

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE BORDJ BOU ARRERIDJ

**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES
DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS**

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Des Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Option : Biotechnologie et Protection des Végétaux

Thème

**CONTRIBUTION A LA RECHERCHE DES
ACTIVITES ANTIOXYDANTE ET ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS
METHANOLIQUES DE LA PLANTE MEDICINALE
Reichardia picroides L. SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DE
Fusarium oxysporum f. sp. Ciceri.**

Présenté par : DJESSAS Aicha

Jury de soutenance:

Président	: kelaleche Haizia	MAA	<i>UNIVERSITE DE BORDJ BOU ARRERIDJ</i>
Encadreur	: Boumerfeg Sabah	MCA	<i>UNIVERSITE DE BORDJ BOU ARRERIDJ</i>
Examineur	: Sedrati Nouari	MAA	<i>UNIVERSITE DE BORDJ BOU ARRERIDJ</i>

2012/2013

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience pour faire aboutir ce travail

Je remercie vivement

Mme. Boumerfeg Sabah, Maitre de conférences au Département de biologie, Faculté d'SNV Université de Bordj-Bou-Arreidj pour avoir accepté de m'encadrer et qui m'a permis de réaliser ce travail sous sa direction.

Merci à tous les membres de jury qui ont accepté de juger ce modeste travail,

Mes remerciements les plus respectueux

Vont à Mr. Baghiani A. Professeur au département de Biochimie, Université Ferhat Abbas de Sétif, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire.

Un remerciement spécial à

Mr. Bensalama A, Maitre assistant à l'Université de Bordj-Bou-Arreidj et M^{elle} . Aouachria S, Maitre assistant à l'Université F.A. de Sétif, pour Leur disponibilité, et leurs précieux conseils. Qu'ils soient assurés de toute mon estime et de mon profond respect.

Je remercie également

Mr. Dahou, Mr. Sadrati N et Mme. Zerroug A, Maitres assistants à l'Université de Bordj-Bou-Arreidj, pour leurs soutiens et encouragements.

Merci à ma collègue

Du labo Aicha pour tous les bons moments passés, pour sa Gentillesse, sa disponibilité et sa compétence, Merci du fond du cœur.

Je remercie mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Dédicaces

*À mes parents Djoudi et Nacira que dieu protège,
qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien
tout au long de mes études*

À mon Marie Adel pour son soutien moral

À ma seconde famille : La famille Ben saadi

À mes chères sœurs : Aziza, Soumia, Asma

*À mes frères : Abd el Malek, Zoubir, Abd Allah,
Rabie, Haroun et le petit Younes*

À tous mes Amies.

À tous ceux que j'aime.

Résumé

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de métabolites secondaire qui possède des capacités antioxydantes et un pouvoir inhibiteur des microorganismes. Dans la présente étude on a tenté d'évaluer l'activité antioxydante et antifongique des extraits bruts préparés à partir de la partie aérienne et sous terrainne de la plante médicinale *Reichardia picroides* L. L'estimation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium montre que l'extrait brut de feuilles (EBr. F) est plus riche en ces composés ($72.40 \pm 1.04 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait et $18.53 \pm 0.90 \mu\text{g EQ /mg}$ d'extrait) par rapport au teneur de l'extrait brut des racines (EBr. R) ($41.88 \pm 0.43 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait et $1.19 \pm 0.14 \mu\text{g EQ / mg}$ d'extrait). L'inhibition de l'oxydation couplée de l'acide linoléique β -carotène a été évaluée par le test de blanchissement du β -carotène qui a montré une activité antioxydante puissante avec un pourcentage d'inhibition de $88.63 \pm 0.59\%$ pour EBr. F et $73.65 \pm 2.13 \%$ pour EBr. R. L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits par la méthode de diffusion dans un milieu solide montre EBr. F à faible concentration possède une activité antimicrobienne sur *F.oxysporium*, plus ou moins importante en comparaison avec celle de EBr. R sur la même souche fongique. D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que la plante étudiée possède une activité biologique considérable qui est localisée principalement dans la partie aérienne.

Mots clés: *Reichardia picroides* L. , métabolites secondaires, *Fusarium oxysporum*, activité antifongique, pouvoir antioxydant, stress oxydant.

الملخص

تحتوي مستخلصات الطبيعية الناتجة عن النباتات على العديد من المستقلبات الثانوية التي تملك قدرات مضادة للأكسدة و نشاط مثبط للكائنات الحية الدقيقة. حاولنا في هذه الدراسة تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للفطريات للمستخلصات الخام المحضرة من القسم الهوائي والقسم الترابي للنبتة الطبية *R. picroides*. بينت نتائج التقدير الكمي لعديدات الفينول الكلية بطريقة Folin-Ciocalte و الفلافونويدات بطريقة ثلاثي كلوريد الألمنيوم ان المستخلص الخام للقسم الهوائي للنبتة غني بهذه المركبات (1.04 ± 72.40 ميكرو غرام مكافئ لحمض الغاليك/ مغ من المستخلص و 18.53 ± 0.90 ميكرو غرام كيرسيتين / مغ من المستخلص) مقارنة بمحتوى المستخلص الخام للجذور (41.88 ± 0.43 ميكرو غرام مكافئ لحمض الغاليك/ مغ من المستخلص و 1.19 ± 0.14 ميكرو غرام كيرسيتين / مغ من المستخلص)، كما اظهرت نتائج النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال اختبار β - caroten- linolic acid . ان نسبة تثبيط اكسدة حمض اللينولييك كانت عالية سواء بالنسبة لمستخلص القسم الهوائي او القسم الترابي بنسبة 88.63 ± 0.59 % و 73.65 ± 2.13 % على الترتيب. من جهة اخرى بينت نتائج تقييم فعالية المستخلصات المضادة للميكروبات بطريقة الاتصال المباشر ان للمستخلص الخام للقسم الهوائي نشاط مضاد للميكروبات عند التراكيز المنخفضة ضد الفطر *F.oxysporium* اكبر مقارنة مع فعالية مستخلص الخام للقسم الترابي للنبتة ضد نفس الفطر. من خلال النتائج المحصل عليها يمكن القول ان للنبتة المدروسة نشاطية بيولوجية هامة تتركز اساسا في جزئها الهوائي.

الكلمات المفاتيح:

F. oxysporum ، *Reichardia picroides* ، النشاط المضاد للفطريات، النشاط المضاد للأكسدة،

المستقلبات الثانوية ، الاجهاد التاكسدي.

Liste des abréviations

AA :	Activité antioxydante
AlCl₃ :	Trichlorure d'aluminium
ATP :	Adénosine triphosphate
BHT :	Butylhydroxytoluène
EAC :	Equivalent en acide quercétine
EAG:	Equivalent en acide gallique
EBr.F :	Extrait brut de feuilles
EBr.R :	Extrait brut de Racines
FCR :	Réactif de Folin-Ciocalteu
GAE:	Equivalent d'acide gallique
GPx :	Glutathion peroxydase
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion disulfure oxydé
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
I % :	Pourcentage d'inhibition
LOO[°] :	Lipid peroxide radical
MeOH :	Méthanol
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NADPHO :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit oxydase
NO[°] :	Radical nitroxy
NO₂⁻ :	Nitrite
O₂^{°-} :	Radical superoxyde

OH[°] : Radical hydroxyle

PDA : Potato Dextrose Agar

ROS : Reactive oxygen species = Espèces réactifs de l'oxygène.

SD : Standard deviation

SOD : Superoxyde dismutase

XO : Xanthine oxydase

Liste des figures

Figure 1:	Les types de pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L.) kabuli et dési.....	3
Figure 2:	Myroconidies asymétriques, légèrement incurvées, disposées en amas à l'extrémité de monophialides solitaires (1), de chamydospores sont parfois observées (2).....	6
Figure 3:	Une plante de pois chiches déracinée affectée par la fusariose, montrant clairement des symptômes de jaunissement typiques.....	7
Figure 4:	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	10
Figure 5:	Structure de la molécule d'isoprène.....	12
Figure 6:	Structure générale des flavonoïdes.....	14
Figure 7:	<i>Reichardia picroides</i> L.	16
Figure 8:	Procédure d'extraction des flavonoïdes de <i>Reichardia picroides</i>	19
Figure 9:	Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	20
Figure 10:	Droite d'étalonnage de la quercétine.....	21
Figure 11:	La cinétique de l'activité antioxydante des extraits de <i>R. picroides</i> par rapport au BHT, MeOH et H ₂ O par le test de β -carotène / acide linoléique.....	26
Figure 12:	Activité antioxydante des extraits de <i>R. picroides</i> par le test de β -carotène / acide linoléique.....	27
Figure 13:	Activité antifongique des extraits de <i>R. picroides</i>	29
Figure 14:	Activité antifongique des extraits de <i>R. picroides</i>	29
Figure 15:	Activité antifongique des extraits de <i>R. picroides</i>	30

Liste des tableaux

Tableau I:	Les trois types de métabolites secondaires.....	12
Tableau II:	Le rendement des extraits de <i>R. picroides</i> et ses teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes.....	24
Tableau III:	Activité des extraits de <i>R. picroides</i> sur la croissance de <i>F.oxysporum</i>	28

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Résumé

المخلص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	1
1. Culture du pois chiche.....	3
1.1. Taxonomie et caractéristiques botaniques.....	4
1.2. Cycle et saisons de la culture.....	4
1.3. Maladies du pois chiche.....	4
1.3.1. Le flétrissement vasculaire du pois chiche.....	4
2. Les moisissures.....	5
2.1. <i>Fusarium oxysporum</i>	5
2.1.1. Taxonomie et caractéristiques morphologique.....	5
2.1.2. Epidémiologie et cycle évolutif de la maladie.....	6
3. Les méthodes de lutte contre les agents pathogènes.....	7
3.1. La lutte culturale.....	7
3.2. La lutte chimique.....	7
3.3. Lutte génétique.....	8
3.4. La lutte biologique.....	8
4. Les plantes et le stress oxydant.....	8
4.1. Définition.....	8
4.2. Les radicaux libres.....	9
4.2.1. Les sources endogènes.....	9
4.2.2. Les sources exogènes.....	9
4.3. Les antioxydants.....	10
4.3.1. Antioxydants enzymatiques.....	10
4.3.2. Antioxydants non enzymatiques.....	11

5. Les métabolites secondaires.....	11
5.1. Les terpènes.....	12
5.2. Les alcaloïdes.....	12
5.3. Les composés phénoliques.....	13
5.3.1. Classification des composés phénoliques.....	13
6. Utilisation des plantes en protection des végétaux.....	14
6.1. Activités biologiques des métabolites secondaires.....	14
6.1.1. Activité antifongique.....	15
7. <i>Reichardia picroides</i> (L.) Roth (picridium desf.).....	15
7.1. Description botanique.....	15
7.2. Nomenclature de la plante.....	16
7.3. Composition chimique.....	17
7.4. Utilisation en médecine traditionnelle.....	17
Matériels et méthodes.....	18
1. Matériels.....	18
1.1. Matériel biologique.....	18
1.2. Appareils et produits chimiques.....	18
2. Méthodes.....	18
2.1. Extraction des flavonoïdes.....	18
2.2. Dosage des polyphénols totaux.....	20
2.3. Dosage des flavonoïdes.....	20
2.4. Test de blanchissement du β -carotène des extraits de <i>R. picroides</i>	21
2.5. Activité antifongique.....	22
2.5.1. La souche fongique.....	22
2.5.2. Méthodes de contact direct.....	22
2.6. Analyse statistique.....	23
Résultats et discussion.....	24
1. Extraction des polyphénols.....	24
2. Analyse des extraits de <i>R. picroides</i>	24
2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	25
2.2. Teneur en flavonoïdes.....	25

3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>R. picroides</i>	26
4. Activité antifongique des extraits.....	28
Conclusion.....	32
Références bibliographiques.....	34

Introduction

Les plantes médicinales sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention des substances actives possédant des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture. Selon Teixeira da Silva (2004) ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font et reste l'objet de nombreuses recherches, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels les saponosides, les huiles essentielles et les composés phénolique. Les polyphénols sont doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation (Bruneton, 1999).

