

Avant-propos

Ce Project de recherche a été réalisé conjointement entre laboratoire des Ressources Naturelles et Environnement, de la Faculté polydisciplinaire de Taza et le laboratoire des Molécules Bioactives Structures et Fonctions, de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fès. L'ensemble des résultats obtenus au cours de la réalisation de cette thèse ont fait l'objet de publications scientifiques et de communications orales et affichées dans des congrès au niveau national et international :

- **Articles publiés**

Mariame Houhou, Khalid Amrani Joutei, Chaimae Rais, Lahsen Elghadraoui, Said Louahlia. "Biomass partitioning and morphological parameters of *Trigonella foenum-graecum* submitted to sulfur deficiency". *Indian journal of plant physiology*. 2018. Vol 23(1), 118-127.

Mariame Houhou, Khalid Amrani Joutei, Said Louahlia. "Biomass Production, Chlorophyll Content and Morphological Parameters Are Affected by Sulfur Deficiency in *Eruca sativa* L." *International journal of Ecology and environmental sciences*. 2018. Vol 44 (1), 67-75.

Mariame Houhou, Khalid Amrani Joutei, Said Louahlia. "Biomass Production and Biochemical Parameters are affected by Sulfur Deficiency in *Trigonella foenum-graecum*". *International Journal of Scientific and Engineering Research*. 2018. Vol 9 (3), 1122-1129.

Mariame Houhou, Khalid Amrani Joutei, Chaimae Rais, Said Louahlia; "Phenolic Compounds, Antioxidant and Antibacterial Activities are Affected by Sulfur Deficiency in *Foeniculum vulgare* Seeds". *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 2018. Vol 21 (3), 241 -247.

- **Communications orales et affichées**

M. Houhou, S. Louahlia, K. Amrani Joutei, C. Rais, L. Elghadraoui." Etude de l'effet de la carence en soufre sur la qualité biochimique chez *Trigonella foenum-graecum*". *Forum International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales : Valorisation et Innovation*.

M. Houhou, K. Amrani Joutei, C. Rais, L. Elghadraoui, S. Louahlia. " Biomass production and biochemical parameters are affected by sulfur deprivation in *Eruca sativa*". *2^{ème} Edition du Congrès International « Substances Naturelles et Développement Durable »*. 19-21 Mai 2016 . la Facult. des Sciences- Universit. Mohammed V de Rabat – Maroc.

M. Houhou, K. Amrani Joutei, C. Rais, L. El Hanafi, L. Elghadraoui, S. Louahlia. " Etude de l'impact d'une deficiencie en soufre sur la biomasse, les teneurs en sulfates, chlorophylles et proline chez *Foeniculum vulgare*". *Le colloque international sur : « Les changements climatiques : Quelles stratégies pour un développement durable ? »*. 2-3 Novembre 2016.

M. Houhou, K. Amrani Joutei, C. Rais, L. Hanafi, L. EL Ghadraoui , S. Louahlia. " Etude de l'impact d'une deficiencie en soufre sur la biomasse, les teneurs en chlorophylles, et en protéines solubles chez *Foeniculum vulgare*" *Premier Forum National de Biotechnologie Environnementale, Une voie vers le développement durable Faculté Polydisciplinaire de Taza, Maroc, 22 novembre 2016*.

M. Houhou, K. Amrani Joutei, C. Rais, L. Hanafi, L. EL Ghadraoui, S. Louahlia. ‘’ Etude de l’impact d’une deficiencia en soufre sur la teneur en polyphénols et pouvoir antioxydant d’extrait de graines de *Trigonella Foenum-Graecum*’’. *La deuxième journée du doctorant en biologie de l’USMBA : « Pharmacologie et biotechnologie »* le 10.05.2017 a la faculté des sciences et techniques de Fès

M. Houhou, K. Amrani Joutei, S. Louahlia. ‘’ Phenolic compounds and antibacterial activities are affected by sulfur deficiency in *Trigonella foenum-graecum* seeds’’. 6ème édition de l’Ecole Internationale de Recherche sur le thème: Biodiversité des PAM, Biotechnologies, Produits de terroirs et Valorisation des Substances Naturelles. Université Ibn Zohr, Faculté des Sciences – Agadir, 19-21 Avril 2018.

M. Houhou, K. Amrani Joutei, C. Rais, L. Elghadraoui, S. Louahlia. ‘’ Etude de l’effet d’une déficience en soufre sur le développement et la qualité des plantes aromatiques et médicinales : cas de *Trigonella Foenum-Graecum*’’. *Forum International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales : Valorisation et Innovation*.

M. Houhou, K. Amrani Joutei, C. Rais, L. El Hanafi, L. Elghadraoui, S. Louahlia.’’ L’impact de la deficiencia en soufre sur le rendement et la teneur en sulfate dans les graines de trigonelle foenum graecum’’. *Premier Forum National de Biotechnologie Environnementale, Une voie vers le développement durable. Faculté Polydisciplinaire de Taza, Maroc, 22 novembre 2016*.

M. Houhou, K. Amrani Joutei, C. Rais, L. Elghadraoui S. Louahlia. ‘’ Etude de l’effet d’une déficience en soufre sur la morphologie des plantes aromatiques et médicinales : cas de *Foeniculum vulgare*’’. *Journée nationale : Impact des changements climatiques sur le fonctionnement des écosystèmes*.

Remerciements

Avant de présenter ce travail, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir accordé la force et la volonté de terminer ce travail.

*Je tiens à remercier mon directeur de thèse, **Pr. Khalid AMRANI JOUTEI** de m'avoir accueilli au laboratoire des Molécules Bioactives Structures et Fonctions. Merci de m'avoir donné la chance de bénéficier de votre savoir-faire dans le domaine de la biologie végétale en général et la phytochimie particulièrement, merci de votre disponibilité, de vos idées et vos conseils toujours pertinents.*

*Je souhaite remercier également mon directeur de thèse **Pr. Said LOUAHLIA**. Merci de m'avoir donné la chance de travailler avec vous, de m'avoir encadré et soutenu durant ces longues années de thèse. Je vous remercie pour votre bonne humeur continue, pour votre participation particulière aux manipulations que ce soit au sein du laboratoire ou dans la serre. Merci d'avoir accordé beaucoup de temps et dépensé tant d'énergie pour que nous puissions réaliser ce projet de recherche. Merci de m'avoir apporté vos connaissances, vos conseils et vos critiques toujours constructives, votre rigueur scientifique et vos exigences rédactionnels m'ont permis de me surpasser professionnellement. Merci pour tout!*

*Je souhaite remercier les membres du jury de thèse d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je suis très honorée que **Pr. GHNAYA Tahar**, **Pr. SMOUNI Abdelaziz**, et **Pr. MIKOU Karima** aient accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également **Pr. IBRAHIMI Azeddine** et **Pr. HAMMANI Khalil** de l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail en acceptant d'en être les examinateurs. Je remercie également **Pr. DERRAZ Khalid** d'avoir accepté de présider ce jury.*

*Je remercie d'une manière toute particulière **Pr. DAHMANE EL MONTASSIR** pour sa collaboration et pour le partage de son savoir-faire.*

Je remercie d'une manière particulière tous les doctorants, collègues et amis des laboratoires Molécules Bioactives Structures et Fonctions, Ressources Naturelles et Environnement et Ecologie Fonctionnelle et environnement, je ne serais pas arrivée jusque là sans votre aide et votre collaboration. Je remercie aussi tous ceux qui ont assuré l'irrigation de mes plantes sous serre durant mon absence et ceux ayant participé à mes différentes récoltes.

Mes plus profondes pensées s'adressent maintenant à ma famille. Ce chemin n'aurait pu être possible sans le soutien de mes parents. Mon père, ma mère, un simple merci ne serait jamais suffisant pour vous dire à quel point je suis reconnaissante envers vos sacrifices, votre soutien, votre encouragement, et votre patience. Merci pour votre écoute et vos conseils pleins de sagesse, je ne serais jamais arrivée jusque-là sans vous. Merci encore !

Merci à mes sœurs Houda et Fatma, et à mon frère Marwane, pour m'avoir supporté durant ces cinq longues années, J'espère vous avoir montré l'exemple et vous avoir prouvé qu'il est toujours possible de réaliser ses rêves, il suffit d'y croire.

Je n'oublierais de remercier ma chère amie et sœur Sara, merci d'avoir partagé avec moi ce long chemin qui aurait été sans doute plus long et plus dur sans toi. Merci.

J'exprime toute ma gratitude à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Merci à tous !

Liste des abréviations

AA : Acide Ascorbique

AcétylCoA : AcétylCo-enzyme A

ANR : Activité Nitrate Réductase

APR : Adénosine 5'-phosphosulfate réductase

APS : Adénosine 5'phosphosulfate

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

AtSULTR : *Arabidopsis thaliana* sulfur transporter

BHA : Hydroxy Anisole Butylé

BHT : Hydroxy Toluène Butylé

BIG : protéine analogue à la Calossine nécessaire au transport de l'auxine polaire chez *Arabidopsis*

BoSULTR : *Brassica oleracea* sulfur transporter

BSA : Sérum Albumine Bovine

CFT : Concentration en Flavonoïdes Totaux

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPT : Composés Phénoliques Totaux

Cys : cystéine

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2- diphenyl -1-picrylhydrazyle

LAR (Leaf area ratio) : Surface foliaire massique

LWR (Leaf weight ratio) : Poids foliaire spécifique

Met: Méthionine

MS : Matière sèche

MS (Mass spectroscopy) : Spectrométrie de Masse

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

OAS : O-acétylsérine,

OASTL : O-acétylsérinethiollyase

PAM : plantes aromatiques et médicinales

PAPS: Adénosine 3'-phosphate 5' phosphosulfate,

PCs : phytochélatines

Ps: *Pseudomonas aeruginosa*.

PSI : Photosystème I

QE : Equivalent en Quercitine

R/S : Ratio partie aérienne/partie racinaire

S :Soufre

S.a: *Staphylococcus aureus*

S²⁻ : sulfide,

SAM : S-adénosylméthionine ;

SAT : S-acétyl-transférase,

SLA (specific leaf area) : Surface foliaire spécifique

SLIM1 : Sulfur limitation 1

SMM : S-méthylméthionine

SO₂ : Dioxyde de soufre

SO₄²⁻ : Ion sulfate,

SO₃²⁻ : sulfite,

SR : Sulfite Réductase,

SURE : Sulfur Responsive Elements

TAC : Capacité Antioxydante Totale

Tg : Téragramme

TR : Temps de Rétention

UDP-sulfoquinovose : Uridine-Diphosphate-sulfoquinovose

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1 : Différents composés issus du métabolisme du soufre chez les végétaux supérieurs

Figure 2 : Structure de base des glucosinolates

Figure 3 : Structure de base des phytochélatines

Figure 4 : Structure de base de l'alliine

Figure 5 : Absorption racinaire du soufre sous forme de sulfate

Figure 6 : Les voies d'assimilation réductrice et non réductrice du sulfate

Figure 7: Interactions et régulations entre l'assimilation de l'azote et celle du soufre

Figure 8 : Couplage métabolique entre les voies d'assimilation du soufre et de l'azote

Figure 9 : La plante de *Trigonella foenum-graecum*

Figure 10 : La plante de *Foeniculum vulgare* Mill

Figure 11 : La plante d'*Eruca Sativa*

Figure 12 : Protocole de fractionnement des flavonoides

Figure 13 : Effet de la carence en soufre sur la production en biomasse de *Trigonella foenum-graecum*

Figure 14: Effet de la carence en soufre sur la production en biomasse de *Foeniculum vulgare*

Figure 15: Effet de la carence en soufre sur la production en biomasse d'*Eruca sativa*

Figure 16 : Effet de la carence en soufre sur la morphologie de *Trigonella foenum-graecum*

Figure 17 : Effet de la carence en soufre sur la morphologie d'*Eruca sativa*

Figure 18: Teneur en soufre totale et en sulfates des feuilles de *Trigonella foenum-graecum*

Figure 19 : Teneur en soufre totale et en sulfates des feuilles de *Foeniculum vulgare* soumis

Figure 20 : Teneur en soufre totale et sulfates des feuilles d'*Eruca sativa*

Figure 21: Concentration de soufre totale dans les graines de *Trigonella foenum-graecum* et de *Foeniculum vulgare*

Figure 22 : Teneur en chlorophylle dans les feuilles de *Trigonella foenum-graecum*

Figure 23 : Teneur en chlorophylle dans les feuilles de *Foeniculum vulgare*

Figure 24 : Teneur en chlorophylle dans les feuilles d'*Eruca sativa*

Figure 25: Teneur en protéines solubles dans les feuilles et les racines de *Trigonella foenum-graecum*

Figure 26: Teneur en protéines solubles dans la partie aérienne et les racines de *Foeniculum vulgare*

Figure 27: Teneur en protéines solubles dans les feuilles et les racines d'*Eruca sativa*

Figure 28: Teneur en sucres solubles dans les feuilles et les racines de *Trigonella foenum-graecum*

Figure 29: Teneur en sucres solubles dans les feuilles et les racines de *Foeniculum vulgare*

Figure 30: Teneur en sucres solubles dans les feuilles et les racines d'*Eruca sativa*

Figure 31: Teneur en acides aminés totaux dans les feuilles et les racines de *Trigonella foenum-graecum*

Figure 32: Teneur en acides aminés totaux dans les feuilles et les racines de *Foeniculum vulgare*

Figure 33: Teneur en acides aminés totaux dans les feuilles et les racines d'*Eruca sativa*

Figure 34 : Activité nitrate réductase dans les racines de *Trigonella foenum-graecum* et de *Foeniculum vulgare* et dans les feuilles et les racines d'*Eruca sativa*

Figure 35 : Profil de séparation par HPLC de l'extrait méthanolique des *Trigonella foenum-graecum*

Figure 36 : Spectres LC-MS de l'extrait méthanolique des graines témoins de fenugrec

Figure 37 : Spectres LC-MS de l'extrait méthanolique des graines S-déficientes de fenugrec

Figure 38 : Profil de séparation par HPLC de l'extrait méthanolique des graines témoins d'*Eruca Sativa*

Figure 39 : Spectres LC-MS de l'extrait méthanolique des feuilles Témoins d'*Eruca sativa*

Figure 40 : Spectres LC-MS de l'extrait méthanolique des feuilles S-déficientes d'*Eruca sativa*

Figure 41 : Effet de la carence en soufre sur le pourcentage d'inhibition du radicale DPPH par l'extrait méthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum*, les graines de *Foeniculum vulgare* et les feuilles d'*Eruca sativa*

Figure 42 : Effet de la carence en soufre sur la capacité antioxydante totale des extraits méthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum*, des graines de *Foeniculum vulgare* et des feuilles d'*Eruca sativa*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Émissions régionales de SO₂ entre 1990 et 2011

Tableau 2 : Production des PAM cultivées au Maroc en 2004

Tableau 3 : Concentrations d'oligo-éléments et des macro-éléments dans les solutions nutritives

Tableau 4: Teneur en éléments minéraux des feuilles et des racines de *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa* soumises à une carence en soufre

Tableau 5: Effet de la carence en soufre sur les concentrations en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés dans les extraits éthanoliques des graines de *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare* et les feuilles d'*Eruca sativa*

Tableau 6 : Identification des flavonoïdes dans les graines de *Trigonella foenum-graecum*

Tableau 7 : Identification des flavonoïdes dans les feuilles d'*Eruca sativa*

Tableau 8: Effet de la carence en soufre sur la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait méthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum*

Tableau 9: Effet de la carence en soufre sur la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait méthanolique des graines de *Foeniculum vulgare*

Tableau 10: Effet de la carence en soufre sur la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait éthanolique des graines d'*Eruca sativa*

Résumé

Le soufre (S) est l'un des six principaux nutriments favorisant la croissance et le développement des végétaux. Les plantes tirent leurs besoins en S du soufre atmosphérique qui rejoint le sol via les retombées atmosphériques. Durant les 30 dernières années, les concentrations en soufre atmosphérique ont chuté considérablement suite à la mise en action d'un ensemble de réglementations internationales. Ces dernières ont pour but d'améliorer la qualité de l'air à travers la réduction des émissions atmosphériques en gaz à effet de serre et en particulier le dioxyde de soufre (SO₂). Associé à d'autres phénomènes anthropiques et écologiques, la diminution des retombées atmosphériques en soufre a causé des réductions dans le soufre des sols disponibles pour les plantes, ce qui peut influencer significativement la qualité et le rendement des plantes cultivées, particulièrement, la qualité et la composition phytochimique des plantes aromatiques et médicinales.

Le but de ce travail est d'étudier l'effet d'une nutrition minérale pauvre en soufre sur la qualité phytochimique et thérapeutique de trois plantes aromatiques et médicinales cultivées, à savoir : *Trigonella foenum-graecum* (fenugrec), *Foeniculum vulgare* (fenouil) et *Eruca sativa* (roquette). Cette étude a été réalisée dans le but d'étudier l'effet de la carence en soufre sur i) la morphologie des plantes étudiées par l'évaluation du rendement et de la distribution de la biomasse au sein de la plante, ii) le métabolisme primaire par l'analyse de certains métabolites primaires iii) le métabolisme secondaire à travers la quantification des polyphénols et l'identification de certaines molécules de flavonoïdes, iv) les activités biologiques des extraits des parties des plantes communément utilisées pour des fins thérapeutiques.

L'analyse des paramètres morphologiques a montré l'effet négatif de la carence en soufre (0.05mM S) sur le rendement et la répartition de la biomasse des trois plantes. Des réductions respectives de 32%, 29% et 83% ont été enregistrées dans le rendement en biomasse de la plante entière chez fenugrec, fenouil et roquette. Le calcul du rapport R/S a montré que la carence en soufre cause une diminution de 16% dans ce paramètre pour la roquette alors que chez le fenugrec et le fenouil il augmente de 33% et 40% respectivement, en plus d'une réduction dans la surface foliaire chez le fenugrec et la roquette respectivement de 37% et 16%.

L'analyse biochimique des feuilles et des racines des trois plantes a révélé des perturbations dans le métabolisme primaire suite à la réduction de la nutrition minérale en soufre. La quantification des teneurs en soufre total dans les tissus foliaires des trois plantes a montré que l'application d'une nutrition minérale en soufre de l'ordre de 0.05 mM, bascule la plante dans un état de déficience. Ceci a causé des perturbations dans l'appareil photosynthétique qui se sont manifestés par des diminutions significatives dans les teneurs en chlorophylle chez les trois espèces étudiées. Les teneurs en sucres solubles ont également chuté dans le tissu foliaire de 56%, 48% et 61% respectivement, chez le fenugrec, le fenouil et la roquette. Par contre, des augmentations dans les teneurs en protéines solubles ont été enregistrées chez le fenugrec et le fenouil *versus* des diminutions chez la roquette suite à la privation des plantes en soufre. L'analyse de l'activité nitrate réductase (ANR) a révélé que la première étape de l'assimilation de l'azote baisse significativement suite à la déficience en soufre chez les trois plantes étudiées, elle a chuté d'un ordre de 68%, 85% et 53% respectivement, chez le fenugrec, le fenouil et la roquette. L'étude de la composition phénolique des graines de fenugrec et fenouil et des feuilles de la roquette a révélé des diminutions dans les teneurs en polyphénols et des flavonoïdes totaux des extraits méthanoliques des trois plantes suite à la carence en soufre. Les teneurs en polyphénols totaux ont diminué de 52%, 30% et 18% respectivement pour le fenugrec, le fenouil et la roquette et les teneurs en flavonoïdes ont chuté de 50%, 42% et 35% dans le même ordre chez les trois plantes étudiées. L'évaluation de la qualité thérapeutique des extraits des graines de fenugrec et fenouil et des feuilles de la roquette, a révélé que la déficience en soufre affecte négativement les activités antioxydante et antibactérienne, des extraits méthanoliques des trois plantes. L'IC₅₀ du radical DPPH a augmenté de 47%, 18% et 60% dans les extraits de fenugrec, de fenouil et de la roquette respectivement, suite à la déficience en soufre.

Mots clés : Déficience en soufre, Sulfates, Surface foliaire, Chlorophylle, Activité Nitrate Réductase, Protéines solubles, Polyphénols, Flavonoïdes, Activité antioxydante, Activité antibactérienne.

Abstract

Sulfur (S) is one of six main nutrients that promote plant growth and development. Plants fulfill their sulfur needs from the atmospheric sulfur which reaches the soil via atmospheric inputs. Over the past 30 years, atmospheric sulfur levels have dropped significantly as a result of the application of many international regulations aimed at improving air quality through the reduction of atmospheric emissions of greenhouse gases especially sulfur dioxide (SO₂). Associated with other anthropogenic and ecological phenomena, the decrease in atmospheric depositions of sulfur has caused reductions in the available sulfur for plants, which can significantly influence the quality and yield of crops, and particularly the quality and the phytochemical composition of aromatic and medicinal plants. This work aimed to study the effect of low-sulfur nutrition on the phytochemical and therapeutic quality of the three cultivated aromatic and medicinal plants, namely: *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek), *Foeniculum vulgare* (fennel) and *Eruca sativa* (rocket). In This study we aimed at highlighting the effect of sulfur deficiency on i) the morphology of the studied plants by assessing the yield and distribution of biomass within the plant, ii) the primary metabolism by analyzing some primary metabolites iii) secondary metabolism through the quantification of polyphenols and the identification of certain flavonoid molecules, iv) the medicinal quality of the plants parts that commonly used for therapeutic purposes. The analysis of morphological parameters showed a negative effect of sulfur deficiency on yield and biomass distribution within the three plants. Reductions of 32%, 29%, and 83%, were recorded in biomass yield of the whole plant in fenugreek, fennel and rocket, respectively. A decrease of 16% was recorded in R/S in rocket plant, whereas in fenugreek and fennel R/S increased by 33% and 40% respectively, in addition to a serious reduction in foliar area in fenugreek and rocket leaves. Biochemical analysis of the leaves and roots of the three plants revealed disturbances in primary metabolism under sulfur deficiency. The quantification of the total sulfur content in the leaves of the three plants showed that the application of sulfur supply of 0.05mM, switches the plant in an S-deficiency state. In addition, Sulfur deficiency caused disturbances in the photosynthetic apparatus, expressed by a significant decrease in chlorophyll content in the three studied species. Soluble sugars decreased in foliar tissue by 56%, 48% and 61% in fenugreek, fennel and rocket respectively. Serious increase in soluble protein content was recorded in fenugreek and fennel *versus* proteins content decrease in rocket under sulfur deprivation. The analysis of the nitrate reductase activity (NRA) revealed that the first stapes of nitrogen assimilation was significantly disturbed as a result of sulfur deficiency in the three studied plants, it falls by 68% 85% and 53% in fenugreek, fennel and rocket, respectively. The study of the phenolic composition in the seeds of fenugreek and fennel and in the leaves of rocket grown under sulfur deficiency, revealed a significant decrease in total phenolic and total flavonoids contents in the methanolic extracts from the three studied plants. The total phenolic contents decreased by 52%, 30% and 18% in fenugreek, fennel and rocket, respectively, and total flavonoid content dropped by 50%, 42% and 35% in the same order for the three studied plants. The assessment of the medicinal quality of the extract from the three studied plants revealed that sulfur deficiency affects negatively the antioxidant and antibacterial activities the three species. The IC₅₀ of DPPH radical increased significantly by 47% 18% and 60% in fenugreek, fennel, and rocket respectively.

Key words: Sulfur deficiency, Sulfates, Leaf area, Chlorophyll, Nitrate Reductase Activity, Soluble protein, Polyphenols, Flavonoids, Antioxidant activity, Antibacterial activity.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I.....	5
Synthèse bibliographique	5
I Le Soufre chez les végétaux supérieurs.....	6
1. Les composés soufrés.....	6
a. Les composés soufrés majeurs.....	6
b. Composés soufrés secondaires.....	7
II Absorption et assimilation des sulfates par les végétaux	10
1. Absorption des sulfates	10
c. Absorption racinaire	10
d. Absorption Foliaire	12
2. Assimilation de sulfate	13
a. Voie d'assimilation réductrice	13
b. Voie d'assimilation non réductrice	16
III Interaction entre le soufre et les autres éléments minéraux.....	16
1. Interaction soufre-azote	16
2. Interaction soufre- autres éléments minéraux.....	18
IV La déficience en soufre.....	19
1. Réponse des plantes à la déficience en soufre.....	21
2. Effets physiologiques et métaboliques de la déficience en soufre	21
a. Effet sur le rendement en biomasse.....	21
b. Effet sur le métabolisme soufré	22
c. Effet sur la photosynthèse.....	23
d. Effet sur le métabolisme azoté.....	24
3. Contrôle transcriptionnel en réponse à la déficience en soufre	24
4. Diagnostic de l'état de déficience chez les plantes.....	26
a. Les paramètres biologiques.....	26
b. Les paramètres composés.....	26
V Stratégies d'adaptation des plantes à la déficience en soufre	28
VI Plantes aromatiques et médicinales au Maroc.....	29
1. Espèces cultivées.....	29
2. Fenugrec (<i>Trigonella foenum-graecum</i>).....	29

a.	<i>Taxonomie de la Plante</i>	30
b.	<i>Description Botanique</i>	30
c.	<i>Composition biochimique</i>	31
d.	<i>Composés phénoliques</i>	32
e.	<i>Utilisations médicinales</i>	33
3.	Fenouil (<i>Foeniculum vulgare</i>)	35
a.	<i>Taxonomie de la plante</i>	36
b.	<i>Description botanique</i>	36
c.	<i>Composition biochimique</i>	37
d.	<i>Composés phénoliques</i>	38
e.	<i>Utilisations médicinales</i>	38
4.	Roquette (<i>Eruca sativa</i>)	40
a.	<i>Taxonomie de la plante</i>	41
b.	<i>Description botanique</i>	41
c.	<i>Composition biochimique</i>	42
d.	<i>Composés phénoliques</i>	43
e.	<i>Utilisations médicinales</i>	44
Chapitre II		46
Matériel et Méthodes		46
I	Paramètres morphologiques et biochimiques	47
1.	Germination des graines et conditions de culture des plantes	47
2.	Détermination de la biomasse et des paramètres morphologiques	47
3.	Détermination de la teneur des feuilles en sulfate et en soufre total	48
4.	Dosage des pigments chlorophylliens	48
5.	Teneur en protéines solubles	49
6.	Dosage des sucres solubles totaux	49
7.	Dosage des acides aminés libres	49
8.	Mesure de l'activité nitrate réductase	50
9.	Détermination des éléments minéraux	50
II	Qualité phytochimique et activités biologiques	51
3.	Extraction hydro-méthanolique	51
4.	Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux (CPT)	52
5.	Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux	52
6.	Détermination des tanins condensés	52
7.	Identification chromatographiques des composés flavonoïdes	53

a. Fractionnement des flavonoïdes.....	53
b. Analyses des fractions flavonoïdes par HPLC/DAD/MS	54
8. Mesure de l'activité antioxydante par la méthode DPPH.....	54
a. Principe	54
b. Mode opératoire	54
9. Mesure de l'activité antioxydante par le test Phosphomolybdate	55
a. Principe	55
b. Mode opératoire	55
10. Evaluation de l'activité antibactérienne	56
a. Test de l'activité antibactérienne	56
III Analyses statistiques.....	56
Chapitre III	57
Résultats	57
I Etude de l'effet de la carence en soufre sur la morphologie de : <i>Trigonella foenum-graecum</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> et <i>Eruca sativa</i>	58
1. Production en biomasse.....	58
2. Morphologie et distribution de la biomasse au sein de la plante	62
II Etude de l'effet de la carence en soufre sur la composition biochimique de <i>Trigonella foenum-</i> <i>graecum</i> , de <i>Foeniculum vulgare</i> et d' <i>Eruca sativa</i>	65
1. Teneur en soufre total et en sulfates des feuilles	65
2. Teneur en soufre total dans les graines de <i>Trigonella foenum-graecum</i> et <i>Foeniculum vulgare</i> 67	
3. Teneur en pigments chlorophylliens	67
4. Teneurs en protéines solubles.....	69
5. Teneur en sucres solubles.....	71
6. Teneurs en acides aminés libres	73
7. Activité Nitrate Réductase.....	75
8. Teneurs en éléments minéraux	76
1. Teneurs en composés phénoliques des graines.....	78
2. Identifications des flavonoïdes par HPLC /MS	80
a. <i>Trigonella foenum-graecum</i>	80
b. <i>Eruca sativa</i>	83
2. Activité antioxydante total	88
3. Activité antibactérienne.....	89
Chapitre IV	97
Discussion Générale et Conclusion	97

I	Discussion générale.....	98
II	Conclusion générale et perspectives.....	110

Introduction générale

Le Maroc, en raison de sa position géographique et de son climat, se distingue par une biodiversité de sa flore d'environ 4200 à 4500 taxons (Fennane, 2004) dont environ 600 ont des vertus aromatiques et/ou médicinales. Les espèces aromatiques et médicinales constitueraient un levier de développement économique et une source de revenu pour les habitants dont la plus importante occupation est l'agriculture vivrière (Khabbach *et al.*, 2013). Toutefois ceci ne peut être possible sans la satisfaction d'un marché de plus en plus exigeant en termes de la qualité phytochimique du produit. L'assurance d'un bon rendement en biomasse et d'une qualité phytochimique irréprochable passe par la connaissance et la maîtrise des exigences de chaque espèce des PAM pour son développement. Ceci permettrait le maintien de son biotope avec des conditions agro-écologiques optimales de production dans un contexte amené à varier et soumis aux diverses perturbations dues principalement aux changements climatiques et trophiques. Le soufre (S) est un élément d'une importance capitale pour le développement des plantes en général et les plantes aromatiques et médicinales en particulier, que ce soit au niveau physiologique, métabolique ou production de métabolites secondaires. Le soufre atmosphérique constitue la source principale du soufre des sols, il peut être d'origine continentale ou océanique, naturelle ou anthropique. Les émissions naturelles sont constituées par le sulfate de sel de mer et les sources biogéniques tandis que les émissions continentales sont majoritairement d'origine anthropique. Le soufre atmosphérique rejoint le sol généralement à travers les précipitations acides contenant de l'acide sulfurique.

