petit frère «Mohammed», qu'Allah, le tout puissant, le protège et le garde.*

*A ma grand-mère «Yamina», qui m'a accompagné avec ses prières, sa douceur, puisse Allah lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur.*

*A mes chères amies «Bouchra», «Malika», «Sihem», «Samia» et «Wahiba», Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées. En témoignage de l'amitié qui nous unie et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé, de bonheur et de réussite.*

*A tous les membres de ma famille, petits et grands.*

## ملخص :

مرض السكري هو متلازمة اضطراب الأيض ، يتميز بارتفاع مزمن في نسبة السكر في الدم و هذا راجع إلى خلل في إفراز أو عمل الأنسولين أو الاثنين معا. واحدة من بين الطرق العلاجية لعلاج هذا المرض هي تثبيط الإنزيمات الهاضمة (ألفا اميلاز و ألفا غلوكوزيداز).

الهدف من هذا العمل الذي قمنا به هو البحث عن التأثير المثبط لثلاث مستخلصات لنبات الحلبة محضرة بالنقع، النقع المغلي و الاستخلاص بالغلي على نشاط ألفا اميلاز و لكن في المختبر.

تبدأ دراستنا بالتحليل الكيميائي النباتي ثم الكمي لهذه المستخلصات لتحديد الكمية الإجمالية من البوليفينول، الفلافونويدات و العفص المكثف.

يبين الفحص الكيميائي للنبتة عن وجود العفص المكثف، الكينونات الحرة، القلويدات، الصابونين، الفلافونويد و التاربيينويد.

المستخلص المحضر بالنقع المغلي يحتوي على اكبر كمية من البوليفينول و العفص المكثف بتركيز 110,13 ميكروغرام مكافئ ح غ/ملغ و 77,31 ميكروغرام مكافئ ك/مل على التوالي بينما الكمية الأكبر من الفلافونويدات موجودة في المستخلص المحضر بالنقع بتركيز 14,07 ميكروغرام مكافئ ك/ملغ.

أظهرت الاختبارات التي أجريت على نشاط إنزيم ألفا اميلاز أن نبتة الحلبة لها تأثير مثبط، هذا التأثير واضح في المستخلص المحضر بالنقع المغلي بتركيز مثبط إلى 50 بالمئة تبلغ قيمته 1,87 ملغ/مل. و لكن هذا التأثير يبقى ضعيف جدا بالنسبة لتأثير الأكاربوز (0,01 ملغ/مل).

اعتمادا على نتائج دراستنا، نقترح أن نبات الحلبة يمكن أن يكون لها دور في تنظيم نسبة السكر المرتفعة في الدم من خلال تثبيط عمل إنزيم ألفا أميلاز و بالتالي التقليل من امتصاص الغلوكوز.

**كلمات البحث:** الحلبة، الالفاميلاز، العمل التثبيطي، البوليفينول، الفلافونويد، العفص المكثف.

## Résumé

Le diabète sucré est une affection métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique. Il est dû à une insuffisance de sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques et / ou une action altérée de cette hormone. Une des approches thérapeutiques dans le traitement du diabète est la diminution de l'absorption intestinale du glucose qui est assurée par l'inhibition des enzymes digestives ( $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidases).

L'objectif de ce travail porte sur la recherche, *in vitro*, d'effet inhibiteur de l'activité de l' $\alpha$ -amylase des extraits bruts hydrométhanolique des graines de *Trigonella foenum graecum L*, préparés par macération, infusion ou décoction.

Notre étude est initiée par un screening phytochimique de ces extraits et une analyse quantitative visant la détermination des taux de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins condensés.

Le screening phytochimique a révélé la présence des tanins, quinones libres, alcaloïdes, saponines, flavonoïdes et terpénoïdes dans les différentes préparations de la plante.

Les taux en polyphénols et en tanins condensés les plus élevés sont enregistrés dans l'extrait hydrométhanolique préparé par infusion (110,13  $\mu\text{g Eq AG/mg ES}$  et 77,31  $\mu\text{g Eq C/mg ES}$  respectivement). Alors que le taux le plus élevé en flavonoïdes est constaté dans l'extrait hydrométhanolique préparé par macération (14,07  $\mu\text{g Eq C/mg ES}$ ).

Les tests réalisés *in vitro* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase montrent que le fenugrec possède un effet inhibiteur, cet effet est plus marqué avec l'extrait préparé par infusion avec une  $\text{CI}_{50}$  d'ordre de 1,87 mg/ml. Cependant, il reste largement faible par rapport à celui de l'acarbose ( $\text{CI}_{50}$  à 0,01 mg/ml).

En fonction des résultats obtenus de notre étude, on suggère que *Trigonella foenum graecum L* peut exercer un effet sur la régulation de l'hyperglycémie en effectuant une inhibition de l'activité de l' $\alpha$ -amylase et par la suite une réduction de l'absorption du glucose.

**Mots clés :** *Trigonella foenum-graecum L*,  $\alpha$ -amylase, activité inhibitrice, polyphénols, flavonoïdes, tanins condensés.

## Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia. It is due to an insufficient insulin secretion by pancreatic beta cells and / or an altered action of this hormone. One of the therapeutic approaches in the treatment of diabetes is the reduction of intestinal absorption of glucose, which is assured by the inhibition of digestive enzymes ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidases).

The objective of this work is to investigate the *in vitro* inhibitory effect of hydromethanolic crude extracts prepared by three modes of extraction (maceration, infusion or decoction) from the *Trigonella foenum graecum L* seeds on the activity of  $\alpha$ -amylase.

Our study is initiated with phytochemical screening of these extracts and a quantitative analysis aiming at the determination of the total polyphenols, flavonoids and condensed tannins levels.

The phytochemical screening reveals the presence of tannins, free quinones, alkaloids, saponins, flavonoids and terpenoids in the different preparations of the plant.

The highest levels of polyphenols and condensed tannins were recorded in the hydromethanol extract prepared by infusion (110.13  $\mu\text{g Eq AG/mg DE}$  and 77.31  $\mu\text{g Eq C/mg DE}$  respectively). Whereas the highest level of flavonoids is found in the hydromethanol extract prepared by maceration (14.07  $\mu\text{g Eq C/mg DE}$ ).

*In vitro* tests on  $\alpha$ -amylase activity show that fenugreek has an inhibitory effect, this effect is more marked with the extract prepared by infusion with an  $\text{IC}_{50}$  equal to 1.87 mg/ml. However, this effect remains largely low compared to that of acarbose ( $\text{IC}_{50}$  at 0.01 mg/ml).

Based on the results of our study, we suggest that *Trigonella foenum graecum L* can exert an effect in the regulation of hyperglycemia by inhibiting the  $\alpha$ -amylase activity and subsequently reducing the glucose absorption.

**Key words:** *Trigonella foenum-graecum L*,  $\alpha$ -amylase, inhibitory activity, polyphenols, flavonoids, condensed tannins.

## Table de matière

Liste des figures .....	IV
Liste des tableaux .....	V
Liste des abréviations.....	VI
Introduction .....	01

### 1<sup>ère</sup> partie : la synthèse bibliographique

#### I .Généralités sur le diabète sucré

1. Définition .....	03
2. Classification.....	03
2.1. Diabète de type 1 .....	03
2.2. Diabète de type 2.....	03
2.3. Diabète gestationnel .....	03
2.4. Autres types.....	03
3. Epidémiologie .....	03
4. Diagnostic.....	04
5. Facteurs des risques.....	04
6. Physiopathologie .....	04
7. Complication du diabète sucré .....	05
8. Traitement du diabète sucré .....	05
8.1. Mesures hygiéno- diététiques.....	05
8.2.Traitement médicamenteux .....	06
a. Antidiabétiques oraux.....	06
b. Insuline .....	06
9. Utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète sucré .....	07

## II. L'alpha amylase

1. Définition de l'alpha amylase .....	09
2. Structure de l'alpha amylase .....	09
3. Rôle de l'alpha amylase dans le métabolisme glucidique .....	10
4. Implication des inhibiteurs de l'alpha amylase dans le traitement du diabète .....	12
5. Inhibiteurs naturels de l'alpha amylase .....	12

## III. *Trigonella foenum-graecum* L

1. Systématique de <i>Trigonella foenum graecum</i> L .....	14
2. Description de <i>Trigonella foenum graecum</i> L .....	14
3. Distribution géographique de <i>Trigonella foenum graecum</i> L .....	15
4. Composés actifs de <i>Trigonella foenum graecum</i> L.....	15
5. Effets thérapeutiques de <i>Trigonella foenum graecum</i> L .....	15
6. Effet antidiabétique de <i>Trigonella foenum graecum</i> L.....	16

## 2<sup>ème</sup> partie : la partie pratique

### VI .Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	17
1.1. Préparation du matériel végétal.....	17
1.2. Dégraissage du matériel végétal.....	17
1.3. Extraction du matériel végétal.....	18
1.4. Calcul du rendement.....	19
2. Tests phytochimiques.....	20
3. Dosage des composés phénoliques .....	21
3.1. Dosage des polyphénols totaux .....	21
3.2. Dosage des flavonoides .....	22
3.3. Dosage des tanins condensés.....	23



4. Etude de l'effet inhibiteur des extraits des graines du fenugrec sur l' $\alpha$ -amylase.....	23
4.1. Réactifs utilisés .....	23
4.2. Evaluation de l'effet inhibiteur sur l' $\alpha$ -amylase.....	24

## **V. Résultats et interprétation**

1. Extraction .....	26
2. Tests phytochimiques.....	26
3. Dosage des composés phénoliques .....	27
4. Effet des extraits des graines de <i>Trigonella foenum-graecum L</i> sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase <i>in vitro</i> .....	29
<b>VI. Discussion</b> .....	<b>32</b>
<b>VII. Conclusion</b> .....	<b>35</b>

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : la structure de l'alpha amylase .....	10
<b>Figure 02</b> : la structure de l'amidon .....	11
<b>Figure 03</b> : Digestion de l'amidon par l'amylase .....	12
<b>Figure 04</b> : Plante et graines de <i>Trigonella foenum-graecum L</i> .....	15
<b>Figure 05</b> : les graines de <i>Trigonella foenum-graecum</i> avant et après broyage .....	17
<b>Figure 06</b> : le montage de soxhlet .....	18
<b>Figure 07</b> : protocole d'extraction du matériel végétal .....	19
<b>Figure 08</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux .	28
<b>Figure 09</b> : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoides .....	28
<b>Figure 10</b> : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés .....	28
<b>Figure 11</b> : Courbe de regression logarithmique d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait préparé par macération .....	30
<b>Figure 12</b> : Courbe de regression logarithmique d'inhibition en fonction des différentes concentration de l'extrait préparé par infusion .....	30
<b>Figure 13</b> : Courbe de regression logarithmique d'inhibition en fonction des différentes concentration de l'extrait préparé par décoction .....	30

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Quelques plantes hypoglycémiantes et leurs mécanismes d'action .....	13
<b>Tableau 02</b> : Caractéristiques des extraits bruts des graines de <i>Trigonella foenum-graecum L</i> .....	26
<b>Tableau 03</b> : Résultats des tests phytochimiques des extraits bruts de <i>Trigonella foenum-graecum L</i> .....	27
<b>Tableau 04</b> : Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et en tanins condensés des extraits bruts hydrométhanoliques de <i>Trigonella foenum-graecum L</i> .....	29
<b>Tableau 05</b> : Valeurs d'CI <sub>50</sub> des extraits de <i>Trigonella foenum-graecum L</i> et de l'acarbose .	31

## Liste des abréviations

**APP** :  $\alpha$ -amylase pancréatique porcine

**$\alpha$**  : alpha

**Cl** : ion de chlore

**CI50** : Concentration inhibitrice

**DT1** : diabète de type 1

**DT2** : diabète de type 2

**FID** : Fédération internationale du diabète

**ES** : Extrait sec

**MeOH** : Méthanol

**M/V** : Masse / volume

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**V/V** : Volume / volume

**UV** : Ultraviolet

**3D** : tridimensionnelle

# *Introduction générale*

## Introduction générale

Le diabète sucré, en particulier le diabète de type 2, est qualifié depuis quelques années comme un des fléaux du 21<sup>ème</sup> siècle, partout dans le monde, dans les pays développés comme dans les pays en développement (**Whiting, 2011**). Le nombre des personnes atteintes de diabète ne cesse de progresser, il est estimé d'environ 422 millions en 2014. Ce chiffre est susceptible de continuer à croître pour atteindre 622 millions en 2040 (**OMS, 2016**).

Le diabète sucré est un trouble métabolique chronique caractérisé par des niveaux élevés du glucose dans le sang. Ceci est dû à une insuffisance de sécrétion d'insuline endogène par les cellules bêta pancréatiques et / ou une action altérée de cette hormone (**Zimmet et al ., 2001**). Le diabète peut être à l'origine de plusieurs complications à long terme touchant de nombreux organes notamment les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux (**Brownlee, 1995**).

Le traitement de cette affection est basé sur l'utilisation des mesures hygiéno-diététiques, des antidiabétiques oraux et/ou l'insulinothérapie pour les diabétiques de type 2, et seulement l'insulinothérapie pour les diabétiques de type 1 (**Charbonnel et cariou, 1997**). Mais la prévalence de cette maladie qui augmente de manière régulière et le traitement souvent coûteux ou indisponible pose un problème réel pour la santé publique dans les pays en développement (**Djrolo et al ., 1998**) et par conséquent la recherche des nouvelles stratégies alternatives dans la pharmacothérapie sont urgentes (**OMS, 2002**).

Pendant longtemps, la médecine traditionnelle a fait partie du traitement des diabétiques. Les remèdes à base des plantes médicinales ont acquis de nouveau une place importante dans l'arsenal thérapeutique du diabète sucré partout dans le monde. Plusieurs espèces des plantes sont utilisées dans ce but (**Azzi et al ., 2012**). Les propriétés hypoglycémiantes de ces plantes sont attribuées à la présence des certains composés chimiques (**Lamba et al ., 2000**).

L'Algérie est caractérisée par une diversité climatique favorable à la croissance et au développement d'une flore riche en plantes médicinales et aromatiques. Ces plantes sont utilisées par de nombreux patients comme traitement de différentes affections et maladies graves, comme le diabète sucré et l'hypertension artérielle, pour plusieurs considérations: historique, culturelle et économique (**Azzi et al ., 2012**).

Parmi les plantes médicinales les plus utilisées dans la région de Tlemcen, on trouve le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum L*) qui possède une activité hypoglycémiant

prononcée (**Allali et al ., 2008**).Le mécanisme de l'action antidiabétique le plus impliqué est la stimulation de la sécrétion d'insuline (**Narender et al ., 2006**). Cependant, la présence des fibres solubles dans le fenugrec ralentissant la digestion et l'absorption des glucides joue aussi un rôle dans son effet hypoglycémiant (**Hannan et al ., 2007 ; Ramulu et al ., 2011**). Ce qui signifie que le fenugrec peut exercer une inhibition de l'alpha amylase, enzyme nécessaire pour la digestion des glucides.