La culture de pois chiche occupe une place importante dans l'alimentation. Le pois chiche souffre de nombreuses difficultés agrotechniques. Les problèmes liés à l'installation de la culture (date, dose de semis), à la protection phytosanitaire (maladies, mauvaises herbes), aux pertes pendant la récolte et à la non disponibilité de variétés adaptées, sont les causes principales des faibles rendements (Bhan et Kukula, 1987). Le flétrissement vasculaire induit par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* (FOC) est considéré comme la maladie la plus grave du complexe de flétrissement et de pourritures racinaires qui affecte les cultures du pois chiche. Les méthodes de lutte chimiques classiques contre ces agents pathogènes présentent des limites.

En fait, l'utilisation massive de pesticides s'avère toxique non seulement pour les pathogènes, les plantes mais aussi les consommateurs (Andreotti *et al.*, 2009). La recherche de nouvelles stratégies de prévention contre les infections et les maladies d'origine fongique, comporte un intérêt majeur, d'une part pour la sécurité sanitaire des aliments et la santé du consommateur et d'autre part, pour la protection de l'économie du pays. Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle, afin d'identifier davantage des substances possédant des propriétés antifongiques et antioxydant de rationaliser leurs utilisation, pour cela nous sommes intéressés à la plante médicinale *Reichardia picroides* L. utilisée en Algérie pour traiter un grand nombre de pathologies d'origine infectieuses et inflammatoires. Nous avons tenté d'évaluer, *in vitro*, l'effet de ses extraits méthanoliques sur une souche fongique (*Fusarium oxysporum*).

Dans cette optique, la présente étude vise les objectifs suivants:

- Analyse quantitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des extraits méthanoliques.
- Evaluation de l'effet antioxydant des extraits méthanoliques en utilisant le système acide linoléique/ β -carotène.
- Etude *in vitro* de l'effet antifongique des extraits méthanoliques sur la croissance de la souche mycélienne *F. oxysporum*.

1. Culture du pois chiche

Le pois chiche est probablement originaire des régions de l'Est de la Méditerranée, notamment, la Palestine et la Syrie (Ladizinsky, 1987). C'est une plante vivrière de la famille des légumineuses, cultivé dans plusieurs pays d'Asie et du Moyen-Orient particulièrement en Inde où la production atteint 92% de la production mondiale, alors qu'en Afrique et en Amérique elle est de 4% et 3% respectivement (Singh, 1990).

Le pois chiche se trouve en deux types, le premier type est kabuli appelé aussi garbanzo, il est caractérisé par un feuillage dont la couleur varie du vert claire au vert foncé et une floraison blanchâtre (**Figure 1**). Il a un port érigé ou semi érigé qui permet la mécanisation de la récolte (Ben Mbarek, 2011). Le deuxième type est caractérisé par un feuillage dont la couleur tend du vert violacé au glauque et une floraison violacée (**Figure 1**). Il a un port retombant et un aspect touffu. Les graines sont de plus petite taille, de forme irrégulière et à surface ridée couverte d'un tégument épais décoloré foncée qui varie du marron au noir (Ben Mbarek, 2011).



Figure 1 : Les types de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) kabuli et dési

1.1. Taxonomie et caractéristiques botaniques

Sur le plan taxonomique, le pois –chiche se rattache à la famille des: *Papilionacées*, genre *Cicer* et espèce *Cicer arietinum L* (Saxena et Singh ,1987). Sur le plan botanique, il est décrit comme une plante herbacée annuelle, dressée ou rampante couverte de poils glanduleux. Sa germination est du type hypogée (les cotylédons restent souterrains). Ses racines peuvent atteindre un mètre de profondeur, mais la plupart se trouvent dans les premiers centimètres (Duke, 1981). Sa tige anguleuse a une hauteur de 0.20 à 1 mètre de haut. Ses feuilles se composent de 7 à 17 folioles ovales et dentées. Les fleurs peuvent être blanches, bleues ou violettes; solitaires et pédonculées. Les gousses sont renflées à 1-2 graines presque rondes (Vander Maessen, 1972).

1.2. Cycle et saisons de la culture

Dans le bassin méditerranéen, le pois chiche est considéré comme une culture de printemps. En général, la plante se développe vigoureusement et complète son cycle évolutif en 4 mois (Bryssine, 1955). C'est une plante rustique connue pour sa résistance à la sécheresse (Singh, 1988).

1.3. Maladies du pois chiche

Dans plusieurs pays, la production du pois chiche est limitée par l'action de plusieurs facteurs de stress dont les plus importants restent les maladies causées par une large gamme d'organismes phytopathogènes comprenant des champignons, des bactéries et des virus (Haware *et al.*, 1986). Certaines d'entre elles sont économiquement importantes puisqu'elles sont responsables d'une réduction des rendements. Il s'agit :

- du nanisme d'origine virale (Haware, 1988).
- de l'anthracnose, maladie foliaire induite par *Ascochyta rabiei* (Haware *et al.*, 1986).
- du complexe de flétrissements et de pourritures radiculaires.

1.3.1. Le flétrissement vasculaire du pois chiche

Cette maladie est la plus redoutable et la plus dévastatrice du complexe de flétrissement et de pourritures radiculaires dans de nombreuses zones productrices du pois chiche. Initialement rapportée en Inde, elle a été observée en Iran, en Syrie, au Pakistan, au Chili, en Éthiopie, au Pérou, en Espagne, aux États-Unis, en Tunisie, en Algérie et au Maroc (Rhrib, 1990). Les pertes qu'elle occasionne sont variables et importantes ; elles ont été estimées 10-15% du rendement annuel en Inde (Nene et Haware, 1980) et supérieures à 40% en Tunisie (HaliIa *et al*, 1984) elles sont plus marquées quand le flétrissement survient au stade plantule (Haware, 1988).

2. Les moisissures

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes (Meyer *et al.*, 2004). uni- ou pluri- cellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) (Chabasse *et al.*, 2002). L'appareil végétatif des champignons est un thalle composé de filaments (hyphes) ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium. Ils se reproduisent grâce à des spores. Celles-ci sont issues soit d'une reproduction sexuée (champignon téléomorphe) ou d'une multiplication asexuée (champignon anamorphe) (Cahagnier *et al.*, 1998). Ils sont ubiquitaires et les aliments sont généralement des milieux très favorables à leur développement. Plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques dont certains, les mycotoxines (Meyer *et al.*, 2004).

2.1. *Fusarium oxysporum*

Le *Fusarium oxysporum* est un parasite tellurique doué d'une vie saprophytique. Par ses organes de résistance, les chlamydospores, il est capable de survivre pendant plusieurs années dans les conditions les plus défavorables, en absence de plante hôte (Kommedhal *et al.*, 1970), pouvant même coloniser des zones profondes du sol cultivé; c'est le cas de la forme spéciale *ciceri* (Haware *et al.*, 1986). Cette situation rend compte des difficultés rencontrées quand les moyens de lutte chimique sont préconisés. De plus, il est connu que des formes spéciales comme *melonis* (Rodriguez, 1960) et *ciceri* (Rhrib, 1990), sont responsables de flétrissement vasculaire de pois chiches (Trapero-Casas et Jimenez-Diaz., 1985).

2.1.1. Taxonomie et caractéristiques morphologiques

Le *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Ciceri* appartient aux Hyphomycètes, à l'ordre des Moniliales. C'est un Deutéromycète qui prend sur milieu PSA ("Potato Sucrose Agar") et à 25°C un aspect blanc cotonneux devenant rugueux en culture plus âgée (Haware *et al.*, 1986). Ses hyphes sont septés et ramifiés. Les microconidies ovales, droites, ou incurvées sont portées par des conidiophores courts ou latéralement par les hyphes. Les macroconidies, moins nombreuses et portées par des conidiophores ramifiés ont 3 à 5 septa; elles sont fusoides et pointues aux deux extrémités. Des chlamydospores se forment dans les cultures âgées (**Figure 2**) (El Aoufir, 2001).

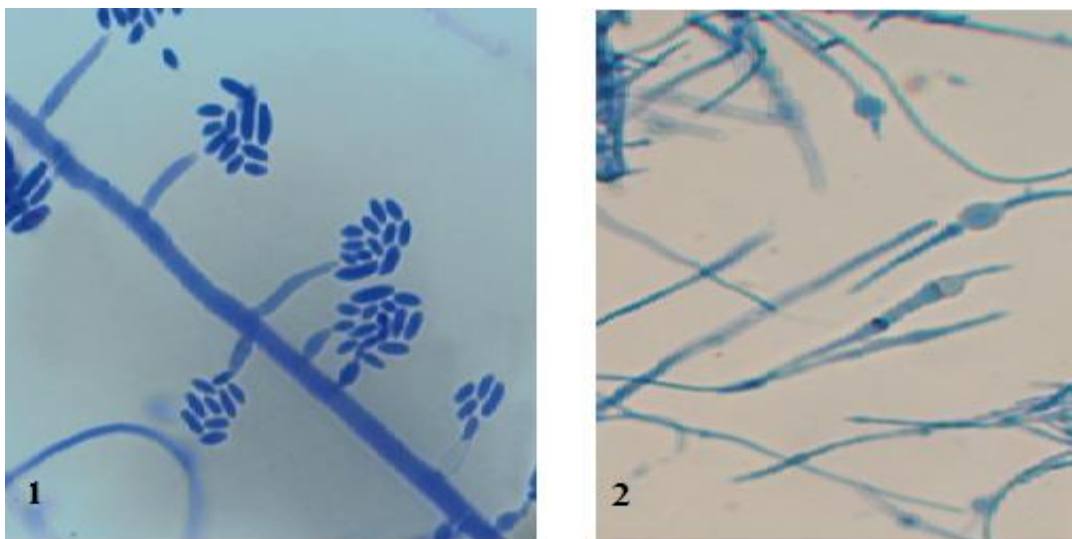


Figure 2: Mycoconidies asymétriques, légèrement incurvées, disposés en amas à l'extrémité de monophialides solitaire (1), de chlamydospores sont parfois observées (2). (Chabasse *et al.*, 2002).

2.1.2. Épidémiologie et cycle évolutif de la maladie

L'infection primaire se fait au moyen des chlamydospores (Haware *et al.*, 1986). Leur germination dans le sol peut être inhibée par les exsudats des racines du pois chiche, phénomène qui a son importance dans la résistance de la plante à la maladie (Haware et Nene, 1984). Le tube germinatif qui s'introduit à travers l'épiderme du système racinaire envahit les vaisseaux du xylème. Le développement du champignon (mycélium et conidies) obstrue ces vaisseaux, ce qui induit par conséquent un flétrissement des plantes accompagné d'une coloration des tissus vasculaires (Gupta *et al.*, 1986). L'infection s'accompagne d'une réduction de la chlorophylle et parallèlement d'une augmentation des acides organiques, des polyphénols et des hydrates de carbone. Les symptômes peuvent se manifester à deux stades de développement de la culture (Haware, 1988). Ils apparaissent au stade plantule, trois semaines après le semis: les feuilles des plantes affectées montrent une flaccidité suivie d'une coloration vert terne et d'un dessèchement conduisant à la mort précoce de la plante. Il s'agit d'un flétrissement typique. Les symptômes peuvent se manifester aussi chez les plantes adultes sous forme d'un jaunissement progressif de bas en haut avec une nécrose des folioles. Il s'agit d'un flétrissement tardif appelé aussi jaunissement vasculaire (Cabrera de la Collina *et al.*, 1985) (**Figure 3**).