Durant ces dernières années, une attention particulière a été accordée à la réduction des émissions atmosphériques en gaz à effet de serre et plus particulièrement en dioxyde de soufre (SO₂). En effet depuis les années 90, la communauté internationale a mis en place des

réglementations limitant les rejets de soufre dans l'atmosphère, tels que le « Clean Air Act », ou encore le protocole de « Gothenburg » révisé en 2005 et qui est entré en vigueur en 2012 avec des nouvelles limites d'émission de SO₂ fixées à -59% en 2020 et -79% en 2030 par rapport aux valeurs enregistrées en 2005. Les faibles dépositions du soufre de l'air associées à l'exportation du soufre du sol suite aux récoltes intensives successives et la perte de la matière organique du sol suite à l'érosion et la minéralisation ont provoqué une chute considérable de la teneur des sols et des rivières en soufre (Ceccotti 1996, Scherer 2001, Haneklaus *et al.*, 2008 ; Grant et Hawkesford 2015). Des études antérieures ont clairement montré une déficience en S dans les sols et les plantes dans diverses parties du monde (Mills and Jones 1996 ; Haneklaus *et al.*, 2007). En Grande Bretagne 97% de réduction d'émission en SO₂ a été enregistré de 1970 à 2016. En république Tchèque, il a été rapporté que les teneurs des sols en soufre soluble ont chuté de 65 à 68% pendant les 26 dernières années (Balik *et al.*, 2009). Egalement en Turquie, plus de 50% des sols examinés ont enregistré une déficience en soufre dans la région d'Anatolie (Inal *et al.*, 2003). Selon la littérature actuelle, aucune étude diagnostique du statut soufré de l'écosystème et des plantes n'a été conduite au Maroc ou bien au sud de la Méditerranée de façon générale. Il a été toujours admis que les changements de la teneur atmosphérique et les précipitations en soufre ont pour origine une pollution transfrontalière plutôt qu'une pollution locale. En effet, Il a été montré que les émissions de gaz polluants en Europe continentale et des îles britanniques étaient responsables de l'acidification des lacs et des sols en pays Scandinaves (Oden, 1968). Par conséquent, il est concevable que ces restrictions appliquées en Europe et les pays frontaliers du Maroc puissent avoir un impact considérable sur le climat et le statut soufré de notre environnement. Une telle situation déficitaire de l'environnement en S influencerait sans aucun doute la biodiversité des PAMs au sud de la Méditerranée et pourrait affecter leur production et leur qualité phytochimique à court ou à long terme.

L'impact d'une nutrition minérale pauvre en soufre sur la qualité et le rendement des plantes cultivées et particulièrement celle appartenant à la famille des brassicaceae semble inévitable. Le soufre est impliqué dans la synthèse d'une très grande gamme de métabolites secondaires qui commence par la synthèse de deux acides aminés soufrés, la cystéine et la méthionine. Ces derniers constitueront par la suite un point de ramification pour la biosynthèse des protéines de structures, les protéines régulatrices et plusieurs molécules bioactives tels que les glucosinolates, les coumarines, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les phytochelatines et beaucoup d'autres composés soufrés que nous détaillerons dans ce manuscrit. En générale, ces métabolites secondaires dotés souvent d'au moins une activité biologique, constituent le principe actif des plantes médicinales et aromatiques en leur conférant des propriétés thérapeutiques.

La carence en soufre peut directement affecter la qualité des plantes en générale et la qualité et la composition des plantes aromatiques et médicinales en particulier. Sauf qu'aucun travail, selon nos recherches bibliographiques, n'a projeté la lumière sur l'impact de la carence en soufre sur le rendement et la qualité thérapeutique des plantes aromatiques et médicinales. Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le cadre de cette logique, de mettre en évidence l'impact de la déficience en soufre sur le rendement et la qualité phytochimique des plantes aromatiques et médicinales. Il s'inscrit dans le cadre d'une étude proactive qui anticipe sur l'effet de la déficience en soufre sur les PAM marocaines cultivées en prenant l'exemple de trois espèces cultivées au Maroc appartenant à trois différentes familles, à savoir : *Trigonella foenum-graecum* (fenugrec), *Foeniculum vulgare* (fenouil) et *Eruca sativa* (roquette). La réponse de ces trois espèces à un faible apport nutritionnel en soufre a été étudiée à travers trois grands aspects, i) l'aspect morphologique par la détermination des paramètres morphologiques qui reflètent la réponse de la plante aux contraintes environnementales, ii) l'aspect biochimique par la quantification de quelques métabolites

primaires afin de diagnostiquer l'état de la déficience en soufre chez la plante et enfin iii) l'aspect thérapeutique par l'analyse de certains métabolites secondaires impliqués dans le profil médicinal de la plante ainsi que l'étude d'activités biologiques des extraits issus des plantes étudiées.

Dans le souci d'accompagner le lecteur et lui permettre d'entrer plus facilement dans le sujet, nous reviendrons plus en détails en rappel bibliographique, pour détailler le cycle biologique du soufre, définir les voies de son absorption et son assimilation chez la plante, puis nous décrirons les principaux métabolites soufrés synthétisés et leurs rôles dans le développement et la croissance des plantes. La deuxième partie bibliographique sera consacrée aux plantes aromatiques et médicinales cultivées au Maroc et en particulier les trois espèces étudiées dans ce travail, leurs propriétés médicinales et leurs utilisations pharmaceutiques.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I Le Soufre chez les végétaux supérieurs

1. Les composés soufrés

a. Les composés soufrés majeurs

Le soufre (S) est un élément nécessaire pour la croissance et le développement des plantes (Marshner, 2005). Les acides aminés contenant du soufre, la cystéine (Cys) et la méthionine (Met), jouent un rôle important dans la structure, la conformation et la fonction des protéines et des enzymes dans les tissus des végétaux (Tabatabai, 1986). La cystéine est le seul acide aminé dont la chaîne latérale peut former des liaisons covalentes et, lorsqu'elle est incorporée dans des protéines, le groupe thiol d'une molécule de cystéine peut être oxydé. Il en résulte des ponts disulfures avec d'autres chaînes latérales de cystéine (formation de cystine) ou une liaison de polypeptides, ce qui apporte une contribution importante à l'édification de la structure et la conformation des protéines (Haneklaus *et al.*, 2007). La cystéine sert non seulement à la production de protéines, mais aussi à la synthèse de la méthionine et ses dérivés (Fig.1). Elle est utilisée comme donneur de soufre réduit pour la synthèse de la méthionine via la voie dite de trans-sulfuration et ses dérivés tels que le S-adénosylméthionine (SAM) et la S-méthylméthionine (SMM) (Giovanelli *et al.*, 1990 ; Noji et saito, 2003). Le résidu S de la fraction de cystéine dans les protéines a, en outre, une grande importance dans la formation des centres Fe-S dans les protéines comme les ferredoxines et dans les protéines régulatrices comme les thiorédoxines (Leustek et Saito, 1999).

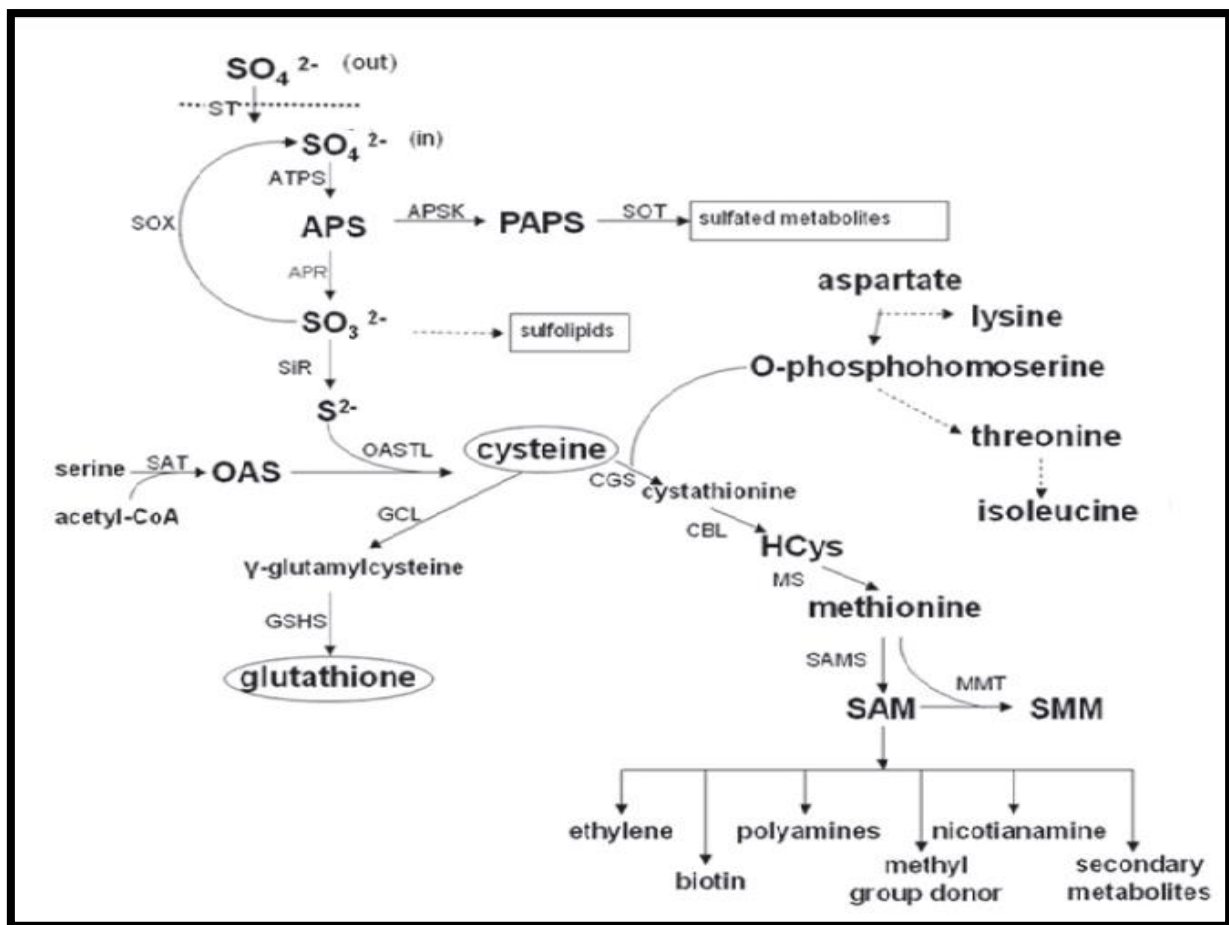


Figure 1 : Différents composés issus du métabolisme du soufre chez les végétaux supérieurs. SO_4^{2-} : Ion sulfate, **APS** : Adénosine 5'phosphosulfate, S^{2-} : sulfide, **PAPS** : Adénosine 3'-phosphate 5'phosphosulfate, **AcétylCoA** : AcétylCo-enzyme A, **APR** : Adénosine 5'-phosphosulfate réductase, **GSH** : glutathion, **OAS** : O-acétylsérine, **OASTL** : O-acétylsérinethiollyase, **SAT** : S-acétyl-transférase, SO_3^{2-} : sulfite, **SR** : sulfite réductase, **SAM** : S-adénosylméthionine ; **SMM** : S-méthylméthionine (Lewandowska et Sirko, 2008).

b. Composés soufrés secondaires

L'Adénosine 5'phosphosulfate (APS) subit un nombre de réactions de réduction qui aboutiront à la formation du S-adénosylméthionine (SAM) qui est un point de ramification pour la synthèse de nombreux autres composés soufrés tels que la S-méthyl-cystéine, la S-alkyl-cystéine, les glucosinolates et les phytoalexines (Haq et Ali, 2003 ; Grill *et al.*, 2001). Alternativement, l'Adénosine 5'phosphosulfate (APS) peut être phosphorylé par l'APS kinase

pour donner l'adénosine 3'-phosphate 5' phosphosulfate (PAPS) qui, à son tour, peut être utilisé pour la synthèse de nombreux composés sulfatés, tels que les coumarines, les glucosinolates, les flavonoïdes, l'acide gibbérélique, l'hydroxyjasmonate, les acides phénoliques, les phytochelatines et l'alliine.

- Les glucosinolates sont les métabolites secondaires soufrés les plus importants. Ils caractérisent au moins 15 familles de dicotylédones et sont constitués de glucose, un groupe contenant du soufre avec un support aglycone et un groupement sulfate (Wink, 1999), (Fig. 2). Les glucosinolates agissent comme attractifs, répulsifs, insecticides, fongicides et protecteurs antimicrobiens et anti-radicalaires (Redovniković *et al.*, 2008).

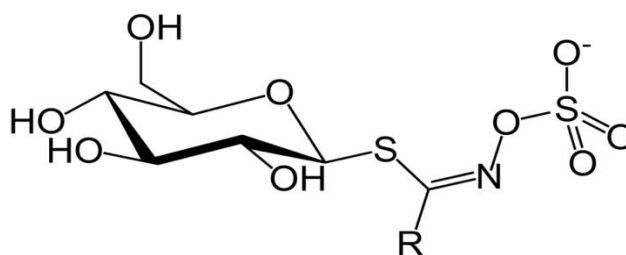


Figure 2 : Structure de base des glucosinolates

- Les phytochelatines (PC) représentent une famille de métabolites secondaires soufrés formés d'une série de répétitions croissantes du dipeptide γ -L-Glutamyl-L-cysteine (γ – Glu-Cys) suivi d'un terminal Gly; (γ – Glu-Cys) n-Gly, où la valeur (n) est généralement compris entre 2 et 5 (Cobbett, 2000 ; Rauser, 1995) (Figure 3). De nombreuses études biochimiques et génétiques ont confirmé que le GSH constitue le substrat de base pour la biosynthèse des PCs (Rauser, 1995 ; Rauser, 1999 ; Zenk, 1996). Les PCs représentent des agents de chélation naturels capables de fixer les métaux lourds et sont responsables de la

tolérance des plantes aux ions métalliques notamment au cadmium (Cd^{2+}) (Cobbett et Goldsbrough, 2002).

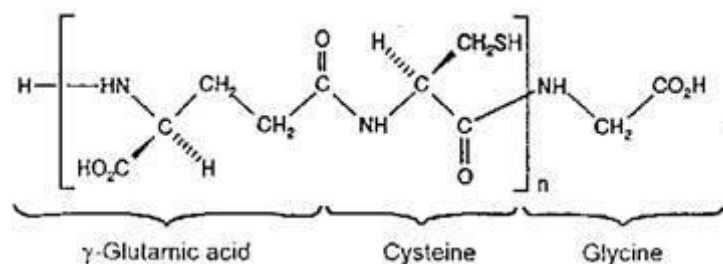


Figure 3 : Structure de base des phytochelatines (PCs)

- L'alliine est un sulfoxyde dérivé de la cystéine, c'est un constituant naturel de la famille des alliées. Ces derniers stockent une grande partie de leur soufre total sous forme d'alliine (Granth et Hawkesford, 2015). Comme les glucosinolates, l'alliine contribue à la défense de la plante contre les parasites et les espèces pathogènes (Curtis *et al.*, 2004). L'alliine agit également comme agent antioxydant, elle fait partie des produits antioxydants naturels (Chung, 2006; Haneklaus *et al.*, 2007), (Fig.4).

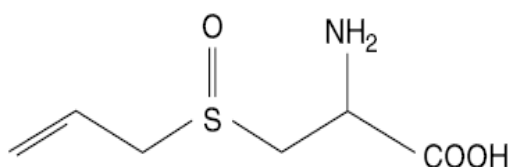


Figure 4 : Structure de base de l'alliine

II Absorption et assimilation des sulfates par les végétaux

1. Absorption des sulfates

c. Absorption racinaire

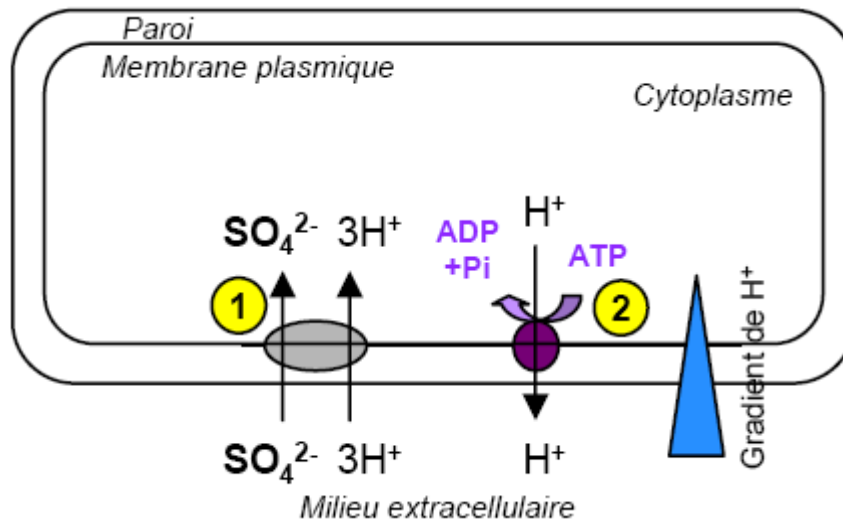


Figure 5 : Absorption racinaire du soufre sous forme de sulfate (Abdallah, 2010).

Le sulfate soluble dans la solution du sol est la principale source du soufre pour les plantes (Haneklaus *et al.*, 2003). L'absorption et le transport de sulfate chez les plantes sont des processus ATP-dépendants. L'absorption de sulfate se fait principalement par les racines à travers les membranes cellulaires et correspond à un flux net, bilan de deux flux unidirectionnels opposés à travers la membrane plasmique des cellules racinaires : l'influx et l'efflux (Cram, 1983 ; Bell *et al.*, 1995). L'influx se fait contre un gradient électrochimique grâce à un transport de type symport ($1\text{SO}_4^{2-} / 3\text{H}^+$) et dépend d'un gradient de protons maintenus par une pompe H^+/ATPase (Fig. 5) (Clarkson *et al.*, 1989 ; Leustek et Saito, 1999 ; Abdallah, 2010).

Un certain nombre de transporteurs de sulfate à forte affinité et à faible affinité ont été mis en évidence chez les végétaux supérieurs (Leustek et Saito, 1999). Le fonctionnement de ces

transporteurs est contrôlé par la concentration de sulfate dans le milieu : lorsque la concentration est inférieure à 0,1 mM, les transporteurs à haute affinité s'activent alors que ceux à faible affinité fonctionnent lorsque les concentrations en sulfate sont supérieures à 0,1mM (Grant et Hawkesford, 2015). Les relations phylogéniques entre les protéines de ces systèmes de transport, leurs fonctions et leur distribution ont permis de classer les gènes qui en codent en cinq groupes (Buchner *et al.*, 2004; Hawkesford et De Kok, 2006; Lewandowska et Sirko, 2008 ;Grant et Hawkesford 2015). Ces groupes de transporteurs ont été identifiés dans les plantes supérieures et en particulier chez *Arabidopsis thaliana* (Buchner *et al.*, 2004)

- Groupe 1 : les transporteurs à haute affinité nommés AtSULTR1;1, AtSULTR1;2 sont les mieux caractérisés. Ils sont exprimés principalement sur les poils absorbants, les cellules épidermiques et les cellules corticales des racines (Takahashi *et al.*, 2000 ; Vidmar *et al.*, 2000 ; Yoshimoto *et al.*, 2007 ; El Kassis *et al.*, 2007). Les transporteurs AtSULTR1;3 à faible affinité quant à eux sont localisés sur le parenchyme du phloème et impliqués spécifiquement dans le chargement phloémique du sulfate (Yoshimoto *et al.*, 2003).
- Groupe 2 : AtSULTR2;1 et AtSULTR2;2 des transporteurs à faible affinité. Ils assurent le transport à longue distance au cours de la translocation du sulfate des organes source aux organes puits (Takahashi *et al.*, 2000). Ils sont localisés dans les cellules des vaisseaux conducteurs de la sève xylémique (pour AtSULTR2;1) et phloémique (pour AtSultr2;2) des racines.
- Groupe 3 : les transporteurs AtSULTR3;1, AtSULTR3;2, AtSULTR3;3, AtSULTR3;4 n'ont pas encore été totalement élucidés. Ils sont appelés également «groupe des feuilles». Chez *Arabidopsis thaliana*, ces transporteurs sont tous localisés au niveau foliaire (Takahashi *et al.*, 2000; Hawkesford *et al.*, 2003), tandis que chez *Brassica oleracea* BoSULTR3;2 est exclusivement exprimé au niveau racinaire et BoSULTR3;3 est retrouvé aux niveaux foliaire, caulinaire et racinaire (Buchner *et al.*, 2004). En outre, BoSULTR 3;4 et BoSULTR 3;5 sont

respectivement exprimés chez *Brassica oleracea* aux niveaux caulinaires et racinaires (Buchner *et al.*, 2004).

- Groupe 4 : AtSULTR4;1 and AtSULTR4;2 des transporteurs impliqués dans le transport de l'ion sulfate aux plastides avant sa réduction. Ils sont localisés dans les tonoplastes du péricycle, du xylème des racines et des hypocotyles. Ils sont responsables des efflux de sulfate de la vacuole vers les plastides.
- Groupe 5 : AtSULTR5;1 et AtSULTR5;2, ces transporteurs se caractérisent par des séquences nucléotidiques différents des autres transporteurs identifiés. Bien que la fonction cellulaire des transporteurs du groupe 5 soit à ce jour inconnue, leur intervention dans l'influx de sulfate vacuolaire est fortement suspectée (Hawkesford *et al.*, 2003).

d. Absorption Foliaire

Dans les zones rurales, l'atmosphère ne contient généralement que des oligo-éléments sous forme de gaz soufrés. Dans les zones à activité industrielle et/ou volcanique, l'atmosphère contient des niveaux plus élevés de polluants atmosphériques sulfureux (Haneklaus *et al.*, 2007). L'impact des gaz atmosphériques sulfureux sur les plantes cultivées semble être ambigu. Après leur absorption foliaire, le SO₂ et le H₂S sont directement métabolisés et malgré leur toxicité potentielle ils sont utilisés comme source de soufre pour la croissance (De Kok *et al.*, 1990, 2002). L'absorption du soufre atmosphérique se produit principalement à travers les stomates (Lewis, 1980). Le taux d'absorption dépend de la conductance stomatique et de la concentration atmosphérique en gaz. La conductance stomatique est généralement le facteur limitant de l'absorption foliaire du SO₂ (Misra *et al.*, 1987 ; De Kok *et al.*, 1990 , 2002). Cette conductance mésophyllienne élevée est principalement contrôlée par des facteurs chimiques / physiques, car le gaz est très soluble dans la solution cellulaire du mésophylle (apoplaste ou symplaste)

2. Assimilation de sulfate

L'assimilation de sulfate peut se faire selon deux voies (Fig. 6), la voie réductrice qui semble la voie majoritaire, elle se déroule au niveau des plastes, et la voie non réductrice qui se déroule au niveau du cytosol (Leustek et Saito, 1999; Kopriva et Koprivova, 2004; Saito, 2004).

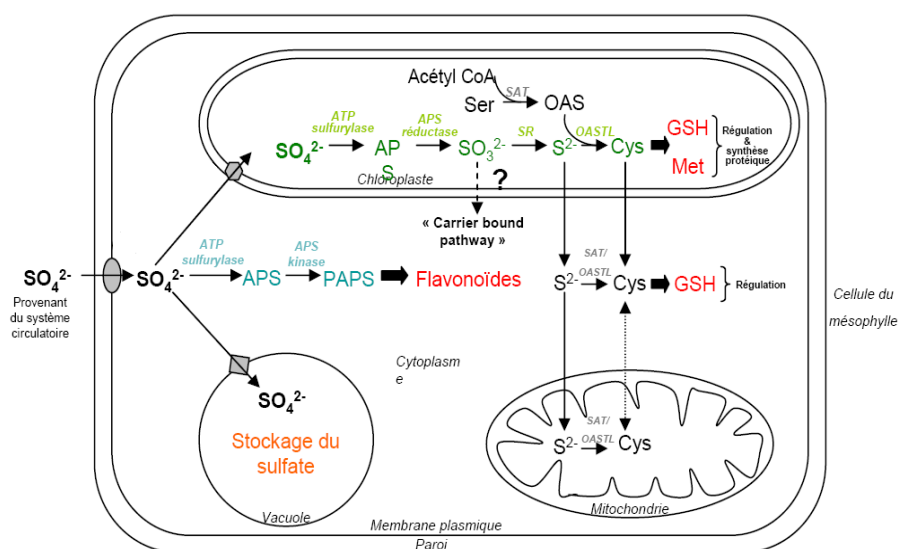
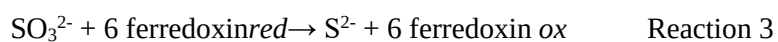
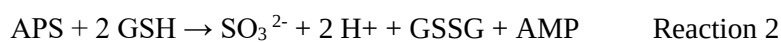
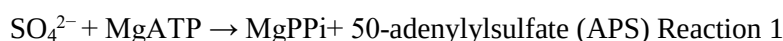


Figure 6 : Les voies d'assimilation réductrice et non réductrice du sulfate (SO_4^{2-}) dans la cellule végétale. Les voies d'assimilation réductrice et non réductrice sont respectivement représentées en vert et en bleu. Les enzymes sont indiquées en italique. Les molécules produites sont présentées en rouge. **AcétylCoA** : AcétylCo-enzyme A, **APR** : Adénosine 5'-phosphosulfate réductase, **APS** : Adénosine 5'-phosphosulfate, **Cys** : cystéine, **GSH** : glutathion sous forme réduite, **Met** : méthionine, **OAS** : O-acétylsérine, **OASTL** : O-acétylsérinethiolylase, **PAPS** : 3'-phospho-5'-adénylylsulfate, S^{2-} : sulfure, **SAT** : S-acétyl-transférase, SO_3^{2-} : sulfite, **SR** : sulfite réductase (Leustek et Saito, 1999 ; De Kok et al., 2005).

a. Voie d'assimilation réductrice

Les enzymes catalysant les réactions de cette voie sont majoritairement localisés dans les chloroplastes et les électrons sont fournis par la ferrédoxine réduite (Abdallah, 2010). L'ion sulfate est un composé inactif qui doit être activé avant d'être réduit et métabolisé (Saito, 2004). La réaction d'activation commence par l'adénylation de sulfate qui forme une molécule d'Adénosine-5'-phosphosulfate (APS) (Réaction 1). La réduction de sulfate s'effectue en deux étapes. En premier, l'APS réductase transfère deux électrons à l'APS en

produisant du sulfite (SO_3^{2-}) (Réaction 2). Le sulfite peut être directement utilisé comme source de S pour l'UDP-sulfoquinovose qui est le précurseur des sulfolipides (Rausch et Wachter, 2005) ou encore il peut être impliqué dans une deuxième voie de réduction appelée « Carrier bound pathway » dans laquelle le sulfite n'est pas libre mais lié au groupement thiol d'un transporteur (Fig. 6). Néanmoins, cette voie est toujours discutée (Leustek et saito, 1999). La seconde étape de la réduction du sulfate concerne la formation de sulfure (S^{2-}) par le transfert de six électrons au sulfite par l'action du sulfite réductase (Réaction 3). Cette réaction implique la ferrédoxine réduite comme source d'électrons. L'étape d'assimilation au vrai sens du terme commence lorsque le sulfure réagit avec l'O-acétylsérine (OAS) pour former la cystéine. Cette réaction est catalysée par l'OAS-thiol-lyase (OAS-TL) (Réactions 4). Le reste de l'ion sulfure dans les chloroplastes est libéré pour servir de substrat aux enzymes du cytosol et des mitochondries.

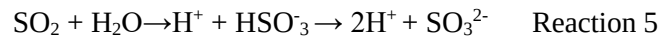


L'OAS est formée par l'acétylation de la sérine avec l'acétyl-CoA qui est catalysée par la sérine acétyl-transférase (Fig.6). La synthèse de la cystéine est une réaction majeure dans le couplage direct entre le métabolisme du soufre et de l'azote dans la plante (Fig.7) (Brunold *et al.*, 1993, 2003).