L'objectif de la présente étude est de réaliser des tests phytochimiques, dosage des composés phénoliques et de rechercher l'effet inhibiteur des extraits bruts hydrométhanoliques des graines de *Trigonella foenum-graecum L* (fenugrec) sur l'activité de l' $\alpha$ - amylase.

*Première partie*  
*Synthèse bibliographique*



# *I. Généralités sur le diabète sucré*

## 1. Définition du diabète sucré

Le diabète sucré est défini comme un trouble métabolique chronique caractérisé par une hyperglycémie. Il résulte d'une diminution de la sécrétion d'insuline et/ou de la résistance à son action (**Calop et al ., 2008**).

Cette maladie peut altérer le fonctionnement de nombreux organes tels que les yeux, les reins, les nerfs et le système cardiovasculaire (**Boulnois-lagache et al ., 2003**).

## 2. Classification

### 2.1. Diabète de type 1 (DT1)

Cette forme de diabète survient essentiellement chez les enfants, les adolescents et les jeunes adultes (**Grimaldi, 2009**). Le DT1 est causé par une destruction auto-immune des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas, productrices de l'insuline, conduisant à une carence insulinaire (**Zimmet et al ., 2001**).

### 2.2. Diabète de type 2 (DT2)

Il apparaît généralement chez les adultes et touche plus de 90 % de la population diabétique. Le DT2 est caractérisé par une hyperglycémie liée, soit à une résistance à l'insuline, soit à une insuffisance de sécrétion d'insuline (insulinopénie relative). L'insulinopénie peut se développer avec l'âge provoquant un diabète Insulino-Dépendant (**Michels et al ., 2003**).

### 2.3. Diabète gestationnel

Ce type concerne les femmes enceintes et se définit par une intolérance au glucose diagnostiquée pour la première fois pendant la grossesse (**FID, 2013**).

### 2.4. Autres types de diabète

Ces types sont moins fréquents et peuvent être secondaires à certaines maladies comme les maladies endocriniennes ou les infections virales. La prise de certains médicaments peut aussi générer de façon temporaire ou permanente ces types de diabète (ex. les glucocorticoïdes) (**Geoffroy et Gonthier, 2012**).

## 3. Epidémiologie

Le diabète sucré est un problème de santé qui touche le monde entier et il présente en hausse effrénée (**FID, 2013**).

D'après les estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), 422 millions de personnes sont atteintes de diabète en 2014 et le nombre de personnes atteintes de cette maladie est supposé dépasser les 622 millions en 2040 (**OMS, 2016**). Ainsi, les prévisions de

l'OMS indiquent que le diabète sera la septième cause de décès dans le monde avec un coût économique de 612 milliards d'US\$ durant l'année 2014 (OMS, 2016).

Actuellement, la fédération nationale des diabétiques en Algérie déclare 5 millions d'Algériens diabétiques, en raison des nouvelles habitudes alimentaires et le manque de l'activité physique.

#### 4. Diagnostic

Le diagnostic de diabète sucré est réalisé par un dosage central de la glycémie (le taux de glucose mesuré dans le sang circulant) (Ménat, 2005). Une personne est diabétique quand :

- ✓ Sa glycémie à jeun est supérieure ou égale à 1,26 g/L au cours de plusieurs mesures.
- ✓ Le glucose plasmatique est supérieur ou égal à 2 g/L à n'importe quel moment (Spinas et Lehmann, 2001).
- ✓ Le glucose plasmatique est supérieur ou égal à 2 g/L deux heures après une charge orale de glucose (75g) (Spinas et Lehmann, 2001).

Il existe aussi des signes qui indiquent la présence du diabète : la polyurie associée à une polydipsie, mais ce sont des symptômes d'une maladie déjà très évoluée (Ménat, 2005).

#### 5. Facteurs de risque

La présence d'une personne atteinte de diabète de type 1 dans la famille constitue le facteur de risque le plus important pour l'apparition du diabète de type 1. Toutefois, les facteurs environnementaux et l'exposition à certaines infections virales peuvent aussi augmenter le risque de développement de cette maladie (FID, 2013).

Pour le diabète de type 2, de nombreux facteurs de risque existent et ils sont étroitement liés au mode de vie (Leontis, 2014). Parmi ces facteurs, on peut citer : le surpoids, l'alimentation déséquilibrée, l'inactivité physique, l'âge avancé, la tension artérielle élevée... (FID, 2013).

#### 6. Physiopathologie

Le diabète de type 1 se caractérise par un début clinique brutal dû à une destruction auto-immune des cellules Bêta des îlots de Langerhans. Cette destruction engendre une carence insulinaire majeure responsable de l'accumulation du glucose dans la circulation sanguine (hyperglycémie) (Calop et al., 2008).

Le diabète de type 2 est une maladie qui se développe en silence pendant plusieurs années et souvent découverte de façon fortuite à l'occasion d'une prise de sang ou en cas de complication (**Boitard et al ., 2014**).

Cette maladie est favorisée par l'association de trois anomalies majeures : une diminution de la sensibilité des cellules à l'insuline (insulinorésistance), des altérations de l'insulinosécrétion (insulinodéficience) et l'augmentation de la production de glucose endogène.

L'insulinorésistance peut être définie comme une perte de réponse des cellules cibles (les cellules du foie, des muscles et de tissu adipeux) à l'insuline, l'hormone ne devient plus capable d'influencer l'entrée de glucose dans ces derniers et donc sa concentration dans le sang augmente (**Boitard et al ., 2014**).

## 7. Complications du diabète

Les deux types de diabète sucré présentent des complications communes. Ces dernières sont souvent précoces et parfois plus sévères en cas de diabète de type 1, mais le développement silencieux de diabète de type 2 et son association à d'autres facteurs de risque peuvent le rendre aussi dangereux (**Ménat, 2005**).

Ces complications résultent généralement d'une atteinte de la paroi des vaisseaux sanguins et sont classées en deux catégories en fonction de la taille des vaisseaux atteints: on parle de microangiopathie pour les petits vaisseaux sanguins et de macroangiopathie pour les autres cas.

- Pour la microangiopathie, on trouve les complications au niveau des yeux (La rétinopathie), au niveau des reins (néphropathie) et au niveau des nerfs (neuropathie).
- Et pour la macroangiopathie, on cite Les complications au niveau des artères du cœur et au niveau des artères du cerveau (**King, 2008**).

## 8. Traitement du diabète

### 8.1. Les mesures hygiéno-diététiques

Le premier point du traitement du diabète sucré repose sur un régime alimentaire équilibré et une activité physique régulière (**AFSSPS, 1999**). Les mesures hygiéno-diététiques sont nécessaires à la prise en charge du diabétique de type 2 et complémentaires au traitement du diabétique de type 1, parmi eux on cite les suivantes :

- L'initiation d'un régime hypocalorique avec une diminution importante de la quantité des glucides accompagné d'une consommation suffisante d'eau.
- La consommation des légumes, fruits et fibres avec une grande quantité.
- L'élimination des graisses saturées qui peuvent provoquer une athérosclérose.
- Répartition des apports alimentaires en 3 repas par jour (**Valmadrid et al ., 1999**).

L'activité physique joue aussi un rôle important dans l'efficacité de l'insuline, dont elle augmente la sensibilité des tissus du corps à son action. De plus, les muscles qui font l'exercice consomment une grande quantité de glucose, ce qui va diminuer le taux de celle-ci dans le sang. La pratique d'activité physique aide aussi à prévenir les complications à long terme du diabète sucré (**Sigal et al ., 2013**).

## **8.2. Le traitement médicamenteux du diabète sucré**

Le traitement médicamenteux dépend de type du diabète. Pour le diabète de type 1, on utilise l'insulinothérapie seule, alors que pour le diabète de type 2, on utilise les antidiabétiques oraux en association ou pas avec l'insuline en fonction de contrôle glycémique du patient.

### **a. Les antidiabétiques oraux**

Le but principal du traitement pharmacologique du diabète est d'équilibrer la glycémie à l'aide des antidiabétiques oraux qui se divise en médicaments insulinosécréteurs, des médicaments insulinosensibilisateurs et des ralentisseurs de l'absorption intestinale du glucose (**Van Gaal et al ., 2003 ; Scheen et al ., 2007**).

Cinq classes des antidiabétiques oraux exerçant des effets hypoglycémiantes par des mécanismes d'action différents (**AFSSPS, 1999**) :

- ✓ Les biguanides, qui diminuent la production hépatique du glucose ;
- ✓ Les sulfamides hypoglycémiantes (sulfonylurées), qui stimulent la sécrétion de l'insuline ;
- ✓ Les glidines (également appelés méglitinides), qui ont un effet identique aux sulfonylurées ;
- ✓ Les glitazones (autrement appelés thiazolidinediones), qui diminuent la résistance à l'insuline ;
- ✓ Les inhibiteurs des alphaglucosidases, représentés par l'acarbose et le miglitol qui freinent l'absorption du glucose par l'intestin (**Inzucchi, 2002**).

### **b. Insuline**

Quand le traitement par les antidiabétiques oraux devient incapable d'équilibrer la glycémie, il faut passer au traitement avec l'insulinothérapie par l'injection d'insuline exogène qui a une action hypoglycémiante, cette hormone assure la captation du glucose par les muscles, le foie, le tissu adipeux, elle augmente la glycogénèse et diminue la glycogénolyse et la lipolyse et donc elle régule la concentration du glucose dans le sang (Tielmans et al., 2007).

## 9. Utilisation des plantes antidiabétiques dans le traitement du diabète sucré

L'étude ethnobotanique des plantes possédant des propriétés antidiabétiques a acquis un grand intérêt au cours de ces dernières années. A l'échelle mondiale, de nombreuses enquêtes ethnopharmacologiques et ethnobotaniques ont été réalisées dans le but de recenser les plantes antidiabétiques utilisées dans les différentes pharmacopées traditionnelles (Azzi et al., 2012).

Afin de vérifier les propriétés thérapeutiques des plantes pour pouvoir les utiliser ensuite dans la médecine moderne, une détermination des plantes médicinales et des produits naturels utilisés dans la pharmacopée traditionnelle était nécessaire (Winters et al., 2003).

Environ 1200 plantes, couvrant 725 genres et 183 familles de plantes sont utilisées par les diabétiques à travers le monde. La plupart d'entre elles auraient des propriétés hypoglycémiantes, mais il s'agit pour la plupart du temps, des affirmations isolées (Bailey et Day, 1989 ; Marles et Farnsworth, 1995).

La vérification scientifique n'était faite que pour peu d'entre elles. En effet, des études ont réussi à démontrer et à confirmer l'activité hypoglycémique de plusieurs plantes en utilisant différents modèles animaux, et plus précisément, les mécanismes et l'activité hypoglycémique de certaines plantes ont été étudiés et élucidés (Bailey et Day, 1989 ; Mukherjee et al., 2006 ; Benariba et al., 2009 ; Azzi et al., 2012).

Ainsi les plantes médicinales constituent une ressource potentielle des agents antidiabétiques bien qu'il n'y a pas encore la possibilité de produire un substitut oral efficace d'origine botanique pour l'insuline. D'ailleurs, la metformine qui est un agent antidiabétique oral largement utilisé pour le traitement du diabète type 2, dérive d'une approche d'usage traditionnelle de *Galéga officinalis* (Bedekar et al., 2010).

L'inhibition des  $\alpha$ -glucosidases et  $\alpha$ -amylase montre aussi une stratégie importante pour contrôler la glycémie postprandiale. Les plantes médicinales ayant un effet inhibiteur vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase ont fait l'objet de nombreuses études dans différents pays. De

nouveaux modèles et techniques d'investigation ont été développés pour mieux étudier l'inhibition enzymatique (**Akshatha et al ., 2014**).

En Algérie les plantes médicinales sont largement utilisées pour traiter de nombreuses maladies. De nombreuses enquêtes ethnopharmacologiques y sont consacrées et ont permis de recenser 60 espèces végétales utilisés dans traitement de diabète sucré (**Hammiche et Maiza, 2006 ; Allali et al ., 2008 ; Azzi et al ., 2012 ; Sari et al ., 2012 ; Bouzabata et al ., 2013, Benderradji et al ., 2014**).

Dans la région de Tlemcen, les plantes les plus utilisées comme antidiabétiques sont : *Trigonella foenum graecum* (Leguminosae), *Citrullus colocynthis* (Cucurbitaceae), *Saccocalyx satureioïdes* (Labiatae), *Berberis vulgaris* (Berberidaceae), *Aloe vera* (Liliaceae) and *Globularia alypum* (Globulariaceae) (**Allali et al ., 2008**).

## *II. L'alpha amylase*



## 1. Définition de l'alpha amylase

L'alpha amylase ( $\alpha$ -(1,4) D-glucane glucanohydrolases, E.C. 3.2.1.1) est une enzyme sécrétée sous deux formes, une pancréatique sécrétée par le pancréas et une salivaire sécrétée par les glandes salivaires. Elle joue un rôle important dans la digestion des glucides (l'amidon et le glycogène) et peut se retrouver aussi dans les microorganismes et les plantes (**Kandra, 2003**).

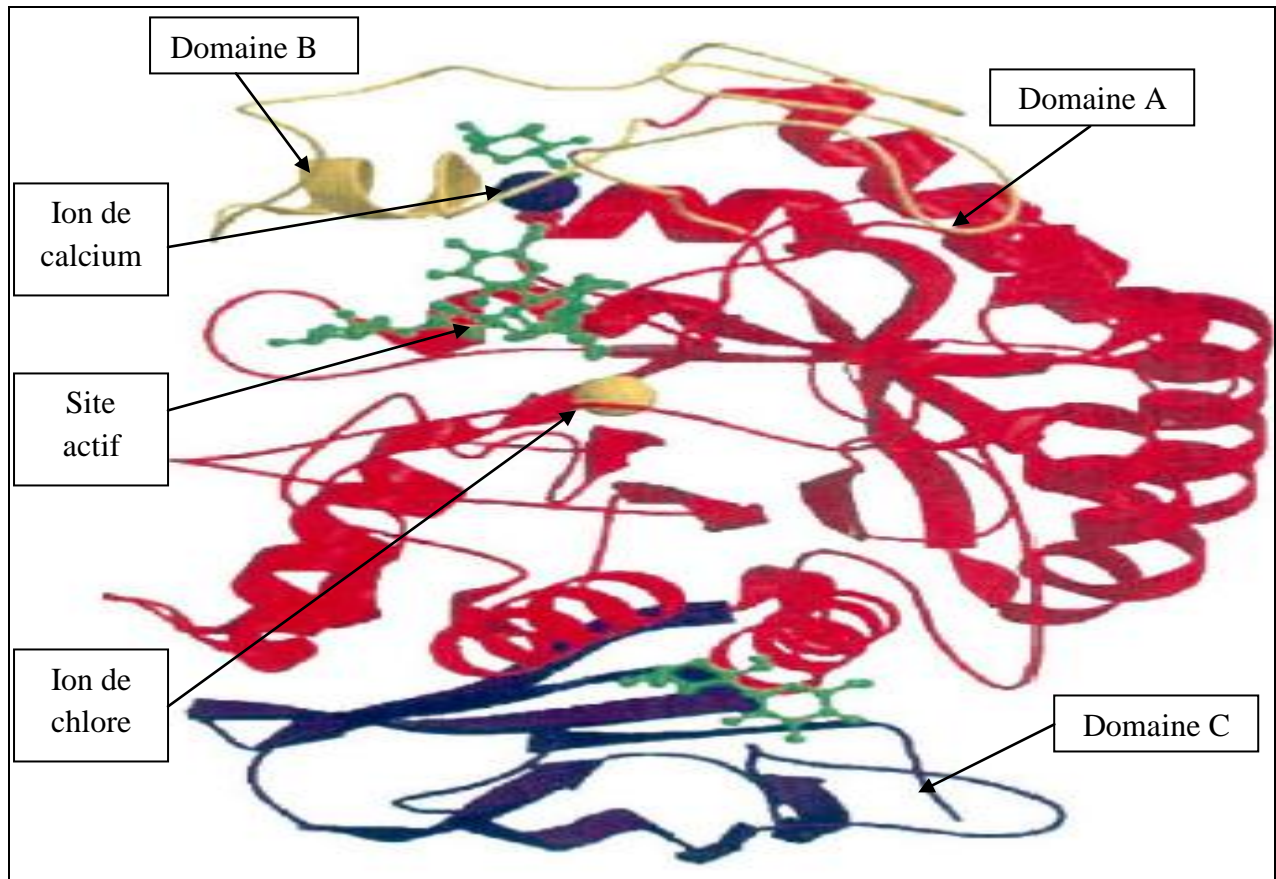
Cette enzyme appartient à la famille des endoamylases et catalyse l'hydrolyse de l'amidon en des petits oligosaccharides par le clivage des liaisons  $\alpha$ -D (1  $\rightarrow$  4) glycosidique (**Iulek et al ., 2000 ; Kandra, 2003**). Cependant, elle n'a aucun effet sur les résidus terminaux et les liaisons  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) des polysides, et son produit final d'hydrolyse contient le D-glucose, le maltose et une petite quantité de maltodextrines (**Whitcomb et Lowe, 2007**).