Figure 3 : Une plante de pois chiches déracinés affectée par la fusariose, montrant clairement des symptômes de jaunissement typiques (Singh *et al.*, 1987).

3. Les Méthodes de lutte contre les agents pathogènes

La lutte contre les agents pathogènes des plantes passe par l'utilisation de plusieurs méthodes dont les plus connues sont.

3.1. La lutte culturale

C'est un ensemble de mesures visant à prévenir les maladies et limiter les risques d'infection. Ces mesures consistent à l'arrachage et la destruction des débris et des plantes hôtes, à l'utilisation des semences indemnes, à la rotation des cultures, à maintenir une fertilisation équilibrée et à appliquer une densité de semis adéquate (Sanou, 2004). Le nettoyage du champ après la récolte et avant le début de la saison réduit considérablement l'inoculum primaire dans le champ (Marley *et al.*, 2005),

3.2. La lutte chimique

La lutte chimique est la méthode la plus employée parce qu'elle permet d'avoir des résultats spectaculaires (Sanou, 2004). Cependant, l'utilisation des produits de synthèse a des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé humaine donc un handicap majeur à leur utilisation.

3.3. Lutte génétique

L'utilisation de variétés résistantes constitue la méthode la plus recommandée qui donne de meilleurs résultats parce que la plante est habilitée à lutter contre les champignons sans l'aide d'une autre substance (Garrier, 2009).

3.4. La lutte biologique

La lutte biologique par l'utilisation des antagonistes ou des substances naturelles connaît un regain d'intérêt grandissant en raison des risques potentiels de la lutte chimique sur l'environnement et les perspectives nouvelles qu'offre cette approche pour la culture biologique (INRA, 2005).

4. Les plantes et le stress oxydant

Les plantes sont souvent confrontées à des conditions environnementales défavorables qu'on peut dénommer « stress » et qui ont pour conséquence une diminution de la croissance. Tous les stress impliquent des réactions de signalisation capables d'aboutir à la mise en place de défenses ou de déclencher une mort cellulaire programmée. La mort cellulaire induite par le stress a été la plus étudiée dans le cas des interactions plantes-pathogènes, où il a été établi que les modifications redox, surtout liées à la production de formes actives d'oxygènes comme le H_2O_2 jouent un rôle important. Un rôle clé pour le H_2O_2 est soutenu par l'observation que des plantes déficientes en catalase, enzyme importante dans le métabolisme de cette molécule, produisent des lésions similaires à celles induites lors de la réponse hypersensible (Queval *et al.*, 2007).

4.1. Définition

Dans les systèmes biologiques, l'oxygène est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est cruciale puisqu'elle apporte à la cellule la majorité d'énergies nécessaire (sous forme d'adénosines triphosphate (ATP) pour assurer ses multiples fonctions (Favier, 2003). Le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre en faveur des espèces pro-oxydantes (radicaux libre) par rapport au système de défense de l'organisme (antioxydants) contre ces substances. Ce déséquilibre a pour conséquence l'apparition des dégâts souvent irréversibles pour les cellules (Delattre *et al.*, 2005).

4.2. Les radicaux libres

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif (Vansant, 2004). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003) (**Figure 4**)

Les principales sources des radicaux libres sont soit endogènes ou exogènes.

4.2.1. Les sources endogènes

- La mitochondrie est la principale source de ROS (Espèces réactifs de l'oxygène) par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90 % des ROS cellulaires (Balaban *et al.*, 2005).
- les enzymes tels que ; la catalase (Belviranli et Gökbel, 2006). La xanthine oxydase (XO) (Harrison, 2002). Le NADPH oxydase (NADPHO) (Krause, 2004).
- Les ions métalliques : comme le fer et le cuivre sous leur forme réduite (Ahmad, 1995).

4.2.2. Les sources exogènes

Un certain nombre de facteurs environnementaux, tels que l'ultraviolette et les rayonnements ionisants peut stimuler la production endogène des radicaux libres après interaction avec les tissus ou cellules (Bartosz, 2003). Diverses autres sources exogènes contribuent directement ou indirectement à la charge totale de l'oxydant. Il s'agit notamment des effets de la pollution atmosphérique et les gaz toxiques naturels, ainsi que les produits chimiques et les toxines. En outre, les micro-organismes étrangers induisent la formation d'oxydants secondaires et la libération dans l'hôte, en plus de leurs capacités parfois d'oxydation directe (Lykkesfeldt et Svendsen, 2007).

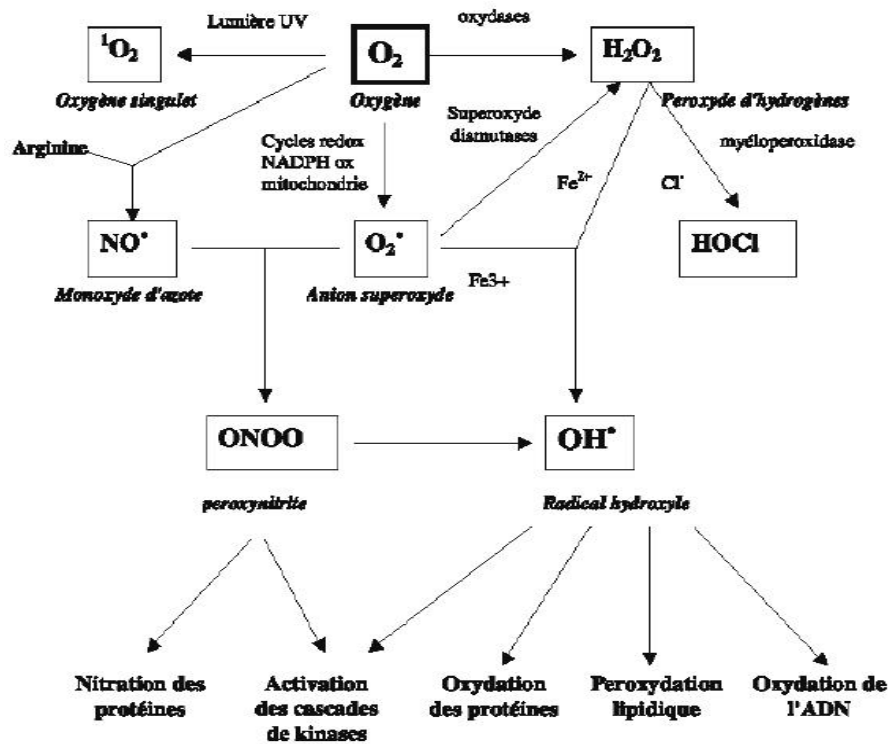


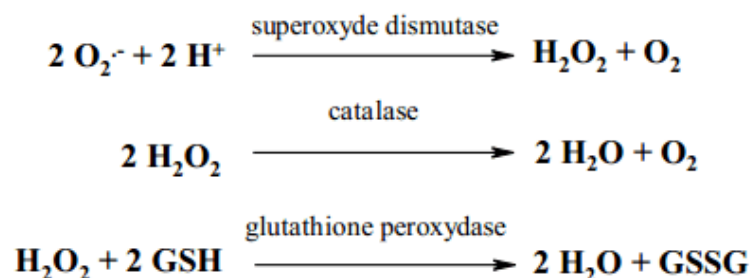
Figure 4: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

4.3. Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (Boyd *et al.*, 2003), ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Vansant, 2004).

4.3.1. Antioxydants enzymatiques

- Le superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 .
- La catalase est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.
- La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion disulfure (GSSG) (Ahmad, 1995).



4.3.2. Antioxydants non enzymatiques

- La vitamine E se fixe à la membrane cellulaire et inhibe la chaîne de réactions de peroxydation lipidique en capturant un radical lipidique peroxy (LOO^\cdot) (Evans, 2000).
- La vitamine C (l'acide ascorbique) est une vitamine hydrosoluble, qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut capter directement O_2^\cdot et OH^\cdot . Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Packer *et al.*, 1997).
- Les caroténoïdes sont très nombreux et représentent la principale source de rétinol. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Krinsky, 1993).
- Les polyphénols sont des métabolites secondaires peuvent prévenir l'oxydation des biomolécules (Meyer *et al.*, 1997). Ces composés peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ROS (Halliwell, 1994).

5. Les métabolites secondaires

Les composés produits par les plantes sont subdivisés en deux groupes de molécules : les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

- Les métabolites primaires sont des composés ubiquistes et nécessaires aux processus vitaux, comme les sucres simples, les acides aminés, les lipides et les acides nucléiques. Ils ont un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement végétal. Ils se retrouvent dans toutes les espèces.
- Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec le stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction. Ils sont différents dans les différentes espèces (**Tableau I**) (Buchanan, 2000).

Tableau I : Les trois types de métabolites secondaires

Famille	Voie de Biosynthèse	Nombre de molécules
Terpénoides	Isopentenyl diphosphate (IPP)	25000
Alcaloïdes	Acides aminés	12000
Composés phénoliques	Acide shikimique et acétate/malonate	8000

5.1. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte (**Figure 5**) (Hernandez-Ochoa, 2005). Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. Les extraits de ces molécules sont employés comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Nombre d'entre eux possèdent des propriétés antiseptiques (Klaas *et al.*, 2002).

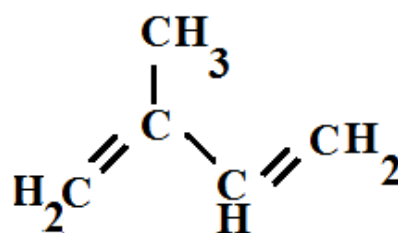


Figure 5: Structure de la molécule d'isoprène (Calsamiglia *et al.*, 2007)

5.2. Les alcaloïdes

Le terme alcaloïde a été introduit au début du XIX^{ème} siècle par W. Meisner (Zenk et Juenger, 2007). Il n'existe pas de définition simple et précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes et d'autres métabolites azotés naturels. Il est admis qu'un alcaloïde est un composé organique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué à faible dose (Bruneton, 1999).

5.3. Les composés phénoliques

Près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille; ils comportent un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyl (Stalikas, 2007). Les composés phénoliques peuvent avoir des fonctions essentielles dans la reproduction et le développement des plantes, de plus ils possèdent des potentialités thérapeutiques (Adom *et al.*, 2005).

5.3.1. Classification des composés phénoliques

- Les acides phénoliques : sont contenus dans un certain nombre de plantes médicinales (Psotová *et al.*, 2003). Comme ; acide chlorogénique, acide caféique, acide protocatéchique, acide vanillique, acide férulique, acide sinapique et acide gallique (Hale, 2003). Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des activités biologiques (Psotová *et al.*, 2003).

- Les tannins : sont des molécules de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da. Ils sont présents dans les feuilles, les fleurs et les graines des plantes (Watterson et Butler, 1983). Les tanins constituent un mécanisme de défense des plantes contre les pathogènes, les herbivores et des conditions environnementales hostiles et peuvent donc se retrouver dans les déchets verts. Deux groupes de tanins peuvent être distingués : Les tanins hydrolysables et les tanins non-hydrolysables ou condensés (proanthocyanidine et phlorotannins) (Kogel-Knabner, 2002).