Le SO_2 absorbé par les feuilles, entre également dans la voie du métabolisme du soufre dans la plante. Le gaz (SO_2) dissous dans la solution cellulaire du mésophylle est rapidement hydraté et dissocié, donnant du bisulfite et du sulfite (Réaction 5). Ces derniers seront par la

suite incorporés dans la voie de la réduction du soufre dans les chloroplastes, ou réduits par voie enzymatique en sulfate au niveau de l'apoplaste ou du symplaste.



Le deuxième acide aminé soufré, la méthionine, est issu de la cystéine à travers l'homocystéine (Saito, 2004). La cystéine est également le précurseur de plusieurs autres composés organiques soufrés en particulier le glutathion, les protéines, les sulfolipides et des composés soufrés secondaires qui sont synthétisés par des réactions qui ne sont pas spécifiques au règne végétal (Leustek et Saito, 1999 ; Saito, 2000, 2004 ; Droux, 2004). La cystéine est la source du soufre réduit (-SH) incorporé dans les molécules organiques.

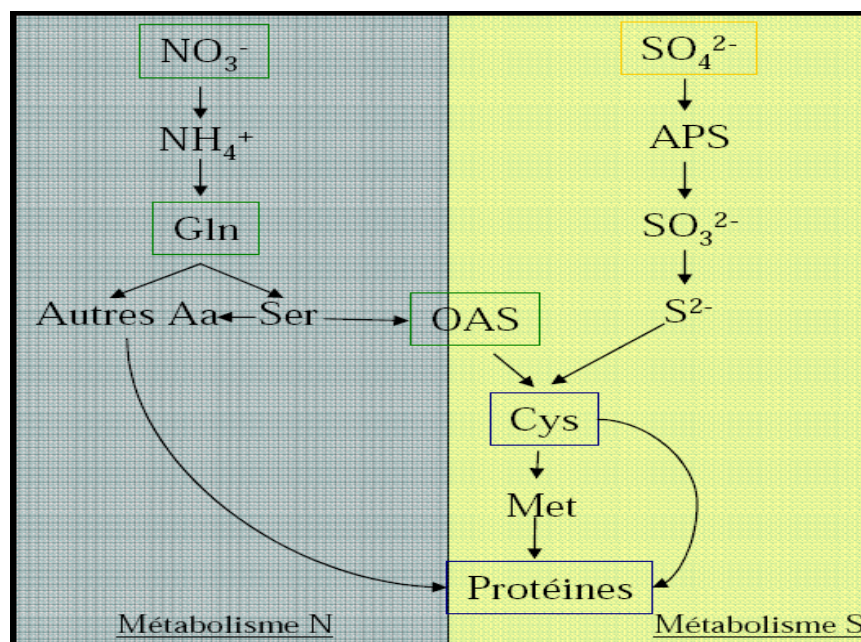


Figure 7: Interactions et régulations entre l'assimilation de l'azote et celle du soufre chez les végétaux supérieures (Smith *et al.*, 1997; Kopriva et Rennenberg, 2004).

b. Voie d'assimilation non réductrice

Les réactions de cette voie d'assimilation se déroulent dans le cytosol. Après activation de sulfate sous forme d'APS, la fixation d'un groupement phosphate en position 3' de l'APS sous l'action de l'APS kinase permet la formation du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) (De Kok *et al.*, 2005; Rausch et Wachter, 2005). Le PAPS constitue ensuite une source de sulfate activé qui servira comme substrat pour les sulfo-transférases qui catalysent la sulfatation d'un certain nombre de composés précurseurs des flavonoïdes, des glucosinolates et des sulfolipides (Leustek et Saito, 1999; Saito, 2004).

III Interaction entre le soufre et les autres éléments minéraux

1. Interaction soufre-azote

Les processus d'assimilations de l'azote (N) et du soufre (S) par les plantes sont étroitement associés (Zhao *et al.*, 1997). Ils sont tous les deux des constituants importants des protéines. L'apport adéquat en ces deux éléments est important pour un rendement optimal des cultures. Plusieurs travaux ont montré la régulation de l'assimilation de l'azote par la disponibilité de S (McGrath et Zhao, 1996 ; Brennan et Bolland, 2008). Cette régulation intervient plus particulièrement au niveau des premières étapes de l'assimilation de l'azote telles que l'absorption et la réduction du nitrate (Koprivova *et al.*, 2000 ; Prosser *et al.*, 2001; Kopriva et Rennenberg, 2004).

L'interaction entre N et S concerne également la production de L'O-acétyl sérine (OAS) un composé azoté qui constitue le substrat de base pour la synthèse de nombreux composés soufrés organiques (Fig. 8). La littérature montre que cette molécule joue un rôle clef dans la co-régulation du métabolisme N et S (Hopkins *et al.*, 2005) et sa teneur augmente en cas de carence en soufre dans les feuilles et les racines des plantes privée en soufre (Wirtz *et al.*, 2004, Buchner *et al.*, 2004, Hopkins *et al.*, 2005).

Les interactions régulatrices entre l'assimilation du soufre et le métabolisme de l'azote est essentiellement maintenue pour coordonner le flux des deux éléments car les plantes ont tendance à maintenir un rapport N/S relativement fixe pour la synthèse des protéines (Hesse *et al.*, 2004; Carfagna *et al.*, 2011). Le ratio N/S est largement utilisé pour le diagnostic du statut S des cultures mais l'utilisation de ce rapport comme critère de diagnostic peut être une problématique car le même rapport peut être obtenu à des niveaux de concentration totalement différents dans le tissu, et par conséquent l'excès d'un élément peut donc être interprété comme une déficience de l'autre, dans le même sens Dijkshoorn et Van Wijk (1966) ont révélé que, même si le rapport du N total sur S total (N/S) varie largement, dans des conditions nutritionnelles adéquates le rapport N organique sur S organique reste plutôt constant à environ 17,5 chez les légumineuses et 13,8 chez les graminées.

La relation régulatrice entre N et S paraît également en cas d'excès de N par rapport à l'offre de S ce qui entraîne un déséquilibre nutritionnel qui peut restreindre la synthèse des protéines et réduire le développement des cultures, par conséquent, les besoins de la plante en S augmenteront avec l'augmentation de l'apport en N (Janzen et Bettany, 1984). La déficience en S peut être accentuée à des concentrations élevées en azote dans le milieu (Janzen et Bettany, 1984; McGrath et Zhao, 1996 ; Brennan et Bolland, 2008).

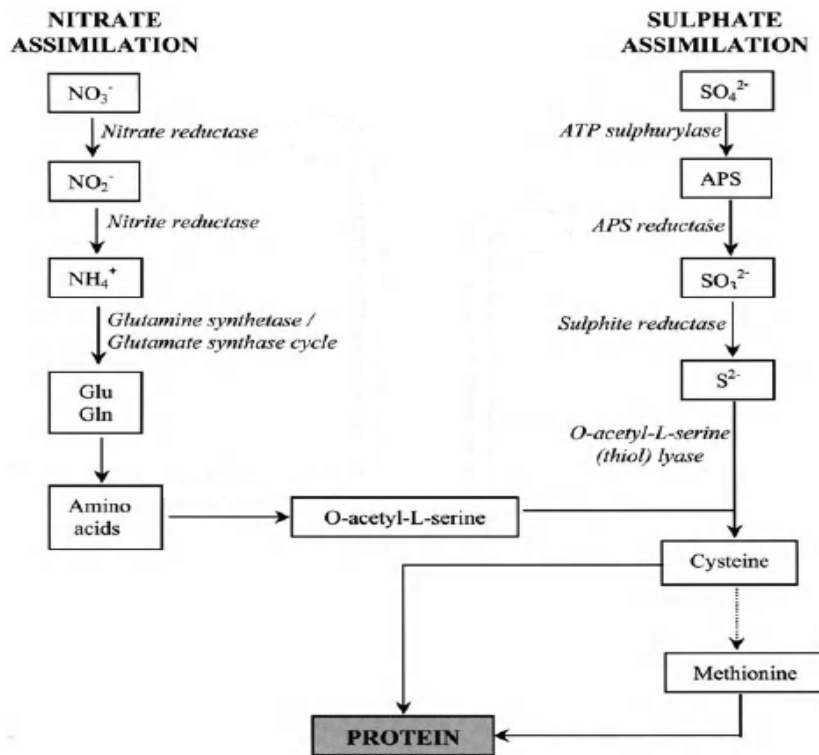


Figure 8 : Couplage métabolique entre les voies d'assimilation du soufre et de l'azote chez les végétaux supérieurs

2. Interaction soufre- autres éléments minéraux

L'effet antagoniste entre le phosphore (P) et le soufre a été démontré dans plusieurs travaux. La littérature suggère une compétition entre le sulfate et le phosphate pour les voies d'absorption et de translocation, ce qui peut influencer le flux et le mouvement de ces 2 éléments dans la plante (Jones *et al.*, 1970; Marok et Dev, 1980 ; Islam *et al.*, 2001 ; Bharose *et al.*, 2011). Cependant, Grant et Hawkesford (2015) supposent l'improbabilité de cette suggestion en se basant sur des connaissances ultérieures et sur la nature moléculaire indépendante des transporteurs des deux éléments. Soliman *et al.* (1992) a montré que l'effet acidifiant de S sur le sol peut influencer la solubilité de P et donc une fertilisation soufrée diminuera l'absorption de P par la plante, et vice versa, la présence de grande concentration en P dans le milieu peut diminuer la disponibilité de S et aggraver l'état de déficience en soufre si le niveau de S est déjà faible dans le sol (Grant et Hawkesford, 2015).

L'interaction entre le Molybdate et le S à travers les transporteurs des ions sulfates a été prouvée à plusieurs occasions (Dudev et Lim, 2004; Alhendawi *et al.*, 2005). Les deux anions sont des analogues chimiques et ils peuvent être en concurrence pour les mêmes transporteurs. Le sélénate (Se) comme le molybdate, est chimiquement similaire au sulfate. Ils sont absorbés et transportés par les mêmes transporteurs (Terry *et al.*, 2000 ; Kaiser *et al.*, 2005). L'effet antagoniste de S et Se apparaît dans les sols à forte concentration en sélénium. L'apport du soufre diminue les niveaux de sélénate dans les cultures (Grantham-Hawkesford, 2015).

L'interaction entre le Soufre et les métaux lourds a également été prouvée. Il a été montré que l'exposition aux métaux lourds peut augmenter l'absorption des ions sulfates et réguler la synthèse de certain nombre d'enzymes qui sont impliquées dans l'assimilation du soufre (Na et Salt, 2011). Le glutathion semble jouer un rôle important dans la tolérance des plantes aux métaux lourds, sa concentration dans les tissus végétaux augmente après exposition au Ni, Zn ou Cd (Na et Salt, 2011). Même constat a été rapporté concernant la phytochélatine synthétase qui est régulée par une gamme d'oligo-éléments incluant Cd, Zn, Cu, Hg, Al et Pb (Lee et Korban, 2002; Schat *et al.*, 2002; Stolt *et al.*, 2003; Na et Salt, 2011).

IV La déficience en soufre

Au cours des dernières années, la déficience en soufre est devenue un problème majeur pour l'agriculture causant des diminutions dans le rendement et dans la qualité des plantes (Hagel, 2005, Nikiforova *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2013). Cette déficience est due à la production intensive de cultures pour maximiser le rendement, à l'utilisation accrue d'engrais contenant peu ou pas de soufre et principalement, à la diminution des dépôts atmosphériques en soufre suite aux réglementations d'émissions plus strictes dans l'objectif d'améliorer la qualité de l'air. Klimont *et al.* (2011) ont signalé une diminution de la concentration de S

atmosphérique d'environ 20Tg entre 1990 et 2011 en Europe de l'Est, en Asie centrale, au Canada et aux États-Unis (Table 1).

Depuis le milieu des années 80, des symptômes de la déficience en soufre ont été observés dans les cultures de colza. Ils seraient liés à la réduction des dépôts atmosphériques qui fournissaient auparavant une source importante de S exploitée par la plante (Haneklaus *et al.*, 2008). De même, les effets de la carence en S sur la qualité du blé (*Triticum aestivum* L.) ont été observés de plus en plus, et dans les années qui suivirent la déficience en soufre est devenue une menace sérieuse pour la qualité et le rendement des cultures. Plusieurs études ont enregistré des diminutions dans les teneurs en soufre chez les plantes cultivées (McGrath *et al.*, 1996 ; Schnug, 1997; Scherer, 2001; Nikiforova *et al.*, 2004 ; 2005 ; Lee *et al.*, 2013).

Tableau 1. Émissions régionales de SO₂ entre 1990 et 2011(Tg SO₂) (Klimon *et al.*, 2011)

Régions	1990	1995	2000	2005	2010	2011
Afrique	5.4	5.2	4.9	5.4	5.8	5.1
Chine	16.5	21.2	24.2	32.4	29.9	29.1
Inde	3.4	4.6	5.7	6.9	9.5	10.1
moyen-Orient	3.6	4.8	5.0	5.3	5.7	5.6
L'autre Asie et Pacifique	8.8	9.2	8.9	8.2	7.9	7.8
Europe	28.8	18.8	13.3	10.5	6.9	6.6
Russie	11.1	6.4	5.9	6.2	4.7	4.4
Amérique latine et Caraïbes	6.8	6.5	7.3	5.3	5.0	5.0
US et Canada	23.2	20.0	17.6	16.1	9.5	8.1
Autres	6.8	8.2	9.8	12.0	13.6	13.6
Total	121	110	106	112	103	101

1. Réponse des plantes à la déficience en soufre

Le degré de réponse des plantes à la carence en soufre diffère selon la sensibilité des espèces. Lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions de carence en S, le colza développe des symptômes très rapidement, le maïs les développe tardivement, alors que d'autres cultures comme la pomme de terre, la betterave à sucre, et le haricot développent ces symptômes plus ou moins rapidement. La valeur critique du soufre sous laquelle la plante est supposée carencée en S varie selon les espèces végétales et dépend de plusieurs paramètres (espèces, stade d'échantillonnage, partie analysée de la plante et les composés soufrés utilisées pour la mesure du niveau du soufre dans la plante). Généralement, dans les plantes déficitaires en S, la concentration de soufre total doit être inférieure à 0,12% pour les brassicaceae alors que dans le cas des non-brassicaceae, cette valeur doit être inférieure à 0,75% (Haneklaus *et al.*, 2007).

2. Effets physiologiques et métaboliques de la déficience en soufre

a. Effet sur le rendement en biomasse

La carence en soufre est caractérisée par un dysfonctionnement de certaines voies métaboliques qui trouve son expression finale dans des troubles physiologiques et des symptômes visibles. Bien avant que de vraies perturbations métaboliques ne se produisent, une diminution d'approvisionnement en S limiterait la capacité des plantes à exploiter le rendement (Schnug et Haneklaus, 1994). Cependant, ce dernier représente une combinaison de paramètres individuels et des changements anormaux dans la structure d'une culture (Geisler, 1983). Il peut indiquer toute pénurie de facteurs de croissance avant que les premiers symptômes de déficience visibles n'apparaissent. Ces changements peuvent également être identifiés par une évaluation visuelle. Bien que les changements dans le rendement ne soient pas du tout spécifique, ils fournissent une information précieuse pour le diagnostic différentiel de la carence en S. Chez le colza par exemple, la structure de rendement la plus fortement

affectée par la carence en S est le nombre de graines par gousse. Ce dernier diminue de manière significative avec la carence en S (Schnug et Haneklaus, 1994). Cependant, même dans les conditions sévères de déficience en soufre, le colza peut redémarrer et/ou continuer la floraison, l'insertion des capsules et le remplissage des semences, et peut regagner un rendement complet si le S est fourni comme fertilisant (Schnug, 1988). Des cultures déficientes en S produisent moins de graines par épis (Rasmussen *et al.*, 1977, Haneklaus *et al.*, 1995). Si les céréales sont touchées par la carence en S dans les premiers stades de croissance (avant la fin du tallage), le nombre d'épis par tête est irréversiblement réduit même si le soufre est fourni comme fertilisant. Cela signifie que les cultures céréalières n'ont aucune capacité à compenser la carence en S dans des stades de croissance ultérieurs (Haneklaus *et al.*, 1995).

b. Effet sur le métabolisme soufré

En cas de déficience en S, les concentrations tissulaires de sulfate, de glutathion et de la cystéine diminuent (Hawkesford et DeKok, 2006) et l'appauvrissement en S conduit à la régulation de la réduction du soufre à plusieurs niveaux de la voie métabolique. Les deux principaux points de régulation sont l'absorption de sulfate et la réduction de l'APS (Davidian et Kopriva, 2010). La principale action régulatrice se produit au niveau de l'APS réductase. La régulation survient par inhibition allostérique et par activation ou répression de l'expression génique de l'APS réductase. L'expression et l'activité de l'APS réductase répond rapidement à la déficience en S ou à des diminutions dans des composés soufrés réduits, comme le sulfure, la cystéine ou le glutathion (Granth et Hawkesford, 2015). Lorsque le soufre est insuffisant, il y a une indisponibilité de sulfure pour la biosynthèse de la cystéine, ce qui conduit donc, à l'accumulation de l'OAS. Celui-ci peut réguler positivement la transcription de l'expression des transporteurs de sulfate et peut également annuler le feedback

négatif partiellement exercé par les composés soufrés réduits. (Howkesford, 2000 ; Grant et Hawkesford, 2015).

c. Effet sur la photosynthèse

La chlorose présente l'un des symptômes spécifiques de la déficience en soufre. Le jaunissement apparaît sur les bords des jeunes feuilles, puis se répand sur toute la feuille (Bergmann, 1992 ; Burke, *et al.*, 1986; Stuiver *et al.*,1997). Ceci est dû en général à des perturbations dans l'appareil photosynthétique (Maxwell et Johnson, 2000). Le soufre est un élément chloroplastique structurel important qui entre dans la composition de la ferrédoxine, la thiorédoxine, la sulfatase réductase, la nitrite réductase et certaines protéines de la chaîne de transfert des électrons localisées sur la membrane des thylakoides. Cette dernière est constituée par un sulfolipide qui assure sa fluidité et favorise les réactions photosynthétiques. La majeure partie du soufre présent dans les chloroplastes est contenue dans la Ribulose 1-5 diphosphate carboxylase/oxygénase dont la synthèse est réduite suite à la déficience en soufre (Abdallah, 2010). L'inhibition de la photosynthèse suite à la carence en soufre est généralement associée à une baisse dans les teneurs en pigments chlorophylliens (Dietz, 1989 ; Gilbert *et al.*,1997; Ahmad et Abdin, 2000; Zhao *et al.*,2001), à la dégradation des métabolites soufrés secondaires dont les sulfolipides, à la perte d'activité du photosystème II et à une baisse de la synthèse de la Rubisco (Marayuma-Nakashita *et al.*,2003 ; Hirai *et al.*, 2003). Le statut redox et les teneurs en glutathion (GSH) et en thiorédoxine permettent de faire face aux effets du stress oxydatif, ils interviennent aussi dans le contrôle de la synthèse d'une protéine constitutive du photosystème II (Giordano *et al.*, 2000 ; Hirai *et al.*, 2003). En cas de carence en soufre, la perturbation de ce statut redox entraîne la génération d'espèces réactives d'oxygène responsables de la destruction du photosystème II (Marayuma-Nakashita *et al.*, 2003; May *et al.*,1998).

d. Effet sur le métabolisme azoté

L'interaction entre le métabolisme du soufre et celui de l'azote semble plus claire en cas de déficience en soufre ou en cas d'une perturbation de son absorption et de son assimilation. Chez des plantes de Tabac (*Nicotiana tabacum*), la privation en soufre a été associée à une diminution accentuée de la nitrate réductase (Reuveny *et al.*, 1980). Prosser *et al.* (2001) ont observé une diminution de l'absorption du nitrate chez l'épinard (*Spinacia oleracea*) cultivé en conditions de carence en sulfate.

Chez des cultures d'orge (*Hordeum vulgare*) et d'épinard (*Spinacia oleracea*) privées en soufre, la première réponse observée est une diminution de l'absorption et de la translocation du nitrate (Clarkson *et al.*, 1989; Karmoker *et al.*, 1991; Prosser *et al.*, 2001). La carence en soufre chez l'orge, étudiée par (Clarkson *et al.*, 1989), engendre une altération dans les voies de translocation d'ammonium et du nitrate vers les organes aériens (Karmoker *et al.*, 1991). Par ailleurs, il a été montré que la privation en sulfate inhibe l'activité nitrate réductase (NR) via une répression de la transcription. Cette inhibition pourrait être engendrée par l'accumulation des produits d'assimilation de l'azote tels que l'ammonium ou les acides aminés (Migge *et al.*, 2000). L'activité de la NR reste positivement contrôlée par la photosynthèse, elle-même fortement inhibée par une carence en soufre (Maxwell et Johnson, 2000)

3. Contrôle transcriptionnel en réponse à la déficience en soufre

Si l'approvisionnement du milieu en soufre est limité, la plante met en jeu un nombre de mécanismes régulateurs de la transcription de certains gènes impliqués dans la réponse à la déficience en soufre. En effet, la régulation de l'expression génétique se produit à plusieurs niveaux de la voie d'assimilation du S par la plante, mais le plus grand contrôle semble être au niveau des transporteurs, dont la taille et l'activité des groupes d'ARNm sont régulées par la disponibilité du soufre (Grant et Hawkesford, 2015). «SURE» (Sulfur Responsive

Elements), une séquence promotrice du gène codant pour le transporteur *SULTR1;1* a été détectée en surexpression chez *A. thaliana* soumise à la déficience en soufre (Marayuma-Nakashita *et al.*, 2005). Toutefois il a été rapporté que l'expression de ce gène peut être enregistrée dans des cas non liés à la déficience en soufre, et donc sa considération doit être associée à une évaluation de l'état nutritionnelle de la plante en S (Lewandowska et Sirko 2008). Le trans-regulateur le plus important, responsable de la régulation transcriptionnelle directe des gènes impliqués dans l'absorption et l'assimilation du soufre est « SLIM1 » (Sulfur limitation 1). Il influence l'activité des gènes codant pour les transporteurs des groupes 1,3 et 4, il joue un rôle important dans la réponse à la déficience en soufre et sa désactivation induit une diminution d'environ 60% dans l'absorption et l'assimilation du S (Marayuma-Nakashita *et al.*, 2005 ; Lewandowska et Sirko 2008). Le trans-regulateur « SLIM1 » influence également l'expression de nombreux gènes liés à l'insuffisance en soufre et en particulier les gènes codants des enzymes de la voie métabolique des glucosinolates (Lewandowska et Sirko 2008). Les glucosinolates sont les premiers métabolites dégradés en cas de déficience en S et les produits qui en résultent sont incorporés par la suite dans la synthèse des métabolites primaires (Haneklaus *et al.*, 2006, 2007 ; Lewandowska et Sirko 2008), « SLIM1 » intervient dans ce procédé de recyclage du soufre par l'activation de la transcription des gènes codants pour des enzymes impliquées dans la voie de dégradation des glucosinolates et diminue, en revanche, l'expression des enzymes impliquées dans leur synthèse (Lewandowska et Sirko, 2008). BIG (protéine analogue à la Calossine nécessaire au transport de l'auxine polaire chez *Arabidopsis*) est un autre gène chez *Arabidopsis* impliqué dans la régulation de la transcription des gènes sous limitation du soufre, il intervient essentiellement au niveau de la régulation entre le métabolisme de l'OAS et celui du GSH (Kasajima *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces régulateurs transcriptionnels servent essentiellement de coordinateurs de l'homéostasie du soufre, entraînant des changements métaboliques plutôt que des effecteurs directs de la voie d'assimilation de sulfates.

4. Diagnostic de l'état de déficience chez les plantes

a. Les paramètres biologiques

De nombreux auteurs ont proposé le contenu en sulfate comme le critère de diagnostic le plus approprié dans le cas de la carence en soufre chez les plantes (Spencer et Freney, 1980 ; Maynard *et al.*, 1983; Cerda *et al.*, 1984; Spencer *et al.*, 1984). Ils justifient leur opinion en se référant au rôle du sulfate comme principale forme de transport et de stockage de soufre chez les plantes (Saalbach, 1970, Syers *et al.*, 1987), d'autres auteurs, cependant, supposent que le sulfate n'est généralement pas un bon indicateur de l'état de déficience en soufre pour les *brassicaceae* car en cas de déficit en S la dégradation des glucosinolates pourrait fausser le résultat (Haneklaus *et al.* , 2007).

D'autres auteurs attribuent cette fonction de diagnostic au glutathion (Yoshida et Chaudry, 1979; Morris *et al.*, 1984). En cas d'une nutrition normale en soufre, environ la moitié du soufre total dans les feuilles est sous forme de soufre insoluble comme les protéines, environ 42% est sous forme de sulfate, et le reste est présent sous forme de glutathion et de glucosinolates. En revanche, en cas de déficience en soufre, environ 70% à 90% de soufre est présent sous forme de sulfates, alors que le glutathion et les glucosinolates ne représentent qu'environ 1% (Blake-Kalff *et al.*, 1998). Cependant, la concentration en soufre totale reste le paramètre le plus fréquemment utilisé pour l'évaluation de l'état nutritionnel en soufre grâce à sa stabilité (Haneklaus, 2007).

b. Les paramètres composés

Les paramètres composés les plus connus sont le rapport N/S et le pourcentage de sulfate de la teneur totale du S, l'idée du rapport N/S repose sur la logique que les plantes ont besoin de

soufre comme de l'azote principalement pour la biosynthèse des acides aminés (Dijkshoorn et Van Wijk, 1967 ; Stewart, 1969). Par conséquent, des changements dans le rapport N/S ont été proposés comme indicateurs de la carence en S (Stewart et Porter, 1969; Murphy, 1988). Malgré l'importance des rapports nutritifs dans les tissus végétaux, l'argument le plus frappant contre l'utilisation du rapport N/S comme critère principale de diagnostic, autre que le fait qu'il nécessite la détermination de deux éléments, c'est que le même ratio de N/S peut être obtenu à des niveaux de concentration totalement différents dans le tissu et donc l'excès dans un élément peut donc être faussement interprété comme une déficience dans l'autre (Finck, 1970). Par contre, la proportion de l'ion sulfate par rapport à la teneur totale en soufre, a été proposée comme critère de diagnostic par plusieurs auteurs (Spencer et Freney, 1980; Spencer *et al.*, 1984). Il semble que les plantes sont suffisamment alimentées en soufre lorsque plus de 12% de leur S total est sous forme de sulfates, l'avantage de l'utilisation de ce critère de diagnostic et que cette valeur est très peu affectée par l'âge de la plante (Smith et Dolby, 1977).

Par ailleurs, des études récentes ont confirmé l'efficacité de l'utilisation d'autres rapports nutritifs comme indicateurs de la déficience en soufre. Maillard *et al.* (2016) a montré que le rapport Mo/S dans les feuilles peut être utilisé comme indicateur de déficience en soufre, cependant, vu les concentrations faibles en Mo dans le tissu foliaire, le calcul de ce paramètre nécessite des méthodes sensibles et performantes comme la Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP). Cela fait de lui un paramètre difficile à utiliser quotidiennement. Sorin *et al.* (2015) et Etienne *et al.* (2018) ont proposé l'utilisation du rapport $(\text{Cl}^- + \text{NO}_3^- + \text{PO}_4^{3-})/\text{SO}_4^{2-}$ comme indicateur de la déficience en soufre, ce paramètre peut être utilisé comme indicateur précoce aux perturbations métaboliques induites par la déficience en soufre. Etienne *et al.* (2018) ont montré que l'utilisation du rapport $(\text{Cl}^- + \text{NO}_3^- + \text{PO}_4^{3-})/\text{SO}_4^{2-}$ peut être simplifiée par la mesure des éléments Cl, P et S dans les feuilles et le calcul du

rapport (Cl+ P)/S peut être une méthode simple et rapide pour le diagnostic foliaire de l'état de déficience en soufre.

V Stratégies d'adaptation des plantes à la déficience en soufre

En cas de déficience en soufre, les plantes développent une stratégie d'adaptation qui consiste à améliorer l'Efficiencia d'Utilisation du Soufre (EUS). L'EUS se détermine principalement à travers la vitesse de croissance relative observée chez les plantes limitées en S. Elle est estimée au stade reproducteur de la plante à partir des composantes de rendement : l'indice de récolte, la production, la teneur en protéines (Balint et Rengel, 2009). Hawkesford (2000) a proposé deux voies principales possibles pour l'amélioration de la stratégie d'EUS :

- **Stratégie visant à l'optimisation de l'acquisition du soufre** via : (i) des modifications dans l'architecture des racines afin d'améliorer l'acquisition des sulfates du sol. Cette voie consisterait à contrôler la structure racinaire et sa prolifération (Hawkesford, 2000), et à favoriser sa croissance dans le but de maximiser la zone de prospection du sol par la plante ce qui permettrait une colonisation potentielle des zones riches en soufre vu que le soufre est très mobile dans la solution du sol. (ii) la régulation transcriptionnelle des transporteurs de sulfates par la multiplication des transporteurs de sulfates à fortes affinités sur la membrane plasmique (Shinmachi *et al.*, 2010). L'expression des gènes codants pour ces transporteurs est régulée au niveau transcriptionnel par le niveau de disponibilité en soufre (Takahashi *et al.*, 1997; Hawkesford, 2000; Leustek *et al.*, 2000; Saito, 2000; Hesse *et al.*, 2004).