## 2. Structure de l' $\alpha$ -amylase

La cristallographie aux rayons X a été utilisée pour obtenir les structures 3D des enzymes  $\alpha$ -amylases du pancréas humain (**Brayer et al ., 1995**), de la salive (**Ramasubbu et al ., 1996**) et du pancréas porcin (**Gilles et al ., 1996**). Les structures de ces enzymes sont toutes étroitement liées. Les  $\alpha$ -amylases de mammifères sont composées de trois domaines structuraux, dont le plus grand (domaine A) contient les résidus importants du site actif qui comprennent deux aspartates et un glutamate. Le domaine A contient également une liaison avec l'ion Cl<sup>-</sup>. L'activation de l'amylase par le chlorure est connue depuis longtemps (**Lifshitz et al ., 1993**). Le domaine B borde la région du site actif et contient un ion Ca<sup>2+</sup> qui est probablement important dans le maintien de la conformation de la protéine dans la région du site actif. Le domaine C à la région N-terminale de la molécule semble peu susceptible de jouer un rôle direct dans le mécanisme catalytique. Il est moins étroitement associé aux domaines A et B (**Brayer et al ., 1995 ; MacGregor et al ., 2001**).

L'événement catalytique dans les  $\alpha$ -amylases est un exemple de mécanisme à double déplacement et des groupes carboxyles d'aspartate et de glutamate fonctionnant comme un acide / base catalyseurs et comme réactif nucléophile pour la formation d'un intermédiaire covalent au cours de la séquence catalytique (**Feller et al ., 1996 ; Agarjahi et al ., 2002**).

Le site de liaison au substrat contient 5 sous-sites avec le site catalytique positionné au sous-site 3. Le substrat peut se lier au premier résidu de glucose dans le sous-site 1 ou 2, permettant le clivage entre le premier et le second ou entre le second et le troisième résidu de glucose (**Whitcomb et Lowe ., 2007**) (Figure 01).



**Figure 01 :** Structure de l'alpha amylase ( le domaine A en rouge, le domaine B en jaune, le domaine C en violet, dans le centre catalytique le  $\text{Ca}^{2+}$  est présenté par un cercle bleu et le  $\text{Cl}^-$  est présenté par un cercle jaune, les structure en vert sont les liaisons avec le site actif et avec les surface des sites des liaisons ( **Payan , 2004**).

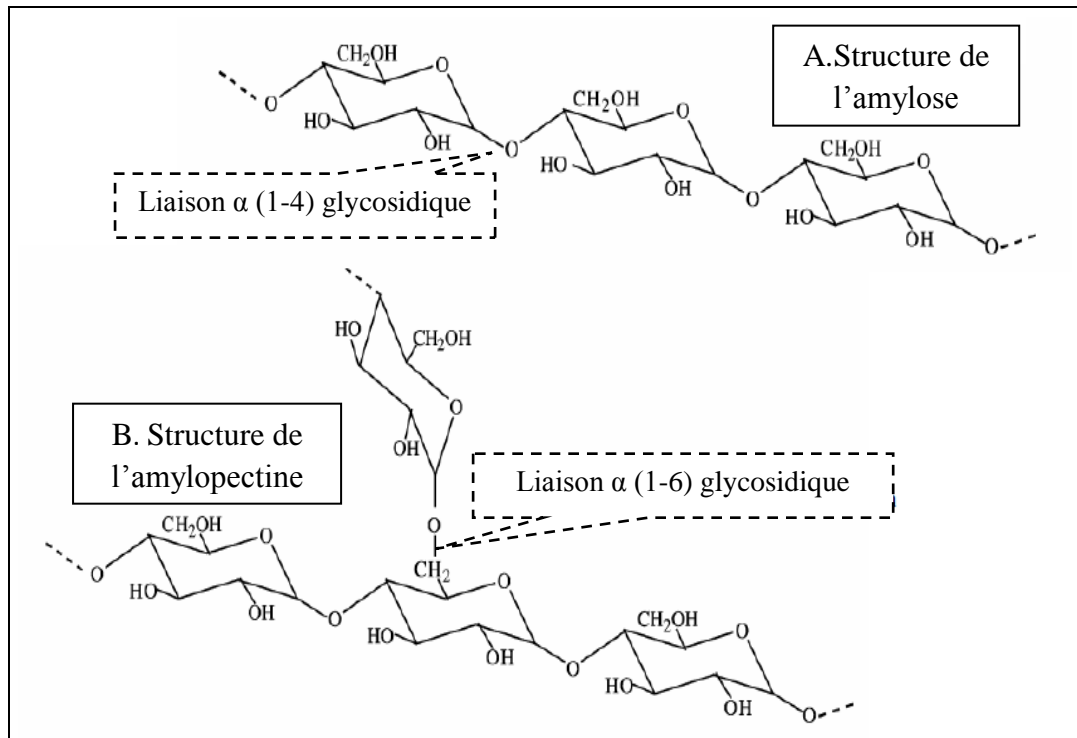
### 3. Rôle de l' $\alpha$ - amylase dans le métabolisme glucidique

La digestion est un processus qui permet la transformation des macromolécules en des unités plus petites absorbables à l'aide de la dégradation mécanique et enzymatique. La digestion des glucides consiste en la dégradation des polysaccharides et des disaccharides en monosaccharides pour être absorbés par l'intestin grêle (**Silverthorn et al ., 2007**).

Grâce à la présence des enzymes appropriées deux glucides complexes peuvent être digérer : l'amidon et le glycogène (**Silverthorn et al ., 2007**).

L'amidon est un composant important dans l'alimentation humaine, c'est un polymère du glucose constitué d'un mélange de deux homopolymères du glucose l'amylose et l'amylopectine. L'amylose est un polymère linéaire de 6000 unités du glucose reliées par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) alors que l'amylopectine possède une structure ramifiée, sur la chaîne

principale  $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 4), des points de branchement sont formés par des liaisons  $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 6) (Tester et Karkalas, 2004) (Figure 02).

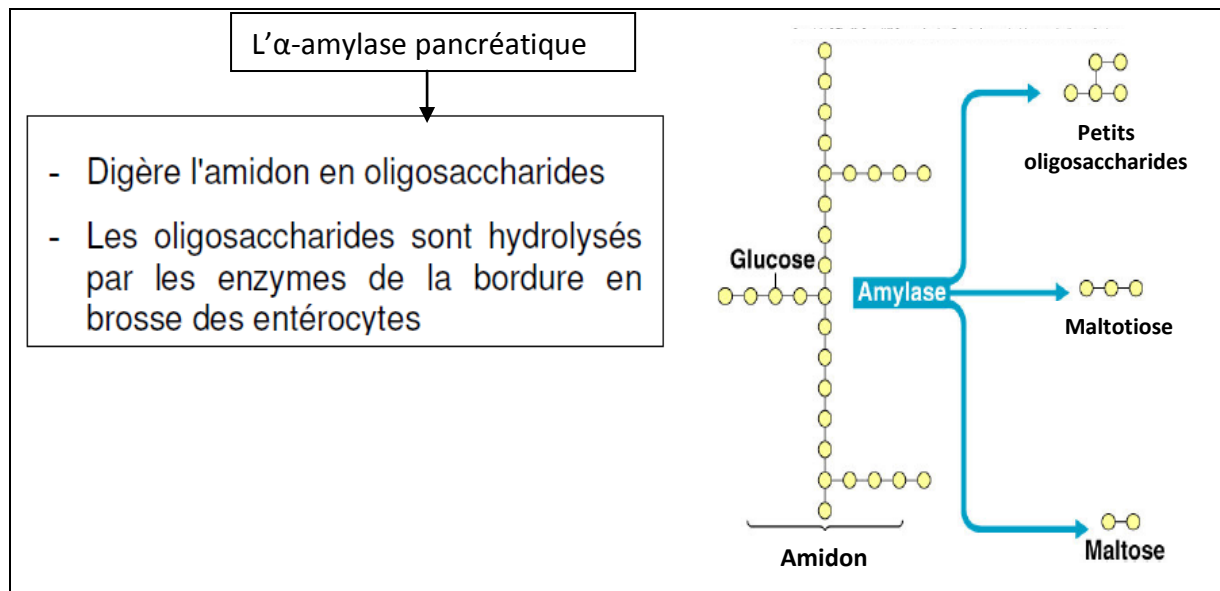


**Figure 02** : Structure de l'amidon, A : structure de l'amylose et B : structure de l'amylopectine (Muralikrishna et Nirmala, 2005).

La digestion des glucides se fait selon deux étapes une dans la bouche et l'autre dans l'intestin grêle. L' $\alpha$ -amylase salivaire débute la digestion, elle joue un rôle mineur dans la digestion de l'amidon alimentaire hydraté par hydrolyse des liaisons  $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 4). Son action est de courte durée car elle est inactivée par le pH acide de l'estomac après déglutition. Ensuite, l' $\alpha$ -amylase pancréatique favorise le clivage des liaisons  $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 4) terminales et les  $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 4) voisines des liaisons  $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 6), ces amylases conduisent à la transformation des polysaccharides en oligosaccharides.

La dégradation de l'amidon produit essentiellement de maltose (2 glucoses) et de maltotriose (3 glucoses) qui seront hydrolysés par les disaccharidases (Quezada-Calvillo et al., 2008) (Figure 03).

Les disaccharidases (maltase, lactase, saccharases...) sont des enzymes situées dans les bordures en brosse des villosités des entérocytes qui hydrolysent les disaccharides en glucides élémentaires absorbables.



**Figure 03** : Digestion de l'amidon par l'α-amylase pancréatique.

#### 4. Implication des inhibiteurs de l'α-amylase dans le traitement du diabète

Le traitement du diabète de type 2 a reconnu de nouvelles stratégies reposant sur l'inhibition de l'absorption des nutriments. Actuellement, il existe des médicaments qui inhibent la dégradation intestinale des sucres complexes (**Yanovski, 2002; Grundy et al., 2005**).

Les inhibiteurs de l'α-amylase sont utilisés généralement lorsque la concentration du glucose dans le sang augmente après les repas. Ils ralentissent l'absorption intestinale des hydrates de carbone (**DeFronzo, 1999**).

L'acarbose et le miglitol sont des pseudo-tetrasaccharides d'origine bactérienne. Ces deux composés présentent une analogie structurale avec les oligosaccharides alimentaires et inhibent de façon compétitive et réversible les α-glucosidases pour retarder le clivage enzymatique des sucres alimentaires (**Reuser et Wisselaar., 1994**).

L'inconvénient majeur de ces deux composés est la fermentation des sucres non absorbés, flatulence et douleurs digestives mais après quelques jours ou quelques semaines une bonne adaptation s'installe surtout avec le respect du principe de l'augmentation progressive des doses (**Ducobu, 2003**).

#### 5. Inhibiteurs naturels de l'α-amylase

Les plantes possèdent plusieurs principes actifs qui leur permettent d'avoir une action sur l'organisme. Dans le cas du diabète, elles ont une action hypoglycémiante, dont le mécanisme diffère ainsi que le principe actif responsable.

L'activité antidiabétique des plantes peut dépendre de plusieurs mécanismes :

- Augmentation de la sensibilité des tissus à l'insuline.
- Stimulation des cellules bêta pour sécréter l'insuline.
- Transport de quelques éléments nécessaires comme le Calcium, le Zinc, le Magnésium et le Cuivre pour les cellules bêta
- Stimulation de la glycogénèse et/ ou l'inhibition de la glycolyse hépatique.
- Inhibition de  $\beta$ -galactosidase, de  $\alpha$ -glucosidase et de  $\alpha$ -amylase.
- Protection des cellules bêta contre la destruction (**Jarald et al ., 2008**).

Le tableau suivant montre des exemples des plantes médicinales et leurs mécanismes d'action:

**Tableau 01** : Quelques plantes hypoglycémiantes et leurs mécanismes d'action (**Bouxiid, 2012**).

Nom scientifique de la plante	Nom arabe de la plante	Mécanisme d'action
<i>Trigonelle foenum-graceum</i>	Halba	Stimulation de la sécrétion d'insuline
<i>Cinamomon cassia</i>	Karfa	Amélioration de la sensibilité à l'insuline
<i>Syzygium aromaticum</i>	Quronfel	Action hépatique sur le métabolisme du glucose
<i>Glyrrhiza uralensis</i>	Arq souss	Amélioration de la sensibilité à l'insuline
<i>Corandrum sativum</i>	Kesbour	Stimulation de la sécrétion d'insuline
<i>Ocimum sanctum</i>	Rihane	Action hépatique sur le métabolisme du glucose

Les familles des plantes qui contiennent les espèces les plus étudiées comme inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases sont les fabacées, Crassulacées, Hippocrateacées, Lamiacées et les Myrtacées, dont les espèces les plus étudiées sont *Salacia reticulata* (Hippocrateacées) et *Morus alba* (Moracées) (**Benalla et al ., 2010**).

Ces plantes exercent leur effet grâce à la présence des différents constitutions tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les alcaloïdes, les terpènes et d'autres (**Bouxiid, 2012**).

*III. Trigonella foenum-  
graecum L*

## 1. Systématique de *Trigonella foenum-graecum* L

Le fenugrec est une petite plante légumineuse dont les jeunes feuilles sont consommées dans les salades et les graines comme épice. Il compte parmi les plus anciennes plantes médicinales et culinaires de l'histoire de l'humanité (Sheick, 2013).