- Les flavonoïdes : L'appellation « flavonoïdes » rassemble une très large gamme de composés phénoliques formés par un squelette de base de 15 atomes de carbones (Dominick *et al.*, 2008) (**Figure 6**). Ces composés représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié : plus de 4000 flavonoïdes ont déjà été identifiés. (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006). Les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles végétaux (Havsteen, 2002), assurant ainsi la protection des tissus contre les agressions des ultraviolets (Rajne rayanama *et al.*, 2001).

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) (Havsteen, 2002). Les flavonoïdes se répartissent en quinze familles de composés, dont les plus importantes sont les suivantes : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, isoflavones, isoflavanones, chalcones, auronés et anthocyanes (Harborne et Williams, 2000).

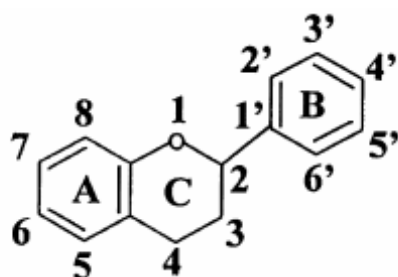


Figure 6: Structure générale des flavonoïdes (Tim Cushnie et Lamb, 2005).

6. Utilisation des plantes en protection des végétaux

Les pesticides naturels sont des produits obtenus à partir des plantes. Ils sont généralement moins dangereux et plus spécifiques pour la cible visée par rapport aux pesticides conventionnels (Garrier, 2009). En effet, la cendre ou les parties de la plante (feuilles, fruits, racines, écorce), ou même la plante entière était utilisée pour la protection des récoltes. Ces pratiques exploitent les propriétés des plantes que leur confèrent des métabolites secondaires actives qu'elles contiennent. L'identification de ces composés et leurs propriétés ainsi que leur localisation dans la plante permettent leur exploitation (Soalla, 2011).

6. 1. Activités biologiques des métabolites secondaires

Les plantes étant immobiles, elles ont dû mettre en place un système de résistance pour combattre les effets de l'environnement et conserver leur forme. Il semblerait notamment que les métabolites secondaires ont un effet protecteur contre le stress attribué à la sécheresse, permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme d'aluminium. Jouent un rôle important dans la protection contre les UV et en protégeant ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles (Treutter, 2005).

Les métabolites secondaires sont souvent des molécules de défense contre les organismes pathogènes (bactéries, virus, champignons), contre les parasites et les insectes. Leur capacité antioxydante peut aussi expliquer un certain nombre de propriétés thérapeutiques (Crozier *et al.*, 2009). Ces molécules de défense peuvent être divisées en deux groupes : ceux préformés, sont des composés synthétisés durant le développement normal de la plante. Ils sont souvent accumulés à des endroits stratégiques de la plante pour la défense, et ceux dont la synthèse va être induite par un phénomène physique, une infection ou un stress. Ils peuvent être présents de manière constitutive, mais leur synthèse va être augmentée par un facteur déclenchant, ou sont uniquement biosynthétisés après une agression et dans ce cas on parle de phytoalexines (Vanetten *et al.*, 1994).

6.1.1. Activité antifongique

Les métabolites secondaires notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis les microorganismes (Cowan, 1999 ; Ortuno *et al.*, 2006). Il paraît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique. De plus, la présence d'une chaîne isoprène apparaît comme importante pour l'activité mais pas essentielle (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008). L'addition de groupements alkyls au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques paraît donc requis pour exprimer une caractéristique antifongique optimale (Chao *et al.*, 2000).

7. *Reichardia picroides* (L.) Roth (*Picridium* Desf.)

Reichardia picroides L. est une plante d'un grand intérêt dans la médecine traditionnelle. Elle est largement distribuée dans la région méditerranéenne particulièrement en Algérie.

La plante est connue par plusieurs appellations; (Arabe) : Alhalhal, (Anglais): Common Brighteyes, Common Reichardia, French Scorzonera (Français) : Cousteline, Reichardie.

7.1. Description botanique

Reichardia picroides est une plante vivace, glabre et glauque à racine pivotante ; tiges de 25-50cm. dressées, rameuses, assez longuement nues supérieurement ; feuilles inférieures pennatifides ou pennatipartites, les suivantes embrassantes à larges oreillettes arrondies, lancéolées, entières ou dentées ; pédoncules monosépales très allongés écailleux au sommet, un peu renflés sous capitule ; achaines brunâtres longs de 2 mm. Fleurs ligulées, hennaphrodites. Involucre campanulé, urcéolé et fortement rétréci au-dessus des akènes. Bractées sur plusieurs rangs, imbriquées, plus courtes à l'extérieur, membraneuses sur les bords et calleuses au sommet. Akènes dimorphes, non rostrés, les externes gros, prismatiques, à 4-5 angles épais et crénelés; les internes généralement stériles, lisses. Aigrette à soies lisses, blanches, nombreuses et caduques toutes ensemble. Pédoncules avec quelques écailles semblables aux bractées. (incl. *P. maritimum* Batt. Non Ball.). (Quezel et Santa, 1963).



Figure 7: *Reichardia picroides* (L.)

7.2. Nomenclature de la plante

Règne :	<i>Plantae</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre :	<i>Asterales</i>
Famille :	<i>Asteraceae</i> (<i>Compositae</i>)
S/famille :	<i>Cichorioideae</i>
Tribus :	<i>Cichorieae</i>
S/tribus :	<i>Hyoseridinae</i>
Genre :	<i>Reichardia</i>
Espèces :	<i>R.picroides</i>
S/empèse :	eu-picroides

7.3. Composition chimique

L'extraction méthanoïque des parties aériennes de *R. picroides* permet d'isolé 15 substances, neuf flavonoïdes glycosides : Luteolin-7-O-glucoside, Luteolin-7- O-rhamnoside, luteolin-7-O-rutinoside, luteolin-7-O-galactosylglucoside, Luteolin-3" 7- Oliglucoside, Luteolin-4' – Olalucoslde, Apigenin-7- O-glucoside, Apigenin-7- O-rutinoside, Apigenin-7-O neohesperidoside et quatre acides phénoliques : acide caféique, acide Chlorogénique, acide Isochiorogémique, 3,4- acide Dicafeoylquinique (Recio *et al.*, 1992).

7. 4. Utilisation en médecine traditionnelle

Les applications de la plante entière sont très vaste, généralement elle est récoltée en fleurs et séchée pour une utilisation ultérieure pour le traitement de grand nombre de pathologies d'origine infectieuse, inflammatoire et tumoral.

Matériels Et Méthodes

1. Matériels

1.1. Matériels biologiques

La plante *Reichardia picroides* Roth. a été récoltée au mois de mars 2013, de la région de Bougaà (Wilaya de Sétif, Algérie). Elle a été identifiée par Pr. B. OUDJHIH, université Elhadj Lakhdar (Batna). Les racines et les feuilles ont été nettoyées séparément puis mises à sécher dans un endroit aéré à température ambiante et à l'abri de la lumière pour mieux conserver les molécules sensibles à la chaleur et à la lumière. Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction.

La souche fongique « *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ceciri* » a été obtenue auprès du laboratoire de phytopathologie de l'Université de Mouhamed el Bachir el Ibrahimy -Bordj Bou Arreridj-.

1.2. Appareils et produits chimiques

- Plusieurs réactifs chimiques ont été utilisés, parmi ces produits: quercétine, acide gallique, butylated hydroxytoluene (BHT), Gentamicine, $AlCl_3$, β -carotène, acide linoléique, Tween 40, proviennent tous de Sigma-Aldrich, l'eau physiologique, l'eau distillé stérile, Méthanol, chloroforme ont été obtenus de Prolabo. Le milieu de culture est le milieu de base Potato Dextrose Agar (PDA) qui a été préparé au niveau de laboratoire.

- Évaporateur (Germany, BÜCHI461), Agitateur magnétique (GP SELECTAS ACE), Etuve (Memmert), Bain marie (Memmert), Autoclave, Bec benzène, Balance à précision (Kern), la hote (EQUIPLABO), Vortex (Top Mix), Spectrophotomètre visible.

2. Méthodes

2.1. Extraction des polyphénols

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée selon la méthode de Markham (1982). Suivant cette méthode, 100 g de la poudre des racines et de feuilles ont été émergés séparément dans un litre de solvant (méthanol 85%). Le mélange a été soumis à une agitation pendant une nuit à 4°C. Le mélange a été filtré sur l'aine de verre, puis sur un papier filtre pour obtenir le premier filtrat. Cette procédure a été répétée sur le résidu avec du méthanol 50% sous agitation pendant 4h pour obtenir le dernier filtrat. Le premier et le dernier filtrat ont été combinés puis soumis à une évaporation rotative à 45 °C pour éliminer le méthanol afin d'obtenir l'extrait brut, EBr. (Figure 8)

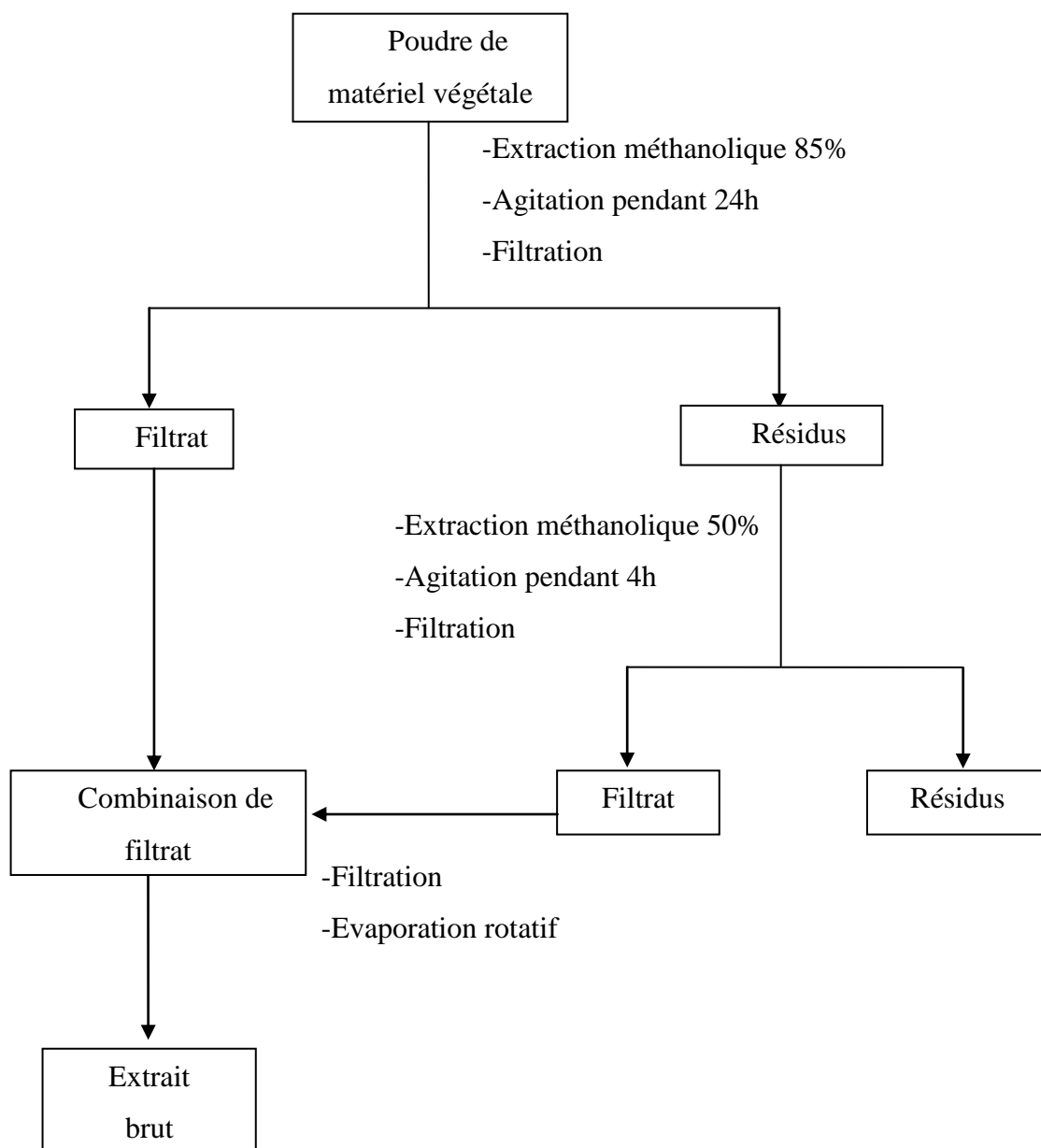


Figure 8: Procédure d'extraction des flavonoïdes de *Reichardia picroides* (Markham, 1982).