- **Stratégie visant à optimiser l'utilisation des réserves en S** via la mobilisation des réserves au sein des organes. Cette stratégie consiste à mobiliser des composés soufrés des organes puits vers les organes en croissance. Les principaux composés qui pourraient être mobilisés sont le sulfate potentiellement accumulé dans les vacuoles, les acides aminés et des peptides soufrés comme le glutathion ou bien les protéines foliaires. Mais cette mobilisation

s'est montrée inefficace chez certaines espèces comme le colza et insuffisante à couvrir les besoins en S des jeunes feuilles, organes présentant les premiers symptômes de chlorose (Blake-Kalff *et al.*, 1998).

VI Plantes aromatiques et médicinales au Maroc

1. Espèces cultivées

Le secteur des plantes aromatiques et médicinales (PAM) au Maroc abonde de potentiel grâce à sa grande diversité en espèces. La forte augmentation de la demande mondiale enregistrée ces dernières décennies pour les PAM et leurs dérivés, et le nombre croissant d'utilisateurs et la diversité des domaines d'utilisation des PAM a fait augmenter l'importance de ce secteur. La production des PAM au Maroc est globalement assurée par les plantes spontanées, alors que les cultivées ne présentent que 2% (Hceflcd, 2008). La culture des PAM est répandue dans plusieurs régions du pays et concerne environ une trentaine d'espèces dont dix espèces sont les plus cultivées (tableau 2).

Tableau 2 : Production des PAM cultivées au Maroc en 2004 (Zrira, 2010, 2011).

PAM cultivées	Surface cultivé (ha)	Production (T)
Anis	520	260
Safran	600	1
Fenugrec	1400	550
Fenouil	250	170
Cumin	3000	550
Coriandre	7000	6300
Niora	6920	27440
menthe	1800	40000
Rose	-	500
Jasmin	100	200

2. Fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*)

Le fenugrec, *Trigonella foenum-graecum*, est connu et utilisé à différentes fins dans les temps anciens, notamment dans la région méditerranéenne, la Chine, l'Inde et l'Indonésie. Cependant, l'origine exacte de cette plante est difficile à déterminer (Petropoulos *et al.*, 2002). Certains auteurs ont suggéré qu'elle est originaire de la région méditerranéenne, d'autres ont

proposé une origine asiatique (Mehrafarin *et al.*, 2011). Le fenugrec est caractérisé par une large distribution à travers le monde, notamment dans les pays de l'Afrique du Nord (Tunisie, Algérie, Maroc et en Egypte), et également en Asie du sud-ouest, en Inde, au Pakistan, en Chine et au Japon. Sa culture s'est étendue plus récemment à l'Europe centrale, au Portugal, en Espagne, au Royaume-Uni et aux États-Unis (Parthasarathy *et al.*, 2008).

a. Taxonomie de la Plante

Les espèces de *Trigonella* identifiées pour l'instant sont en nombre de 18, mais *Trigonella foenum-graecum* est la seule espèce cultivée (Helambe et Dande, 2012)

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnolipsida

Famille : Fabaceae

Genre : *Trigonilla*

Espèce : *Trigonella foenum-graecum* (Mehani et Segni, 2012)

b. Description Botanique

Le fenugrec est une plante herbacée, annuelle, poilue ou glabre selon les variétés, pouvant atteindre 50 cm de hauteur. Elle possède une racine principale bien développée et une tige dressée rameuse et cylindrique (Who, 2007). Les feuilles sont composées de 3 folioles ovales et denticulées. L'inflorescence montre des fleurs axillaires, groupées par deux, rarement solitaires (Parthasarathy *et al.*, 2008). La fleur est sessile, dite papilionacée, de couleur jaune pâle, composée d'un calice à cinq sépales non divisées, d'une corolle à cinq pétales libres de forme triangulaire et de dix étamines et un ovaire pluri-ovulé. Le fruit est une gousse linéaire qui renferme de 10 à 20 graines d'une longueur de 5 mm, dures et jaunes. Ils sont aplatis et ont un contour rhomboïdal très caractéristique (Ait Youssef, 2006) (Fig. 9).



Figure 9 : *Trigonella foenum-graecum* ; (a) Plante entière, (b) la gousse, (c) les feuilles, (d) les graines

c. Composition biochimique

Les feuilles contiennent environ 4,4% de protéines, 0,9% d'acides gras, 1,5% d'éléments minéraux dont les plus abondants sont le calcium, le fer et phosphore, 1,1% de fibres et des hydrates et environ 6% de carbone, les feuilles de fenugrec contiennent également des carotènes, la thiamine, la riboflavine, la niacine et la vitamine C (Snehlata, 2012).

Les protéines constituent entre 20 et 30% du poids sec de la graine de fenugrec avec une teneur importante en nucléoprotéines (Ghedira *et al.*, 2010), elle est caractérisée par la présence d'un acide aminé très rare, qui est la 4-hydroxy-isoleucine qui présente entre 0,1 et 0,3% du poids de la graine sèche (Wichtl et Anton, 2003).

La graine de fenugrec renferme des lipides (7 à 10%) dont 1,5 à 2% de lécithine et une huile grasse dans l'embryon (renfermant principalement de l'acide linoléique et de l'acide linolénique). Les glucides sont particulièrement abondants (20 à 45%) notamment les fibres (cellulose, hémicellulose, etc.), des mucilages surtout localisés sur les parois cellulaires de l'endosperme et constitués de chaînes de mannoses et de chaînes de galactoses avec de faibles proportions de xylose, (Snehlata, 2012). La graine de fenugrec renferme également des alcaloïdes dont la plus caractéristique est la trigonelline (0,37%) (Snehlata, 2012 ; Nathiya, 2014). La graine constitue également une source potentielle de sapogénines conduisant, après hydrolyse à la formation de la diosgénine (0,1-2,2%) ainsi qu'à une dizaine d'autres aglycones, les stérols et particulièrement le cholestérol et le sitostérol sont également présents dans la graine de fenugrec (Wichtl et Anton, 2003 ; Mehrafarin, 2011).

d. Composés phénoliques

La teneur en polyphénols totaux de la graine de fenugrec varient entre 4mg et 60mg/g de la graine sèche (selon les conditions environnementales) (Bukhari *et al.*, 2008 ; Pandey et Awasthi, 2013 ; Abeer AL Mashkor, 2014); les flavonoïdes présentent également une bonne partie des composés phénoliques dans la graine.

La graine de fenugrec a été l'objet de plusieurs études chromatographiques afin d'identifier les différentes molécules de la graine. Plusieurs travaux ont montré que la graine de *Trigonella foenum-graecum* contient des flavonoïdes comme étant le composé phénolique le plus abondant. L'apigénine, la lutéoline, le kaempférol et la Quercétine présentent les classes de flavonoïdes les plus majeurs dans la graine du Fenugrec (Kenny *et al.*, 2013; Benayad *et al.*, 2014; Kadaikunnan *et al.*, 2015; Keskes *et al.*, 2018).

Par l'entremise de la séparation chromatographique par HPLC lié à la spectrométrie de masse (LC-MS), Benayad *et al.* (2014) ont pu identifier 28 composés phénoliques regroupés en flavones di-C-glycosides, flavonol O-di-glycosides, flavones tri- et tétra O- ou C-glycosides et

des flavones acylés en O-, C-glycosides, La plupart des flavones identifiés étaient des dérivés de l'apigénine et de la lutéoline, alors que seuls deux flavonoïdes des glycosides de kaempférol, ont été détectés. Farag *et al.* (2016) ont pu identifier 22 C-,O-flavonoïde et 2 acides phénoliques dans un extrait phénolique des graines de fenugrec en utilisant l'HPLC-MS. Ces flavonoïdes sont majoritairement des O-C-glycosides dont la partie aglycone est soit une apigénine ou une lutéoline. Dans une autre étude menée par Keskes *et al.* (2018), l'analyse de l'extrait méthanolique des graines de fenugrec par HPLC-MS a révélé la présence de 3 flavones C-glucosides dont la partie aglycone est une apigénine ou une lutéoline.

e. Utilisations médicinales

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été attribués à la consommation de fenugrec. Ces effets ont été mis en évidence lors d'essais effectués chez certains animaux.

Activité antioxydante : Les extraits de graines de fenugrec montrent une forte activité anti-radicalaire par piégeage du radical DPPH (Bukhari, 2008 ; Madhava Naidu *et al.*, 2011; Abeed ALMashkor, 2014), et il semble que cette activité est à l'origine des qualités thérapeutiques de la plante (Marzouk *et al.*, 2013). La propriété antioxydante de la plante a été attribuée à la présence de nombreux produits phytochimiques actifs, comme les flavonoïdes, les stérols végétaux, les vitamines, les coumarines, les caroténoïdes, la lignine et la saponine. Cependant, les composés phénoliques ont eu la plus forte contribution dans cet effet (Pak 2008). Plusieurs études cliniques ont montré que les radicaux libres qui induisent un stress oxydatif sont à l'origine d'une grande variété de maladies (Shirzad *et al.*, 2011; Baradaran *et al.*, 2013; Nasri, 2013; Bahmani et Rafieian-Kopaei, 2014).

Activité antimicrobienne : Les graines du fenugrec possèdent une forte activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Khanra *et al.*, 2010), et contre *Vibrio vulnificus* et *Micrococcus luteus* (Asimi *et al.*, 2013). Dharajiya *et al.*, (2016) ont montré que les feuilles de fenugrec possèdent une forte capacité inhibitrice contre *Serratia*

marcescens, *bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Cette capacité antimicrobienne a été attribuée à la présence de nombreuses molécules bioactives, comme les flavonoïdes, les stérols végétaux, les coumarines, les terpénoïdes, les caroténoïdes, la lignine et la saponine.

Activité antidiabétique : Des essais préliminaires sur des animaux et des humains suggèrent des propriétés hypoglycémiques possibles de la poudre de graines de fenugrec prise par voie orale. La graine de fenugrec est bien connue pour être utilisée comme remède antidiabétique (Raju *et al.*, 2001 ; Khalki *et al.*, 2010). Hannan *et al.*, (2006), ont montré l'efficacité de la poudre des graines de *Trigonella* dans le contrôle glycémique chez des rats diabétiques de type 1 et de type 2. Chez l'homme, Gupta *et al.*, (2001), ont montré que le taux du glucose dans le sang d'individus souffrant du diabète de type 2, diminue significativement en recevant une dose journalière d'un extrait hydroalcoolique de graine de *Trigonella* pendant deux mois. Cet effet antidiabétique de fenugrec est lié essentiellement à la présence du Galactomannane par sa propriété visqueuse. Il a le potentiel de réduire l'absorption intestinale de glucose et donc joue un rôle important dans le contrôle de la glycémie (Srichamroen *et al.*, 2008).

Activité hypocholestérolémiques : La graine de fenugrec possède des effets hypocholestérolémiques (Sharma *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 1996a; Sharma *et al.*, 1996b). Mathern *et al.* (2009) ont montré que le fenugrec baisse le taux du cholestérol sérique et le taux de triglycérides et des lipoprotéines chez des patients atteints d'hypercholestérolémie. Chez des rats souffrant d'obésité, l'introduction de fenugrec dans le régime alimentaire diminue l'accumulation de triglycérides dans le foie, tandis que l'excrétion d'acide biliaire et l'élimination du cholestérol augmente par l'administration de fenugrec (Rashmi et Rahul, 2011). Cela peut être dû à une réaction entre les acides biliaires et les dérivés du fenugrec, essentiellement les saponines, ce qui provoque la formation de micelles qui jouent un rôle très important pour l'absorption du tube digestif (Olaiya et Soetan, 2014).

Activité anticarcinogène : Des travaux ont montré que l'extrait de fenugrec possède une forte Activité anti-carcinogène par l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses (Shabbeer *et al.*, 2009). Bhatia *et al.* (2006) ont montré également que l'extrait de fenugrec possède d'un effet protecteur et promoteur pour la thérapie complémentaire chez des patients cancéreux sous l'intervention de la chimiothérapie.

Les Propriétés anticancéreuses de la graine de *Trigonella* sont dues à plusieurs molécules bioactives présentes dans la plante, comme les flavonoïdes, les fibres et les saponines. Sur *et al.* (2001) ont prouvé que les saponines, flavonoïdes et les fibres possèdent un rôle important dans la diminution de l'activité de la β -glucuronidase ce qui empêche les agents cancérogènes libres d'agir sur les colonocytes. De plus, la Diosgenine extraite de la graine de fenugrec est utilisée comme matière première pour la synthèse d'hormones stéroïdes telles que la cortisone et les progestérones potentiellement importantes dans le traitement du cancer (Aggarwal et Shishodia, 2006).

3. Fenouil (*Foeniculum vulgare*)

Foeniculum vulgare Mill, communément appelé fenouil appartient à la Famille des Apiaceae, c'est une plante vivace à odeur aromatique. Elle est originaire du sud de l'Europe et de la région méditerranéenne, largement cultivée en Chine (Weiping et Baokang, 2004), en Inde (Grieve, 1931) et au Maroc (Zrira, 2010, 2011; ElAzzouzi et Zidane 2015). Les jeunes pousses, les feuilles et les fruits complètement mûrs et séchés de *Foeniculum vulgare* Mill, sont couramment utilisés dans la médecine traditionnelle. En tant que culture économique importante, le fenouil a été utilisé et commercialisé pendant des siècles en raison de son utilisation thérapeutique et culinaire. Le thé aux herbes de fenouil, y compris les infusions et les thés instantanés contenant l'extrait de graine de fenouil, est un remède familial habituel utilisé pour le traitement d'une variété de symptômes des voies gastro-intestinales et respiratoires dans certaines régions d'Europe et d'Asie (Raffo *et al.*, 2011)

a. Taxonomie de la plante

Régne : Plantae,

Division: Tracheophyta,

Subdivision: Spermatophytina,

Classe: Magnoliopsida,

Ordre: Apiales,

Famille: Apiaceae,

Genre: Foeniculum,

Espèce : *Foeniculum vulgare*, (Shamkant *et al.*, 2014)

b. Description botanique

Le fenouil est une ancienne herbe saisonnière. Il est cultivé dans les champs et se développe aussi bien à l'état sauvage. *Foeniculum vulgare* est une plante herbacée verticale, ramifiée, avec un feuillage doux qui atteint jusqu'à deux mètres de hauteur (Shamkant *et al.*, 2014). Les feuilles atteignent 40 cm de long; Ils sont finement disséqués, avec les derniers segments filiformes (filaires) d'environ 0,5 mm de largeur. Les fleurs dorées brillantes fleurissent en juillet et en août et aboutissent ensuite à la formation d'un fruit ovoïde ayant 3 à 5 mm de longueur et 1,5 à 2,0 mm de largeur. Les graines mûrissent à partir de septembre à octobre. Cette plante peut se reproduire à partir de la couronne ou des fragments de racine, mais se reproduit librement à partir de graines (Fig. 10).



(a)



(b)



(c)

Figure 10 : *Foeniculum vulgare* Mill ; (a) : Feuilles, (b) : Fruit, (c) Fruit mûr et séché

c. Composition biochimique

Foeniculum vulgare est l'une des plantes dont les feuilles et les graines peuvent être consommées et utilisées pour des fins médicinales. Les feuilles de *Foeniculum vulgare* sont largement utilisées en médecine traditionnelle contre un large éventail de maux en raison de leur richesse en molécules à pouvoir thérapeutique (Barros *et al.*, 2010; Kooti *et al.*, 2015), les feuilles de fenouil contiennent des vitamines et des minéraux tels que le calcium, le potassium, le sodium, le fer, le phosphore, la thiamine, la riboflavine, la niacine et la vitamine C (Miguel *et al.*, 2010, Badgujar *et al.*, 2014). Cependant, les graines de fenouil présentent la partie la plus utilisée de la plante, la graine de fenouil contiennent 6,3% d'eau, 9,5% de protéines, 10% de matière grasse, 13,4% de minéraux, 18,5% de fibres et 42,3% de glucides (Rather *et al.*, 2012). La graine contient 10 à 12% d'huile fixe. L'huile obtenue à partir des graines de fenouil contiennent environ 4% d'acide palmitique, 22% d'acide oléique, 14% d'acide linoléique et 6% d'acide pétrocyclique (Ahmadi *et al.*, 2007). La graine du fenouil contient également une huile essentielle à un rendement d'environ 3% (Weiping et Baokang,

2011) contenant le trans-anéthole (70,1%), 8% de fenshone et de limonène à 5% (Salehi 2006) et le trans-anisole, l'estragole et le 1-octène-3-ol responsable de l'odeur des graines (Diaz-Maroto *et al.*, 2005; Mimica-Dukie *et al.*, 2003).

d. Composés phénoliques

Foeniculum vulgare renferme une grande variété de composés phénoliques à savoir les flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques tels que les dérivés de l'acides hydroxycinnamiques et les coumarines (Križman *et al.*, 2007; Rahimi et Ardekani, 2013). L'analyse par HPLC de l'extrait aqueux des graines de fenouil a révélé la présence d'une grande variété de molécules bioactives et en particulier des flavonoïdes O-glycosides et dont la partie aglycone peut être une quercétine, kaempferol, isoquécétine ou encore une Isorhamnetin en plus des acides phenoliques tels que l'acide cafféoylquinique, l'acide feruloylquinique, l'acide gallique et l'acide p-hydroxybenzoïque (Parejo *et al.*, 2004, Dua *et al.*, 2013).

e. Utilisations médicinales

Plusieurs travaux ont confirmé l'effet bénéfique de *Foeniculum vulgare* sur la santé. La graine et les feuilles présentent les parties de la plante les plus utilisées (Oktay *et al.*, 2003 ;Choi et Hwang, 2004 ; Scalbert *et al.*, 2005).

Activité antioxydante : Le fenouil est connu comme une excellente source d'antioxydants naturels. Cette plante peut inhiber les radicaux libres en raison de la teneur élevée en polyphénols et flavonoïdes. Les composés phénoliques dans cette herbe tels que l'acide cafféoylquinique, l'acide rosmarinique, l'eriodyctyle-7-orutinoside, la quercétine-3-O-galactoside, le kaempferol-3-O-glucoside ont montré une forte activité antioxydante. L'huile volatile de fenouil a également une forte activité antioxydante (Parejo *et al.*, 2004 ; Scalbert *et al.*, 2005 ;Díaz-Maroto *et al.*, 2005). Scalbert *et al.* (2005) ont testé des extraits aqueux et

méthanoliques de graines de fenouil pour leur capacité antioxydante totale (TAC) ; Cette étude a montré que les extraits de fenouil pourraient inhiber- *in vitro*- les radicaux libres et agir comme un antioxydant primaire. L'activité antioxydante des extraits aqueux et éthanoliques de graines de fenouil a été évaluée en utilisant une variété de méthodes, Ces extraits de fenouil ont été comparées à des antioxydants standard tels que l'hydroxyanisolebutylé (BHA), l'hydroxytoluènebutylé (BHT) et le tocophérol. Il s'est avéré que la graine de fenouil est une source potentielle d'antioxydants naturels (Oktay *et al.*, 2003).

Activité antimicrobienne : Le fenouil est largement utilisé pour le traitement des maladies infectieuses bactériennes, mycobactériennes, fongiques, virales et (Duško *et al.*, 2006). Dans une étude menée par Parejo *et al.* (2004), l'extrait aqueux de fenouil a montré une capacité bactéricide contre une variété de bactéries *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* et *Shigella flexneri*. L'extrait de graines de fenouil possède également une activité antifongique contre diverses espèces fongiques telles que *Candida albicans*, les espèces d'*Aspergillus*, les dermatophytes et *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum* (Rahimi et Ardekani, 2013, Badgujar *et al.*, 2014). En général, l'activité antimicrobienne du fenouil est due à des composés tels que l'acide linoléique, l'undecanal, le 1, 3-benzènediol, l'acide oléique et le 2,4-un décadienal et a la 5-hydroxy-furano coumarine qui joue un rôle important dans l'activité antibactérienne de cette plante (Esquivel-Ferriño *et al.*, 2012).

Activité antidiabétique : Pour évaluer l'effet du fenouil sur la réduction du sucre sanguin, une étude a été menée par El-Soud *et al.*, (2011) sur des rats diabétiques. Les résultats ont montré que l'extrait de graine de fenouil améliore l'hyperglycémie chez les rats diabétiques. Une étude similaire a étudié le rôle de l'extrait aqueux de du fenouil dans l'abaissement du taux de sucre dans le sang et des activités antidiabétiques. Les résultats ont montré que l'extrait pourrait être utile pour le contrôle de la glycémie chez les patients

diabétiques et, en plus, leur utilisation quotidienne pourrait être efficace pour réduire les complications chroniques associées au diabète (Sushruta *et al.*, 2007). On a signalé que l'huile essentielle de *F. vulgare* présentait une activité hypoglycémique chez les rats diabétiques. L'ingestion d'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* chez ces rats diabétiques a pu corriger l'hyperglycémie (El-Soud *et al.*, 2011).

Activités cardio-vasculaire et anti-lipidique : L'étude de l'anti-cholestérol et l'effet antiathérogène de l'extrait méthanolique du fenouil a montré que le traitement avec l'extrait réduisait significativement les taux de lipides plasmatiques. L'extrait de fenouil a réduit les triglycérides dans le foie gras et a facilité le flux sanguin dans les artères coronaires en empêchant l'accumulation de dépôt gras dans les artères. En raison des activités hypolipidémiques et antiathérogènes, cette plante pourrait être utilisée dans la lutte contre les troubles cardiovasculaires (Oulmouden *et al.*, 2011, 2014). L'injection intraveineuse de l'extrait a également réduit de manière significative la pression sanguine, (Abdul-Ghani et Amin, 1988 ; El Bardai *et al.*, 2001). L'extrait de fenouil agit également comme un agent diurétique (El Bardai *et al.*, 2001).

4. Roquette (*Eruca sativa*)

Eruca sativa, communément appelée Roquette est une espèce originaire de la région méditerranéenne, du Maroc et du Portugal à l'Ouest au Liban et à la Turquie à l'Est (Zeven *et al.*, 1982), elle appartient à la famille des Brassicaceae (Martinez-Sanchez *et al.*, 2006). La Roquette est actuellement cultivée dans plusieurs pays, tels que les États-Unis, le Royaume-Uni, l'Italie, l'Espagne, le Maroc, Israël, l'Inde et l'Australie (Bozokalfa *et al.*, 2011). Les feuilles présentent la partie communément consommée de la plante, elles sont caractérisées par une saveur distinctive épicée et piquante. Les feuilles sont de plus en plus consommées dans le monde entier, seules ou sous forme de plats mélangées, les feuilles de la Roquette

sont également utilisées pour des fins médicinales et thérapeutiques (Yaniv *et al.*, 1998; Mahran *et al.*, 1991). Son utilisation traditionnelle comme astringent, diurétique, digestif, émollient, tonique, dépuratif, laxatif, rubéfiant. Et stimulant a également été rapportée, il a été également utilisé comme aphrodisiaque, pour le traitement de l'infection oculaire et pour les troubles digestifs et rénaux (Bajilan et Al-naqeeb, 2011).

a. Taxonomie de la plante

Régne:	Plantae
Superdivision:	Spermatophyta
Division:	Magnoliophyta
Classe:	Magniliopsida
Ordre:	Brassicales
Famille:	Brassicaceae
Genre:	Eruca
Espèce:	<i>Eruca sativa</i> (Sarfaraz <i>et al.</i> , 2016)

b. Description botanique

Eruca sativa (Rocket) est une plante cultivée, caractérisée par une odeur inhabituelle. Sa tige est dressée, simple, parfois ramifiée (Jafri, 1973). Les feuilles posées vers la base sont pétiolées, tandis que les supérieures sont comparativement sessiles. Toutes les feuilles sont épinées et rarement pinées, avec un lobe terminal long qui est grossièrement lobé (Miyazawa *et al.*, 2002). Le racème porte des entre 15 et 50 fleurs de couleur jaune pâle ou blanchâtre et atteignent entre 1,5-2,0 cm de largeur; Il y a quatre sépales poilus, marron et des fois violet. Les graines sont de 1,5 à 2 mm de largeur, jaune-brun ou rouge, sphériques ou ovoïdes se posent en deux rangées dans chaque cellule (Miyazawa *et al.*, 2002) (Fig. 11).

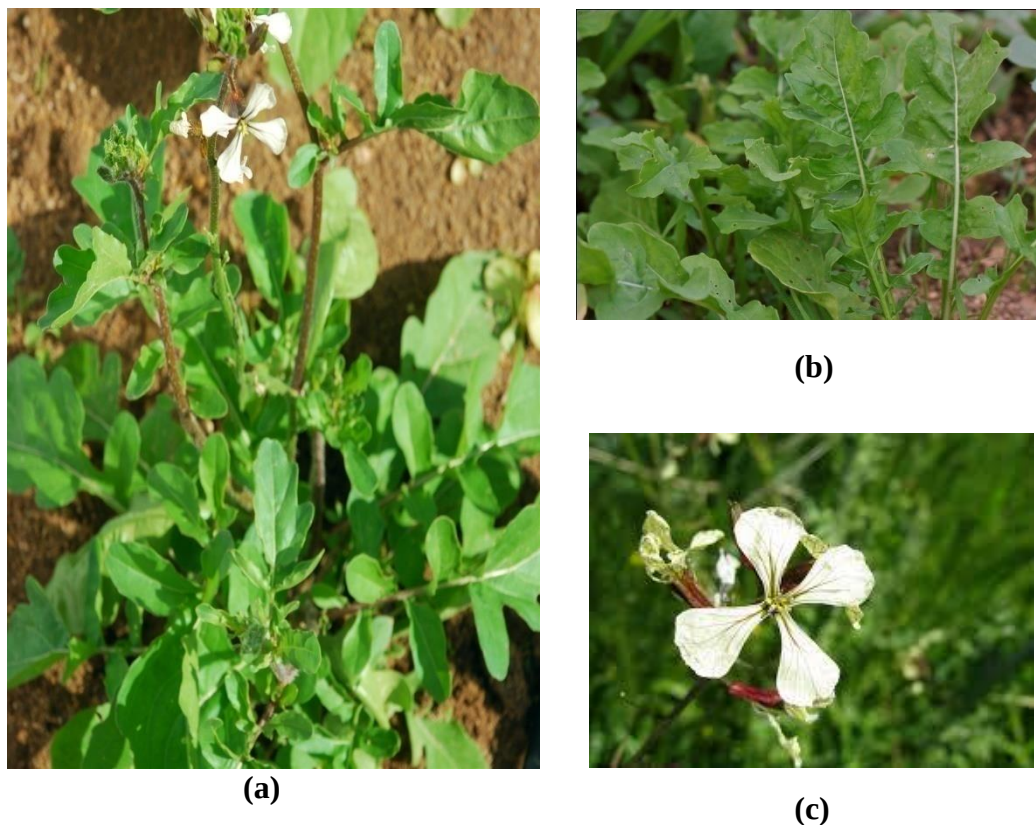


Figure 11 : *Eruca Sativa* ; (a) : Plante entière, (b) : Feuilles, (c) Fleurs.

c. Composition biochimique

La graine d'*E. Sativa* contient 29 % des protéines brutes, 27% d'une huile fixe 6% d'humidité, 3% de glucides, 2% des cendres et des fibres avec un pourcentage de 1% (Gulfraz *et al.*, 2011). La graine renferme également des acides gras comme l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide linoléique (Uğur *et al.*, 2010 ; Bhandari et Chandel, 1996). Les glucosinolates font aussi partie du profil phytochimique d'*E. Sativa* en tant que composé soufré caractéristique de cette plante responsable de son goût piquant et principalement synthétisés par la plante dans le cadre d'un mécanisme de défense contre les prédateurs d'insectes (Aggarwal et Shishodia *et al.*, 2006).

Les glucosinolates (GLS) représentent les composés majoritaires des feuilles de la Roquette. Trois types de GLS sont connus, 4-méthylthiobutylglucosinolate, 4-mercaptopbutylglucosinolate et méthylsulfinylbutylglucosinolate (Bennett *et al.*, 2002). Les feuilles de la Roquette contiennent également des acides gras : l'acide Hexanoïque, l'acide Heptanoïque, l'acide Octanoïque et l'acide Nonanoïque (Blažević et Mastelić, 2008). Les graines d'*Eruca sativa* renferment également des teneurs importantes en alcaloïdes, en glycosides cardiaques et des saponines (Gulfranz *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2013).