*Trigonella foenum-graecum* L est connue sous le nom d'alhova et aussi de henegriego ou fenogreco (en anglais : fenugreek, en français : fenugrec et en arabe al holba) (Bermejo et León., 1994).

Cette plante présente la systématique suivante :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Trigonella*

Espèce : *Trigonella foenum-graecum* L

Nom binomial : *Trigonella foenum-graecum* L (Yadav et al., 2014).

## 2. Description de *Trigonella foenum-graecum* L

C'est une plante annuelle herbacée appartient à la famille des fabacées, son pied peut atteindre une hauteur entre 30 à 60 cm. Sa culture ne nécessite qu'une terre calcaire et un peu d'humidité. Il existe aussi des nombreuses ramifications sur la tige et elle possède des feuilles de forme ovale séparées en trois parties (trifoliolées) (Moradi kor et al., 2013). Les fleurs de *Trigonella foenum graecum* L ont une couleur blanche jaunâtre donnant par la suite le fruit sous forme d'une gousse dont la longueur est variables environ 20 cm et qui renferme les graines (Moradi kor et al., 2013).

Les graines de *trigonella foenum-graecum* L sont des graines solides avec une couleur brune claire à brune jaunâtre, d'une épaisseur de 2 mm et longueur de 5 mm, elles se rassemblent à des cailloux et présentent une odeur épicée spéciale (Yadav et al., 2014) (figure 04).



**Figure 04 :** Plante et graines de *Trigonella foenum graecum L*

### **3. Distribution géographique de *Trigonella foenum-graecum L***

Le fenugrec est originaire d’Afrique du Nord, du Moyen-Orient et d’Inde, puis il est largement répandu autour de bassin méditerranéen. Les producteurs de fenugrec sont l’Inde, l’Iran, le Népal, le Bangladesh, le Pakistan, l’Argentine, l’Égypte, la France, l’Espagne, la Turquie, le Maroc et la Chine. Cependant, aujourd’hui il pousse partout dans le monde (Sheicklar, 2013).

### **4. Composés actifs de *Trigonella foenum-graecum L***

Les actions biologiques et pharmacologiques du fenugrec sont attribuées à la variété de ses constituants, il contient des substances polyphénoliques, des constituants volatils, des acides aminés ...etc. Les graines de fenugrec sont riches en hydrates de carbone (45 à 60%), principalement des fibres mucilagineuses, 20-30% de protéines (riches en lysine et tryptophane), 5 à 10% d’huiles fixes (lipides), les alcaloïdes (pyridine principalement trigonelline) (0,2-0,38%), la choline (0,5%), les flavonoïdes (apigénine, lutéoline, orientine, quercétine, vitexine et isovitexine), des acides aminés libres tels que la 4-hydroxy-isoleucine (0,09%), le calcium et le fer, les saponines (0.6- 1.7%), le cholestérol, les vitamines A, B1, C et 0,015% d’huiles volatiles (les sesquiterpènes) (Mehrafarin *et al.*, 2010).

### **5. Effets thérapeutiques de *Trigonella foenum-graecum L***

Le fenugrec compte parmi les plus anciennes plantes médicinales et culinaires. Ses graines, grâce à leurs composés chimiques, se révèlent être d’une grande valeur alimentaire et présentent de multiples vertus phytothérapeutiques (Harchane *et al.*, 2012), Il est utilisé pour :



- ✓ Stimuler l'appétit, soulager les troubles digestifs et respiratoires, et redonner de l'énergie aux convalescents et aux personnes déprimées. Il est également utilisé pour favoriser la production du lait maternel.
- ✓ Lutter contre la chute des cheveux.
- ✓ Traiter les ulcères de jambe, la goutte, les douleurs musculaires et l'eczéma.
- ✓ Prévenir l'apparition de certains types de cancers, en particulier du colon, du sein, et de la vésicule biliaire.
- ✓ Arrêter la constipation.
- ✓ Eliminer les infections et les inflammations des voies respiratoires.
- ✓ Soigner les blessures cutanées et les douleurs rhumatismales (**Yadav et al ., 2014**).

## 6. Effet antidiabétique de *Trigonella foenum-graecum L*

Le fenugrec en poudre est un ingrédient riche qui peut être une bonne alternative pour gérer la glycémie élevée et le taux de cholestérol. Il présente beaucoup moins d'effets secondaires par rapport à certains médicaments de l'industrie pharmaceutique.

L'activité hypoglycémiante du fenugrec a été démontrée à travers plusieurs études réalisées sur des chiens (**Ribes et al ., 1984**), des lapins (**Alarcon-Aguilara et al ., 1998**), des rats diabétiques (**Riyad et al ., 1988**) et elle est confirmée aussi sur des volontaires (**Bordia et al ., 1997**; **Sharma et al ., 1990**). Les graines du fenugrec présentent également un rôle antioxydant (**Ravikumar et Anuradha, 1999**).

Nombreux auteurs se sont intéressés à l'effet antidiabétique du fenugrec parmi eux : **Khosla et al ., 1995** qui ont étudié l'action antidiabétique de la poudre des graines mélangée au régime pendant 2 semaines sur des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane. Une réduction de la glycémie a été observée, cette réduction était dose dépendante.

**Sauvaire et al., 1998** qui ont montré que la 4-hydroxy-isoleucine extraite des graines augmente la libération d'insuline des cellules beta des îlots de Langerhans induites par le glucose par une action directe dose-dépendante.

**Gupta et al ., 2001** qui ont examiné l'effet d'extrait hydro-alcoolique des graines du fenugrec sur des sujets diabétiques type 2 et ils ont trouvé que ces graines ont la capacité d'améliorer la glycémie et de diminuer l'insulinorésistance.

Le fenugrec joue le rôle d'un hypoglycémiant aussi par la présence des fibres solubles ralentissant la digestion et l'absorption des glucides ce qui augmente l'action de l'insuline.

(**Hannan et al ., 2007** ; **Ramulu et al ., 2011**).

*Deuxième partie*

*Partie pratique*

## *IV. Matériel et méthodes*

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire antibiotiques, antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique, département Biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, Université Aboubekr Belkaïd (Tlemcen).

## 1. Matériel végétal

### 1.1. Préparation du matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre étude est les graines de *Trigonella foenum-graecum L*, récoltées en mois de février 2017 dans la région de Djبالا (wilaya de Tlemcen). Le matériel végétal est séché à température ambiante afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Après séchage, les graines sont broyées en poudre et stockées soigneusement dans un endroit sec en vue de réaliser des analyses ultérieures (Figure 05).



**Figure 05** : Les graines de *Trigonella foenum-graecum L* avant et après broyage (photo du laboratoire).

### 1.2. Dégraissage du matériel végétal

Pour éliminer les graisses et les lipides contenus dans notre échantillon, nous avons effectué un dégraissage du matériel végétal en utilisant le soxhlet.

Une cartouche contenant 100 g de poudre des graines broyées de fenugrec est placée dans le corps de soxhlet qui est monté sur un ballon remplie par 250 ml d'éther de pétrole. En chauffant pendant 3 h à l'aide d'un chauffe ballon, le solvant s'évapore puis se condense tout en restant en contact avec le matériel végétal (Figure 06).



Figure 06 : le montage de soxhlet (photo du laboratoire).

### 1.3. Extraction du matériel végétal

Les extraits utilisés au cours de notre étude sont préparés en milieu hydrométhanolique selon différents modes d'extraction : macération, infusion et décoction (sous reflux) (figure 07).

#### ❖ Extraction par macération

5 g du matériel végétal séché et dégraissé de notre plante est mis en contact avec 100 ml d'un mélange eau/méthanol (30:70 ; v/v). La préparation est laissée macérer à une température ambiante pendant 24 h à l'abri de la lumière. Après filtration, le filtrat hydrométhanolique est soumis à une évaporation à sec à l'aide d'un rotavapeur. Le résidu sec est conservé jusqu'à utilisation.

#### ❖ Extraction sous reflux

5 g du matériel végétal séché et dégraissé de notre plante est mis en contact avec 100 ml d'un mélange eau/méthanol (30:70 ; v/v). Le mélange est porté sous reflux pendant 1 h à 60°C sous agitation. Après refroidissement à température ambiante, le filtrat hydrométhanolique est soumis à une évaporation à sec à l'aide d'un rotavapeur. Le résidu sec est conservé jusqu'à utilisation.

### ❖ Extraction par infusion

5 g du matériel végétal séché et dégraissé de notre plante est mis en contact avec 100 ml d'un mélange eau/méthanol (30 :70 ; v/v) préalablement chauffé jusqu'à l'ébullition. La préparation est laissée refroidir. Après filtration, le filtrat hydrométhanolique est soumis à une évaporation à sec à l'aide d'un rotavapeur. Le résidu sec est conservé jusqu'à utilisation.

#### 1.4. Calcul du rendement

Le rendement en extrait sec est déterminé en calculant le rapport suivant :

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

**R(%)** : Rendement exprimé en %.

**M**: Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

**M<sub>0</sub>** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

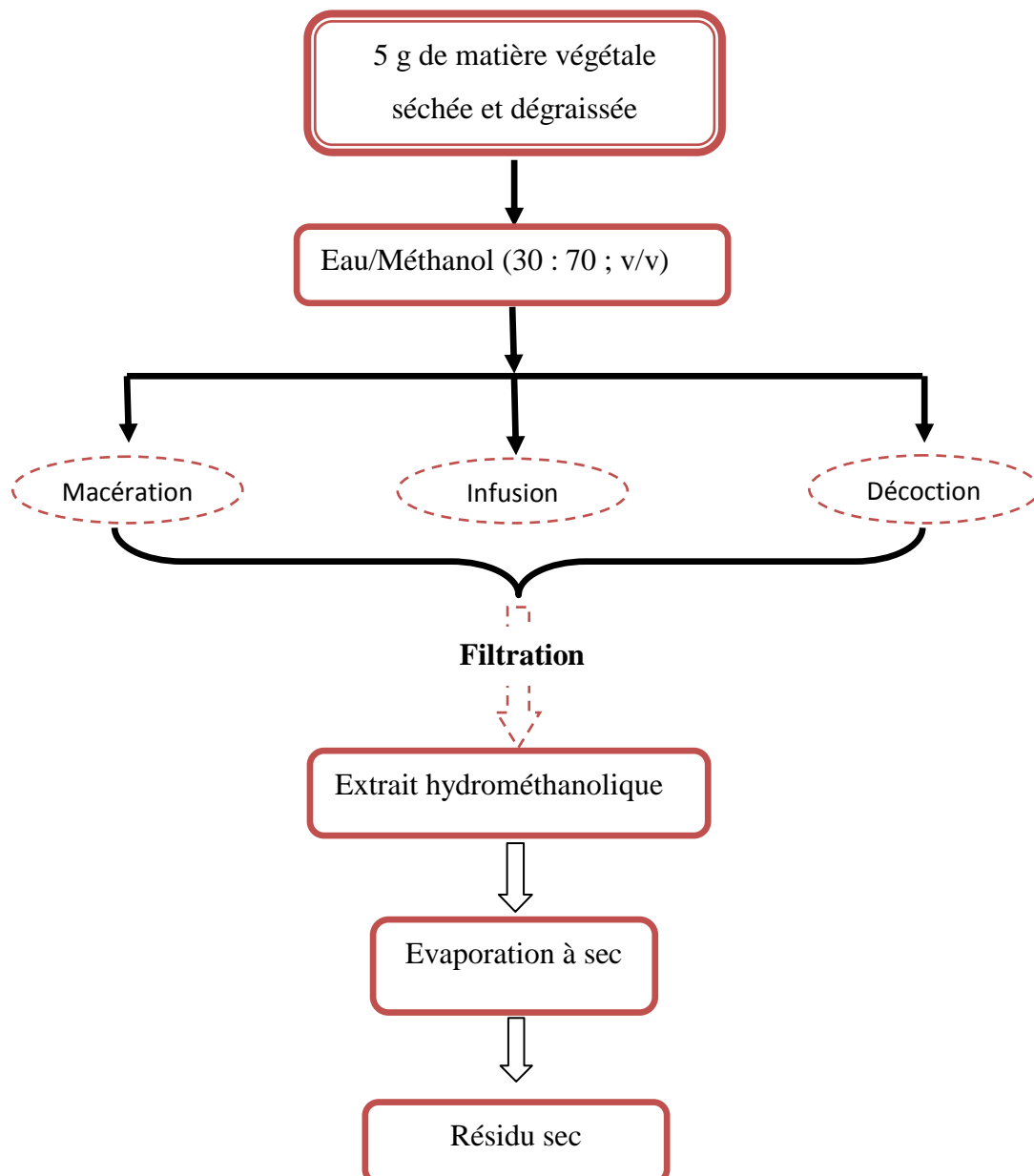


Figure 07 : Protocole d'extraction du matériel végétal.

## 2. Tests phytochimiques

La détermination préliminaire des classes phytochimiques qui rentrent dans la composition de la plante étudiée était possible par la réalisation des tests phytochimiques sur les extraits bruts. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ainsi qu'à des examens en lumière UV.

Les tests phytochimique ont été réalisés sur les extraits bruts hydrométhanolique préparés par macération, infusion ou décoction selon les méthodes décrites par **Trease et Evans (1989) et Harborne (1998)**.

### ✓ **Tanins**

A 1 ml de chaque extrait, nous avons ajouté 250 µl de  $\text{FeCl}_3$  (1%). La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre (tanins catéchiques) ou bleu-noirâtre (tanins galliques).

### ✓ **Flavonoïdes**

A 1 ml d'extrait, nous avons ajouté 1 ml d'HCl concentré puis 3 copeaux de tournure de magnésium. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge, rose ou orange.

### ✓ **Quinones libres**

A 1 ml d'extrait, nous avons ajouté 0,1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 10 %. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres

### ✓ **Coumarines**

Nous avons divisé le volume de 2 ml de l'extrait en deux. A un volume, nous avons additionné 0,1 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10 %). L'autre volume est gardé comme témoin. L'apparition d'une fluorescence après observation sous UV à 366nm indique la présence de coumarines.

### ✓ **Anthraquinones**

A 1 ml de l'extrait, nous avons ajouté 1 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10 %). L'apparition d'une coloration violette, après agitation, indique présence des anthraquinones.

**✓ Anthocyanes**

A 1 ml de l'extrait, nous avons ajouté 1 ml d'HCl (2N). Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacée par addition d'ammoniac, cela indique la présence des anthocyanes.

**✓ Alcaloïdes**

Dans deux tubes contenant 0,5 ml d'extrait, nous avons ajouté 0,5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5 ml de réactif de Wagner dans le second. L'apparition d'un précipité blanc ou marron respectivement indique la présence des alcaloïdes.

**✓ Terpénoïdes**

Test de Libermann-Burchard : A 1 ml d'extrait, nous avons ajouté 0,1 ml d'anhydride acétique et 0,1 ml d'acide sulfurique. L'apparition d'une couleur mauve, verte ou violette indique la présence des terpénoïdes.

Test de Slawski : A 1 ml d'extrait, nous avons ajouté 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml d'acide sulfurique. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron à l'interphase.