2.2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols dans les EBr de *R. picroides* a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Cette méthode consiste à réduire l'acide phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) (Réactif de Folin-Ciocalteu) par les groupes hydroxyles phénoliques, qui aboutit à la formation d'un produit bleu en solution alcaline. Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 μl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 μl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (20-100 $\mu\text{g/ml}$) et est exprimée en μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait) (**Figure 9**).

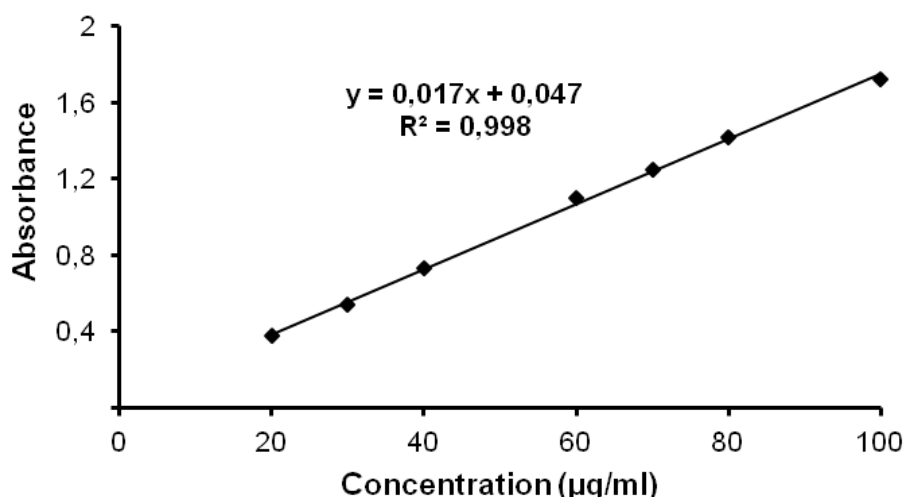


Figure 9 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures).

2.3. Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les EBr de *R. picroides*. 1 ml d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) est ajouté à 1 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la Quercétine (1-40 $\mu\text{g/ml}$) et est exprimée en microgramme d'équivalent de Quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg d'extrait) (**Figure 10**).

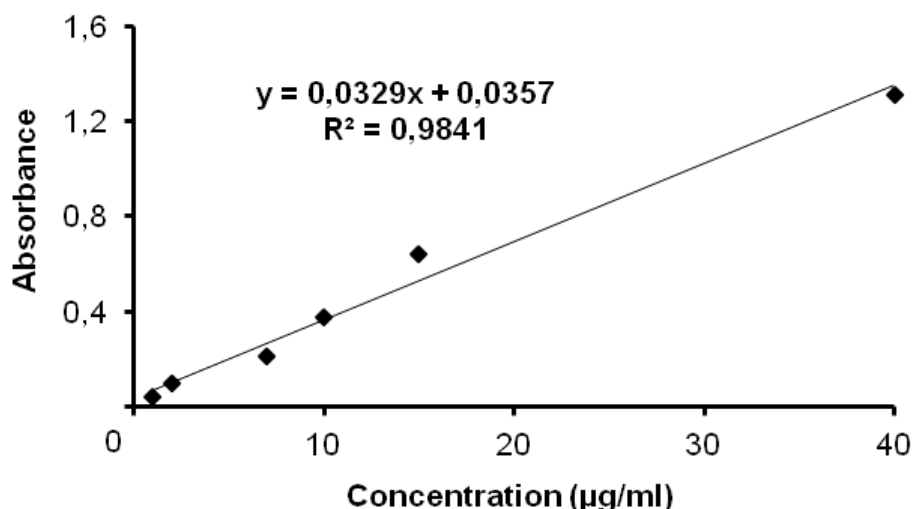


Figure 10 : Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois mesures).

2.4. Test de blanchissement du β -carotène des extraits de *R. picroides*

Dans ce test la capacité antioxydante des extraits de *R. picroides* est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Aslan et ses collaborateurs (2006). L'émulsion de β -carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 0,5 mg de β carotène dans 1 ml du chloroforme, 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont additionnés, le chloroforme est complètement évaporé, par la suite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement. 350 μ L de solution d'extraits ou d'antioxydants standard (BHT) solubilisé dans le méthanol (2 mg/ml) sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion précédente.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350 μ l de méthanol) est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 24 heures. Le pourcentage de l'activité antioxydante relative des extraits (AA%) est calculé selon l'équation suivante :

$$AA\% = \text{Abs (échantillon)} / \text{Abs (BHT)} * 100$$

2.5 Activité antifongique

2.5.1. La souche fongique

La souche fongique *Fusarium oxysporum f. sp. Ceciri* a été obtenue auprès du laboratoire de phytopathologie de l'Université de Bordj Bou Arreridj. La culture pour l'espèce fongique a été maintenues dans le milieu Potato Dextrose Agar (le PDA : 200 g de pomme de terre, 20 g de glucose, 15 g d'agar-agar, 1000 ml d'eau distillée) inclinées et conservées à 4°C.

2.5.2. Méthodes de contact direct

La méthode de contact direct est utilisée en vue de déterminer les extraits actifs par l'évaluation du taux d'inhibition selon la méthode de Fandohan *et al.*, (2004).

Les solutions mères de 100 mg/ml de l'EBr de *R. picroides* sont préparés dans l'eau distillée stérile (Fadel *et al.*, 2011) afin de préparer une gamme de concentration de 0.075 à 100 mg/ml. Un volume de 500 µl de chaque concentration des l'EBr de *R. picroides* est incorporé séparément dans des tubes contenant 20ml du milieu PDA maintenu en surfusion. Par la suite chaque tube est homogénéisé instantanément par agitation manuelle puis son contenu est coulé dans une boîte de pétri. Un disque mycélien de 6mm de diamètre prélevé de la culture jeune du mycète a été inoculé. Après cinq jours d'incubation à (25 ± 2) °C la lecture des résultats a été effectuées par mesure du diamètre de la zone de croissance.

Parallèlement, le diamètre de la zone de croissance de la même souche fongique en absence d'extrait dans les mêmes conditions précédentes est déterminé. L'effet antifongique des extraits sur la croissance des souches filamenteuses est déterminé par la mesure du taux d'inhibition de la croissance en utilisant la formule d'Ebbot (Motiejūnaitė et Peičulytė, 2004) :

$$T = (Dk - D0) / Dk \times 100$$

Dk : Diamètre de la colonie fongique du témoin (en mm)

D0 : Diamètre de la colonie fongique en présence de l'extrait (en mm)

T : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage

Les résultats obtenus sont comparés à ceux de témoin en absence d'extrait.

L'extrait est dit :

- Très actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100 %, la souche fongique est dite très sensible.
- Actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 75 %, la souche fongique est dite sensible.

- Moyennement actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 50%, la souche est dite limite.
- Peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 25%, la souche est dite peu sensible ou résistante.

2.6. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SD (déviation standard) (Trois répétitions). Les résultats ont été analysés par le test de student pour la comparaison des résultats en présence des extraits avec le contrôle positif. La différence a été considérée statistiquement par le programme GraphPad Prism significative lorsque la valeur de p est ≤ 0.05 .

Résultats et Discussion

1. Extraction des polyphénols

La préparation des extraits des racines et des feuilles de *R. picroides* a été réalisée selon la méthode Markham (1982) en utilisant le méthanol 85%. Dans cette extraction, le méthanol a été utilisé pour obtenir l'EBr en raison de sa polarité qui permet de plus efficacement extraire les métabolites secondaires (Mohammedi et Atik, 2011). Le calcul de rendement par rapport au poids de la poudre a montré que l'EBr.F et l'EBr.R représentent un rendement assez proche (24.34% et 23.86%, respectivement) (**Tableau II**). Recio et ses collaborateurs (1992) ont réalisé l'extraction méthanolique de la partie aérienne de *R. picroides* par Soxhlet où un rendement de 8.5% a été trouvé, qui est plus faible que celui trouvé en utilisant la méthode de Markham (24.34%).

Tableau II: Le rendement des extraits de *R. picroides* et ses teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

Extraits	Rendement%	A	B
EBr.F	24.34	72.40 ± 1.04	18.53 ± 0.90
EBr.R	23.86	41.88 ± 0.43	1.19 ± 0.14

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3). **A.** Teneurs en phénols totaux (µg EAG /mg d'extrait)
B. Teneurs en flavonoïdes totaux (µg EQ /mg d'extrait).

2. Analyse des extraits de *R. picroides*

Les composés phénoliques forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta *et al.*, 2005). Et comme la majorité des effets biologiques des plantes est dû à ces substances, et qui sont l'un des principaux contributeurs à l'activité antioxydante et antifongique (Harbone et Williams, 2000), le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des deux extraits bruts de *R. picroides* a été effectué.

2.1. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007), qui a été choisie pour les raisons suivantes ; (i) c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, (ii) la méthode est bien standardisée, (iii) la grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré, (iv) c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche à travers le monde (Huang *et al.*, 2005).

La courbe d'étalonnage obtenue montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations (**Figure 10**). La quantité de polyphénols a été exprimée en μg GAE / mg d'extrait.

D'après les résultats présentés dans le **Tableau II**, l'EBr.F est significativement le plus riches en polyphénols ($72.40 \pm 1.04 \mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait) par rapport à l'EBr.R ($41.88 \pm 0.43 \mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait) ($P \leq 0.05$). Il a été rapporté dans une étude sur 133 plantes médicinales (Surveswaran *et al.*, 2007) que l'extrait de feuilles de *R. picroides* a montré une teneur en polyphénols plus élevée (1.76 g/100g) que celle trouvée dans les feuilles d'*Artemisia obrotanum* (0.49 g/100g). D'autre part, l'extrait des racines de *R. picroides* a révélé une teneur en polyphénols (1.00 g/100g) similaire à celle trouvée dans *Anacyclus pyrethrum* (0.92 g/100g).

2.2. Teneur en flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des polyphénols naturels les plus importantes (Djeridane *et al.*, 2010). La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996), méthode simple, peu coûteuse et offrent une sensibilité ce qui le rend plus pratique dans le contrôle de qualité et les laboratoires d'analyse. En outre, cette méthode permet de déterminer la teneur totale en flavonoïdes même en présence d'autres composés polyphénoliques qui ne forment pas des complexes avec AlCl_3 (Matyushchenko et Stepanova, 2003).