Des travaux ont montré que les feuilles d'*E. Sativa* renferment également une huile essentielle avec un rendement de 0.07% dont les composés majoritaires sont le 4-Méthylthiobutyl isothiocyanate (Erucin) (60%), l'isophytol (3%) et le 5-Méthylthiopentyl isothiocyanate (1%) (Miyazawa *et al.*, 2002, Marwat *et al.*, 2016).

d. Composés phénoliques

Les études sur la composition phytochimique des feuilles et des graines de *E. sativa* révèlent la présence de nombreux molécules bioactives, des composés phénoliques en particulier des flavonoïdes (Michael *et al.*, 2011). Dans la graines, les composés phénoliques sont représentés en général par des flavonoïdes est plus précisément le kaempferole, la quercétine et l'isorhamnetine (Michael *et al.*, 2011, Bennett *et al.*, 2006) des Benzaldehyde, 2-Phénylacetaldehyde, Methyl salicylate et la Vanilline, (Blažević et Mastelić, 2008). Les feuilles d'*E. Sativa* présente également une source de composés phénoliques, Alruwaih et Yaylayan (2017) ont montré que les feuilles de la Roquette sont riches en flavonoides, et en particulier le kaempferole, la Quercétine et l'isorhamnetine.

e. Utilisations médicinales

Les feuilles et la graine d'*E. Sativa* sont toutes les deux douées de plusieurs propriétés pharmaceutiques en raison des différentes molécules bioactives qu'elles renferment telles que les composés phénoliques, les vitamines, les acides gras et les huiles fixes et essentielles.

Activité antioxydante : L'extrait d'*E. Sativa* possède un effet antioxydant puissant, en raison de la présence de beaucoup de composés phytochimiques biologiquement actifs comme les GSH les flavonoïdes, la vitamine C, vitamine K, la vitamine A et beaucoup d'autres composés connus par leurs capacité antioxydante (Heimler *et al.*, 2007, Pasini *et al.*, 2012). L'extrait d'*E. Sativa* s'est montré efficace pour l'élimination des espèces réactives d'oxygène (ROS), (Sarwar *et al.*, 2007, Alqasoumi *et al.*, 2009). Heimler, *et al.* (2007) ont montré que l'extrait éthanolique des feuilles d'*Eruca sativa* avait un effet antioxydant puissant contre les radicaux libres ainsi qu'une capacité de chélation des ions Fe^{2+} importante, en raison des composés phénoliques présentes dans l'extrait. La capacité antioxydante d'*E. Sativa* s'est montré également responsable de l'effet protecteur de la plante contre le cancer et la dégénérescence maculaire (Sarfaraz *et al.*, 2016).

Activité antimicrobienne : Plusieurs travaux ont montré l'activité d'*E. Sativa* contre différentes espèces du monde microbien. Une étude a été menée pour évaluer l'activité antimicrobienne des graines d'*E. Sativa*, l'extrait d'eau brute a montré une inhibition significative contre certaines souches fongiques comme *Spadicoides stoveri* et *Paecilomyces variotii*. L'extrait méthanolique des graines a montré une activité antibactérienne contre *Enterobacter agglumerans* et *Hafnia alvei*. On a également constaté qu'il était efficace contre *Penicillium funiculosum* (Rani *et al.*, 2010). D'autres travaux ont montré l'effet antibactérien de l'huile issue des graines d'*E. Sativa* contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*,

Salmonella typhi, et *Klebsiella pneumonia* a des concentrations très faibles (50-70 µg/ml) en comparaison avec des antibiotiques de référence (Khoobchandani *et al.*, 2010 ; Gulfraz *et al.*, 2011). La capacité d'inhibition microbienne de la plante est généralement attribuée à la présence de nombreuses molécules bioactives, comme les flavonoïdes, les glutathions, les stérols végétaux, les coumarines, les terpénoïdes, les caroténoïdes, la lignine et la saponine.

Activité pesticide : Des travaux ont montré l'effet pesticide d'*E. Sativa* contre certains des parasites ravageurs et mauvaises herbes. Messiha *et al.* (2013) a prouvé que l'incorporation de la poudre des graines d'*E. Sativa* à des concentrations entre 0 et 70g/kg dans le sol a pu lutter contre les mauvaises herbes qui poussaient dans une culture de Maïs et les graines d'*E. Sativa* ont montré un effet herbicide significatif. L'extrait d'*E. Sativa* mélangé avec un engrais a montré un grand potentiel pour lutter contre les nématodes parasites des végétaux, la Roquette est à la fois un fumier vert (il contient des produits chimiques à forte activité biocide qui imitent les fumigants synthétiques) et une culture de piégeage de nématodes (les nématodes sont attirés par les racines de Roquette, et ne peuvent grandir et se multiplier) (Riga *et al.*, 2006). L'utilisation de la roquette dans le contrôle biologique a également été mentionnée dans la littérature du 13^{ème} siècle, les semences d'*E. Sativa* ont été semées avec d'autres légumes pour inhiber le développement de certains ravageurs (Yaniv, 1996).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

I Paramètres morphologiques et biochimiques

1. Germination des graines et conditions de culture des plantes

Les graines du Fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*), de la Roquette (*Eruca sativa*) et du Fenouil (*Foeniculum vulgare*) sont semées dans des pots contenant 1 kg de substrat composé de sable / vermiculite (3: 1); dans une serre semi-contrôlée à une température allant de 18 ° C à 26 ° C le jour. Deux semaines après le semis, les pots sont en deux lots en raison de trois répétitions par traitement. Les plantes témoins sont irriguées avec une solution nutritive complète de Hoagland et Arnon (1950) modifiée contenant 1 mol.m⁻³ de soufre, tandis que les plantes destinées à une alimentation pauvre en soufre reçoivent une solution nutritive contenant l'équivalent de 0.05 mol.m⁻³ de soufre (Tableau 3). Les pots sont arrosés à 90% de la capacité au champ avec une solution nutritive et de l'eau du robinet en cas de besoin pour maintenir la stabilité de la conductivité du milieu et les concentrations requises de soufre dans les deux lots. L'effet de la privation en soufre est analysé à la fin de la période de traitement. Les plantes sont récoltées au stade reproducteur (90 jours pour Fenugrec, 120 jours pour Fenouil et 60 jours pour la Roquette).

Tableau 3 : Concentrations d'oligo-éléments et des macro-éléments en (mM) dans les solutions nutritives.
C: plantes témoins; -S: plantes carencées

Elements nutritifs	P	K	N	S	Mg	Mn	Cu	Zn	Cl	Mo	Ca	Fe	B
C	1	4	3	1,005	1	0,003	0,0008	0,002	2,002	0,0001	1,05	0,03	0,01
- S	1	4	3	0,05	1	0,003	0,0008	0,002	2,002	0,0001	1,05	0,03	0,01

2. Détermination de la biomasse et des paramètres morphologiques

Les plantes récoltées sont séparées en feuilles, tiges et racines. La matière sèche de la plante est obtenue après séchage à 80°C pendant 48h. La surface foliaire totale est mesurée en utilisant la méthode gravimétrique (Ross et Koppel, 2000). Les autres paramètres: Ratio partie

aérienne/partie racinaire(R/S), la surface foliaire massique (LAR), la surface foliaire spécifique (SLA) et le poids foliaire spécifique (LWR) sont calculés comme suit:

R/S = biomasse sèche de la partie racinaire/biomasse des feuilles.

LAR = surface foliaire /biomasse de la plante entière.

SLA = surface foliaire /biomasse des feuilles.

LWR = poids foliaire /biomasse de la plante entière.

3. Détermination de la teneur des feuilles en sulfate et en soufre total

Le matériel végétal est soigneusement lavé avec l'eau du robinet, puis avec de l'eau distillée. Les ions sulfates des feuilles sont extraits par ébullition du tissu frais dans de l'eau tandis que la teneur totale en soufre des feuilles est déterminée par digestion acide de 50 mg de matière sèche dans HNO_3 et $HClO_4$ (85 :15 ; v/v). Le volume du digestat constituant l'extrait est ajusté à 20ml avec l'eau distillée (Zhao *et al.* 1994). Le soufre est ensuite dosé par l'ajout de 5ml de l'extrait à 2ml d'une solution tampon (A) contenant 3% de chlorure de magnésium ($MgCl_2, 6H_2O$), 0,5% d'acétate de sodium ($CH_3COONa, 3H_2O$), 0,1% de nitrate de potassium (KNO_3) et 2ml d'acide acétique ($CH_3COOH, 99\%$). Après agitation au vortex, 15mg de chlorure de Barium ($BaCl_2$) sont ensuite ajoutés et l'absorbance de la solution est mesurée à 430 nm contre un blanc. La teneur en soufre est exprimée en (mg) sulfate par gramme (g) du poids de la matière sèche. (Bardsley et Lancaster, 1960, Astolfi et Zuchi, 2013).

4. Dosage des pigments chlorophylliens

La chlorophylle est extraite à partir de 30 mg de feuilles fraîches immergées dans 4 ml de Diméthylsulfoxyde (DMSO) et incubés pendant 30 min à l'obscurité à 65°C. Après centrifugation, l'absorbance de l'extrait est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 663 et 645 nm. Les concentrations de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et de la chlorophylle totale sont calculées selon les formules suivantes (Arnon 1949; Hiscox et Israelstam, 1979) :

$$Chl\ a\ (g/l) = 0,0127 * A_{663} - 0,00269 * A_{645}$$

$$\text{Chl b (g/l)} = 0,0229 * A_{645} - 0,00468 * A_{663}$$

$$\text{Chl Tot (g/l)} = 0,0202 * A_{64} + 0,00802 * A_{663}$$

5. Teneur en protéines solubles

La concentration en protéines solubles totales est déterminée selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.* 1951). 200 mg de matériel frais sont broyés dans 5 ml de tampon phosphate de sodium (0,5 mM, pH 7,5). Après centrifugation à 3500 tr/min pendant 10 minutes, le surnageant est ensuite utilisé pour la détermination des protéines solubles totales en ajoutant à 200µl de l'extrait 2ml de réactif de Lowry et 200µl de réactif de Folin 50%. Après 10min, l'absorbance de la solution est déterminée à une longueur d'onde de 750nm. La concentration en protéines solubles totales est exprimée en (µg) équivalent de BSA (sérum albumine bovine) par (g) de matière sèche.

6. Dosage des sucres solubles totaux

La concentration en sucres solubles totaux est déterminée selon la méthode décrite par Grandy *et al.* (2000). 100 mg de matériel frais sont broyés dans 4 ml d'éthanol (80%). Le mélange est placé dans un bain marie à 80° C pendant 30 min puis centrifugé à 4500 tr/min pendant 10 min. Les sucres solubles totaux sont déterminés à l'aide du réactif anthrone (anthrone 0,2% w/v) fraîchement préparé dans l'acide sulfurique (75%). L'absorbance est immédiatement lue à 625 nm puis converti en équivalent glucose (mg.mol) en utilisant une courbe d'étalonnage dont les concentrations varient de 20 à 400 µg.ml⁻¹.

7. Dosage des acides aminés libres

L'extraction des acides aminés est réalisée selon la méthode de Barber *et al.*, (1997). 100 mg de matière fraîche broyée dans 2 ml de tampon phosphate de sodium (0,5 mM, pH 7,5) et 2 ml d'éthanol (80%) sont incubés à 80° C pendant 30 minutes. Après l'ajout de 2 ml d'éthanol (50%), l'ensemble est centrifugé à 5000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant est ensuite

évaporé et le résidu sec est repris dans 500 µl d'eau distillée. Le dosage des acides aminés est effectué en ajoutant 1 ml du réactif de ninhydrine fraîchement préparé (Rosen, 1957) à 100 µl d'extrait dilué 5 fois. Les tubes à essai sont ensuite incubés pendant 20 minutes dans un bain marie bouillant et la réaction est arrêtée par refroidissement rapide dans de l'eau froide. L'absorbance est ensuite lue à 625 nm. Une courbe d'étalonnage est préparée de la même manière que les échantillons avec des solutions standard de proline.

8. Mesure de l'activité nitrate réductase

La mesure de l'activité nitrate réductase est effectuée selon la méthode de Jaworski (1971) par le dosage des ions nitrites dans un milieu d'incubation composé de 50ml de Tampon phosphate, 1,5ml de propanol et 0,75 g de KNO_3 . 200 mg de la matière végétale (feuilles ou racines) sont incubés dans le milieu d'incubation pendant 45min à une température de 30°C. L'extrait contenant les nitrites issues de la réduction des nitrates présents dans le milieu d'incubation par l'action de la nitrate réductase du matériel végétal est récupéré puis le dosage des nitrites est effectué par l'ajout de:

- Griess 1 : 0,25g d'acide sulfanilique dissous dans 15 ml d'eau distillée, 25 ml d'acide acétique sont ajoutés puis le tout est ajusté à 50ml avec l'eau distillée.
- Griess 2 : 0,1 g de α -naphtylamine dissous dans 25ml d'acide acétique, et le volume est ajusté à 50ml avec l'eau distillée.

La densité optique est lue à 520nm par spectrophotométrie d'absorption, et convertie en équivalent de nitrites (µmole) grâce à une courbe d'étalonnage établie avec une solution mère de NaNO_2 .

9. Détermination des éléments minéraux

La composition minérale des feuilles et des racines est déterminée par digestion de 50 mg de matière sèche dans un mélange d'acide nitrique (HNO_3) et d'acide perchlorique (HClO_4) (85 :

15) à 120°C. La solution de digestion est ajustée à 10 ml avec de l'eau distillée. Les éléments minéraux: calcium (Ca), potassium (K), magnésium (Mg) et molybdène (Mo) sont déterminés par spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES).

II Qualité phytochimique et activités biologiques

1. Germination des graines et conditions de culture des plantes

Les graines de chaque plante (Fenugrec, Fenouil et Roquette) ont été semées dans les mêmes conditions décrites précédemment (paragraphe I.1). La récolte des graines a été réalisée au stade mature après 180 jours de croissance pour le fenugrec et après 195 jours pour le fenouil, alors que la récolte des feuilles de la roquette a été réalisée après 60 jours de croissance.

2. Détermination des sulfates et du soufre totale dans les graines

Après minéralisation des graines selon la méthode de (Zaho *et al.* 1994), la détermination du soufre totale dans la graine est effectuée par la même méthode décrite auparavant (paragraphe I.3) (Bardsley et Lancaster, 1960, Astolfi et Zuchi, 2013).

3. Extraction hydro-méthanolique

Les graines du fenugrec et du fenouil et les feuilles de la roquette ont fait l'objet d'une extraction hydro-méthanolique selon la méthode de Hayouni *et al.* (2007) légèrement modifiée. 10g de la matière végétale sèche broyés en poudre et mélangés avec 100 ml de méthanol à 80% sont macérés à froid pendant six heures. Les extraits sont filtrés à travers du papier Whatman 5 et le résidu est ré-extrait deux fois dans les mêmes conditions pour assurer une extraction complète. Les extraits sont ensuite évaporés à sec à 50°C par un évaporateur rotatif. Les extraits sont placés ensuite dans une bouteille ambrée et conservés à -8°C jusqu'à analyse ultérieure.

4. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux (CPT)

La teneur en polyphénols dans les extraits méthanoliques est déterminée par spectrophotométrie suivant la méthode de Folin-Ciocalteu décrite précédemment par Ribereau-Gayon (1972) avec des modifications mineures. 200 µl de la dilution appropriée de l'extrait sont oxydés avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu, puis le mélange réactionnel est neutralisé avec 2 ml de carbonate de sodium à 5% (w/v). Après 2 heures d'incubation à l'obscurité à température ambiante, l'absorbance de la couleur bleue résultante est mesurée à 750 nm (spectrophotomètre VWR UV-6300PC). L'acide gallique est utilisé pour établir une courbe d'étalonnage. La teneur en composés phénoliques est estimée en mg équivalent d'acide gallique /g de matière sèche.

5. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

La teneur totale en flavonoïdes des extraits est réalisée selon la méthode d'Ordonez *et al.* (2006) avec quelques modifications. Brièvement, 0,1 ml d'AlCl₃ (10%) et 0.1 ml d'acétate de sodium sont ajoutés à 0.5 ml d'extrait méthanolique. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 415 nm (spectrophotomètre VWR UV-6300PC), puis la teneur totale en flavonoïdes est calculée en mg équivalent de Quercitrine/ g de matière sèche pris comme référence pour établir la courbe d'étalonnage.

6. Détermination des tanins condensés

Pour le dosage des tanins condensés on s'est basé sur la méthode décrite par Ribereau-Gayon et Stonestreet (1966). Après hydrolyse acide les tanins se transforment en anthocyanes, ces dernières sont quantifiées par mesure de l'absorbance à 550 nm dans deux essais, un D1 non hydrolysé et un D2 hydrolysé. La concentration totale de tanins est exprimée en g/L par référence à l'équation suivante : $\text{Tanins (g/L)} = (D2 - D1) \times 19,33$. Puis converti en µg/g (MS).

7. Identification chromatographiques des composés flavonoïdes

a. Fractionnement des flavonoïdes

Le protocole d'extraction des fractions flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de Bekkara *et al.* (1998) avec quelques modifications (Fig.12).

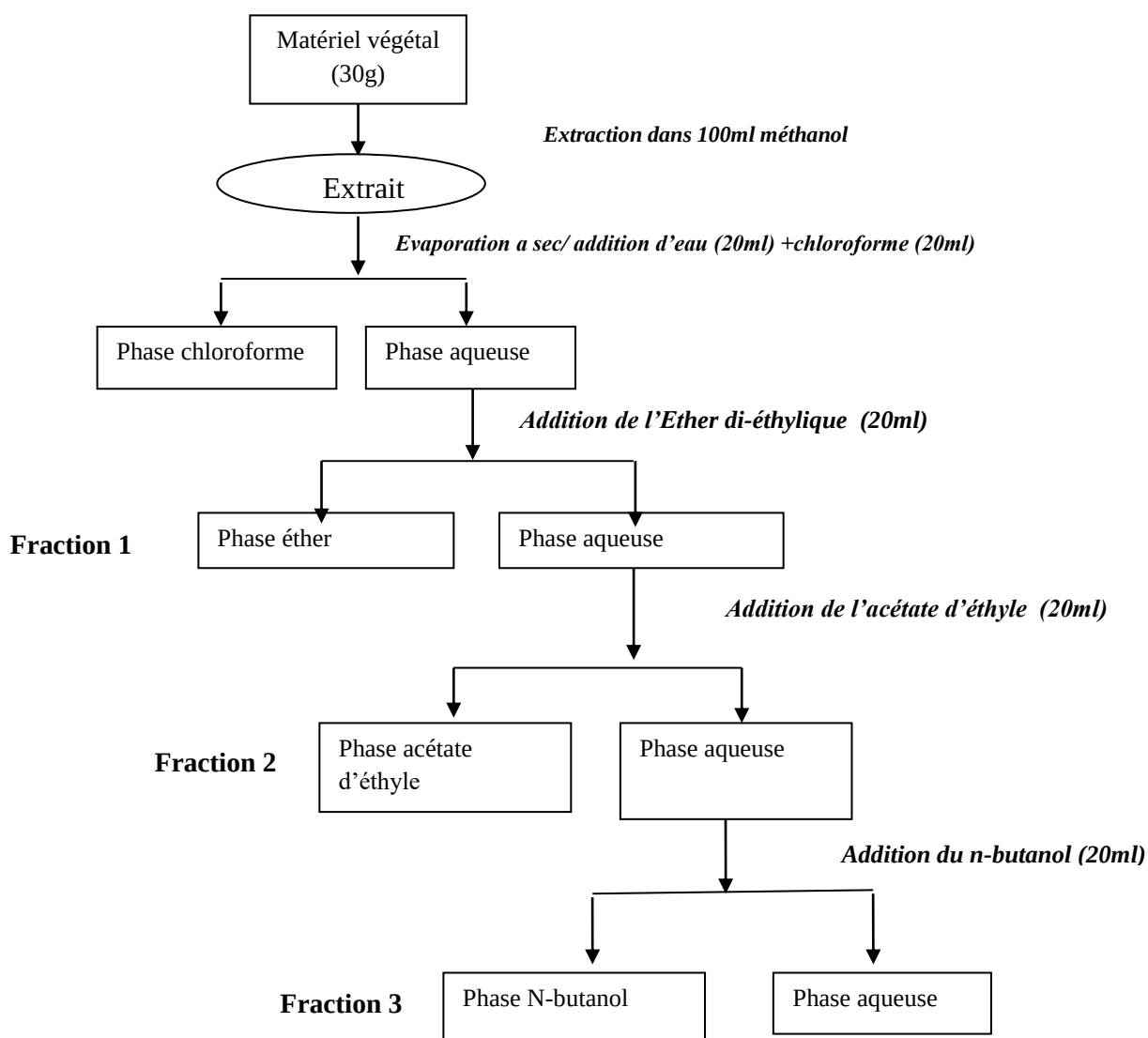


Figure 12 : Protocole de fractionnement des flavonoides par solvants organiques.

Les trois fractions ont été recuperées dans le méthanol après évaporation du solvant organique.

b. Analyses des fractions flavonoïdes par HPLC/DAD/MS

L'identification des composés flavonoïdes des trois fractions est déterminée à l'aide d'un chromatographe doté d'un détecteur DAD. La colonne est couplée à un spectromètre de masse à ionisation Electrospray (ESI). Un volume de 10µl de chaque fraction solubilisée dans le méthanol est injecté sur une colonne inverse C18 en utilisant une phase mobile à gradient constituée de l'eau (A) et l'acétonitrile (B), la détection des molécules flavonoïdes est réalisée à des longueurs d'onde de 280-320-340-360 nm.

8. Mesure de l'activité antioxydante par la méthode DPPH

a. Principe

Le composé chimique 2,2- diphenyl -1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et restent dans leur forme monomère relativement stable à température ordinaire, la délocalisation provoque aussi la couleur bleue violette bien caractéristique de la solution de DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie entre 515-518 nm (Popovici *et al.*, 2009). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphenyl- 1- picrylhydrazyle) de couleur violette se réduit en 2,2 diphenyl -1- picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui *et al.*, 2006)

b. Mode opératoire

Afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits par piégeage des radicaux libres, nous avons mesuré la modification de la densité optique du DPPH selon la méthode de Manzocco *et al.* (1998) avec des modifications mineures. Les concentrations appropriées des extraits et de l'acide ascorbique comme antioxydant de référence (0,1mg/ml ; 0,5mg/ml et 1mg/ml) sont ajoutées à 0,5 ml de la solution de DPPH (0,5 mM), le tube témoin est préparé en utilisant la

solution méthanolique du DPPH. Après 30 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm. Le pourcentage de piégeage des radicaux DPPH est calculé en utilisant l'équation ci-dessous:

$$\% \text{ d'inhibition du radical DPPH} = [(A_c - A_e) / A_c] * 100$$

Avec A_c : Absorbance du contrôle et A_e : Absorbance de l'extrait.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est ensuite utilisé pour calculer IC_{50} .

9. Mesure de l'activité antioxydante par le test Phosphomolybdate

a. Principe

Le test Phosphomolybdate ou la capacité antioxydante totale est une méthode spectroscopique pour la détermination quantitative de la capacité antioxydante à travers la formation du complexe phosphomolybdène. Le test est basé sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) par l'échantillon testé et la formation subséquente d'un complexe phosphate-Mo (V) vert à un pH acide.

b. Mode opératoire

La détermination de la capacité antioxydante totale est réalisée selon la méthode décrite par Prieto *et al.* (1999). 0.1 ml de la solution d'extrait est combiné avec 1 ml de réactif (acide sulfurique 0,6M, phosphate disodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Le tube bouché est ensuite incubé dans un bain d'eau à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance de la solution aqueuse est mesurée à 695 nm. Le blanc contenant 1 ml de la solution du réactif et le volume approprié d méthanol est fraîchement préparé. La capacité antioxydante est exprimée en équivalents d'acide ascorbique.

10. Evaluation de l'activité antibactérienne

a. Test de l'activité antibactérienne

Les espèces bactériennes utilisées dans cette étude sont: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC25922, *Enterococcus faecalis* ATCC51299, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. Ces organismes ont été maintenus sur milieu LB gélosé (Lysogeny Broth).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* est étudiée selon la méthode de micro-dilution en utilisant des micro-plaques à 96 puits (Tian *et al.*, 2014, Barkai *et al.*, 2017). Le milieu LB est distribué dans les puits de la microplaque. Les extraits sont préparés dans une solution de DMSO à 20% puis dilués successivement d'un puits à l'autre à des concentrations comprises entre 400 et 0,390 mg/ml pour le Fenugrec et entre 600 et 0.976 mg/ml pour le fenouil et la roquette. Le témoin est composé par le DMSO stérile, ensuite, un volume de 50 µl de la suspension bactérienne (concentrée à 10⁶-10⁸ UFC/ ml) est ajouté dans chaque puits (la suspension bactérienne a été normalisée en utilisant un étalon 0,5 Mc Farland). La CMI est définie comme la concentration la plus faible sans croissance visible de la souche étudiée. Elle est déterminée après incubation pendant 24 h à 37°C par l'ajout de la résazurine qui passe de la couleur bleue au rose suite à un métabolisme bactérien actif. Toutes les expériences sont répétées trois fois.

III Analyses statistiques

L'analyse statistique de tous les résultats obtenus est réalisée à l'aide de SYSTAT 12. Les données sont soumises à une analyse de variance à un facteur (ANOVA) afin de déterminer les différences significatives entre les traitements. Les résultats sont considérés comme significatifs à $P < 0,05$.

Chapitre III

Résultats

I Etude de l'effet de la carence en soufre sur la morphologie de : *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*

1. Production en biomasse

Dans les plantes témoins, la biomasse sèche des plantes atteint 420 mg/plante, 6,5 g/plante et 249 mg/plante respectivement pour *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa* suites à l'application de la privation en soufre. Un effet inhibiteur de la croissance globale est observé après l'exposition des trois plantes à une nutrition minérale pauvre en soufre, en effet, la biomasse totale des trois plantes chute significativement de 32%, 29% et 83% respectivement pour *Trigonella*, *Foeniculum* et *Eruca* ($P < 0.05$) (fig. 13A, 14A et 15A).

Chez *Trigonella foenum-graecum*, l'analyse des différents organes de la plante montre une différence significative entre les plantes témoins et les plantes S-déficientes, à la fois dans la partie racinaire et dans la partie aérienne. Toutefois, il est intéressant de noter que l'effet de la privation en S sur la production de biomasse est plus marqué dans les feuilles, et dans une moindre mesure, dans les racines et les tiges. En comparaison avec les plantes témoins, les plantes S-déficientes présentent des diminutions dans la production de biomasse respectivement de 61% et de 25% dans les feuilles et les tiges (fig. 13B et 13C). Ces différences enregistrées dans les deux organes de la partie aérienne sont significatives selon l'analyse statistique réalisée ($P < 0,05$). En outre, la carence en soufre révèle un effet significatif sur la croissance de la partie racinaire, une diminution significative de 22% a été enregistrée chez les plantes S-déficientes ($P < 0,05$), en comparaison avec le témoin (fig. 13D). Néanmoins aucun effet n'est observé quand à la répartition de la biomasse chez les racines latérales et la racine pivotante. Quelle que soit la concentration des sulfates dans le milieu (1 ou $0,05 \text{ mol.m}^{-3}$), les racines latérales constituent la majeure partie des racines. Chez *Trigonella foenum-graecum* aucun changement n'est enregistré dans le ratio Pivot / Racines

latérales (Données non présentées). Comparativement aux plantes témoins, la matière sèche de la racine pivotante et des racines latérales diminue significativement de 63% et de 16,6%, respectivement (fig. 13E et 13F).

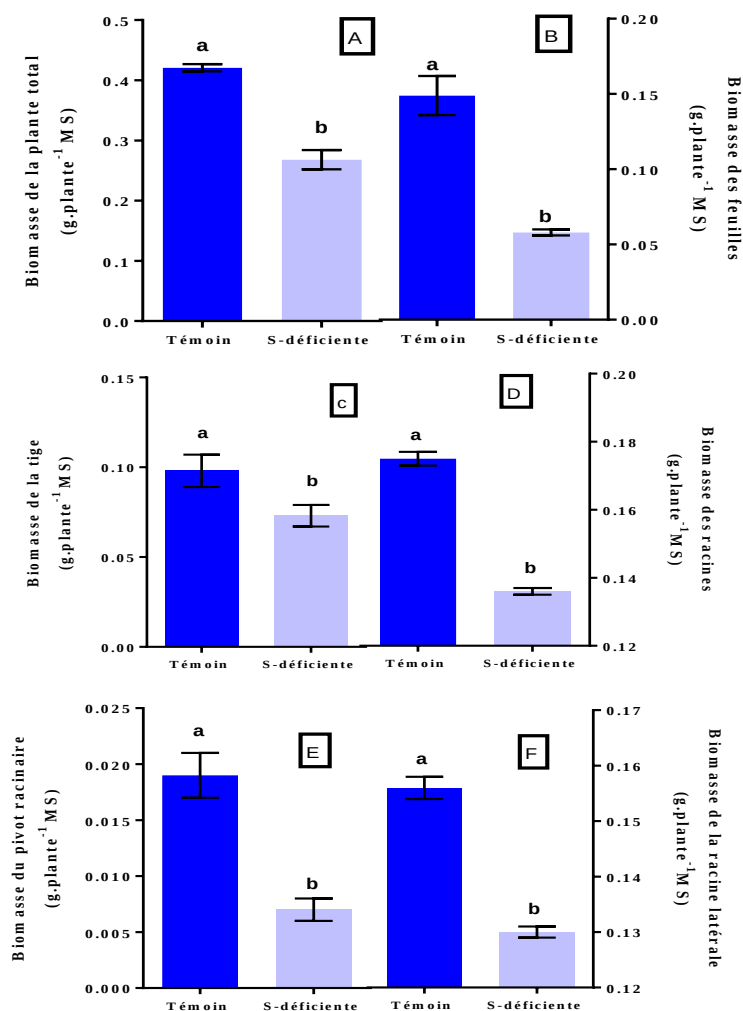


Figure 13 : Effet de la carence en soufre sur la production en biomasse de *Trigonella foenum-graecum* : de la plante entière (A), feuilles (B), tiges (C), racines totales (D), racines pivotantes (E) et racines latérales (F). Témoin: solution nutritive complète (1mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P < 0,05). MS : Matière sèche.