**✓ Saponines**

10 ml de chaque extrait est agité pendant 15 secondes. Une mousse persistante pendant 20min confirme la présence des saponines.

**✓ Composés réducteurs**

A 1 ml d'extrait, nous avons ajouté 2 ml de liqueur de Fehling (1ml réactif A et 1ml réactif B), puis incubé les tubes au bain marie pendant 08 min. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique.

**3. Dosage des composés phénoliques**

Les extraits étudiés sont solubilisés dans l'eau distillée à une concentration de 1 mg/ml pour le dosage des polyphénols totaux et à une concentration de 10 mg/ml pour celui des flavonoïdes et des tanins condensés.

**3.1. Dosage des polyphénols totaux**

La quantité des polyphénols totaux a été évaluée selon la méthode décrite par Vermerius et Nicholson en 2006.



Le réactif utilisé est le réactif de folin-Ciocalteu. Il est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et l'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_4$ ) qui se réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu du tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdènes ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration présente un maximum d'absorption à 700 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents dans l'échantillon (**Vermerius et Nicholson, 2006**).

#### ▪ Mode opératoire

Les composés phénoliques totaux sont quantifiés de la manière suivante : 0,1 ml d'extrait est mélangé avec 2 ml de la solution de carbonate de sodium à 2%. Le tout est agité et incubé pendant 5 minutes. 0,1ml du réactif Folin-Ciocalteu 1N est ensuite ajouté. Le mélange obtenu est incubé à une température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes.

L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 700 nm contre un blanc.

Dans les mêmes conditions opératoires, une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle en utilisant l'acide gallique comme étalon à un intervalle de concentrations de 0,05 à 0,6mg/ml. Chaque essai est répété 3 fois.

Les résultats sont exprimés en microgramme Equivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec ( $\mu g$  Eq AG/mg ES).

### 3.2. Dosage des flavonoïdes

Le taux des flavonoïdes est quantifié par la méthode spectrophotométrique au trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) et la soude ( $NaOH$ ), décrite par **Ardestani et Yazdanparast, 2007**. Le trichlorure d'aluminium, utilisé comme agent chromogène, forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et après l'ajout de la soude, la couleur devient rose et absorbe dans le visible à 510 nm (**Ardestani et Yazdanparast, 2007**).

#### ▪ Mode opératoire

250  $\mu l$  de l'extrait est mélangé avec 1 ml d'eau distillée et 75  $\mu l$  d'une solution de nitrite de sodium  $NaNO_2$  (15 %). Après incubation pendant 6 min à température ambiante, 75  $\mu l$  de trichlorure d'aluminium  $AlCl_3$  10 % est ajouté. Après 6 minutes, 1 ml d'hydroxyde de sodium (4 %) est ajouté. Le volume total est complété à 2,5 ml d'eau distillée. Après agitation et incubation pendant 15 minutes, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 510 nm contre un blanc (**Ardestani et Yazdanparast, 2007**).

En parallèle, une gamme d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme étalon à des concentrations de 0,05 à 0,5 mg/ml. Chaque essai est répété 3 fois.

Les résultats sont exprimés en microgramme Equivalent catéchine par milligramme d'extrait sec ( $\mu\text{g Eq C/mg ES}$ ).

### **3.3. Dosage des tanins condensés**

La quantité des tanins condensés est estimée en utilisant la méthode à vanilline. En milieu acide, les tanins condensés se dépolymérisent et, par réaction avec la vanilline, se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, mesurables par un spectrophotomètre à 550 nm (**Sun *et al.*, 1998**).

#### **▪ Mode opératoire**

Un volume de 50  $\mu\text{l}$  de chaque extrait est ajouté à 1500  $\mu\text{l}$  de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v). Après agitation à l'aide d'un vortex, 750  $\mu\text{l}$  d'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. La lecture de l'absorbance est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc à 550 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme étalon à différentes concentrations (0,3 à 2,7 mg/ml).

Les résultats sont exprimés en microgramme Equivalent catéchine par milligramme d'extrait sec ( $\mu\text{g Eq AG/mg ES}$ ).

#### **➤ Expression des résultats**

Les teneurs (T) en polyphénols, flavonoides et tanins condensés sont calculées à partir des régressions des courbes d'étalonnage.

## **4. Evaluation de l'effet inhibiteur des extraits des graines du fenugrec sur l' $\alpha$ -amylase**

### **4.1. Réactifs utilisés :**

#### **4.1.1. Solution de l' $\alpha$ -amylase**

L'origine de l' $\alpha$ -amylase utilisée dans notre étude est le pancréas de porc (APP) (E.C.3.2.1.1). Elle se présente sous forme lyophilisée, son poids moléculaire est de 13000 avec

une activité spécifique de 13UI/ml. L'optimum de l'activité  $\alpha$ -amylasique d'origine porcine est à pH 6,9 pour une température de 37°C. Elle est conservée à +4°C.

#### 4.1.2. Solution de substrat

Comme substrat, nous avons utilisé l'amidon soluble de pomme de terre. Un gramme d'amidon est dissous dans 100 ml de solution tampon phosphate (0,02 M, pH 6,9) en chauffant à une température de 50-70°C sous agitation.

#### 4.1.3. Solution d'extrait

Les extraits secs de la plante étudiée sont dissous dans la solution tampon phosphate. Une gamme de concentrations croissantes a été préparée variant de 0,125 à 3 mg/ml.

#### 4.1.4. Solution d'acarbose

Une solution d'acarbose à différentes concentrations variant de 0,00125 à 1 mg/ml est préparée dans le tampon phosphate (0,02 M, pH 6,9).

#### 4.1.5. Réactif chromogène 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)

Dans un erlenmeyer, 1 g de l'acide 3,5-dinitrosalicylique est dispersé dans 40 ml d'eau distillée. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. En parallèle, nous avons préparé une solution de NaOH 2N dans la quelle nous avons dissous 30 g de tartrate double de sodium et de potassium sous agitation. Une fois les deux solutions sont mélangées, le réactif devient limpide avec une couleur orange. Le volume final est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée. Le réactif obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à +4°C.

### 4.2. Evaluation de l'effet inhibiteur sur l' $\alpha$ -amylase

#### 4.2.1. Principe

Cette méthode consiste à évaluer l'effet inhibiteur potentiel des extraits bruts de la plante étudiée sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase pancréatique d'origine porcine qui présente une similitude structurale et cinétique avec l' $\alpha$ -amylase humaine. Le substrat utilisé est l'amidon. L'acarbose, molécule de référence dans l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase, va servir comme témoin positif. Les produits issus de cette réaction sont : les oligosaccharides, dextrines, maltose et glucose (Worthington, 1988).

La quantité de produits formés est déterminée par la méthode de Heidari et al. (2005) et Thalapaneni et al. (2008) qui prend en compte le caractère réducteur des groupements aldéhydes et cétones libres des sucres. En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation de ces fonctions provoque simultanément la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) de couleur jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur rouge orange qui absorbe

à 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel.

#### ▪ Mode opératoire

Pour chaque concentration obtenue à partir des extraits, nous avons testé l'effet sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.

Nous avons préparé :

Un tube blanc (pour le contrôle négatif) : 400  $\mu$ l de solution tampon + 200  $\mu$ l d'amidon;

Un tube contrôle négatif : 200  $\mu$ l de solution tampon + 200  $\mu$ l d'amidon + 200  $\mu$ l de solution enzymatique;

Un tube blanc (pour l'extrait) : 200  $\mu$ l de solution tampon + 200  $\mu$ l de solution d'extrait + 200  $\mu$ l d'amidon;

Un tube d'essai :

- 200  $\mu$ l de solution enzymatique a été ajoutée à 200  $\mu$ l de solution d'extrait, le tout a été agité et incubé pendant 10 min à 37°C dans l'étuve ;
- 200  $\mu$ l de la solution d'amidon a été ajouté et le tube a été placé dans l'étuve pendant 15 min à 37°C;
- Afin de stopper la réaction enzymatique, on a ajouté 400  $\mu$ l de DNSA ;
- Le tube a été mis dans un bain marie bouillant pendant 5 min et déposé après, dans un bain glaçant ce qui provoque un choc thermique conduisant à l'arrêt de la réaction entre le maltose et le DNSA.

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.

La réaction d'inhibition a été répétée trois fois pour chaque extrait.

#### ➤ Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition (I%) est calculé par l'équation suivante :

$$I\% = \frac{A_A - A_B}{A_A} \times 100$$

$A_A$  : l'absorbance de contrôle négatif.

$A_B$  : l'absorbance d'échantillon.

Les  $CI_{50}$  (concentration inhibitrice de 50%) pour chaque extrait sont calculées à partir des régressions des courbes logarithmiques d'inhibition.

# *V. Résultats et interprétation*

## 1. Extraction

Les extraits préparés à partir des graines de *Trigonella foenum-graecum L* par différentes méthodes présentent des aspects, des couleurs et des rendements variables.

Le tableau n°2 résume les caractéristiques de chacun de ces extraits.

En effectuant les différents modes d'extraction, nous avons remarqué la richesse de ces graines en lipides avec un pourcentage de 6,84%, qui ont été éliminés par la suite en utilisant le soxhlet.

**Tableau 02** : Caractéristiques des extraits bruts hydrométhanoliques des graines de *Trigonella foenum-graecum L*.

Mode d'extraction	Aspect	Couleur	Solubilité	Rendement %
<b>Macération</b>	Cristallisé	Jaune orange	Eau distillée	18,1
<b>Infusion</b>	Cristallisé	Jaune orange	Eau distillée	16,94
<b>Décoction</b>	Cristallisé	Jaune orange	Eau distillée	17,94

D'après les résultats du tableau ci-dessus, nous avons constaté que tous les extraits sont récupérés sous forme des cristaux d'une couleur jaune orange. Ainsi que, ces extraits sont totalement solubles dans l'eau distillée.

Les rendements des extraits sont rapprochés, l'extrait préparé par la macération représente le rendement le plus élevé (18,1%), suivi par celui préparé par la décoction (17,94 %) et à la fin l'extrait obtenu par l'infusion avec un rendement de 16,94%.

## 2. Tests phytochimiques

L'étude phytochimique effectuée sur nos échantillons a permis la détection des différentes familles de composés chimiques dans les extraits préparés.

Les résultats expérimentaux mentionnés dans le tableau n°3 montrent la présence ou l'absence de certains groupes chimiques selon le mode d'extraction réalisé.

**Tableau 03 :** Résultats des tests phytochimiques des extraits bruts hydrométhanoliques des graines de *Trigonella foenum graecum L.*

Extraits	Tanins	Flavonoïdes	Anthocyanes	Coumarines	Quinones Libres	Anthraquinones	Alcaloïdes		Terpénoïdes		Saponines	Composés réducteurs
							Mayer	Wagner	Libermann	Slakowski		
<b>Macération</b>	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
<b>Infusion</b>	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
<b>Décoction</b>	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-

Selon les résultats obtenus, nous avons remarqué la présence des tanins, quinones libres, alcaloïdes et terpénoïdes dans les trois types d'extraits. Alors que les anthocyanes, les coumarines, les anthraquinones et les composés réducteurs sont indétectables. Les saponines révèlent un test positif dans l'extrait préparé par l'infusion seulement. En plus, les flavonoïdes sont présents dans les extraits préparés par infusion et par décoction et pratiquement absents dans l'extrait préparé par macération.

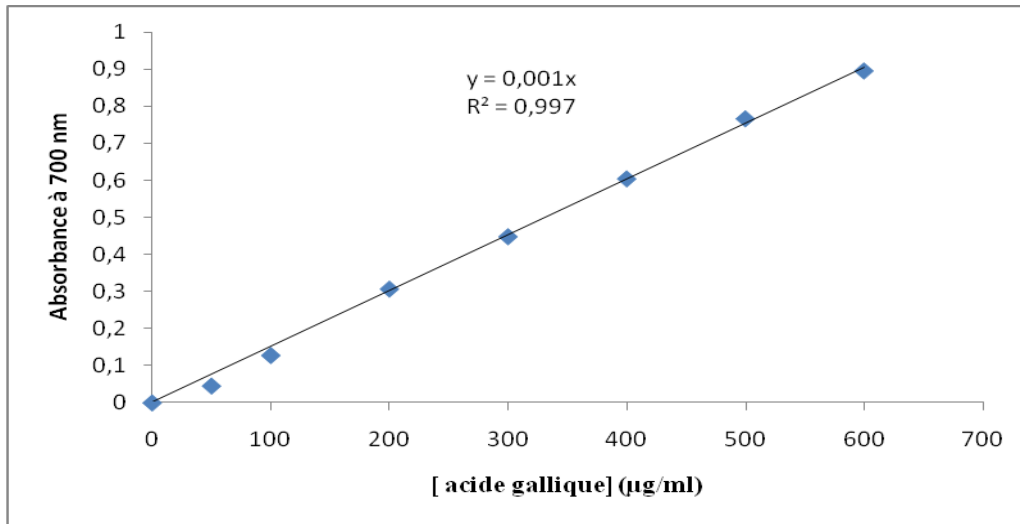
### 3. Dosage des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé par la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin-Ciocalteu. La quantité des flavonoïdes a été estimée en utilisant la méthode au trichlorure d'aluminium et la soude. Tandis que, les tanins condensés sont quantifiés en utilisant la méthode à vanilline en milieu acide.

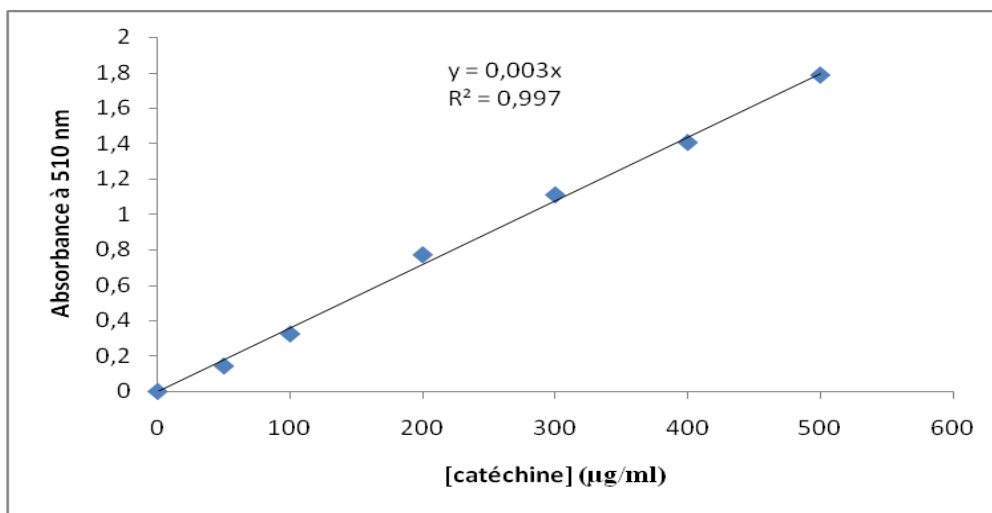
Le taux des polyphénols totaux est exprimé en  $\mu\text{g Eq AG/mg ES}$  alors que celui des flavonoïdes et des tanins condensés est exprimé en  $\mu\text{g Eq C/mg ES}$ .