La teneur en flavonoïdes est exprimée en équivalent microgramme de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg d'extrait). Les résultats ont montré que l'EBr.F représente la teneur la plus élevée ($18.53 \pm 0.90 \mu\text{g}$ EQ /mg E) par rapport à l'EBr.R ($1.19 \pm 0.14 \mu\text{g}$ EQ / mg d'extrait) (**Tableau II**). D'autre manière, la teneur de l'EBr.F en flavonoïdes est égale environ 15.6 fois celle de l'EBr.R

3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *R. picroides*

La technique de blanchissement du β -carotène permet d'évaluer l'activité antioxydante des extraits spectrophotométriquement par l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique en suivant la décoloration du β -carotène à 490 nm. Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur (Tepe *et al.*, 2005). En absence des antioxydants, les radicaux libres formés provoquent l'oxydation du β -carotène et donc sa décoloration. Par contre, la présence des antioxydants dans l'extrait minimise l'oxydation du β - carotène qui conserve sa couleur (Tepe *et al.*, 2005). La cinétique de blanchissement du β - carotène en absence et en présence des extraits de *R. picroides* et d'antioxydant standard (BHT) a été suivie (**Figure 11**).

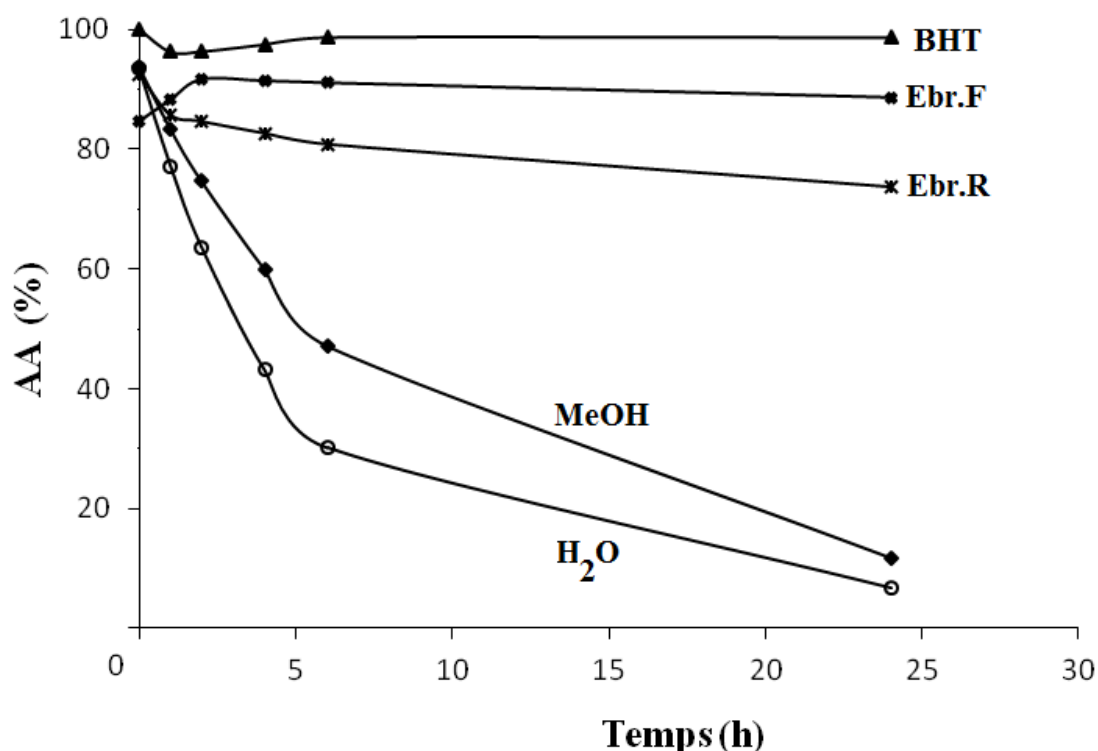


Figure 11: La cinétique de l'activité antioxydante des extraits de *R. picroides* par rapport au BHT, MeOH et H₂O par le test de β -carotène / acide linoléique. (Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 3)).

Le BHT utilisé comme contrôle positif montre une courbe sous forme d'un plateau ce qui explique son pouvoir antioxydant très efficace ($98.66 \pm 0.50\%$), tandis que le méthanol et l'eau distillé ne présente presque aucun effet ($11.73 \pm 4.45\%$ et $5.59 \pm 0.35\%$, respectivement). En comparaison avec le standard les extraits inhibent efficacement le blanchissement du β -carotène ou l'EBr.F présente l'activité antioxydante la plus élevée ($88.63 \pm 0.59\%$), qui est significativement supérieure à celle de l'EBr.R ($73.65 \pm 2.13\%$) ($p < 0.05$) (**Figure 12**)

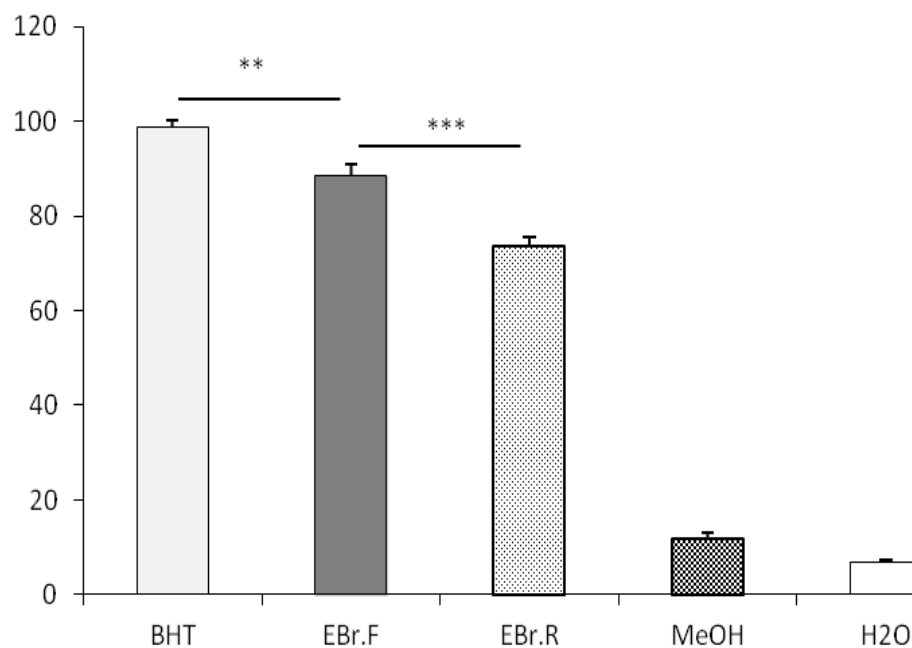


Figure 12: Activité antioxydante des extraits de *R. picroides* à 24 h, par le test de β -carotène / acide linoléique. EBr.F : l'extrait brut des feuilles ; EBr.R : l'extrait brut des racines. (Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3). $p < 0.05$).

Cette activité antioxydant peut être dû à la teneur élevée en polyphénols de l'EBr.F par apport à l'EBr.R, ce qui en accord avec les résultats trouvés par Baghiani et ses collaborateurs (2010) ; Boumerfeg et ses collaborateurs (2012) plus la teneur en polyphénols est élevée, l'activité antioxydante est élevée. Plusieurs études ont montré que l'effet antioxydant des sources naturels est dû à leurs composés phénoliques (Yang *et al.*, 2002). Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2006). Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène, paraît très utile

comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria *et al.*, 2006).

4. Activité antifongique des extraits

La formation de métabolites toxiques dans les plantes à la suite de leur attaque par des champignons peut être le résultat de trois mécanismes différents ; le champignon, en parasitant un végétal vivant, peut entraîner, soit une exacerbation de certaines réactions métaboliques de la plante, conduisant à des concentrations anormalement élevées d'un constituant habituel, soit la formation par le végétal de produits toxiques n'existant pas dans la plante saine (Le Bars, 1988). Le champignon peut transformer un composé peu ou pas toxique en un produit toxique (Le Bars, 1988). Dans la présente étude l'activité antifongique de l'EBr.F et l'EBr.R de *R. picroides* a été étudié vis-à-vis une souche mycélienne "*Fusarium oxysporum*" par la méthode de contact direct. Les résultats montrent qu'à des concentrations élevées des extraits bruts de *R. picroides* (5 à 100 mg/ml), les diamètres de croissance des colonies de *F. oxysporum* avec ceux de témoin ne présentent aucune différence. Cependant la diminution de la concentration des extraits dans le milieu de culture commence à donner des effets (**Tableau III**), (**Figure 13**). Les concentrations expérimentées appliquées sont 0.075 mg/ml, 0.3 mg/ml, et 1.25 mg/ml dont un volume de 500µl a été prélevé de chaque concentration et mis dans un volume de 20 ml PDA

Tableau III: Activité antifongique des extraits de *R. picroides* sur la croissance de *F.oxysporum*.

Témoin PDA	C (mg/ml)	EBr.F		EBr.R	
		D cr ch	I%	D cr ch	I%
		(mm)		(mm)	
40.5mm	0.075	36.33±0.577	10.29±1.42	38.33±0.29	5.35± 0.71
	0.3	31.33±0.577	22.63±1.42	35.33±0.577	12.75±1.42
	1.250	28.33±0.577	30.04 ±1.42	32.33±0.577	20,16±1.42

EBr.F : l'extrait brut des feuilles ; EBr.R : l'extrait brut des racines, PDA : milieu de culture; D cr ch ; diamètre de croissance de la colonie de champignon.

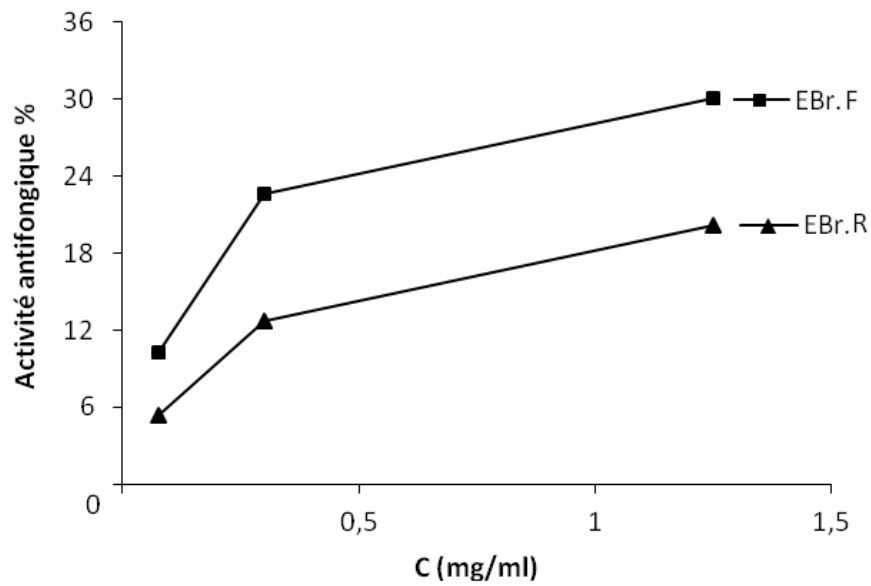


Figure 13: Activité antifongique des extraits de *R. picroides*. EBr.F l'extrait brut des feuilles EBr.R l'extrait brut des racines.