Chez *Foeniculum vulgare*, l'analyse des différentes parties de la plante montre des différences significatives entre les plantes témoins et les S-déficientes. Des diminutions significatives de la matière sèche d'environ 32% et 21%, sont enregistrées respectivement au niveau des parties aériennes et racinaires en comparaison avec le témoin (fig.14B et 14C). L'analyse de la

production en biomasse des racines montre que la racine pivotante est plus affectée par la carence en soufre par apport aux racines latérales. Comparativement au témoin, la matière sèche des racines pivotantes et des racines latérales diminue significativement de 24% et 15%, respectivement (fig.14D et 14E). La différence de la réponse à la déficience en S entre les parties aériennes et racinaires est plus nette dans le rapport R/S. Ce paramètre est plus élevé chez les plantes S-déficientes que chez les plantes témoins, passant de 0,357 à 0,417 chez plantes S-suffisantes ($p < 0,05$), (fig.14F).

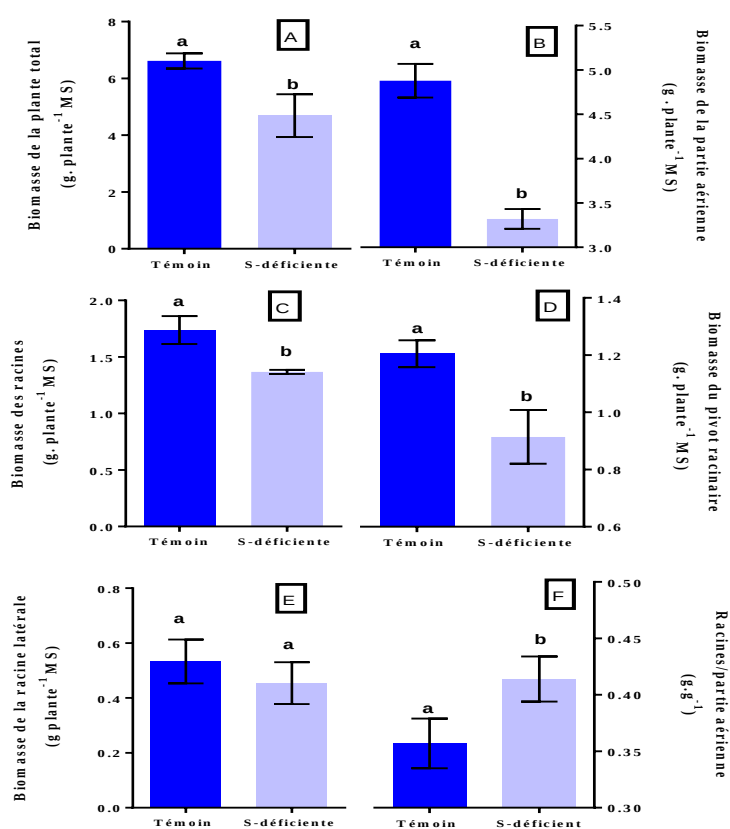


Figure 14: Effet de la carence en soufre sur la production en biomasse de *Foeniculum vulgare*: plante entière (A), partie aérienne (B), racines totales (C), racines pivotantes (D), racines latérales (E) et ratio Racine/partie aérienne (F). Témoin: solution nutritive complète (1mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,05$). MS : Matière sèche.

Chez *Eruca sativa*, L'analyse des différents organes de la plante montre que la carence en soufre a un effet significatif sur, à la fois la partie aérienne et la partie racinaire. On remarque

que l'effet de la déficience en S est relativement plus prononcé dans les feuilles que dans les racines. En comparaison avec le témoin, la privation en S provoque une diminution de 54,5% et de 52% ($p < 0,05$) respectivement dans les feuilles et les racines (fig.15B et 15C). L'effet de la privation en soufre sur la tige n'est pas significatif selon le test statistique ($p > 0,05$) (fig.15 D). En ce qui concerne la partie souterraine de la plante, il a été remarqué que la faible disponibilité du soufre dans le milieu a un effet remarquable à la fois sur les racines latérales et sur le pivot, ceci par comparaison avec les plantes témoins ($p < 0,05$). Toutefois, les racines latérales sont relativement plus affectées que la racine pivotante avec des diminutions respectives de 77,7% et de 72,7% par rapport aux témoins (fig.15E et 15F).

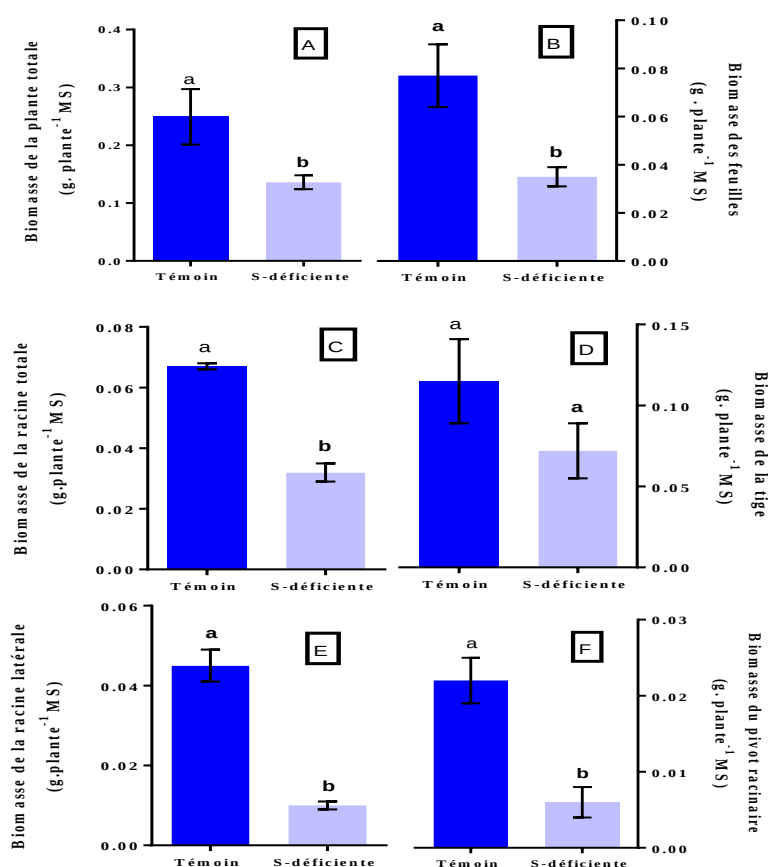


Figure 15: Effet de la carence en soufre sur la production en biomasse d'*Eruca sativa* : plante entière (A), feuilles (B), racines totales (C), tiges (D), racines latérales (E) et racine pivotante (F). Témoin: solution nutritive complète (1mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,05$). MS : matière sèche.

2. Morphologie et distribution de la biomasse au sein de la plante

La réduction de la nutrition en soufre affecte significativement la distribution de la biomasse au sein des plantes. Chez *Trigonella foenum-graecum* le rapport R/S augmente de 33,5% en comparaison avec les plantes témoins ($p < 0.05$) (fig. 16A). Cette augmentation est due à l'impact plus prononcé de la carence en S sur la partie aérienne (-46%) que sur la partie racinaire (-22%). La figure 16B présente l'effet de la carence en soufre sur la surface foliaire de *Trigonella foenum-graecum*, la comparaison des résultats avec le témoin, montre que les plantes ayant reçu une nutrition minérale pauvre en soufre (0.05 mol.m^{-3}) possèdent la surface foliaire la plus faible avec une diminution de 37,7%, ($p < 0.05$). L'analyse de la figure 16C montre que la surface foliaire spécifique (SLA) est supérieure chez les plantes S-déficientes. Chez le témoin, la SLA est de $279,7 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$ alors que chez les plantes S-déficientes ce paramètre augmente jusqu'à $364,7 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$, ($p < 0.05$).

Dans les conditions du témoin, la surface foliaire massique (LAR) et le poids foliaire spécifique (LWR) enregistrés sont respectivement de $83,6 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$ et $0,34 \text{ g}^{-1}.\text{g}^{-1}$. Avec l'application de la déficience en soufre, le LWR diminue significativement de 35,5 % en comparaison avec le témoin passant de $0,34 \text{ g}^{-1}.\text{g}^{-1}$ à $0,22 \text{ g}^{-1}.\text{g}^{-1}$ ($p < 0.05$) (fig. 16 D), alors que la surface foliaire massique (LAR) ne montre aucune différence significative ($p > 0.05$) (fig.16 E).

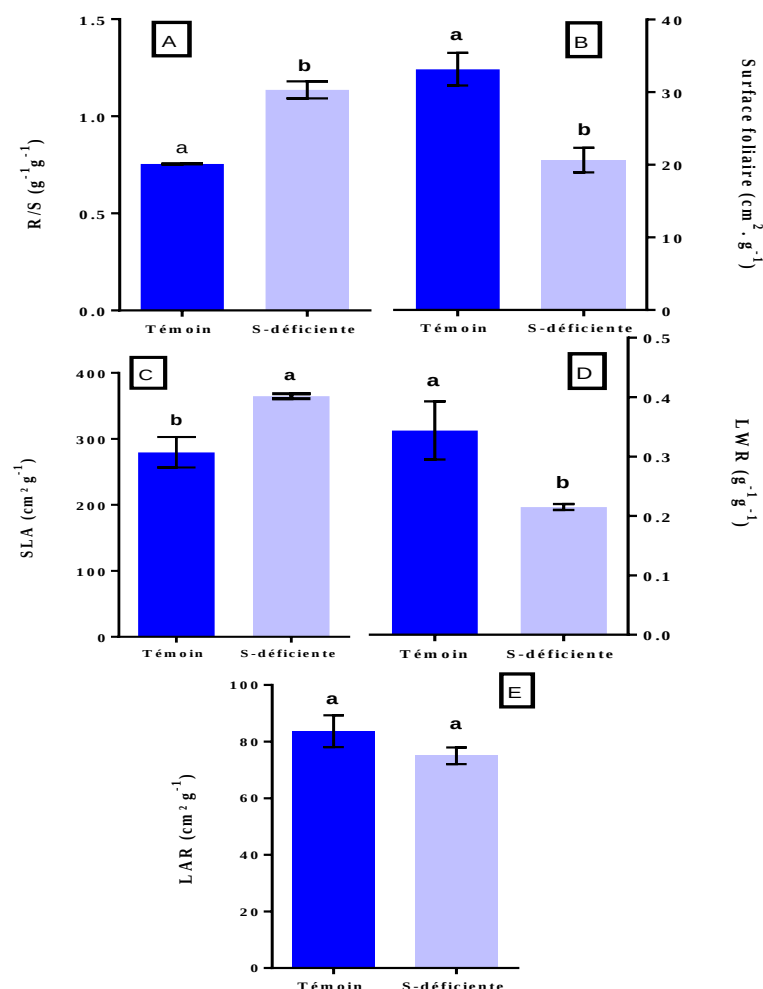


Figure 16 : Effet de la carence en soufre sur le rapport R/S (A), la surface foliaire totale (B), la surface foliaire spécifique SLA (C), la surface foliaire massique (LWR) (D) le poids foliaire spécifique (LAR) (E) de *Trigonella foenum-graecum*. Témoin : solution nutritive complète (1mol.m^{-3} de S); S-déficiente : solution nutritive déficiente en soufre ($0,05\text{mol.m}^{-3}$ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de $n = 3$. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,05$).

Chez les plantes d'*Eruca sativa* et à l'application de la déficience en soufre, le rapport R/S diminue significativement de 16% en comparaison avec le témoin ($p < 0.05$) (fig. 17A). L'analyse des résultats de la surface foliaire montre que les plantes ayant reçu une nutrition minérale pauvre en soufre ($0,05\text{mol.m}^{-3}$) enregistrent la surface foliaire la plus faible ($37,05\text{ cm}^2.\text{plante}^{-1}$) en comparaison avec les plantes témoins ($44,27\text{ cm}^2.\text{plante}^{-1}$) (fig. 17B). La surface foliaire spécifique (SLA) est également affectée par la carence en soufre, elle passe de $683,203\text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$ chez le témoin à $1160,870\text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$ chez les plantes S-déficientes ($p < 0.05$) (fig.

17C). Dans les conditions du témoin, la surface foliaire massique (LAR) et le poids foliaire spécifique (LWR) atteignent respectivement des valeurs de 186,26 g.g⁻¹ et 0,272 g.g⁻¹. Avec l'application de la déficience enS, une diminution légère mais significative est enregistrée pour le LWR (-11,7%) (fig. 17D), en parallèle LAR augmente significativement de 35,5 % par rapport aux plantes témoins (p<0.05) (fig. 17E).

En ce qui concerne *Foeniculum vulgare*, sa morphologie ne permet pas de calculer tous les paramètres morphologiques à l'exception du rapport R/S. Ce paramètre est plus élevé chez les plantes S-déficientes en comparaison avec les plantes témoins (fig. 14F).

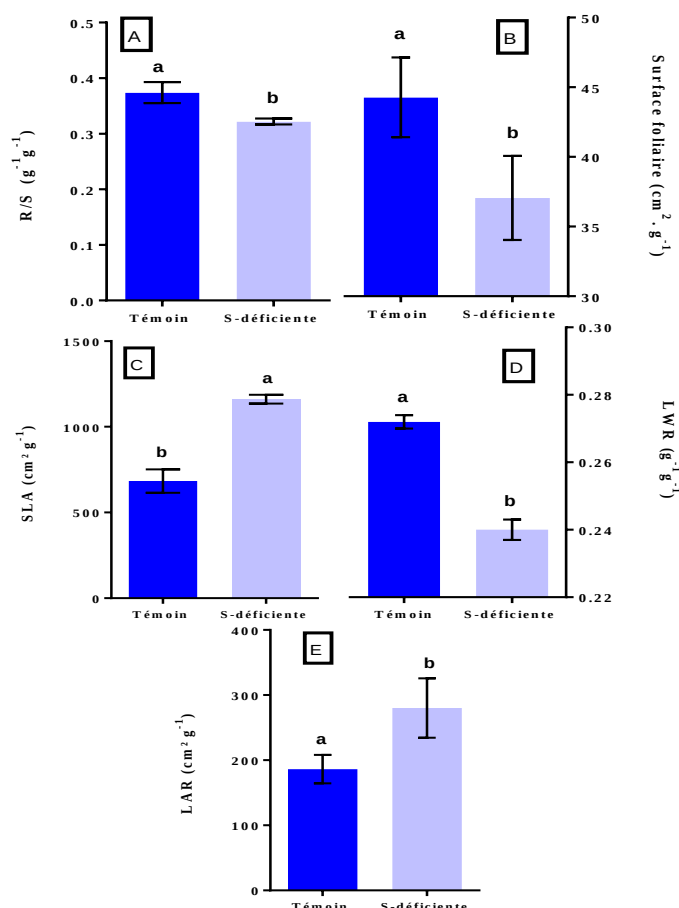


Figure 17 : Effet de la carence en soufre sur le rapport R / S (A), la surface foliaire totale (B), la surface foliaire spécifique SLA (C), la surface foliaire massique (LWR) (D) le poids foliaire spécifique (LAR) (E) de *Eruca sativa*. Témoin : solution nutritive complète (1mol.m⁻³ de S); S-déficiente : solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P < 0,05).

II Etude de l'effet de la carence en soufre sur la composition biochimique de *Trigonella foenum-graecum*, de *Foeniculum vulgare* et d'*Eruca sativa*

1. Teneur en soufre total et en sulfates des feuilles

Chez les plantes témoins, ayant reçu une nutrition minérale suffisante en soufre ($1\text{mol.m}^{-3}\text{ S}$), la concentration du soufre total est de $1,5\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$, $1\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$ et $13,2\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$, respectivement pour *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*. L'application de la déficience en soufre cause une diminution significative dans les teneurs en soufre total des feuilles des trois plantes ; les concentrations du soufre totale atteignent des valeurs de $0,5\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$, $0,4\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$ et $1,4\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$ en enregistrant des diminutions de 68%, 59% et 89%, respectivement pour *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa* ($p<0.05$), (fig. 18A, 19A et 20A). Les teneurs des feuilles en sulfates sont également affectées par la carence en soufre. Les trois plantes enregistrent des diminutions de 55%, 59% et 89% respectivement pour *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*. Ces valeurs se sont montrées significatives selon le test statistique réalisé ($p<0.05$), (fig. 18B, 19B et 20B).

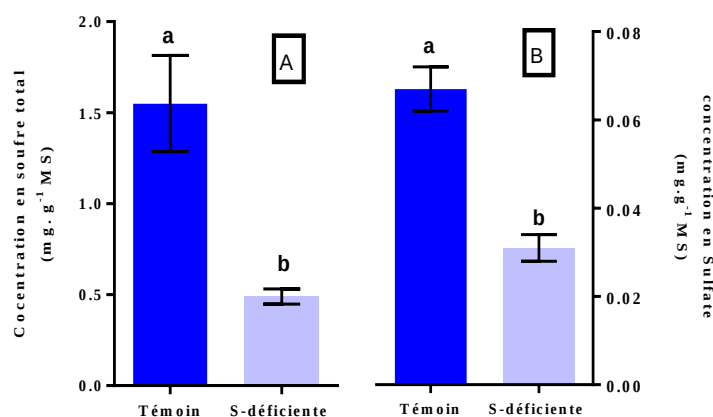


Figure 18: Teneurs en soufre totale (A) et en sulfates (B) des feuilles de *Trigonella foenum-graecum* soumises à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète ($1\text{mol.m}^{-3}\text{S}$), S-déficiente : solution nutritive déficiente en soufre ($0.05\text{mol.m}^{-3}\text{S}$). MS : Matière sèche. Les barres verticales sont les valeurs SE de $n = 3$. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,05$). MS : matière sèche.

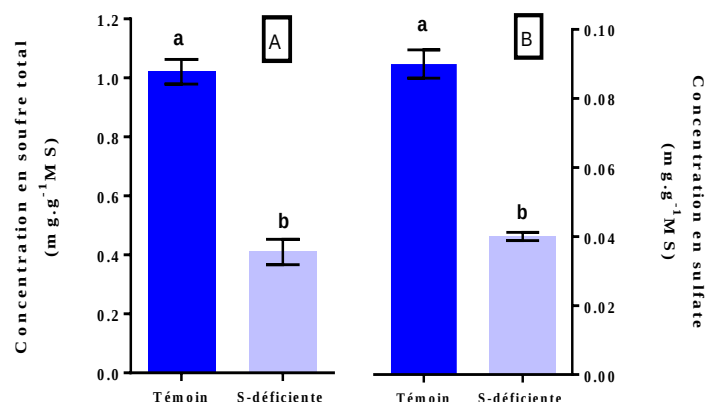


Figure 19 : Teneur en soufre totale (A) et en sulfates (B) des feuilles de *Foeniculum vulgare* soumis a une carence en soufre. Témoin : solution nutritive complète (1mol.m⁻³S), S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0.05 mol.m⁻³ S). MS : Matière sèche. Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P <0,05). MS : matière sèche.

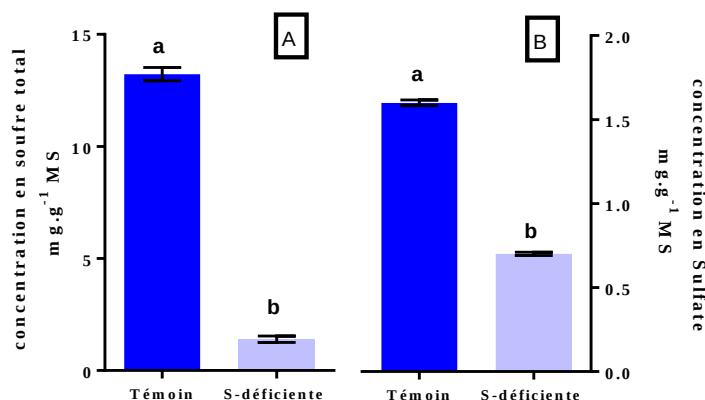


Figure 20 : Teneur en soufre totale (A) et sulfates (B) des feuilles d'*Eruca sativa* soumis a une carence en soufre. Témoin : solution nutritive complète (1mol.m⁻³S), S-déficiente : solution nutritive déficiente en soufre (0.05 mol.m⁻³S) de S. MS : Matière sèche. Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P <0,05). MS : matière sèche.

2. Teneur en soufre total dans les graines de *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare*

Le dosage du soufre totale dans les graines de *Trigonella foenum-graecum* et de *Foeniculum vulgare* montre qu'en cas de nutrition normale en soufre, le soufre totale constitue 0,12% et 0,19% respectivement pour la matière sèche des graines de *Trigonella foenum-graecum* et de *Foeniculum vulgare*, alors que chez les graines des plantes S-déficientes le soufre total constitue seulement 0,04% de la matière sèche chez *Trigonella foenum-graecum* et 0,1% pour *Foeniculum vulgare* ($P < 0,05$) (fig. 21).

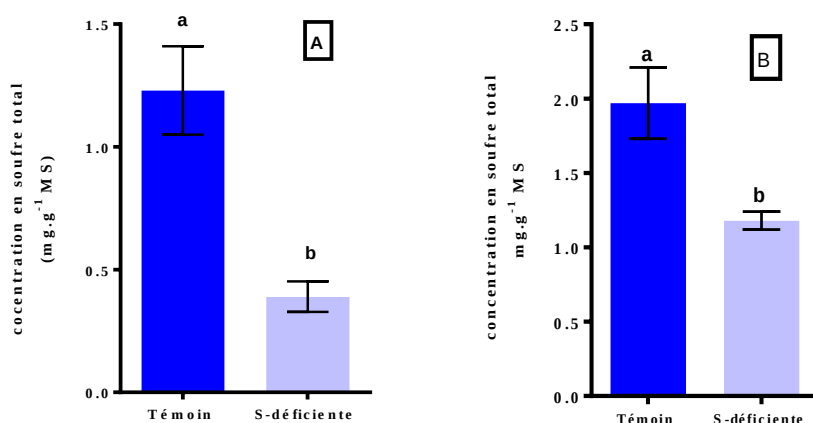


Figure 21: Concentration de soufre totale dans les graines de *Trigonella foenum-graecum* (A) et de *Foeniculum vulgare* (B) soumises à une carence en soufre; Contrôle: solution nutritive complète (1 mol.m⁻³ de S); S-déficiente : solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les astérisques indiqués dans les barres d'erreur signifient des différences significatives entre les traitements à $P < 0,05$. MS: Matière sèche.

3. Teneur en pigments chlorophylliens

Les teneurs en chlorophylle totale des feuilles chez les plantes témoins sont de 9,6 mg.g⁻¹ MS, 0,47 mg.g⁻¹MS et 13,56 mg.g⁻¹MS respectivement pour *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa* (fig. 22, 23 et 24). La limitation de l'apport en S durant la culture des plantes montre des diminutions significatives de la teneur en chlorophylle totale chez les trois plantes de l'ordre de 59%, 30% et 68% respectivement pour *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*. L'impact de la déficience en S se manifeste à

la fois sur la teneur en chlorophylle *a* et en chlorophylle *b*. Chez *Trigonella foenum-graecum*, les teneurs des feuilles en chlorophylle *a* et en chlorophylle *b* diminuent respectivement de 59% et 60%. Cette diminution est de chez *Foeniculum vulgare* la nutrition pauvre en soufre provoque des diminutions de 27% et de 35%, alors que chez *Eruca sativales* diminutions représentent 53% et 73% respectivement pour la chlorophylle *a* et la chlorophylle *b* (fig. 22, 23 et 24).

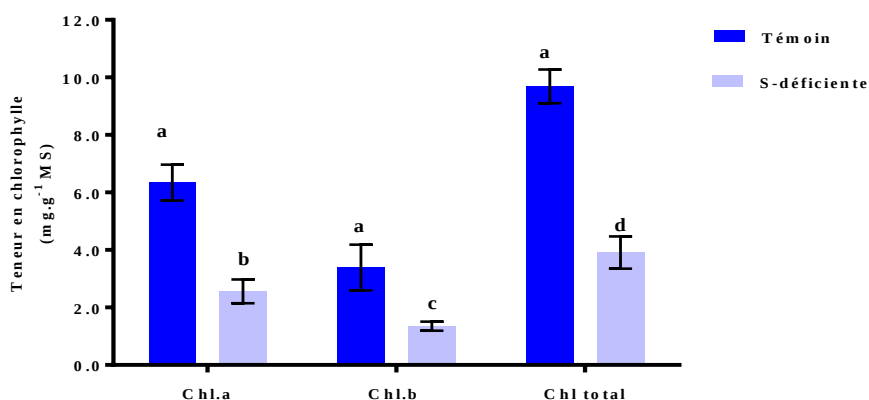


Figure 22 : Teneurs en chlorophylle dans les feuilles de *Trigonella foenum-graecum* soumise à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P < 0,05). MS : matière sèche. Chl : Chlorophylle.

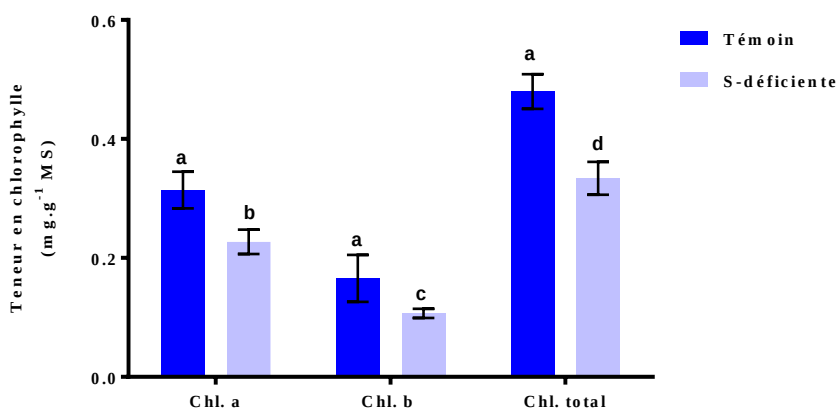


Figure 23 : Teneurs en chlorophylle dans les feuilles de *Foeniculum vulgare* soumise à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n=3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P < 0,05). MS : matière sèche. Chl : Chlorophylle.

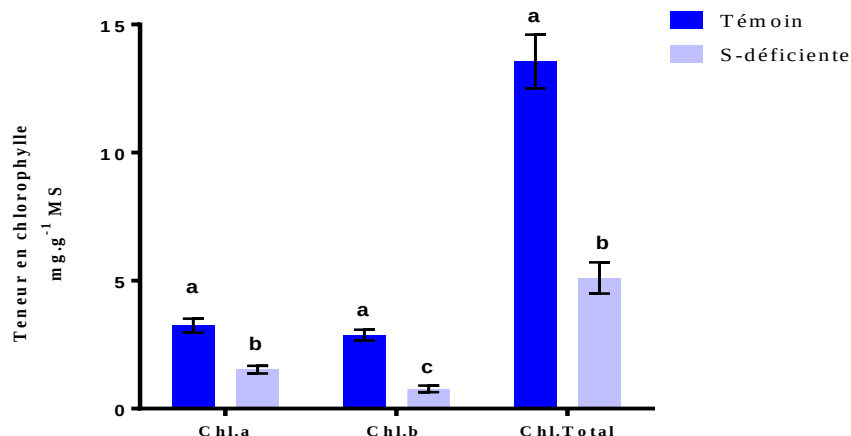


Figure 24 : Teneurs en chlorophylle dans les feuilles d'*Eruca sativa* soumis à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P <0,05). MS : matière sèche. Chl : Chlorophylle.

4. Teneurs en protéines solubles

Chez *Trigonella foenum-graecum*, chez les plantes ayant reçu une nutrition optimale en soufre, la concentration en protéines solubles est de 29,6 µg.g⁻¹ MS et 115,4 µg.g⁻¹ MS respectivement dans les feuilles et les racines. L'exposition des plantes à la nutrition pauvre en soufre augmente significativement ces teneurs de l'ordre de 57% et 48% respectivement pour les feuilles et les racines (P <0,05) (fig. 25).

Le même phénomène est observé chez *Foeniculum vulgare*. Chez ces plantes, une alimentation pauvre en soufre entraîne une augmentation des teneurs en protéines totales : Dans les parties aériennes, la concentration en protéines solubles passe de 10 µg.g⁻¹ MS à 68 µg.g⁻¹ MS, (augmentation significative de 83%, P (<0,05) alors que dans les racines, l'augmentation de la teneur en protéines solubles dans les plantes déficientes en S est moins prononcée n'atteignant que 27%. L'analyse statistique a montré que cette augmentation n'est pas significative (P > 0,05), comparée avec celle mesurée dans les plantes témoins (fig. 26). Contrairement à *Trigonella foenum-graecum* et à *Foeniculum vulgare*, *Eruca sativa* montre un phénomène inverse puisque la déficience en soufre entraîne une diminution significative des teneurs en protéines solubles. Chez les plantes témoins, les teneurs en protéines solubles

totales dans les feuilles représentent $44,27\mu\text{g.g}^{-1}\text{MS}$, alors qu'une exposition à une nutrition pauvre en soufre montre une diminution significative de 31% dans les feuilles ($p < 0,05$). Cependant, dans les racines, la carence ne montre aucun effet significatif selon le test statistique ($p > 0,05$) (fig. 27).