Les courbes d'étalonnage sont représentées dans les figures 08, 09 et 10 respectivement.

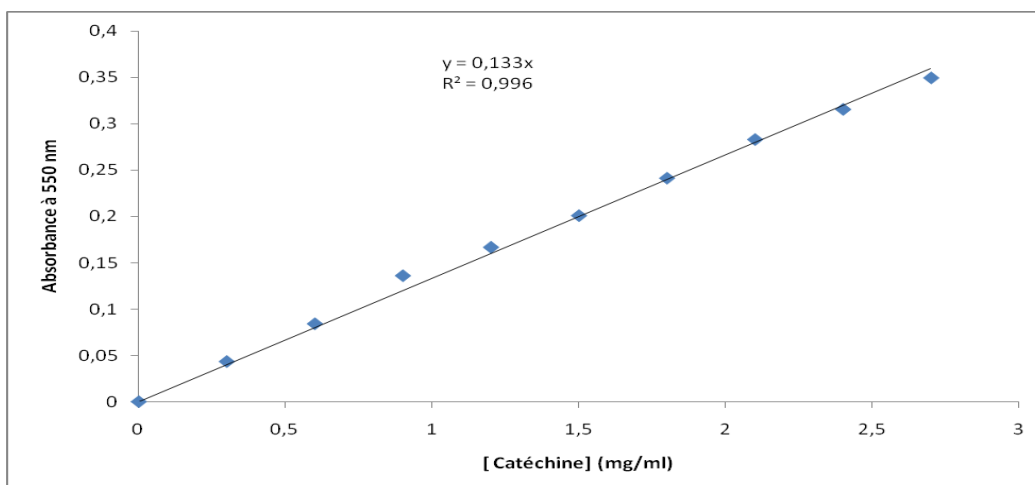
Les résultats des teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés des extraits bruts hydrométhanolique de la plantes étudiée, sont résumés dans le tableau 04.



**Figure 08** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.



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



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



**Tableau 04** : Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et en tanins des extraits bruts hydrométhanoliques des graines de *Trigonella foenum-graecum L.*

	<b>Polyphénols</b> ( $\mu\text{g Eq AG/mgES}$ )	<b>Flavonoïdes</b> ( $\mu\text{g Eq C/mgES}$ )	<b>Tanins condensés</b> ( $\mu\text{g Eq C/mg ES}$ )
<b>Macération</b>	86,26 $\pm$ 2,51	14,07 $\pm$ 1,75	33,83 $\pm$ 0,94
<b>Infusion</b>	110,13 $\pm$ 1,33	11,36 $\pm$ 0,55	77,31 $\pm$ 1,01
<b>Décoction</b>	97,8 $\pm$ 0,66	12,38 $\pm$ 0,34	44,73 $\pm$ 2,63

Pour le dosage des polyphénols totaux, nous avons constaté des teneurs variables dans nos extraits. La teneur la plus élevée est celle de l'extrait préparé par infusion avec une concentration de 110,13  $\mu\text{g Eq AG/mg ES}$ , suivi par l'extrait préparé par décoction avec une concentration de 97,8  $\mu\text{g Eq AG/mg ES}$  et la valeur la plus faible est représentée par l'extrait de la macération avec une concentration de 86,26  $\mu\text{g Eq AG/mg ES}$ .

Les résultats de dosage des flavonoïdes révèlent des teneurs rapprochées. La teneur la plus élevée est celle de l'extrait préparé par macération avec une concentration de 14,07  $\mu\text{g Eq C/mg ES}$ , suivi par les extraits préparés par décoction et infusion avec des concentrations de 12,38 et 11,36  $\mu\text{g Eq C/mg ES}$  respectivement.

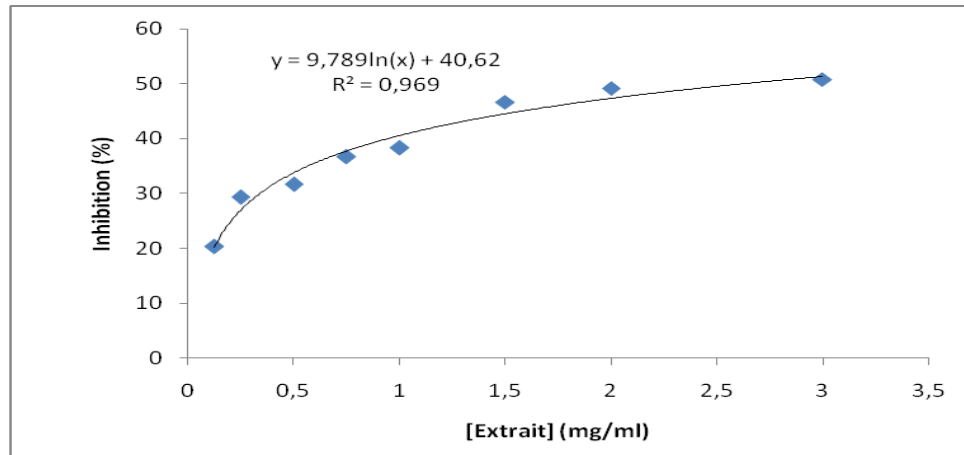
En ce qui concerne les teneurs en tanins condensés, l'extrait le plus riche est celui obtenu par infusion avec une concentration de 77,31  $\mu\text{g Eq C/mg ES}$ , les autres extraits ont présentés les concentrations suivantes: 44,73  $\mu\text{g Eq C/mg ES}$  pour la décoction et 33,83  $\mu\text{g Eq C/mg ES}$  pour la macération.

#### **4. Effet des extraits de *Trigonella foenum graecum L* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro***

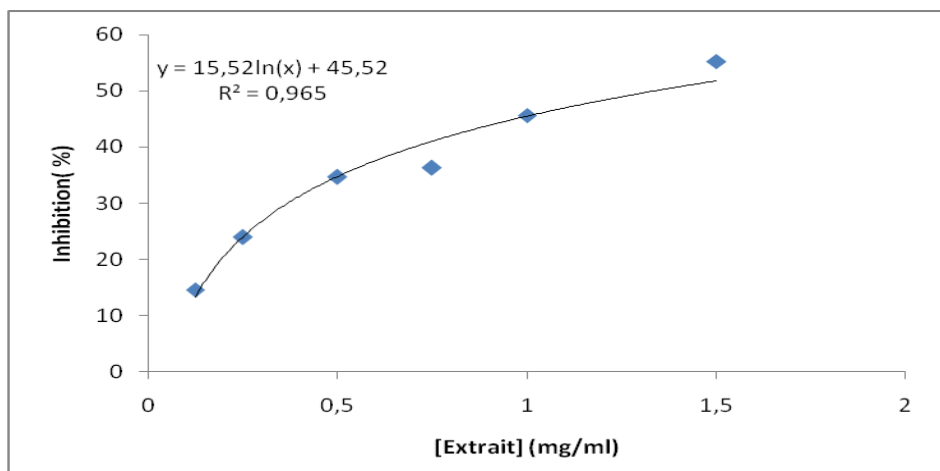
Pour déterminer l'effet inhibiteur des extraits hydrométhanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum L* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro*, nous avons testé l'effet des différentes concentrations de chaque extrait sur l'activité de l'enzyme avec une concentration finale de substrat (amidon) à 1%. L'effet inhibiteur de l'acarbose sur l'activité de l'enzyme a été aussi testé.

Les courbes de  $CI_{50}$  des extraits sont présentées dans les figures 11, 12 et 13 respectivement.

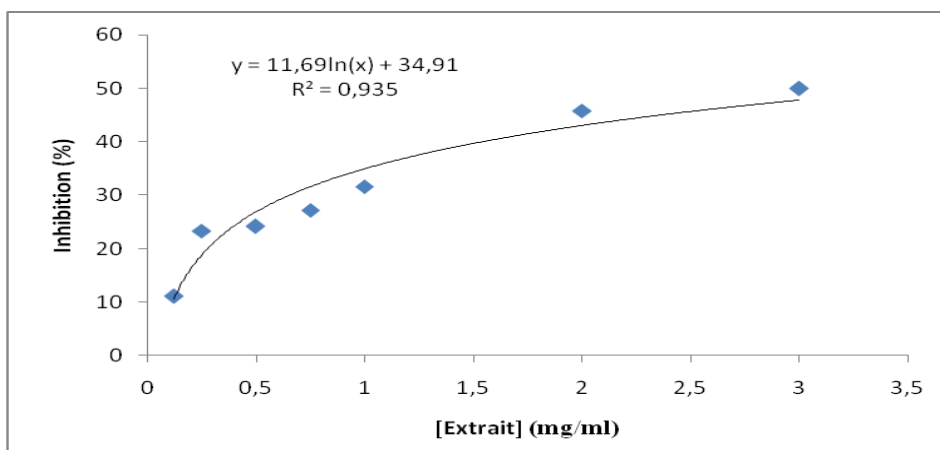
Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n°5.



**Figure 11 :** Courbe de régression logarithmique d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait préparé par macération.



**Figure 12 :** Courbe de régression logarithmique d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait préparé par infusion.



**Figure 13 :** Courbe de régression logarithmique d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait préparé par décoction.

**Tableau 05** : valeurs de la  $CI_{50}$  des extraits de *Trigonella foenum-graecum L* et de l'acarbose.

Echantillon	$CI_{50}$ (mg/ml)
Extrait de macération	2,83
Extrait de l'infusion	1,87
Extrait de décoction	3,63
L'acarbose	0,011

Selon les résultats de ce tableau, les extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum L* montrent une inhibition *in vitro* de l'activité de l' $\alpha$ -amylase. Les résultats sont exprimés dans un premier temps en pourcentage d'inhibition et ensuite par les  $CI_{50}$  (la quantité d'échantillon nécessaire pour diminuer l'activité enzymatique de 50%).

Le pourcentage d'inhibition varie d'un extrait à un autre et en fonction de la concentration utilisée, il augmente de façon proportionnelle avec l'augmentation de la concentration des extraits.

L'extrait qui présente l'inhibition la plus forte est celui obtenu par infusion avec une valeur d' $CI_{50}$  de 1,87 mg/ml, suivi par l'extrait de la macération qui provoque une inhibition moyenne avec une  $CI_{50}$  de 2,83 mg/ml et à la fin l'extrait de la décoction avec une  $CI_{50}$  de 3,63 mg/ml.

Par rapport à la  $CI_{50}$  de l'acarbose, les extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum L* présentent un effet inhibiteur largement faible sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro*.

## *VI. Discussion*

*Trigonella foenum-graecum L* est une plante annuelle principalement utilisée comme épice dans de nombreuses régions du monde (**Suliman et al ., 2008**), elle est également connue comme l'une des plus anciennes plantes médicinales reconnues dans l'histoire enregistrée (**Acharya et al ., 2006**). Les feuilles et les graines du fenugrec ont été largement utilisées pour préparer des extraits et des poudres à propriétés antidiabétiques, anticancéreuses (**Mazza et al ., 2002 ; Basch et al ., 2003**), antimicrobiennes (**Pande et al ., 2011**), antiparasitaires et hypocholestérolémiques (**Al-habori et al ., 2002**). A travers notre étude nous nous sommes intéressés à la propriété antidiabétique des graines de cette plante en effectuant une recherche *in vitro* de leur effet sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.

Les extraits préparés à partir de notre échantillon ont donné des rendements d'ordre 18,1% pour la macération, 17,94% pour la décoction et 16,94 % pour l'infusion.

Ces résultats sont largement inférieurs par rapport celles de **Valliappan et al. (2015)**, qui ont noté un rendement de 29,19% dans un extrait hydroalcoolique préparé par macération, et supérieur à celle de **Mishra et al. (2016)**, qui ont donné un rendement de 9,2 % pour un extrait méthanolique préparé par Soxhlet. Cette différence est due probablement à la nature des solvants utilisés, mode d'extraction, la période et l'origine de la récolte.

L'étude phytochimique qualitative des extraits bruts hydrométhanolique de notre plante a révélé la présence d'un nombre important des groupements chimiques de nature variée : Les tanins, les quinones libres, les alcaloïdes, les saponines, les flavonoïdes et les terpénoïdes. Par contre, les anthocyanes, les coumarines, les anthraquinones et les composés réducteurs sont pratiquement absents.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Kumari et al. (2016)**, qui ont démontré la présence des tanins, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des terpénoïdes, des saponines et des quinones. En plus, ils ont détecté la présence des anthraquinones et des sucres réducteurs et aussi des autres molécules bioactives telles que les glycosides et les stéroïdes.

L'étude réalisée par **Sumayya et al. (2012)**, a aussi détecté la présence des flavonoïdes, des alcaloïdes, des saponines, des quinones, des tanins et des terpénoïdes.

Par contre, l'analyse phytochimique de **Yadav et al. (2011)** et **Mishra et al. (2016)**, sur l'extrait hydrométhanolique des graines de fenugrec ne révèle que la présence des tanins, des flavonoïdes, des alcaloïdes et des terpénoïdes.

Les différences observées dans la composition phytochimique entre les différentes études peuvent être expliquées par l'origine de la plante, l'état de maturation, le moment de la récolte et aussi la nature des composés recherchés par chaque étude.

Le dosage quantitatif effectué sur les extraits de *Trigonalla foenum-graecum L a* permis d'enregistrer des taux en polyphénols et en tanins condensés plus élevés dans l'extrait hydrométhanolique préparé par infusion avec des concentrations d'ordre de 110,13 µg Eq AG/mg ES et 77,31 µg Eq C/mg ES respectivement. Alors que, le taux le plus élevé des flavonoïdes s'est rencontré dans l'extrait préparé par macération avec une concentration de 14,07 µg Eq C/mg ES.

Contrairement à nos résultats, les travaux réalisés précédemment ont abouti à des taux de polyphénols plus élevés ou plus faibles. A titre d'exemple, on cite les études suivantes : **Bukhari et al. (2008)**, ont rapporté un taux de 5,65 mg Eq AG/ g de poids sec dans le méthanol. Pendant ce temps, **Souri et al. (2008)**, ont indiqué des niveaux plus élevés de 194,63 mg / 100 g de poids sec dans l'extrait méthanolique, **Vadalia et al. (2010)**, ont rapporté 55 mg / g dans l'extrait méthanolique, **Chan et al. (2011)**, ont mentionné 4,4 mg Eq AG/ 100 g dans l'extrait aqueux tandis que **Priya et al. (2011)**, ont observé un taux de 0,876 mg Eq AG/ g d'extrait hydroalcoolique (éthanol). Et enfin, **Bhaisare et al. (2014)**, ont trouvé un taux de 0,577 mg Eq AG/ g d'extrait hydro-alcoolique de fenugrec.

Les variations marquées dans la teneur totale en polyphénols peuvent résulter de la quantité initiale de matériel végétal traitée mais aussi de type du solvant (méthanol, éthanol, acétone) utilisé pour réaliser l'extraction.

Les effets hypoglycémiantes du fenugrec ont été attribués à plusieurs mécanismes. **Sauvaire et al. (1998)**, ont démontré *in vitro* que l'acide aminé 4-hydroxyisoleucine contenu dans les graines de fenugrec augmente la libération d'insuline induite par le glucose dans les cellules β des îlots pancréatiques humains et de rat. Le même résultat était confirmé par **Christophe et al. (2000)**, qui ont trouvé que l'isomère majeur de 4-hydroxyisoleucine induit par un effet direct la sécrétion d'insuline.