A des concentrations de 0.075 et 0.3 mg/ml de l'Ebr.F, le diamètre de croissance est diminué de 40.5 mm (témoin) à 36.33 ± 0.577 et 31.33 ± 0.577 mm, respectivement (**Figure 14**) et qui sont équivalents aux taux d'inhibition de $10.29 \pm 1.42\%$ et $22.63 \pm 1.42\%$, respectivement ; cet effet est supérieur à celui exercé par l'EBr.R dont les diamètres ont été de 38.33 ± 0.29 mm à la concentration 0.075 mg/ml et de 35.33 ± 0.577 mm à la concentration 0.3 mg/ml équivalents à $5.35 \pm 0.71\%$ et $12.75 \pm 1.42\%$, respectivement.

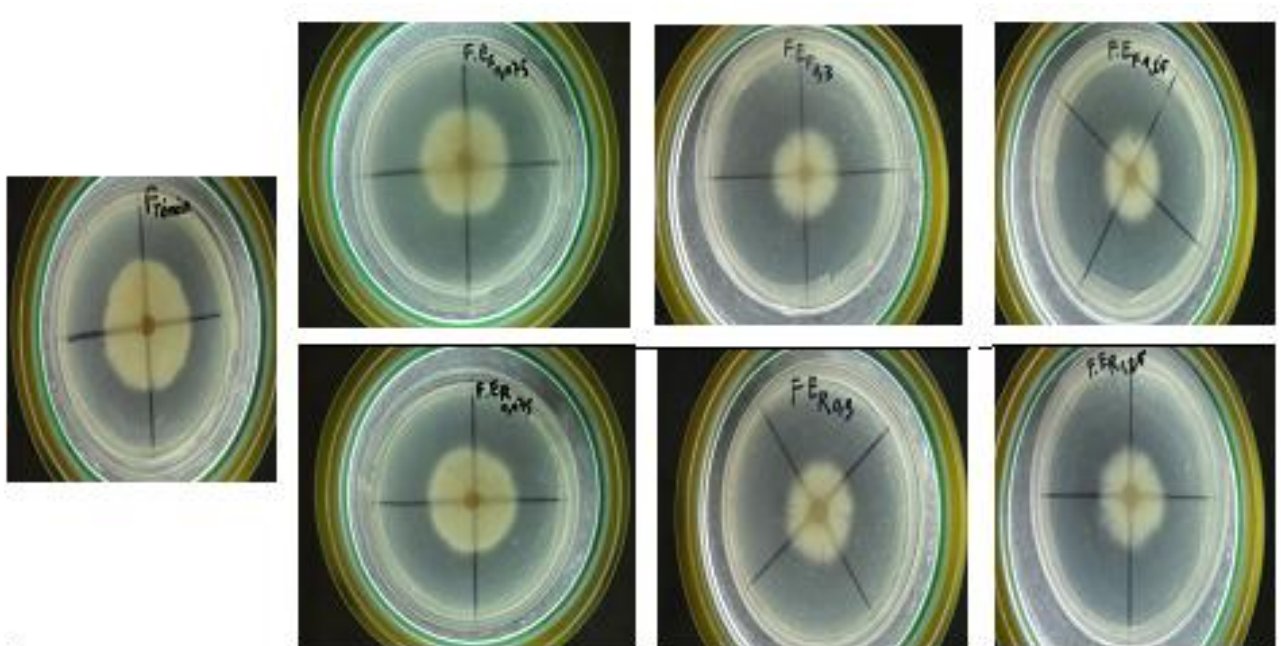


Figure 14 : Activité antifongique des extraits de *R. picroides*.

L'effet de l'EBr.F à 1.25 mg/ml est Moyennement actif sur la souche *F.oxysporum* où le pourcentage de réduction de la colonie est de $30.04 \pm 1.42\%$ qui est significativement ($p < 0.05$) supérieur à celui donné par l'EBr.R ($20,16 \pm 1.42\%$) (**Figure 15**).

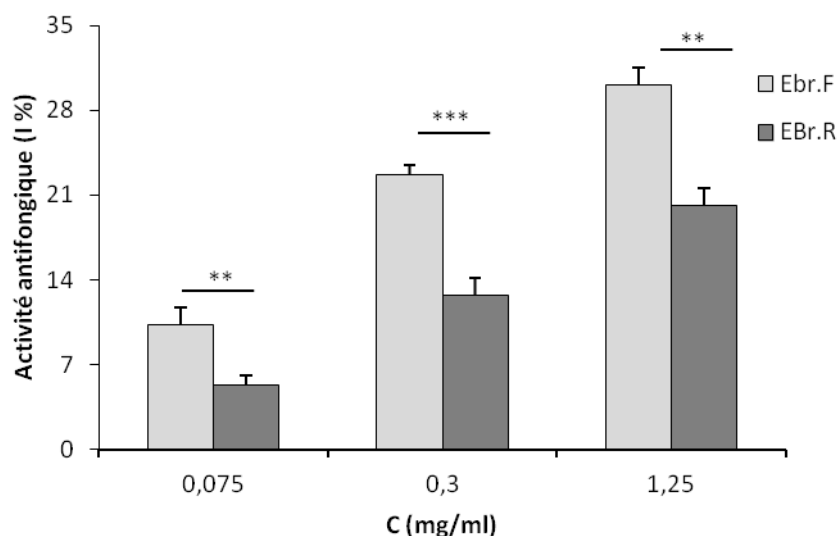


Figure 15 : Activité anifongique des extraits de *R. picroides*. (Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3). $p < 0.05$).

Ces résultats peuvent également être expliqués par la teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes de l'EBr.F ($72.40 \pm 1.04 \mu\text{g EAG/mg E}$ et $18.53 \pm 0.90 \mu\text{g EQ /mg E}$, respectivement) par rapport à celle de l'EBr.R ($41.88 \pm 0.43 \mu\text{g EAG/mg E}$ et $1.19 \pm 0.14 \mu\text{g EQ /mg E}$).

D'autre études comme celle réalisés par Bougandoura et Bendimared (2012), qui ont évalué l'activité antifongique de l'extrait méthanolique des feuilles de *Satureja calamintha* vis-à-vis *F. oxysporum* par la même méthode (méthodes de contact direct), ils ont trouvé un pourcentage d'inhibition plus élevé (66,66%) que celle de l'EBr.F du *R. picroides* ($30.04 \pm 1.42\%$), malgré que ce dernier a montré un rendement et une teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes plus élevé (24.34% , $72.40 \pm 1.04 \mu\text{g EAG /mg d'extrait}$, $18.53 \pm 0.90 \mu\text{g EQ /mg d'extrait}$, respectivement) que celle présenté par l'extrait méthanolique de *Satureja calamintha* (8,58%, $2,968 \pm 0,809 \mu\text{g EAG /mg de matière sèche}$, $1,280 \pm 0,077 \mu\text{g EC /mg de matière sèche}$, à l'ordre). Cela peut être dû à la nature des polyphénols qui constituent chaque extrait et la possibilité de l'effet synergique avec d'autres molécules non-phénoliques, ou bien il se peut que son activité soit masquée par la présence des sucres (Sanogo, 2006 ; Surveswaran *et al.*, 2007). Il a été rapporté que le caractère lipophile des composés naturel augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique. De plus, la présence d'une chaîne isoprène apparait comme importante pour l'activité mais pas essentielle (Jimenez-Gonzalez *et*

al., 2008). L'addition de groupements alkyls au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques paraît donc requis pour exprimer une caractéristique antifongique optimale (Chao *et al.*, 2000).

Conclusion

Le flétrissement vasculaire induit par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* (FOC) est considéré comme la maladie la plus grave du complexe de flétrissement et de pourritures racinaires qui affecte les cultures du pois chiche. L'utilisation massive de pesticides s'avère toxique non seulement pour les pathogènes, les plantes mais aussi les consommateurs. La recherche de nouvelles stratégies de prévention contre les maladies fongiques, comporte un intérêt majeur. Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques et protectives. La plante *Reichardia picroides* est parmi les plantes largement utilisées de nos jours en médecine traditionnelle en Algérie. Dans notre étude, les extraits bruts de *Reichardia picroides* semblent présenter un intérêt réel et potentiel par leurs activités antioxydantes et antifongique qui ont été établies *in vitro*. L'extraction méthanolique (85%) a permis d'obtenir des rendements d'extraits bruts des feuilles et des racines de *R. picroides* de 24.34% et 23.86%, respectivement. Effectivement, le dosage phytochimique en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu a permis de démontrer que ces extraits sont riches en composés phénoliques. De même le dosage des flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 a montré que l'EBr.R et l'EBr.F représentent des teneurs considérable de l'ordre de 1.19 ± 0.14 et 18.53 ± 0.90 $\mu\text{g EQ /mg}$ d'extrait, respectivement. Le test de β -carotène révèle que ces deux extraits sont très actives (le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β -carotène égal $88.63 \pm 0.59\%$ pour l'EBr.F et $73.65 \pm 2.13\%$ pour l'EBr.R) en comparaison avec le contrôle positif BHT ($98.66 \pm 0.50\%$, un composé connu par son activité antioxydante très forte). Par ailleurs, un test antifongique vis-à-vis le champignon « *F. oxysporum* f. sp. *Ciceri* » a été réalisé, les résultats ont montré que l'extrait brut de feuilles de *R. picroides* est moyennement actif vis-à-vis le champignon ($30.04 \pm 1.42\%$) tandis que l'extrait des racines est révélé peu actif ($20,16 \pm 1.42\%$) sur la même souche fongique ces résultats sont liés directement à la diversité quantitative des composés présents dans les extraits du *R. picroides*.

Notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches.

Les résultats obtenus de la présente étude restent préliminaires.

- Il serait intéressant de tester l'activité des fractions chromatographiées et d'isoler les molécules qui sous tendent les diverses activités détectées dans ces deux extraits.
- De plus, des études complémentaires approfondies concernant l'identification des composés phénoliques par des méthodes plus performantes sont nécessaires.

- Pour mieux évaluer le pouvoir antioxydant des extraits des études similaires *in vivo* seraient intéressantes et plus prometteuse visant d'autres marqueurs biologiques tels que l'évaluation de la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydants.
- De même, des études approfondies sur la pharmacodynamique de ces principes actifs serait utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques qui être un alternatif à l'utilisation des produits de synthèse pour lutter contre les agents pathogènes
- Il serait intéressant d'extraire et de tester les huiles essentielles de cette plante.

Références bibliographique

- Adom K.K., Sorrells M. et Liu R.H. (2005). Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **53**: 2297-2306.
- Ahmad S. (1995). Oxidative stress and antioxidant de fenses in biology. 1st Ed. *Chapman & Hall*. New York. 1-457.
- Andreotti G., Beane-Freeman L., Hou L., Coble J., Rusiecki J et Hoppin JA. (2009). Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *Internatinal journal of Cancer* **124**: 2495–2500.
- Aslan A., Güllüce M., Sökmen M., Adigüzel A., Sahin F. and Özkan H. (2006). Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Evernia prunastri*, and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical Biology*, **44**: 247-252.
- Baghiani A., Boumerfeg S., Belkhiri F., Khennouf S., Charef N., Harzallah D., Arrar L. and Abdel-Wahhab M. (2010). Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L. extracts grow wild in the Algeria flora. *The Comunicata Scientiae* **1**: 128-136.
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M et Gazin M. (1996). Oxigen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel-forschung* **46**: 1086-1094.
- Balaban R.S., Nemoto S et Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**: 483-495.
- Bartosz G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology* **9**: 5-21.
- Belviranlı M. et Gökbel H. (2006). Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. *European Journal of General Medicine* **3**: 126-131.
- Ben Mbarek K. (2011). Comportement du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) du type « kabuli » vis-à-vis du stress hydrique et identification de génotypes tolérant la sécheresse. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem. Université de Sousse.
- Beta T., Nam S., Dexter J.E. and Sapiststein H.D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chemistry* **82**: 390-393.
- Bhan V.M et Kukula S. (1987). Weeds and their control in chickpea. Review. Option méditerranéenne. **6**: 319-328.
- Bougandoura N et Bendimared N. (2012). Effet antifangique des extraits de *Satureja calamintha* ssp.(Nepeta) briq. *Revue des Bio Ressources* **2**: 1-7.
- Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni D., Adjadj M., Belkhiri F., Charef N., Khennouf S et Arrar L. (2012). Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. Extracts. *Chinese Medicine* **3**: 30-41.
- Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B. (2003). Étude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition* **4**: 7.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Médicales internationales Editions Technique & Documentation, Cachan. 647-673.