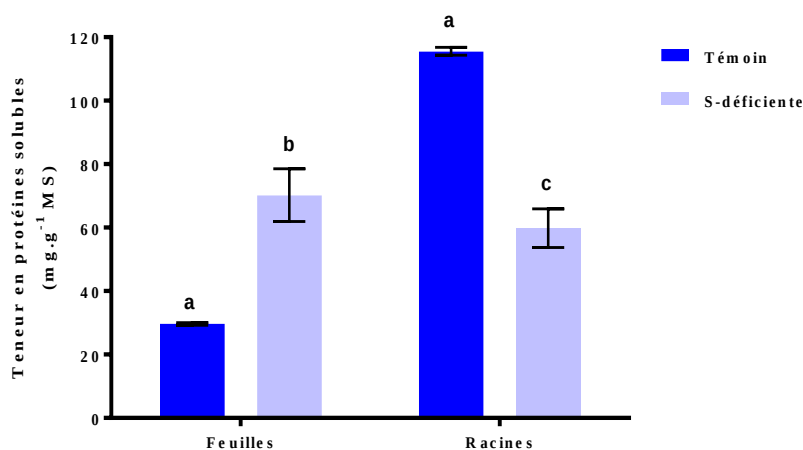


Figure 25: teneurs en protéines solubles dans les feuilles et les racines de *Trigonella foenum-graecum* soumises à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1 mol.m^{-3} de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre ($0,05 \text{ mol.m}^{-3}$ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de $n = 3$. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,05$). MS : matière sèche.

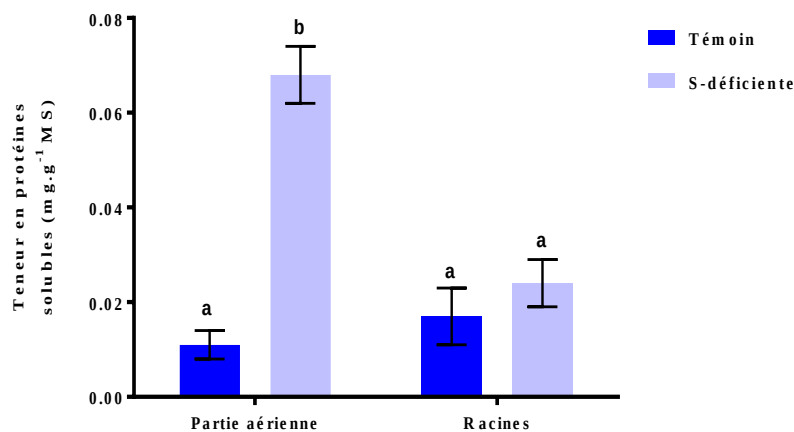


Figure 26: Teneurs en protéines solubles dans la partie aérienne et les racines de *Foeniculum vulgare* soumise à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1 mol.m^{-3} de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre ($0,05 \text{ mol.m}^{-3}$ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de $n = 3$. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,05$). MS : matière sèche

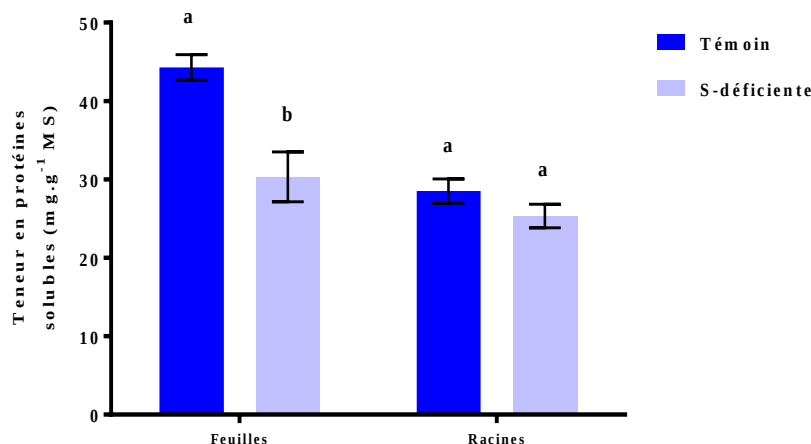


Figure 27: Teneurs en protéines solubles dans les feuilles et les racines d'*Eruca sativa* soumises à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1 mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P < 0,05). MS : matière sèche.

5. Teneur en sucres solubles

La réduction de la nutrition en soufre de *Trigonella foenum-graecum* provoque une diminution importante des teneurs en sucres solubles dans la plante. Ces teneurs représentent 58,2 mg.g⁻¹MS et 30,6 mg.g⁻¹MS respectivement dans les feuilles et les racines chez les plantes témoins alors qu'une carence en soufre entraîne une chute de ces teneurs à des valeurs de 28,5 mg.g⁻¹MS et de 13,5 mg.g⁻¹MS dans les feuilles et dans les racines respectivement (fig. 28). Les teneurs en sucres solubles diminuent ainsi de 56% dans les feuilles et de 50% dans les racines (p < 0,05).

Chez *Foeniculum vulgare*, la nutrition soufrée réduite entraîne également une diminution importante des teneurs en sucres solubles. Dans les plantes ayant reçu une nutrition soufrée normale (1 mol.m⁻³ S), les teneurs en sucres solubles sont de 7,2 mg.g⁻¹MS et de 8,4 mg.g⁻¹MS respectivement dans les feuilles et les racines. Dans les plantes ayant reçu une nutrition déficiente en soufre, nous avons constaté une diminution significative des teneurs en sucres solubles : dans les parties aériennes, on assiste à une baisse significative de 48% puisque ces teneurs passent de 7,2 mg.g⁻¹MS dans les plantes témoins à 3,7 mg.g⁻¹MS dans les plantes

déficientes en S, ($P < 0,05$). Dans les racines, la même observation peut être faite puisqu'on assiste à une diminution statistiquement significative ($P < 0,05$) de 37% faisant passer les teneurs en sucre de $8,4 \text{ mg.g}^{-1}\text{MS}$ à $5,3 \text{ mg.g}^{-1}\text{MS}$ (fig. 29).

Chez *Eruca sativa*, une nutrition pauvre en soufre affecte nettement les niveaux de sucres solubles dans la plante. Dans les feuilles des plantes témoins, la teneur en sucres solubles atteint $6,4 \text{ mg.g}^{-1}\text{MS}$, alors que l'application d'une nutrition soufrée limitée la concentration en soufre qui diminue jusqu'à $2,46 \text{ mg.g}^{-1}\text{MS}$, ce qui reflète une diminution de 61,5%. En parallèle, la diminution est d'environ 26,3% dans les racines puisque la teneur en sucres solubles chute de $1,86 \text{ mg.g}^{-1}\text{MS}$ dans les plantes témoins, à $1,37 \text{ mg.g}^{-1}\text{MS}$ dans celles privées en S ($p < 0,05$) (fig. 30).

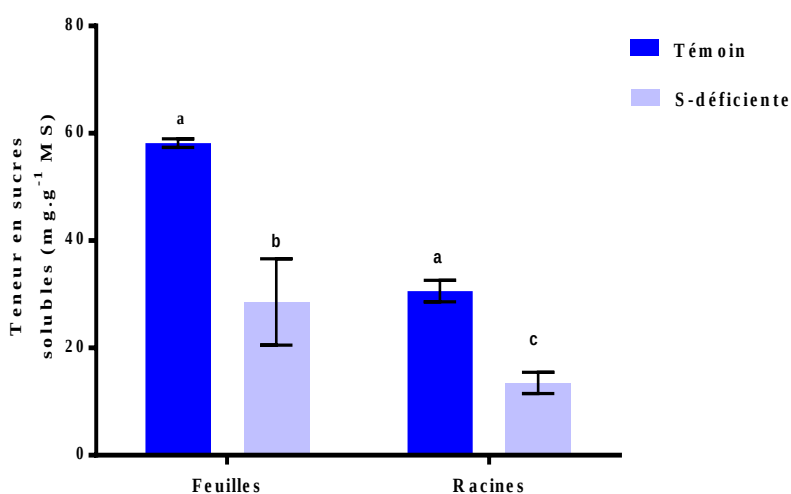


Figure 28: Teneurs en sucres solubles dans les feuilles et les racines de *Trigonella foenum-graecum* soumises à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1 mol.m^{-3} de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre ($0,05 \text{ mol.m}^{-3}$ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de $n = 3$. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,05$). MS : matière sèche.

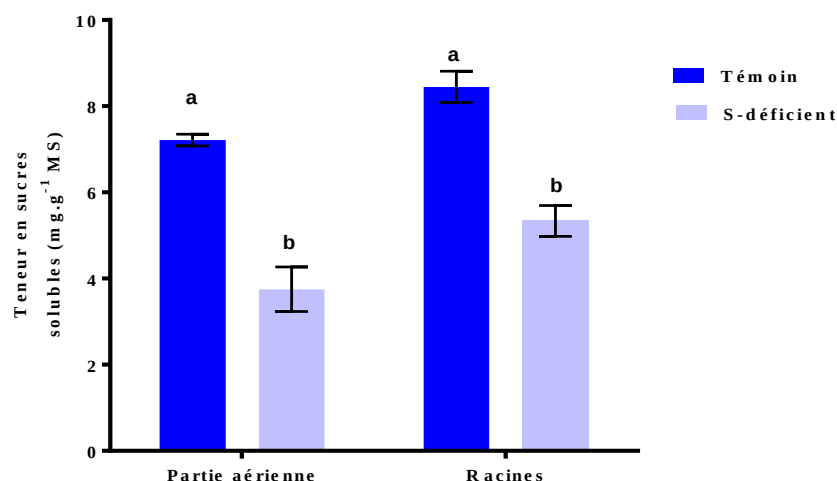


Figure 29: Teneurs en sucres solubles dans les feuilles et les racines de *Foeniculum vulgare* soumises à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1 mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P < 0,05). MS : matière sèche.

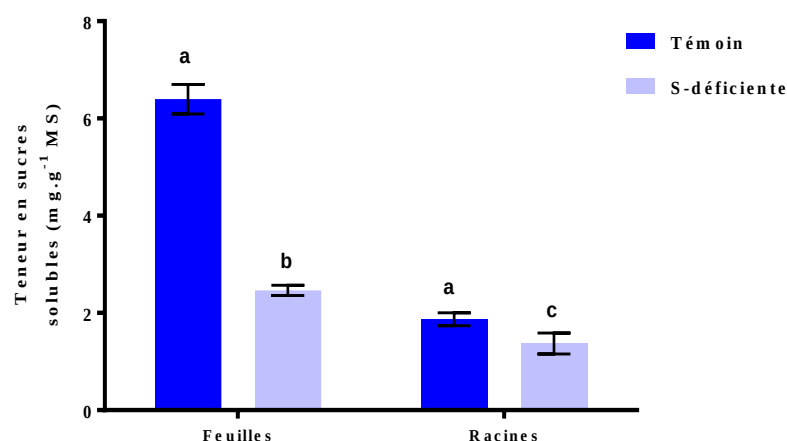


Figure 30: Teneurs en sucres solubles dans les feuilles et les racines d'*Eruca sativa* soumises à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1 mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P < 0,05). MS : matière sèche.

6. Teneurs en acides aminés libres

Le niveau des acides aminés dans *Trigonella foenum-graecum* est fortement affecté par le déficit en soufre. La diminution des teneurs en acides aminés libres est respectivement de 56% et de 40% dans les feuilles et les racines, comparativement aux plantes témoins (p < 0,05)

puisque ces teneurs passent de 1,3 mg.g⁻¹MS et 0,9 mg.g⁻¹MS dans les plantes témoins à 0,6 mg.g⁻¹MS et 0,5 mg.g⁻¹MS dans celles déficientes en soufre respectivement dans les feuilles et les racines (fig. 31). En ce qui concerne *Foeniculum vulgare*, la concentration en acides aminés dans les feuilles et les racines a également été affectée significativement par la carence en soufre. Suite à l'application d'une nutrition pauvre en soufre (0.05 mol.m⁻³), les teneurs en acides aminés diminuent de 41% et 49% respectivement dans les feuilles et les racines, en comparaison avec les plantes témoins (p<0.05) (fig. 32). Le même effet est observé chez *Eruca sativa*, la concentration d'acides aminés libres est nettement affectée par la privation en soufre ; dans les plantes témoins, la concentration en acides aminés est respectivement de 1,4 mg.g⁻¹MS et de 0,63 mg.g⁻¹MS dans les feuilles et les racines. Lors de l'application d'une déficience en soufre, les niveaux d'acides aminés diminuent aussi bien dans les feuilles que dans les racines de 36% et 21% respectivement (p <0,05) (fig. 33).

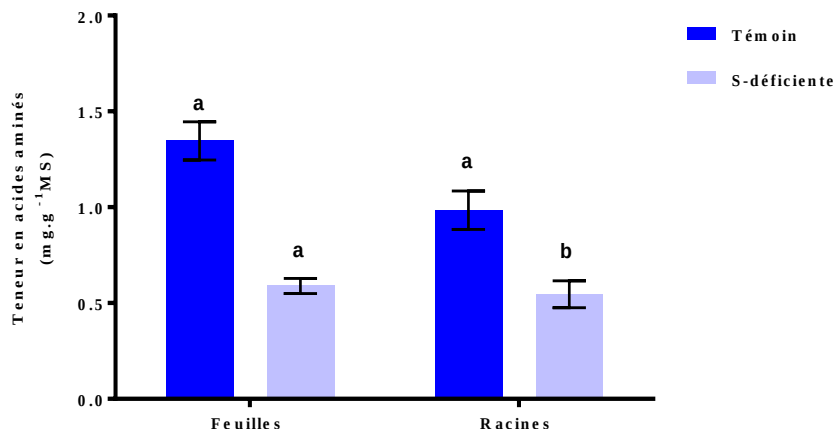


Figure 31: Teneurs en acides aminés totaux dans les feuilles et les racines de *Trigonella foenum-graecum* soumises à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1 mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P <0,05). MS : matière sèche

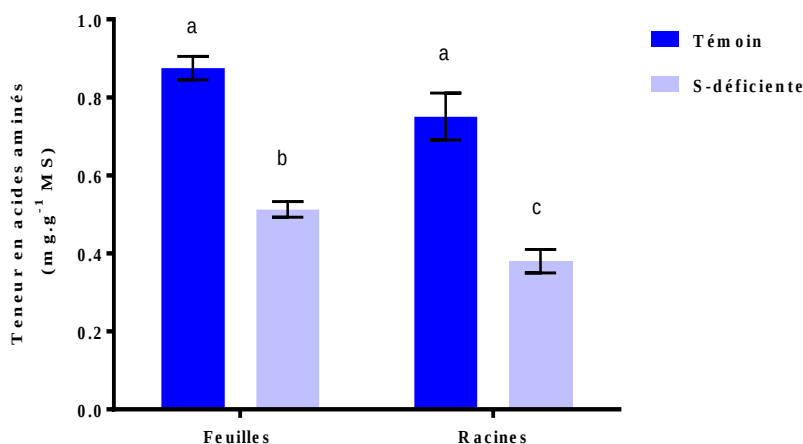


Figure 32: Teneurs en acides aminés totaux dans les feuilles et les racines de *Foeniculum vulgare* soumises à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1 mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P <0,05). MS : matière sèche.

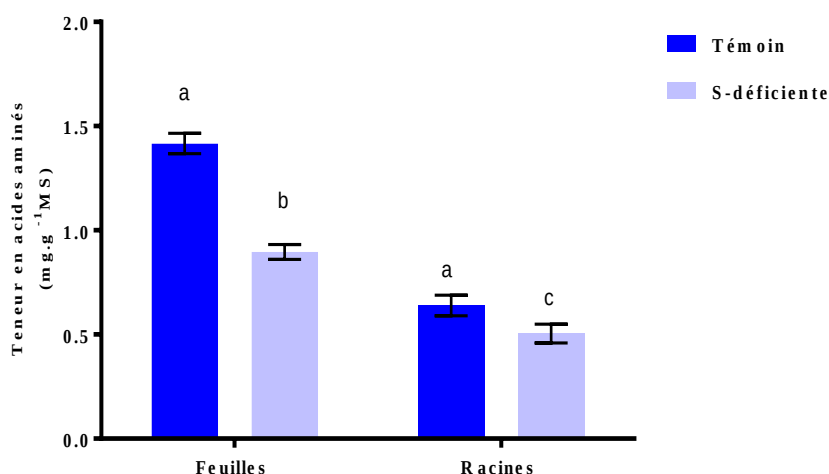


Figure 33: Teneurs en acides aminés totaux dans les feuilles et les racines d'*Eruca sativa* soumises à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète (1mol.m⁻³ de S); S-déficiente: solution nutritive déficiente en soufre (0,05 mol.m⁻³ de S). Les barres verticales sont les valeurs SE de n = 3. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (P <0,05). MS : matière sèche.

7. Activité Nitrate Réductase

L'ANR *in vivo* dans les racines de *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare*, et *Eruca sativa*, exprimée en quantité de nitrite produite par heure a été estimée *in vivo* dans nos conditions expérimentales. L'analyse des résultats montre un impact important de la carence en S sur la première étape de l'assimilation des nitrates chez les trois plantes. Dans les plantes

témoins, l'ARN est estimée à $7,1 \mu\text{g}$ de $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; $11,9 \mu\text{g}$ de $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ et $31,26 \mu\text{g}$ de $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivement chez *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*. Après l'application d'une nutrition minérale pauvre en soufre, l'ANR *in vivo* chute significativement pour les trois plantes de 68%, 85% et 53,42% respectivement chez *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*, ($P < 0,05$) (fig. 34).

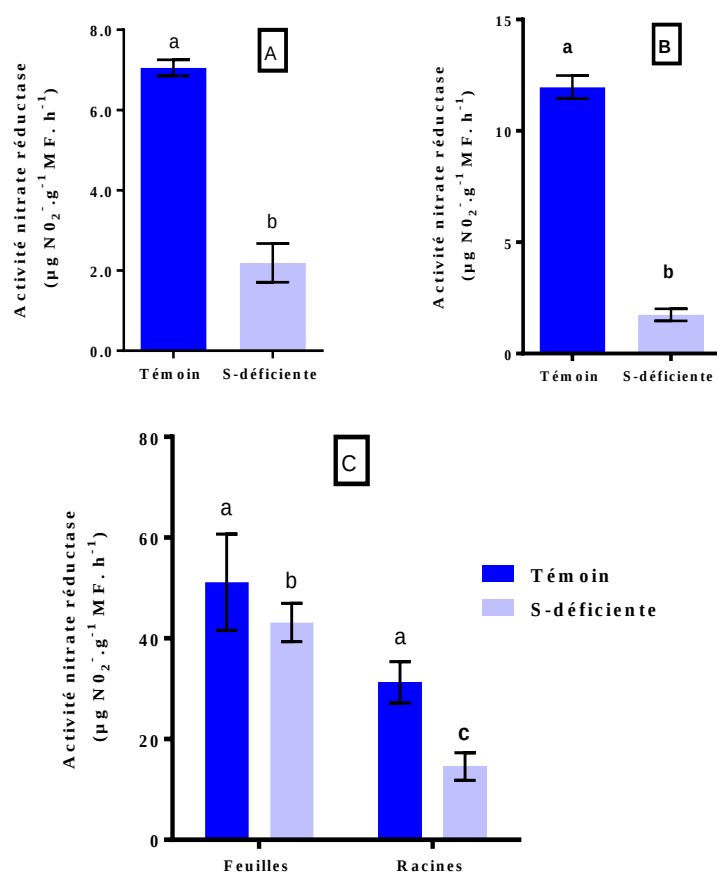


Figure 34 : Activité nitrate réductase dans les racines de *Trigonella foenum-graecum*(A) et de *Foeniculum vulgare* (B) et dans les feuilles et les racines d'*Eruca sativa* (C) soumises à une carence en soufre. Témoin: solution nutritive complète ($1 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ de S); S-déficiente: solution nutritive S-déficient ($0,05 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ de S). Les barres verticales sont les valeurs S Ede $n = 3$. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,05$). MF : matière fraîche.

8. Teneurs en éléments minéraux

Chez les plantes témoins des trois espèces étudiées *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*, les éléments minéraux se trouvent répartis de façon égale entre les feuilles et les racines (tableau 4). Le Ca et le K représentent les teneurs les plus élevées chez

le trois plantes, tandis que le Mo représente le contenu le plus faible. Dans le cas d'une carence en soufre, des augmentations dans la teneur de tous les éléments minéraux ont été enregistrées dans les feuilles de *Trigonella foenum-graecum*, sauf pour Ca ($P > 0,05$). Des augmentations significatives de l'ordre de 11%, 17% et 19% ont été enregistrées dans le cas du K, du Mg et du Mo, respectivement ($p < 0,05$). En revanche, aucune différence significative dans la composition minérale des racines n'a été observée, à l'exception du K qui présente une augmentation légère mais significative lors de l'application de la carence en S.

Chez *Foeniculum vulgare*, on constate une augmentation du contenu de tous les éléments minéraux dans les feuilles et les racines. Dans les feuilles, des augmentations significatives de l'ordre de 39%, 50,8%, 43% et 64% ont été enregistrées dans le cas du Ca, du K, du Mg et du Mo respectivement suite à la déficience en S ($p < 0,05$). Les teneurs en Mg et en Mo ont également augmenté dans les racines de l'ordre de 13% et 59% respectivement. Par contre, aucune différence significative n'a été enregistrée dans les concentrations du Ca et du K dans les racines des plantes S-déficientes.

En ce qui concerne *Eruca sativa*, suite à l'application de la carence en soufre, des augmentations importantes ont été enregistrées dans le contenu de tous les éléments minéraux des racines. Des augmentations significatives de l'ordre de 76%, 90% et 86% ont été enregistrées respectivement dans Ca, K, Mg des racines ($p < 0,05$). Chez les plantes témoins d'*Eruca sativa*, le Mo se trouve sous forme de traces dans les racines, mais à l'application de la carence en soufre la concentration en cet élément augmente considérablement pour atteindre $73 \text{ g.g}^{-1} \text{ MS}$ ($p < 0,05$) (Tableau 4).

Tableau 4: Teneurs en éléments minéraux des feuilles et des racines (mg.g⁻¹ MS) de *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa* soumises à une carence en soufre. Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P <0,05)

Feuilles						
Témoin			S-déficiente			
	<i>T. Foenum-graecum</i>	<i>F. Vulgare</i>	<i>E. Sativa</i>	<i>T.Foenum-graecum</i>	<i>F. Vulgare</i>	<i>E. Sativa</i>
Ca	2,960a	3,081a	6,778a	3,340a	5,113b	6,531a
K	2,500a	6,002b	5,295a	2,810b	12,202c	5,409b
Mg	0,470a	1,894a	3,957a	0,570b	3,378c	3,711a
Mo	0,007a	0,007a	0,01a	0,009b	0,009b	0,013a
Racines						
Témoin			S-déficiente			
	<i>T. Foenum-graecum</i>	<i>F. Vulgare</i>	<i>E. Sativa</i>	<i>T.Foenum-graecum</i>	<i>F. Vulgare</i>	<i>E. Sativa</i>
Ca	2,960b	5,522a	6,327a	2,640b	5,075a	26,739c
K	2,760a	6,798a	3,918a	2,840c	7,071a	41,703b
Mg	0,470b	1,792c	4,010b	0,420b	2,060c	30,145c
Mo	0,007b	0,075b	Traces	0,007b	0,183c	0,073

III Etude de l'effet de la carence en soufre sur la teneur en certaines molécules bioactives et la qualité médicinale de *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*.

1. Teneurs en composés phénoliques des graines

Les extraits méthanoliques des plantes témoins montrent une richesse importante en composés phénoliques totaux (CPT), en particulier dans les graines de *Trigonella foenum-graecum* qui représentent une teneur de 29,36 mg GAE/g MS, suivies par les graines de *Foeniculum vulgare* et les feuilles d'*Eruca sativa* avec des valeurs respectives de 3,67 mg GAE/g MS et 3,84mg GAE/g MS. A l'application d'une déficience en soufre, les teneurs en CPT des extraits chutent chez les trois plantes ; les diminutions les plus prononcées sont enregistrées chez les graines de *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare* avec 52% et 30%

respectivement alors que *Eruca sativa* est la moins affectée avec une chute de 18% seulement ($P < 0.05$) (Tableau 5).

La quantification de la concentration en flavonoïdes totaux (CFT) dans les extraits des trois plantes montre que la déficience en soufre a un effet négatif sur les teneurs en Flavonoïdes totaux. Chez les plantes témoins, la CFT est de 2,45 mg QE /g MS, 0,785 mg QE/g MS et 0,423mg QE /g MS respectivement chez *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*. Après l'application d'une nutrition minérale pauvre en soufre, la CFT chute significativement de 50%, 42% et 35% respectivement par les graines de *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare* et les feuilles de *Eruca sativa* ($p < 0.05$) (Tableau 5). Par ailleurs, on constate que la carence en soufre n'a aucun effet significatif sur les teneurs en tanins condensés dans les 3 plantes ($P > 0.05$) (Tableau 5).

Tableau 5: Effet de la carence en soufre sur les concentrations en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés dans les extraits méthanoliques des graines de *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare* et les feuilles d'*Eruca sativa* exprimé en matière sèche (MS).

Plante	Type d'extrait	Polyphénols totaux (mg GAE /g MS)	flavonoïdes totaux (mg QE/g MS)	Tanins condensés (µg/g MS)
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Témoin	29,36 ± 1.30a	2,45 ± 0.29 c	5,25± 1.51d
	S-déficiente	14,07 ± 2.37b	1,21 ± 0.13d	5,96±0.91d
<i>Foeniculum vulgare</i>	Témoin	3,67 ± 0.08a	0,78 ± 0.094c	15,61± 1.21d
	S-déficiente	2,54 ± 0.04b	0,451 ± 0.018d	12,98± 0.46 d
<i>Eruca sativa</i>	Témoin	3,84 ± 0.06	0,423 ± 0.09 c	1,13± 0.39d
	S-déficiente	3,16 ± 0.09b	0,272 ± 0.02d	2,13±0.39d

Les valeurs présentent les moyennes ± Ecart-type (n= 3). Les valeurs avec des lettres différentes dans la même colonne de la même plante sont significativement différentes ($P < 0.05$). GAE: Equivalent en acide Gallique; QE: Equivalent en Quercitine.

2. Identifications des flavonoïdes par HPLC /MS

a. *Trigonella foenum-graecum*

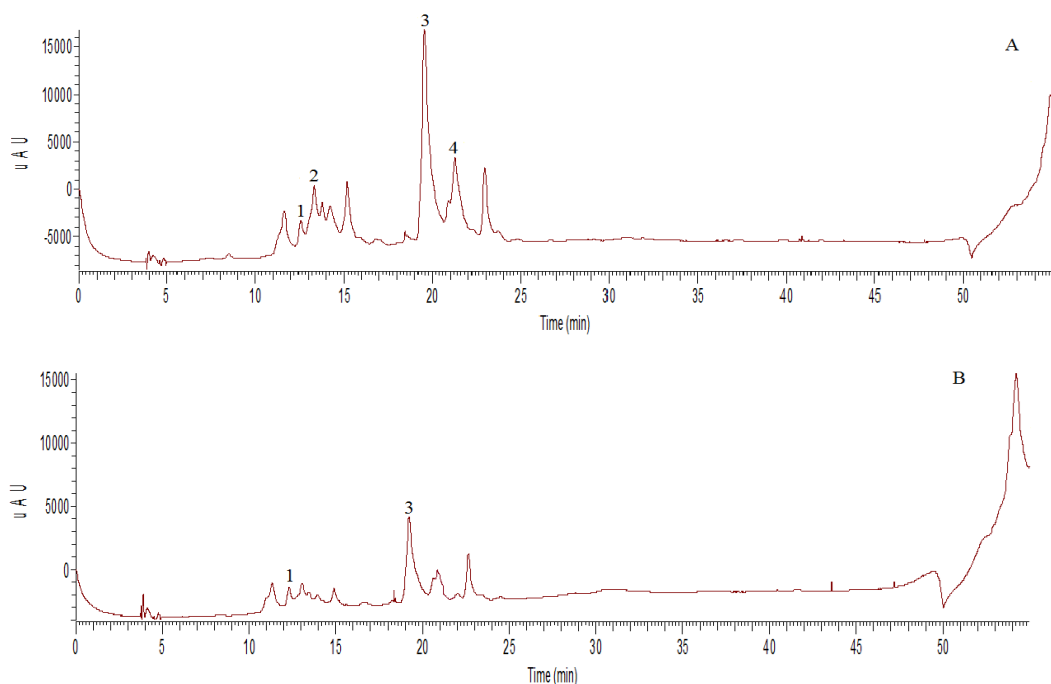


Figure 35 : Profil de séparation par HPLC de l'extrait méthanolique des graines témoins (A) et des grains S-déficientes (B) de *Trigonella foenum-graecum*, détecté à 320 nm.