D'un autre part, les données provenant des études sur les animaux ont fourni des preuves que les fibres isolées du fenugrec ont aussi des effets bénéfiques sur le traitement du diabète. D'après **Hannan et al. (2007)** et **Venkatesan et al. (2007)**, la fraction des fibres alimentaires solubles isolée du fenugrec a supprimé l'hyperglycémie postprandiale et a abaissé les lipides sériques chez les rats diabétiques. Ces effets ont été attribués à la vidange gastrique retardée des glucides, à l'augmentation de la motilité intestinale et à l'inhibition de la lipase

intestinale et de l'activité de la sucrase. Il est intéressant de noter que ces auteurs ont également constaté que la fraction de fibres augmentait à la fois la capture du glucose par les adipocytes et le taux de glycogène hépatique (**Hannan et al ., 2007**).

Par la présente étude, on a pu démontrer l'effet inhibiteur des extraits préparés à partir de notre plante sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase bien que cet effet n'est pas très bien élucidé dans la littérature. Ce mécanisme d'action antidiabétique peut être expliqué par la présence des fibres solubles. Il faut signaler cependant que l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase n'assure qu'une partie de l'effet antidiabétique.

En comparant les trois modes d'extraction réalisés au cours de l'étude, on déduit que l'extrait hydrométhanolique préparé par infusion présente l'inhibition la plus importante de l'activité de l' $\alpha$ -amylase avec une valeur de  $CI_{50}$  de 1,87 mg/ml par rapport aux deux autres extraits qui ont des  $CI_{50}$  de 2,83 mg/ml pour l'extrait de la macération et de 3,63 mg/ml pour celui de la décoction. Ces résultats obtenus sont expliqués par la richesse de l'extrait de l'infusion par les tanins et la présence d'une teneur considérable en flavonoïdes et en quinones libres, qui sont connues pour leur effet inhibiteur sur l' $\alpha$ -amylase (**Sales et al ., 2012**).

## *VII. Conclusion*



La phytothérapie constitue une alternative intéressante pour améliorer les traitements conventionnels destinés à la prise en charge du diabète.

A la lumière des résultats obtenus au cours de cette étude, nous avons conclu que :

- Les extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum L.*, récoltées dans la région de Djبالا (Wilaya de Tlemcen), sont riches en métabolites secondaires : tanins, quinones libres, alcaloïdes, saponines, flavonoïdes et terpénoïdes;
- L'extrait hydrométhanolique préparé par infusion renferme les taux les plus élevés en polyphénols et en tanins condensés (110,13 µg Eq AG/mg ES et 77,31 µg Eq C/mgES, respectivement);
- L'extrait hydrométhanolique préparé par macération présente le taux le plus élevé en flavonoïdes (14,07 µg Eq C/mg ES) ;
- Les extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum L.*, principalement l'extrait préparé par l'infusion peuvent inhiber l'activité de l' $\alpha$ -amylase *in vitro*.

D'autres études approfondies seront nécessaires pour mieux comprendre l'utilité thérapeutique de ces composés:

- ✓ L'identification et la caractérisation des composés actifs présents dans les extraits de *Trigonella foenum-graecum L.*
- ✓ La recherche de type d'inhibition en étudiant la cinétique enzymatique de l' $\alpha$ -amylase en présence et en absence de ces extraits.
- ✓ La réalisation des tests antidiabétiques et toxicologique des extraits des graines de *Trigonella foenum-graecum L.* chez des modèles animaux.
- ✓ La recherche d'autres mécanismes d'actions antidiabétiques en présence d'extraits préparés de cette plante (captation du glucose ...).

# *Références bibliographiques*

- 1) **Acharya, S. N., Thomas, J. E., & Basu, S. K. (2006).** Fenugreek: an “old world” crop for the “new world”. *Biodiversity*, 7(3-4), 27-30.
- 2) **Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., & Haser, R. (2002).** Structural basis of  $\alpha$ -amylase activation by chloride. *Protein Science*, 11(6), 1435-1441.
- 3) **Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSPS).** Traitement Médicamenteux du Diabète de Type 2 - Février 1999.
- 4) **Akshatha, V. J., Nalini, M. S., D'Souza, C., & Prakash, H. S. (2014).** Streptomycete endophytes from anti-diabetic medicinal plants of the Western Ghats inhibit alpha-amylase and promote glucose uptake. *Letters in applied microbiology*, 58(5), 433-439.
- 5) **Allali, H., Benmehdi, H., Dib, M. A., Tabti, B., Ghalem, S., & Benabadji, N. (2008).** Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian Journal of Chemistry*, 20(4), 2701.
- 6) **Alarcon-Aguilara, F. J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C. C., & Flores-Saenz, J. L. (1998).** Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of ethnopharmacology*, 61(2), 101-110.
- 7) **Al-Habori, M., & Raman, A. (2002).** 10 Pharmacological properties. *Fenugreek: the genus Trigonella*, 162.
- 8) **Ardestani, A., & Yazdanparast, R. (2007).** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxydation. *Food and chemical toxicology*, 45(12), 2402-2411.
- 9) **Azzi, R., Djaziri, R., Lahfa, F., Sekkal, F.Z., Benmehdi, H., Belkacem, N. (2012).** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*; 6(10):2041-2050.
- 10) **Bailey, C. J., & Day, C. (1989).** Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes care*, 12(8), 553-564.
- 11) **Basch E, Ulbricht C, Kuo G, Szaparyp, Smith M. (2003).** Therapeutic applications of fenugreek. *Alt. Med. Rev*, 8 (1), 20-27.
- 12) **Bedekar, A., Shah, K., & Koffas, M. (2010).** Natural products for type II diabetes treatment. *Advances in applied microbiology*, 71, 21-73.
- 13) **Benalla, W., Bellahcen, S., Bnouham, M. (2010).** Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Current diabetes reviews*, 6(4), 247-254.

- 14) **Benariba, N., djaziri, R., Zerriouth, B.H., Louchami, K., Sener, A., Malaisse, W.J. (2009).** Antihyperglycemic effect of *Citrullus colocynthis* seed aqueous extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metab. and func. Res. On Diabetes*, 2, 71-76.
- 15) **Benderradji, L., Rebbas, K., Ghadbane, M., Bounar, R., Brini, F., & Bouzerzour, H. (2014).** Ethnobotanical study of medicinal plants in Djebel messaad region (M'sila, Algeria). *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, 3(12), 445.
- 16) **Bermejo, J. E. H., & León, J. (Eds.). (1994).** *Neglected crops: 1492 from a different perspective* (No. 26). Food & Agriculture Org.
- 17) **Bhaisare, D. B., Thyagarajan, D., Punniamurthy, N., & Ranganathan, R. R. C. V. (2014).** Phytochemical analysis of four herbal seed extract and their use in poultry ration. *Journal of Poultry Science*, 2(2), 34-37.
- 18) **Boitard, C., Cavaroc, A., Sauvart, J., Aubert, A., Castanon, N., Layé, S., & Ferreira, G. (2014).** Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain, behavior, and immunity*, 40, 9-17.
- 19) **Bordia, A., Verma, S.K., Srivastava, K.C. (1997).** Effect of ginger (*Zingiber Officinale* Rosc.) and fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.) on blood lipids, blood sugar and platelet Aggregation in patients with coronary artery disease. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 56(5), 379-384.
- 20) **Boulnois-lagache, C., Duhot, D., Fagot-Campagna, G., Gillery, P., Grenier, J.L., Marissal, J.P., Menu, G., Moulin, P., Ovize, M., Simon, D., Vidal-Cathala, E. (2003).** Principe de dépistage du diabète. Service évaluation des technologies, service évaluation économique.
- 21) **Bouzabata Amel.(2013).** Traditional treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5(1), 12-20.
- 22) **Bouxi, H. (2012).** les plantes médicinales et diabète de type 2 (à propos de 199 cas). Thèse de Doctorat : médecine : Université Sidi Mohammed Ben Abdellah - Fès,
- 23) **Brayer, G. D., Luo, Y., & Withers, S. G. (1995).** The structure of human pancreatic  $\alpha$ -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science*, 4(9), 1730-1742.
- 24) **Brownlee, M. (1995).** The pathological implications of protein glycation. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale*, 18(4), 275-281.

- 25) **Bukhari SB, Bhangar MI and Memon S (2008)**. Antioxidative activity of extracts from fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*). *Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry*, 9(2), 78-83.
- 26) **Calop, G., Limat, S., Fernandez, C. (2008)**. Pharmacie clinique et thérapeutique. 3e édition. Paris : Masson ,419 p.
- 27) **Chan KW, Iqbal S, Khong NMH and Babji AS .(2011)**. Preparation of deodorized antioxidant rich extracts from 15 selected spices through optimized aqueous extraction. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(25), 6067-6075.
- 28) **Charbonnel, B et Cariou, B. (1997)**. Diabète non insulino-dépendant : indications thérapeutiques. *Médecine thérapeutique*; 3,103-111.
- 29) **Christophe, B.; Manteghetti, M.; Gross, R.; Baissac, Y.; Jacob, M.; Petit, P.; Sauvaire, Y.; Ribes, G. (2000)**.*Eur. J. Pharmacol.* 390, 339.
- 30) **DeFronzo, R. A. (1999)**. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine*, 131(4), 281-303.
- 31) **Ducobu, J. (2003)**. Oral antidiabetic drugs in 2003. *Rev Med Brux*, 24 (4),.361-368.
- 32) **Feller, G., le Bussy, O., Houssier, C., & Gerday, C. (1996)**. Structural and functional aspects of chloride binding to *Alteromonas haloplanctis*  $\alpha$ -amylase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(39), 23836-23841.
- 33) **FID, 2013**. 6e édition. Bruxelles, Belgique.
- 34) **Geoffroy, L et Gonthier, M. (2012)**. Le diabète sous toutes ses formes. Dans *Le diabète chez l'enfant et l'adolescent*, 2e édition. Montréal : Éditions du CHU Ste-Justine.
- 35) **Gilles, C., Astier, J.P., Marchis-Mouren, G., Cambillau C., et al. (1996)**.Crystal structure of pig pancreatic  $\alpha$ -amylase isoenzyme II, in complex with the carbohydrate inhibitor, acarbose. *Eur. J. Biochem*, 238, 561–569.
- 36) **Grimaldi A. (2009)**. *Traité de diabétologie*, 2 [1] e éditions. Ed. Médecine- Sciences, Flammarion.
- 37) **Grundy, S. M., Cleman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., ... & Spertus, J. A. (2005)**. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. *Circulation*, 112(17), 2735-2752.
- 38) **Gupta, A., Gupta, R., & Lal, B. (2001)**. Effect of *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) Seeds on Glycaemic Control and Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. *J Assoc Physicians India*, 49, 1057-1061.
- 39) **Hamliche, Vet Maiza, K. (2006)**. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of ethnopharmacology*, 105(3), 358-367.

- 40) **Hannan, J. M. A., Ali, L., Rokeya, B., Khaleque, J., Akhter, M., Flatt, P. R., & Abdel-Wahab, Y. H. A. (2007).** Soluble dietary fibre fraction of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed improves glucose homeostasis in animal models of type 1 and type 2 diabetes by delaying carbohydrate digestion and absorption, and enhancing insulin action. *British Journal of Nutrition*, 97(03), 514-521.
- 41) **Harborne, A. J. (1998).** *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer Science & Business Media.
- 42) **Harchane, H., El Addas, H., Amsaguine, S., El Amrani, N., Radallah, D. (2012).** Effets de l'extrait aqueux des graines du fenugrec (*Trigonella foenum graecum*) sur l'amélioration du profil lipidique et la prise de poids chez le rat. *Phytothérapie*, 10 (6) ,357-362.
- 43) **Heidari, R., Zareae, S., & Heidarizadeh, M. (2005).** Extraction, purification, and inhibitory effect of alpha-amylase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum* Var. Zarrin). *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(2), 101-105.
- 44) **Inzucchi, S. E. (2002).** Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. *Jama*, 287(3), 360-372.
- 45) **Iulek, J., Franco, O. L., Silva, M., Slivinski, C. T., Bloch, C., Rigden, D. J., & de Sá, M. F. G. (2000).** Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 32(11), 1195-1204.
- 46) **Jarald, E, Balakrishnan, S.J., Chandra J.D. (2008).** Diabetes and Herbal Medicines. *Iranian journal of pharmacology & therapeutics* 97-106.
- 47) **Kandra, L. (2003).**  $\alpha$ -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 666, 487-498.
- 48) **King, G. L. (2008).** The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *Journal of periodontology*, 79(8S), 1527-1534.
- 49) **Khosla, P., Gupta, D.D., Nagpal, R.k. (1995).** Effect of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) on blood glucose in normal and diabetic rat. *Indian J Physiol Pharmacol*, 39 (2), 173-174.
- 50) **Kumari, O. S., Rao, N. B., & Gajula, R. G. (2016).** Phytochemical analysis and anti-microbial activity of *Trigonella foenumgracum* (Methi seeds). *Journal of Medicinal Plants*, 4(4), 278-281.
- 51) **Lamba, S. S., Buch, K. Y., Lewis, H., & Lamba, J. (2000).** Phytochemicals as potential hypoglycemic agents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21, 457-496.

- 52) **Leontis, Lisa M RN, ANP-C and Amy Hess-Fischl MS, RD, LDN, BC-ADM, CDE.** 2014.
- 53) **Lifshitz, R., & Levitzki, A. (1976).** Identity and properties of the chloride effector binding site in hog pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Biochemistry*, 15(9), 1987-1993.
- 54) **MacGregor, E. A., Janeček, Š., & Svensson, B. (2001).** Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1546(1), 1-20.
- 55) **Marles, R. J., & Farnsworth, N. R. (1995).** Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2(2), 137-189.
- 56) **Mazza, G., Di Tommaso, D., & Foti, S. (2002).** Volatile constituents of Sicilian fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds. *Sciences des aliments*, 22(3), 249-264.
- 57) **Mehrafarin, A., Qaderi, A., Rezazadeh, Sh., Naghdi Badi, H., Noormohammadi, Gh., Zand, E. (2010).** Bioengineering of Important Secondary Metabolites and Metabolic Pathways in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *J. of Medicinal Plants*, 9(35), 1-18.
- 58) **Ménat, E. (2005).** La diététique du diabète. Alpen Editions sam, 20-21p.
- 59) **Michels, K. B., Solomon, C. G., Hu, F. B., Rosner, B. A., Hankinson, S. E., Colditz, G. A., & Manson, J. E. (2003).** Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study. *Diabetes care*, 26(6), 1752-1758.
- 60) **Mishra, R., Mandloi, S., Yadav, N., & Choithani, J. (2016).** Phytochemical analysis of *Trigonella foenum-graecum* and its antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.
- 61) **Moradi Kor Nasroallah \*1, Mohamad Bagher Didarshetaban2, Hamid Reza Saeid.** (2013). Pour 3 Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) As a Valuable Medicinal Plant. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(8), 922-931.
- 62) **Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006).** Towards commercial production of microbial surfactants. *TRENDS in Biotechnology*, 24(11), 509-515.
- 63) **Muralikrishna, G et Nirmala, M. (2005).** Cereal  $\alpha$ -amylases – an overview. *Carbohydrate Polymers*, 60, 163-173.
- 64) **Narender, T., Puri, A., Khaliq, T., Saxena, R., Bhatia, G., & Chandra, R. (2006).** 4-hydroxyisoleucine an unusual amino acid as antidiabetic and antihyperglycemic agent. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16(2), 293-296.
- 65) **OMS (Organisation mondiale de la santé). (2002b).** Stratégie de l'OMS pour médecine traditionnelle pour 2002-2005. Genève, WHO/EDM/TRM/2002.1/1-63.