- Bryssine, M. P. (1955). La culture du pois chiche au Maroc et ses possibilités d'amélioration. Bulletin de la société des Agriculteurs du Maroc. 31-39.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Eds., *American Society of Plant Physiologists* **24**:1250-1318.
- Cabrera de la Cofina J., Trapero-Casas A et Jimenez-Diaz R. M. (1985). Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* in Andalucia, Southern Spain. *International Chickpea Newsletter* **13**: 34-26.
- Cahagnier B., Dragacc, S., Frayssinet C., Frémy J.M., Hennebert G.L., Lesage-meessen L., Multon J.L., Richard-Molard D et Roquebert M.F. (1998). Moisissures des aliments peu hydrates. Lavoisier Technique & Documentation, France.
- Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90.
- Chabasse D., Bouchara J-P., De gentile L., Brun S., Cimmon B et Penn P. (2000). Cahier de formation, les moisissures d'intérêt médicale.
- Chao C., Saito S., Kang J., Anderson C.W., Appella E., et Xu Y. (2000). Transcriptional activity is essential for dependent or cellular differentiation. *Nature Medicine* **2**: 804–810.
- Cowan M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 564-582.
- Crozier A., Jaganath I.B et Clifford M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **26**: 965-1096.
- Delattre J., Beaudoux J.L et Bonnefort-Rousselot D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant. Aspect biologiques et pathologiques. Technique & Documentation Lavoisier: Londres - Paris - New York. *Disease* **64**: 379-380.
- Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M. et Stocker P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 2599-2606.
- Dominick V., Spracklen ., Boris Bonn et Kenneth S Carslaw. (2008). Boreal forests, aerosols and the impacts on clouds and climate. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*.
- Duke J.A. (1981). Handbook legumes of world economic importance Ed .Plenum press, New-York and London. 25.
- El Aoufir A. (2001). Étude du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum*) causé par le *Fusarium oxysporum* e.sp. *Ciceri*. Evaluation de la fiabilité de l'analyse isoenzymatique et de la compatibilité végétative pour la caractérisation des races physiologiques. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph-D.). Université Laval, Québec.
- Evans W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *American Journal of Clinical* **72**: 647-652.
- Fadel F., Chebli B., Tahrouch S., Benddou A et Hatimi A. (2011). Activité antifongique d'extraits de *Serapion siliniqua* sur la croissance *in vitro* de *Penicillium digitatum*. *Bulletin de la Société de Pharmacie* **150**: 19-30
- Fandohan P., Gbenou J., Gnonlofin B. (2004). Effet of essential oil on the growth of Fumonisin contamination in corn. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **52**: 6824-6829.

- Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.
- Ferreria A., Proenca C., Serralheiro M.L.M. et Araujo M.E.M. (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology* **108**: 31-37.
- Garrier E. (2009). Protection des plantes, fiche privé n°06, version. 1- 4.
- Gupta, O. M., Kotasthane S. R et Khare M. M. (1986). *Fusarium* wilt of chickpea (*Cicer arietinum*). *Agricultur Reviews* **7**: 87-97.
- Hale A.L. (2003). Screening potato genotypes for antioxidant, identification of the responsible compounds, and differentiating Russet Norkotah Strains using aflu and microsatellite marker analysis. Genetics. Office of Graduate Studies of Texas A&M University. 260.
- Haliła H. M., Grindley H. E et Houdiard P. (1984). Sources of resistance to *Fusarium* wilt in kabuli chickpeas. *International Chickpea News letter* **10**: 13-14.
- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Review* **52**: 253-265.
- Harborne J.B. et Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry Journal* **55**: 481-504.
- Harrison R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now. *Free Radical Biology and Medicine*, **33**: 774-797.
- Havsteen B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **96**: 67-202.
- Haware M. P. (1988). *Fusarium* wilt and other important disease of chickpea in the mediterranean area. Proceedings of International Workshop on Present Status and Future prospects on Chickpea Crop Production and Improvement in the Mediterranean Countries. 11-13.
- Haware M. P., Nene Y. L. et Mathur S. B. (1986). Seed borne diseases of chickpea. Technical Bulletin from the Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. *Copenhagen Denmark* **1**: 14.
- Hernandez-Ochoa L.R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de Synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.
- Huang D., Ou B. and Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 1841-1856.
- INRA. (2005). Rapport d'activité. N° dépôt légal : 2006/0871. Maroc.
- Jimenez-Gonzalez L., Alvarez-Corral M., Munoz-Dorado M. et Rodriguez-Garcia I. (2008). Pterocarpan interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews* **7**: 125-154.
- Klaas C. A., Wagner G., Laufer S., Sosa S., Loggia R. D., Bomme U., Pahl H. L. et Merfort I. (2002). Studies on the anti-inflammatory activity of Phytopharmaceuticals prepared from Arnica flowers. *Planta Medica* **68**: 385-391.
- Kogel-Knabner, I. (2002). The macromolecular organic composition of plant and Microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 139-162.

- Kommesdhal, T., Christensen J. J. et Frederiksen R. A. (1970). A half century of research in Minnesota on flax wilt caused by *Fusarium oxysporum*. University Minnesota.
- Krause K.H. (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **57**: 28-29.
- Krinsky N.I. (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Annual Review of Nutrition* **13**: 56-187.
- Ladizinsky, G. (1987). Pulse domestication before cultivation. *Economic Botany*, **41**: 60-65.
- Le Bars J. (1988). Toxicogenesis as a fonction of the ecological conditions of the grain/microorganims system. In "Presrvation and storage of grains, seeds and their by products", J.L.MULTON, Lavoisier publicité. New-York, Paris. 347-366.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F. et Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* **102**: 771-776.
- Liyana-Pathirana C.M. et Shahidi F. (2006) Antioxydant propertes of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivium* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 477-485.
- Lykkesfeldt J et Svendsen O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* **173**: 502-511.
- Markham K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification (Chapter 1 and 2). London: Academic. Press, 1-113.
- Marley P.S., Diourte M., Néya A., Rattunde F.W. (2005). Sorghum anthracnose and sustanaible management strategies in West and Central Africa. *Journal of Sustainable Agriculture* **245** : 43-56.
- Matyushchenko N.V. et Stepanova T.A. (2003). Quantitative determination of the total content of flavonoids in the new phytopreparation Elima. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **37**: 261-263.
- Meyer A.S., Yi O.S et person D.A. (1997). Inhibition of humain low- density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **45**: 1638-1643.
- Mohammedi Z. et Atik F. (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **2**: 609-615.
- Motiejūnaitė O. et Pečiulytė D. (2004). Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality. *Medicina* (Kaunas) **40**: 787-794.
- Nene Y. L. et Haware M. P. (1980). Screening chickpea for resistance to wilt. *Plant Disease* **64**: 379-380.
- Ortuno A., Baidez A., Gomez P., Arcas M.C, Porrás I., Garcia-Lidon A et Del Rio J.A. (2006). Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry Journal* **98**: 351-8.
- Packer L., Tritschler H.J. et Wessel K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha lipoic acid. *Free Radical Biology and Medicine* **22**: 359-378.
- Psotová J., Lasovský J. et Vičar J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behaviour, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomedical Papers* **147**: 147-153.

- Queval G., Issakidis-Bourguet E., Hoeberichts FA., Vandorpe M., Gakière B., Vanacker H., Miginiac-Maslow M., Van Breusegem F et Noctor G .(2007). Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *Plant Journal* **52**: 640-657
- Quezel P et Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition du centre national de la recherche scientifique 15, quai Anatole-France –Paris 7°. Tom II. 1079.
- Rajne rayanama K., Reddy M., Charluvadi M. R., Krishna D. R., (2001). Bioflavonoids: Classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* **33**: 2-16
- Recio C M., Rosa M G., Marta H ., Juan B P., Salvador M et Jose L R. (1992). Phenolic of *Reicardia* and their taxonomic implications. *Biochemical systemics and ecology* **20**: 449-452.
- Rhrib A. (1990). Trachéomycoses et pourritures racinaires du pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Mémoire de 3ème Cycle. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.
- Rodriguez R. A. (1960). The nature of resistance in muskmelons to wilt. Ph.D. Thesis. University Minnesota, St Paul. 87
- Sanogo R., Diallo D., Diarra S., Ekoumon C. et Bougoudougou F. 2006. Activité antibactérienne et antalgique des deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Medical* **1**: 18-24.
- Sanou P. (2004). Les champignons transmis par les semences de maïs: détection, identification et méthodes de lutte. Rapport de fin de cycle de technicien supérieur en technologie des semences. Centre Agricole Polyvalent de Matourkou, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. 41.
- Sarni-Manchado P et Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier Technique & Documentation. Paris. 300-398.
- Saxena M .C. et Singh K B. (1987).The chickpea. Ed- CAB international. 399.
- Shirley B.W. (1996). Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science* **1**: 377-382.
- Singh K. B. (1990). Status of chickpea in the world. *International Chickpea Newsletter* **22**: 10-16.
- Singh K. B., Kumar J., Smithson J. B et Haware M. P. (1987). Complementation between genes for resistance to race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Plant Pathology* **36**: 539-54.
- Singh K.B. (1988). Winter chickpea: Problems and potential in the mediterranean region. In Proceeding on Present Status Production and Tmprovement in the Mediterranean Countries.11-13.
- Soalla W. R. (2011). Efficacité d'extraits aqueux de plantes contre les champignons pathogènes du niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) au Burkina Faso. Mémoire de fin de cycle, Institut du Développement Rural, Université polytechnique de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. 59.
- Stalikas C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. *Journal of Separation Science* **30**: 3268-3295.
- Surveswaran S., Cai Y.-Z., Corke H. et Sun M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry* **102**: 938-953.

- Teixeira da Silva J. A. (2004). Mining the essential oils of the Anthemideae. *Afr. Journal of Biotechnology* **3**: 706-720.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. et Polissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* **90**: 333-340.
- Tim Cushnie T. P., Lamb, J. A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**: 343-356.
- Trapero-Casas A., et Jimenez-Diaz R. M. (1985). Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in Southern Spain. *Phytopathology* **75**: 1146-1151.
- Treutter D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology* **7**: 581-591.
- Vander Maessen L.J.C. (1972). *Cicer* L, a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L), its ecology and cultivation. Meddling land bouw bog school wagenigen, Nederland.72.
- Vanetten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A. and Farmer E.E. (1994). Two Classes of Plant
- Vansant G. (2004). Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium «Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.
- Watterson J. J et Butler L. G. (1983). Occurrence of an unusual leucoanthocyanidin and absence of proanthocyanidins in sorghum leaves. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **31**: 41-45
- Yang J.H., Lin H.C. et Mau J.L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* **77**: 229-235.
- Zenk M.H et Juenger M. (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry. Review*.

[Http://wwwagriculture.gov.sk.ca](http://wwwagriculture.gov.sk.ca)