- 66) **OMS. Organisation mondiale de la santé. (2016).** Rapport mondial sur le diabète .Genève.
- 67) **Pande, K. K., Pande, L., Pande, B., Pujari, A., Sah, P., & Sah, S. (2011).** Limonene dominates the Phytochemistry of *Trigonella foenum-graceum* in Nature. *Nat Sci*, 9, 17-20.
- 68) **Payan, F. (2004).** Structural basis for the inhibition of mammalian and insect  $\alpha$ -amylases by plant protein inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1696(2), 171-180.
- 69) **Priya V, Jananie RK and Vijayalakshmi K (2011).** Studies on anti-oxidant activity of *Trigonella foenum graecum* seed using in vitro models. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(10), 2704- 2708.
- 70) **Quezada-Calvillo, R., Sim, L., Ao, Z., Hamaker, B. R., Quaroni, A., Brayer, G. D., ... & Nichols, B. L. (2008).** Luminal starch substrate “brake” on maltase-glucoamylase activity is located within the glucoamylase subunit. *The Journal of nutrition*, 138(4), 685-692.
- 71) **Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G. D., & Levine, M. J. (1996).** Structure of human salivary  $\alpha$ -amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 52(3), 435-446.
- 72) **Ramulu, P., Giridharan, N. V., & Udayasekhararao, P. (2011).** Hypolipidemic effect of soluble dietary fiber (galactomannan) isolated from fenugreek seeds in WNIN (GR-Ob) obese rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(19), 4804-4813.
- 73) **Ravikumar, P et Anuradha, C. V. (1999).** Effect of fenugreek seeds on blood lipid peroxidation and antioxidants in diabetic rats. *Phytotherapy research*, 13(3), 197-201.
- 74) **Reuser, A. J. J., & Wisselaar, H. A. (1994).** An evaluation of the potential side-effects of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors used for the management of diabetes mellitus. *European journal of clinical investigation*, 24(S3), 19-24.
- 75) **Ribes, G., Sauvaire, Y, Baccou, J.C., Valette, G., Chenon, D., Trimble, E.R., Loubatières-Mariani, M.M. (1984).** *Annals of nutrition and metabolism*, 28(1), 37-43.
- 76) **Riyad M, A., Abdul-Ghani A.S., Sulernan M.S. (1988).** Effect of Fenugreek and Lupine Seeds on the Development of Experimental Diabetes in Rats. *Planta Med*, 54(4), 286-290.
- 77) **Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., & Silveira, D. (2012).**  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 141-183.



- 78) **Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Boudjelal, A. (2012).** Ethnobotanical study of therapeutic plants used to treat arterial hypertension in the Hodna region of Algeria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, 1(9), 411.
- 79) **Sauvaire, Y., Petit, P., Broca, C., Manteghetti, M., Baissac, Y., Fernandez-Alvarez, J., ... & Ribes, G. (1998).** 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. *Diabetes*, 47(2), 206-210.
- 80) **Scheen, A., Radermecker, R., Philips, J. C., Rorive, M., De Flines, J., Ernest, P., Paquot, N. (2007).** Le traitement du diabète de type 2: entre insulinosensibilisateurs et insulinosécrétagogues. *Revue Médicale de Liège*, 62, 40-46.
- 81) **Sharma, R. D., Raghuram, T. C., & Rao, N. S. (1990).** Effect of fenugreek seeds on blood glucose and serum lipids in type I diabetes. *Eur J clin nutr*, 44(4), 301-6.
- 82) **Sheicklar, A. (2013).** *Trigonella foenum-graecum L.* (Fenugrec) as a Medicinal Herb in Animals Growth and Health. *Science international*, (1) 6,194-198.
- 83) **Sigal, R. J., Armstrong, M. J., Colby, P., Kenny, G. P., Plotnikoff, R. C., Reichert, S. M., & Riddell, M. C. (2013).** Physical activity and diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*, 37, S40-4.
- 84) **Silverthorn, DU., Ober, WC., Garrison, CW., Silverthorn, AC., Bruce, RJ. (2007).** *Physiologie humaine*. 4<sup>ème</sup> édition. Paris : Masson, 661p.
- 85) **Souri E, Amin G, Farsam H and Barazandeh TM (2008).** Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(2), 83-87.
- 86) **Sumayya, A. R., Srinivasan, S., & Amatullah, N. (2012).** Screening and biochemical quantification of phytochemicals in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3(1), 165-169.
- 87) **Sulieman, A. M. E., Ahmed, H. E., & Abdelrahim, A. M. (2008).** The Chemical Composition of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*) and the Antimicrobial Properties of its Seed Oil. *Gezira Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(2), 1-21.
- 88) **Spinas, G. A., & Lehman, R. (2001).** Diabète sucré: diagnostic, classification et pathogènes. In *Forum Med Suisse* (Vol. 2, pp. 519-522).
- 89) **Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998).** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4267-4274.

- 90) **Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004).** Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151-165.
- 91) **Thalapaneni, N. R., Chidambaram, K. A., Ellappan, T., Sabapathi, M. L., & Mandal, S. C. (2008).** Journal of Complementary and Integrative Medicine. *Integrative Medicine*, 5(1), 11.
- 92) **Tielmans, A., Laloi-Michelin, M., Coupaye, M., Virally, M., Meas, T., & Guillausseau, P. J. (2007).** Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (première partie). *La Presse Médicale*, 36(2), 269-278.
- 93) **Trease, G. E., & Evans, M. C. (1989).** Text book of Pharmacognosy 13th Edition Bailleire Tindall, London, Toronto. Tokyo. Pgs, 200-201.
- 94) **Vadalia DN, Pethe AM and Chakraborty GS (2010).** Antioxidant activity of polyherbal formulation. *Journal of Pharmacy Research*, 3(8), 1756-1758.
- 95) **Valliappan,C., Lakshmanan, N., Veerappan, S., Ramu, L., Vellingiri, V., Pemiah, B. (2015).** spectrophotometric, HPTLC and gc-ms studies on selected spice extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*,7(6), 184-190.
- 96) **Valmadrid, C. T., Klein, R., Moss, S. E., Klein, B. E., & Cruickshanks, K. J. (1999).** Alcohol intake and the risk of coronary heart disease mortality in persons with older-onset diabetes mellitus. *Jama*, 282(3), 239-246.
- 97) **Van De Laar, F. A., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., Van De Lisdonk, E. H., Rutten, G. E., & Van Weel, C. (2005).**  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 28(1), 154-163.
- 98) **Venkatesan, N., Devaraj, S. N., & Devaraj, H. (2007).** A fibre cocktail of fenugreek, guar gum and wheat bran reduces oxidative modification of LDL induced by an atherogenic diet in rats. *Molecular and cellular biochemistry*, 294(1-2), 145.
- 99) **Vermerius, W., Nicholson, R., (2006).** Phenolic Compound Biochemistry. *Springer, Dordrecht. ISBN*, 101, 4020-5163.
- 100) **Volpe, J. J. (2009).** Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *The Lancet Neurology*, 8(1), 110-124.
- 101) **Yadav, R., Kaushik, R., & Gupta, D. (2011).** The health benefits of Trigonella foenum-graecum: A Review. *Int J Eng Res Appl*, 1, 32-35.
- 102) **Yadav, R., Tiwari, R., Chowdhary, P., & Pradhan, C. K. (2011).** A pharmacognostical monograph of Trigonella foenum-graecum seeds. *Screening*, 1, 6.
- 103) **Yanovski, S. Z. (2002).** Binge eating in obese persons. *Eating disorders and obesity: A comprehensive handbook*, 2, 403-410.

- 104) **Winters, L.A., Walmsley, T.L., Wang, Z.K., Grynberg, R.(2003).** Liberalising Labour Mobility under the GATS, Economic Paper, No.53, Commonwealth Secretariat. London.
- 105) **Whitcomb, D.C., Lowe, M.E. (2007).** Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci*, 52, 1-17.
- 106) **Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C., Shaw, J.( 2011).** IDF Diabetes Atlas : Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94, 311-321.
- 107) **Worthington, C. C. (1988).** Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemicals. Worthington Biochemical Corporation.
- 108) **Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M., & Shaw, J. (2001).** Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865), 782-787.

## ملخص :

مرض السكري هو متلازمة اضطراب الأيض ، يتميز بارتفاع مزمن في نسبة السكر في الدم و هذا راجع إلى خلل في إفراز أو عمل الأنسولين أو الاثنين معا. واحدة من بين الطرق العلاجية لعلاج هذا المرض هي تثبيط الإنزيمات الهاضمة (ألفا اميلاز و ألفا غلوكوزيداز).

الهدف من هذا العمل الذي قمنا به هو البحث عن التأثير المثبط لثلاث مستخلصات لنبات الحلبة محضرة بالنقع، النقع المغلي و الاستخلاص بالجلي على نشاط ألفا اميلاز و لكن في المختبر.

تبدأ دراستنا بالتحليل الكيميائي النباتي ثم الكمي لهذه المستخلصات لتحديد الكمية الإجمالية من البوليفينول، الفلافونويدات و العفص المكثف.

يبين العفص الكيميائي للنبات عن وجود العفص المكثف، الكينونات الحرة، الفلويونات، الصابونين، الفلافونويد و التاربيبيويد.

المستخلص المحضر بالنقع المغلي يحتوي على أكبر كمية من البوليفينول و العفص المكثف بتركيز 110,13 ميكرو غرام مكافئ ح/غ/ملغ و 77,31 ميكرو غرام مكافئ ك/مل على التوالي بينما الكمية الأكبر من الفلافونويدات موجودة في المستخلص المحضر بالنقع بتركيز 14,07 ميكرو غرام مكافئ ك/ملغ.

أظهرت الاختبارات التي أجريت على نشاط إنزيم ألفا اميلاز أن نبتة الحلبة لها تأثير مثبط، هذا التأثير واضح في المستخلص المحضر بالنقع المغلي بتركيز مثبط إلى 50 بالمئة تبلغ قيمته 1,87 ملغ/مل. و لكن هذا التأثير يبقى ضعيف جدا بالنسبة لتأثير الأكاربوز (0,01 ملغ/مل).

اعتمادا على نتائج دراستنا، نقترح أن نبات الحلبة يمكن أن يكون لها دور في تنظيم نسبة السكر المرتفعة في الدم من خلال تثبيط عمل إنزيم ألفا أميلاز و بالتالي التقليل من امتصاص الجلوكوز.

**كلمات البحث:** الحلبة، الألفا اميلاز، العمل التثبيطي، البوليفينول، الفلافونويد، العفص المكثف.

## Résumé

Le diabète sucré est une affection métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique. Il est dû à une insuffisance de sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques et / ou une action altérée de cette hormone. Une des approches thérapeutiques dans le traitement du diabète est la diminution de l'absorption intestinale du glucose qui est assurée par l'inhibition des enzymes digestives ( $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidases).

L'objectif de ce travail porte sur la recherche, *in vitro*, d'effet inhibiteur de l'activité de l' $\alpha$ -amylase des extraits bruts hydrométhanolique des graines de *Trigonella foenum graecum L.*, préparés par macération, infusion ou décoction.

Notre étude est initiée par un screening phytochimique de ces extraits et une analyse quantitative visant la détermination des taux de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins condensés.

Le screening phytochimique a révélé la présence des tanins, quinones libres, alcaloïdes, saponines, flavonoïdes et terpénoïdes dans les différentes préparations de la plante.

Les taux en polyphénols et en tanins condensés les plus élevés sont enregistrés dans l'extrait hydrométhanolique préparé par infusion (110,13  $\mu\text{g Eq AG/mg ES}$  et 77,31  $\mu\text{g Eq C/mg ES}$  respectivement). Alors que le taux le plus élevé en flavonoïdes est constaté dans l'extrait hydrométhanolique préparé par macération (14,07  $\mu\text{g Eq C/mg ES}$ ).

Les tests réalisés *in vitro* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase montrent que le fenugrec possède un effet inhibiteur, cet effet est plus marqué avec l'extrait préparé par infusion avec une  $\text{CI}_{50}$  d'ordre de 1,87 mg/ml. Cependant, il reste largement faible par rapport à celui de l'acarbose ( $\text{CI}_{50}$  à 0,01 mg/ml).

En fonction des résultats obtenus de notre étude, on suggère que *Trigonella foenum graecum L.* peut exercer un effet sur la régulation de l'hyperglycémie en effectuant une inhibition de l'activité de l' $\alpha$ -amylase et par la suite une réduction de l'absorption du glucose.

**Mots clés :** *Trigonella foenum-graecum L.*,  $\alpha$ -amylase, activité inhibitrice, polyphénols, flavonoïdes, tanins condensés.

## Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia. It is due to an insufficient insulin secretion by pancreatic beta cells and / or an altered action of this hormone. One of the therapeutic approaches in the treatment of diabetes is the reduction of intestinal absorption of glucose, which is assured by the inhibition of digestive enzymes ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidases).

The objective of this work is to investigate the *in vitro* inhibitory effect of hydromethanolic crude extracts prepared by three modes of extraction (maceration, infusion or decoction) from the *Trigonella foenum graecum L.* seeds on the activity of  $\alpha$ -amylase.

Our study is initiated with phytochemical screening of these extracts and a quantitative analysis aiming at the determination of the total polyphenols, flavonoids and condensed tannins levels.

The phytochemical screening reveals the presence of tannins, free quinones, alkaloids, saponins, flavonoids and terpenoids in the different preparations of the plant.

The highest levels of polyphenols and condensed tannins were recorded in the hydromethanol extract prepared by infusion (110.13  $\mu\text{g Eq AG/mg DE}$  and 77.31  $\mu\text{g Eq C/mg DE}$  respectively). Whereas the highest level of flavonoids is found in the hydromethanol extract prepared by maceration (14.07  $\mu\text{g Eq C/mg DE}$ ).

*In vitro* tests on  $\alpha$ -amylase activity show that fenugreek has an inhibitory effect, this effect is more marked with the extract prepared by infusion with an  $\text{IC}_{50}$  equal to 1.87 mg/ml. However, this effect remains largely low compared to that of acarbose ( $\text{IC}_{50}$  at 0.01 mg/ml).

Based on the results of our study, we suggest that *Trigonella foenum graecum L.* can exert an effect in the regulation of hyperglycemia by inhibiting the  $\alpha$ -amylase activity and subsequently reducing the glucose absorption.

**Key words:** *Trigonella foenum-graecum L.*,  $\alpha$ -amylase, inhibitory activity, polyphenols, flavonoids, condensed tannins.