Après extraction des flavonoïdes des graines de fenugrec (témoins et S-déficientes), l'échantillon est analysé par HPLC doté d'un détecteur de type DAD et couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/DAD/MS). Le profil de séparation HPLC révèle la présence de différents pics chromatographiques dans les extraits des échantillons étudiés (fig. 35). L'analyse des spectres de masse de chaque extrait par référence à la littérature permet de nommer 4 C-glycosides appartenant à deux familles de flavonoïdes : le Kampherol-7-O Rhamnosyle de la famille des Flavonoles, et la Vicenine-2, l'Isoorientine et l'Isoschaftoside de la famille des flavones (Tableau 6).

Chez les extraits des graines issues des plantes témoins (1mM S), l'analyse des spectres de masse révèle la présence de 3 flavones et un flavonole. À un TR=12,44 min qui correspond

au pic 1 sur la Figure 35A, le spectre de masse indique un signal à 563,1 $[M-H]^-$ m/z qui correspond à l'Isoschaftoside, un C-glycosyl qui est une apigénine (fig. 36A). A $RT=13,00$ min qui correspond au pic 2 sur la figure 35A, le spectre indique un pic de base à 447,1 $[M-H]^-$ m/z , selon la littérature cet ion correspond à l'Isoorientine qui est une Luteolin C-glycosyl (fig. 36B), le troisième composé est détecté à un $TR= 19,53$ min correspondant au pic 3 sur la figure 35A, sur un pic de base de 593,1 $[M-H]^-$ m/z et qui indique une apigénine C-glycosyl qui est la Vicenine-2 (fig. 36C), cependant le dernier composé identifié et qui correspond au pic 4 sur la figure 35A, est le Kampherol-7-O Rhamnosyle avec un pic de base de 577 $[M-H]^-$ m/z (fig. 36D). Par contre, chez l'extrait des plantes S-déficientes (0,05 mM S)

Le chromatogramme de séparation indique la présence de deux pics (1 et 3) (fig. 35B) dont l'identification par spectrométrie de masse montre qu'il s'agit de deux flavones ; l'Isoschaftoside sur un pic de base 563,1 $[M-H]^-$ m/z à $TR= 12,36$ min et la Vicenine-2 avec un pic de base 593,1 $[M-H]^-$ m/z à $TR= 19,23$ min (fig. 37A et 37 B).

Tableau 6 : Identification des flavonoïdes dans les graines de *Trigonella foenum-graecum* témoins (1mMS) et déficientes (0.05mMS).

	Pic	TR (min)	[M-H] m/z	Composé	Référence
Témoin	1	12,44	563,1	Isoschaftoside	Keskes et al.2018 ; Kite et al. 2011
	2	13,00	447,1	Isoorientine	Keskes et al.2018 ; Kite et al. 2011
	3	19,35	593,1	Vicenine-2	Keskes et al.2018 ; Kite et al. 2011
	4	21,07	577,1	Kampherol-7-O Rhamnosyle	Benayad et al.2014
S-déficiente	1	12,36	563,1	Isoschaftoside	Keskes et al.2018 ; Kite et al. 2011
	3	19,23	593,1	Vicenine-2	Keskes et al.2018 ; Kite et al. 2011

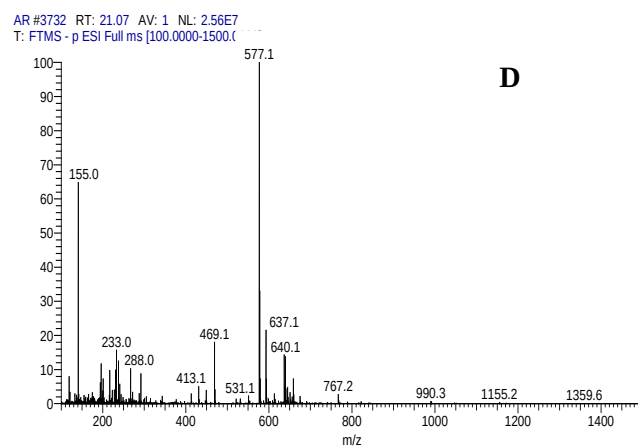
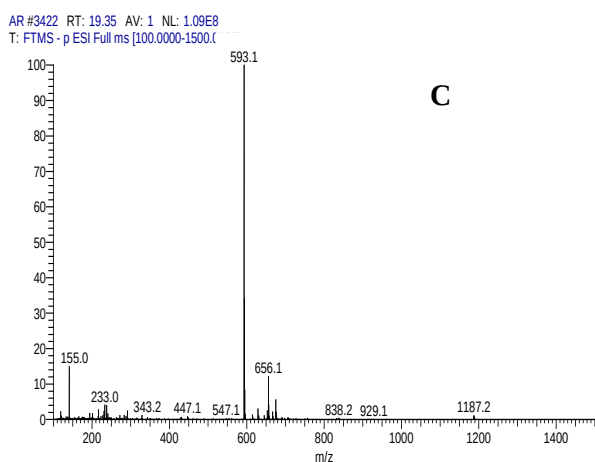
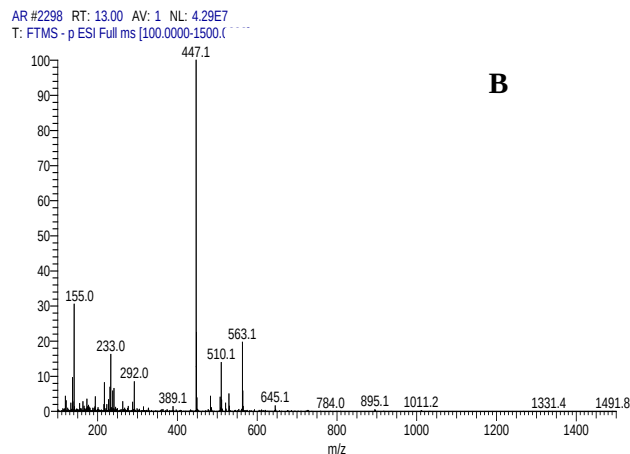
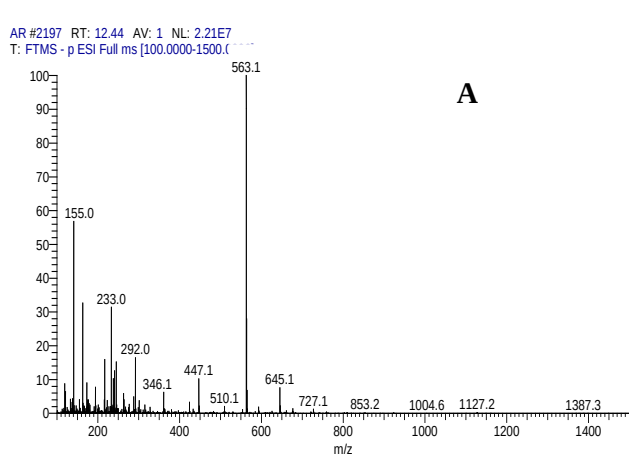


Figure 36 : Spectres LC-MS des ions $[M - H]^-$ de l'Isoschaftoside (A), l'Isoorientine (B), la Vicenine-2 (C) et le Kampherol-7-O Rhamnosyle (D) obtenu par Electrospray (ESI) en mode négatif dans un extrait méthanolique des graines témoins de fenugrec (1mM S).

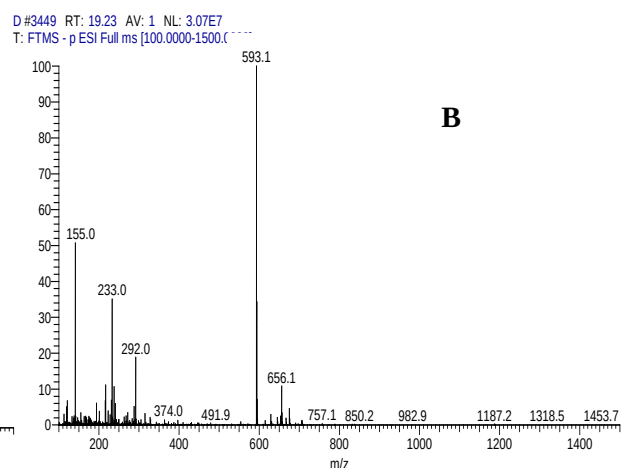
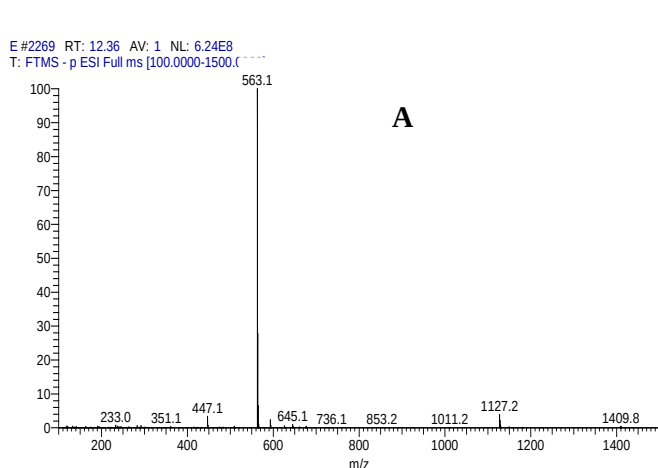


Figure 37 : Spectres LC-MS des ions $[M - H]^-$ de l'Isoschaftoside (A) et la Vicenine-2 (B) obtenu par Electrospray (ESI) en mode négatif dans un extrait méthanolique des graines S-déficientes de fenugrec (0.05 mM S).

b. *Eruca sativa*

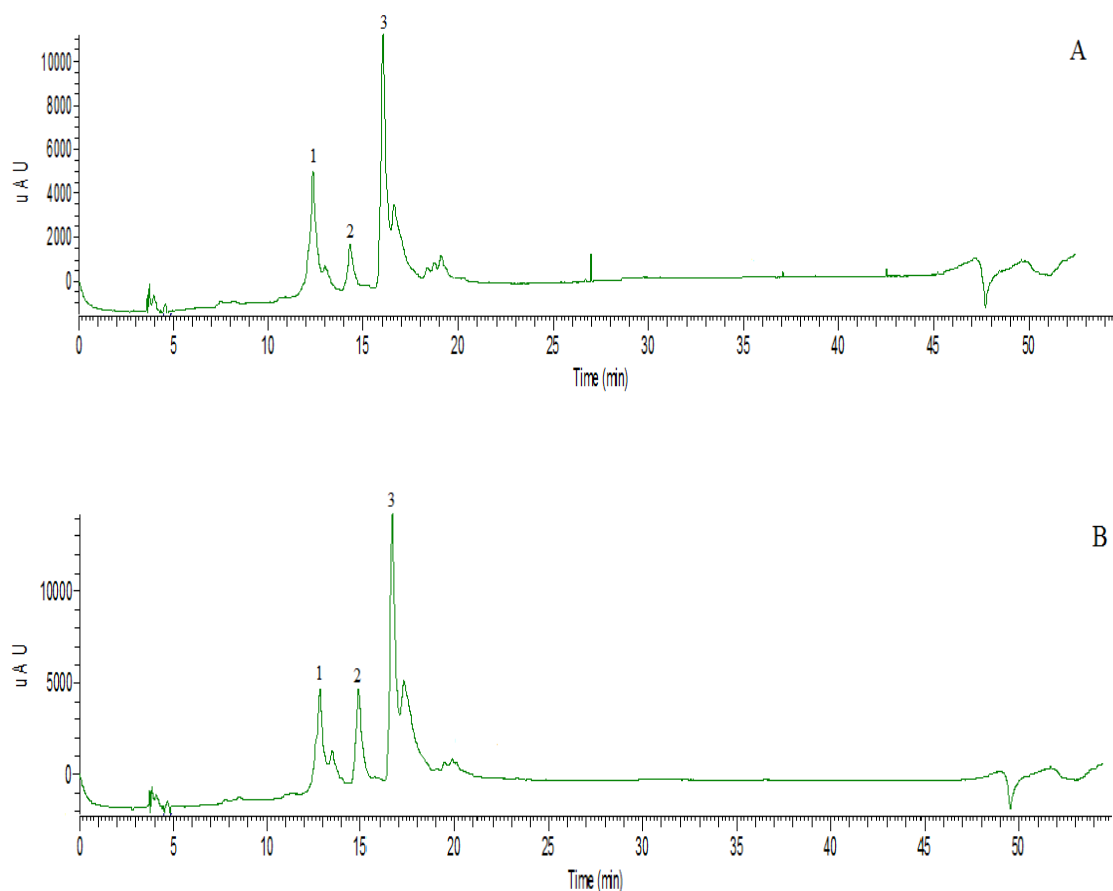


Figure 38 : Profil de séparation par HPLC de l'extrait méthanolique des graines témoins (A) et des grains S-déficientes (B) d'*Eruca Sativa*, détecté à 340 nm.

La figure 38 présente les chromatogrammes de séparation par HPLC des deux extraits d'*Eruca sativa* (Témoin et S-déficiente), le profil de séparation indique la présence de trois pics dans les deux types d'extraits. La spectrométrie de masse permet d'identifier les trois composés flavonoïques correspondants aux pics détectés par référence à la littérature. Le tableau 7 présente les flavonoïdes identifiés dans des feuilles d'*Eruca sativa*. L'analyse des spectres des deux types d'extraits (Témoin et S-déficiente) montre que l'application de la nutrition limitée en soufre (0,05mM) n'a pas d'effet sur la composition en flavonoïde des feuilles d'*Eruca sativa*. Le spectre de masse indique la présence de trois C-glycosides de la

famille des flavonoles dans les deux extraits analysés, il s'agit de l'isorhamnetin-3-glucoside, la Quercetin-3-glucoside et le Kaempferol-3,40 – diglucoside (Figure 39 et 40).

Table 7 : Identification des flavonoïdes dans les feuilles d'*Eruca sativa* témoins (1mMS) et S-déficientes (0,05mM S).

	Pic	TR (min)	[M-H-] m/z	Composé	Référence
Témoin	1	12,95	609,1	Kaempferol-3,4 –diglucoside	Alruwaih et al. 2017 ; Bell et al. 2015, Bell et al. 2014.
	2	14,97	463,1	Quercetin-3-glucoside	Alruwaih et al. 2017 ; Bell et al. 2015, Bell et al. 2014.
	3	16,82	447,1	Isorhamnetin-3-glucoside	Bell et al. 2015, Bell et al. 2014.
S-déficiente	1	12,35	609,1	Kaempferol-3,40 –diglucoside	Alruwaih et al. 2017 ; Bell et al. 2015, Bell et al. 2014.
	2	15,02	463,1	Quercetin-3-glucoside	Alruwaih et al. 2017 ; Bell et al. 2015, Bell et al. 2014.
	3	16,84	447,1	Isorhamnetin-3-glucoside	Bell et al. 2015, Bell et al. 2014.

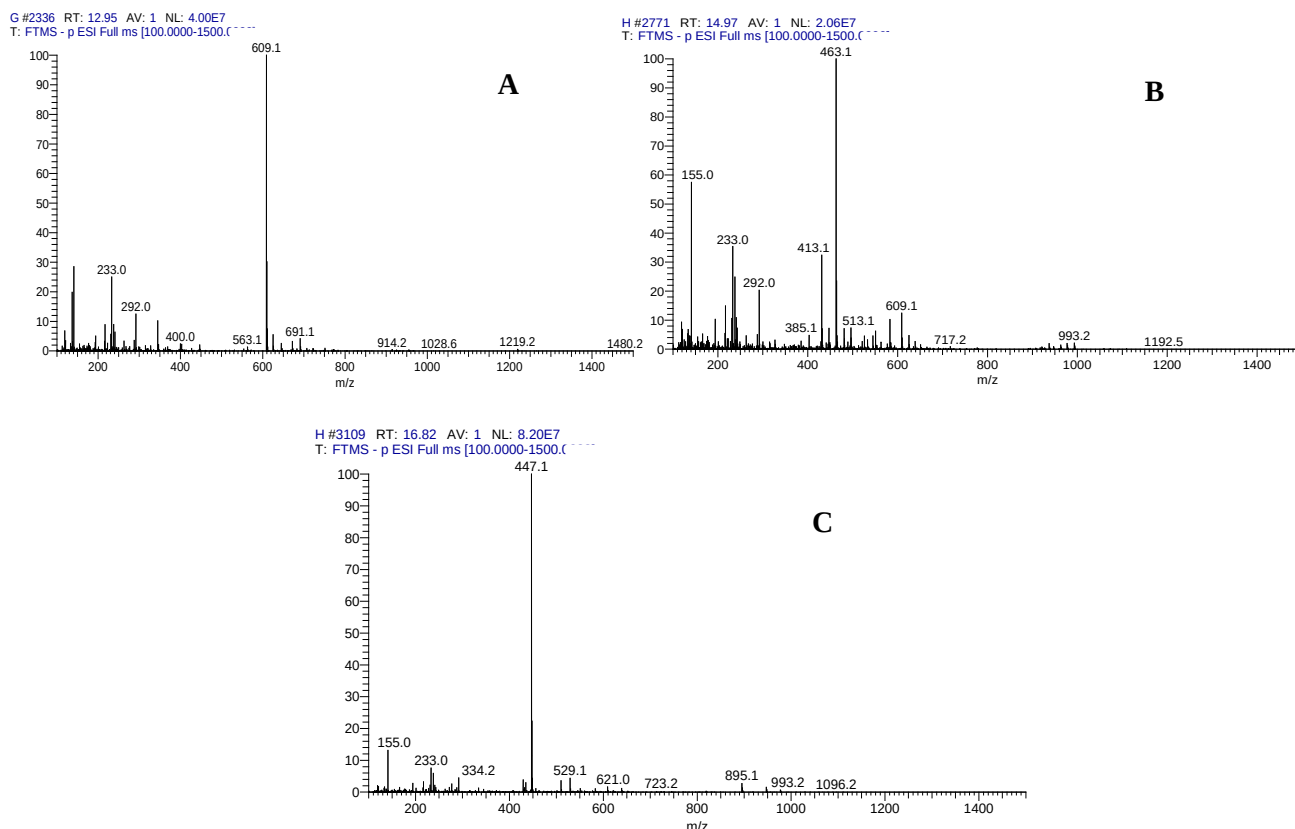


Figure 39 : Spectres LC-MS des ions $[M-H]^-$, Kaempferol-3,40 –diglucoside (A), Quercetin-3-glucoside (B) et Isorhamnetin-3-glucoside (B) obtenu par Electrospray (ESI) en mode négatif dans les extrait méthanolique des feuilles Témoins (1mM S) d'*Eruca sativa*.

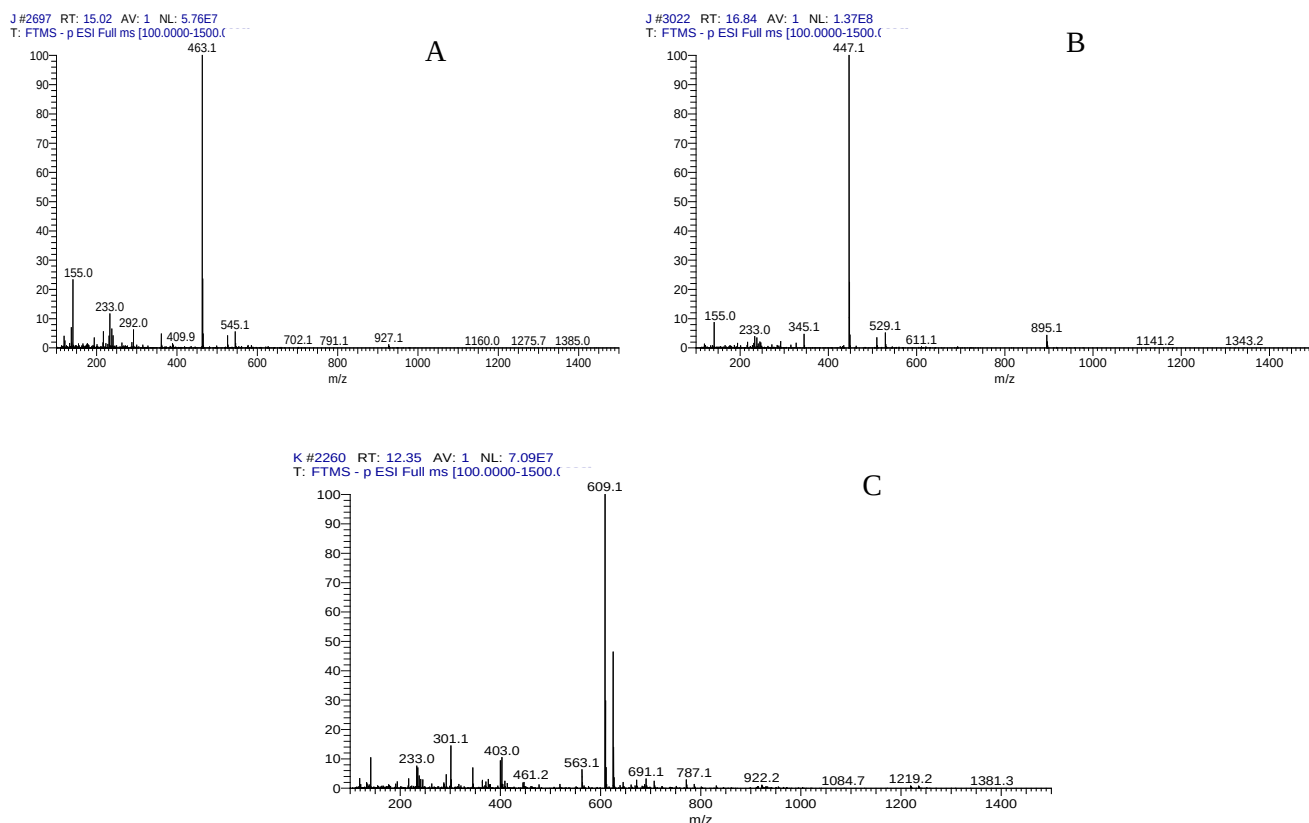


Figure 40 : Spectres LC-MS des ions $[M-H]^-$ Kaempferol-3,40 –diglucoside (A), Quercetin-3-glucoside (B) et Isorhamnetin-3-glucoside (B) obtenu par Electrospray (ESI) en mode négatif dans les extrait méthanolique des feuilles S-déficiantes (0.05 mM S) d'*Eruca sativa*

IV. Effet de la déficience en soufre sur les activités biologiques

1. Activité antioxydante par piégeage du radical DPPH

Chez *Trigonella foenum-graecum*, l'étude de l'activité anti-radicalaire par piégeage du radical DPPH montre que l'extrait méthanolique témoin des graines de *Trigonella foenum-graecum* dispose d'un pouvoir antioxydant très fort en comparaison avec l'acide ascorbique (AA) comme antioxydant de référence. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait témoin des graines est de 73%, 81% et 87% pour les concentrations 0.1mg/ml, 0,5mg/ml et 1mg/ml. Pour les mêmes concentrations, les pourcentages d'inhibition de DPPH par comparaison avec l'AA sont respectivement 87%, 91% et 93% (fig. 41A). Suite à l'application de la carence en soufre, la capacité anti-radicalaire de l'extrait méthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum* diminue significativement ; les pourcentages d'inhibition du radical DPPH par l'extrait des graines S-déficientes est de 47%, 75% et 78% respectivement pour les concentrations 0,1mg/ml, 0,5mg/ml et 1mg/ml (fig. 41A).

En ce qui concerne *Foeniculum vulgare*, l'évaluation du pouvoir antioxydant par piégeage du radical DPPH de l'extrait méthanolique des graines de *Foeniculum vulgare* montre un pouvoir antioxydant relativement important en le comparant avec celui de l'acide ascorbique. Le pourcentage d'inhibition de l'extrait témoin est de 28%, 43% et 51% pour les concentrations 0,1mg/ml, 0,5mg/ml et 1mg/ml respectivement en comparaison avec ceux de l'AA 87%, 91% et 93% pour les mêmes concentrations (fig. 41B). L'application de la carence en soufre entraîne une diminution considérable du pouvoir anti-radicalaire de l'extrait méthanolique des graines de *Foeniculum vulgare*. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait des graines S-déficientes est de 16%, 24% et 45% respectivement pour les concentrations 0,1mg/ml, 0,5 mg/ml et 1mg/ml (fig. 41B).

Le pouvoir anti-radicalaire enregistré par l'extrait méthanolique des feuilles d'*Eruca sativa* est très proche de celui de l'antioxydant de référence AA. Le pourcentage d'inhibition du

radicale DPPH par l'extrait des feuilles d'*Eruca sativa* est de 78%, 88% et 94%, respectivement pour les concentrations 0,1mg/ml, 0,5mg/ml et 1mg/ml. Après exposition à une nutrition pauvre en soufre, le pourcentage d'inhibition du DPPH diminue jusqu'à 42% 61% et 65 %, respectivement pour les mêmes concentrations (fig. 41C).

Le calcul de la concentration inhibitrice de 50% du radicale DPPH (IC₅₀) des extraits témoins a révélé des valeurs de 180µg/ml, 778µg/ml et 135,5µg/ml respectivement pour *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*. Après l'application de la déficience en soufre, l'IC₅₀ augmente considérablement pour les trois plantes en enregistrant des valeurs de 340µg/ml, 957µg/ml et 341µg/ml respectivement pour *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*.

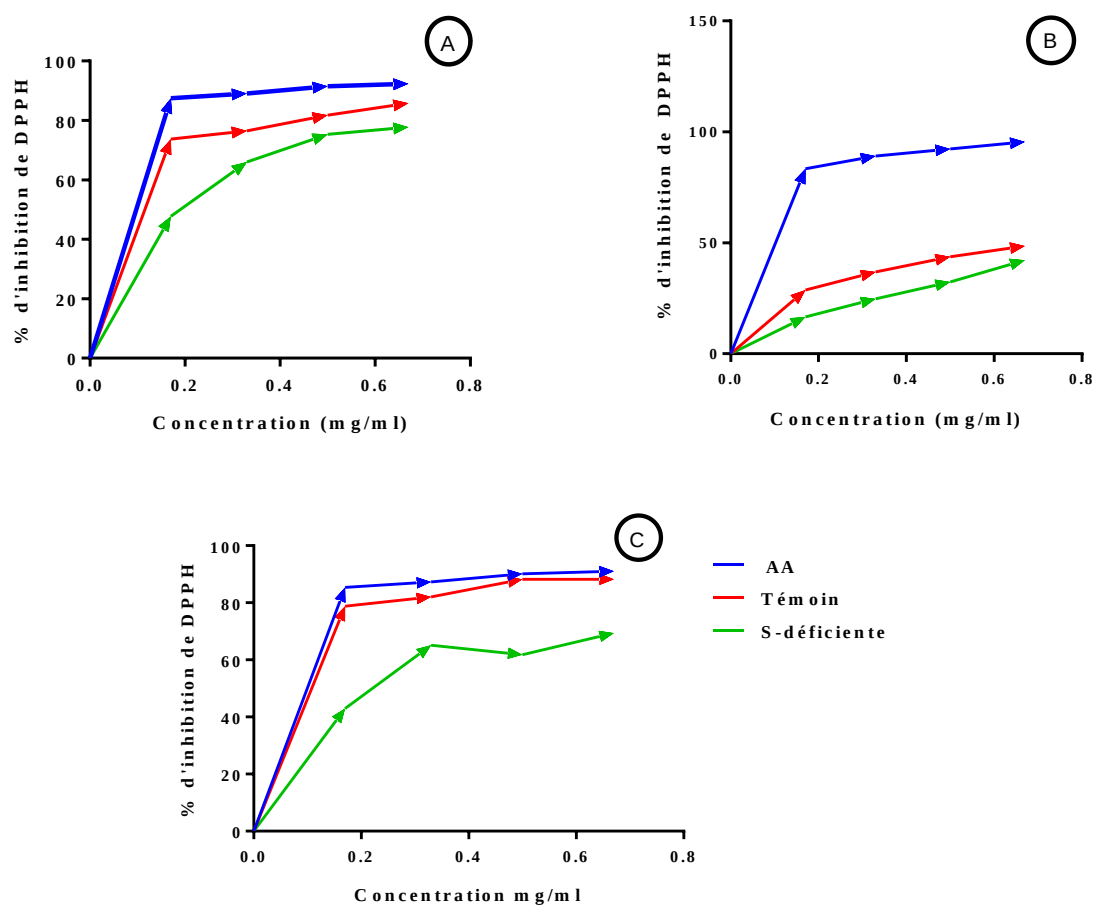


Figure 41 : Effet de la carence en soufre sur le pourcentage d'inhibition du radicale DPPH par l'extrait méthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum* (A) les graines de *Foeniculum vulgare* (B) et les feuilles d'*Eruca sativa* (C). AA : acide ascorbique, Témoin : Extrait témoin (1mM de S), S-déficient : Extrait déficient en soufre (0,05 mM de S).

2. Activité antioxydante total

La capacité antioxydante totale de l'extrait méthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum* à une concentration de 100µg/ml montre une valeur maximale de 228,72µg/ml, 57,5µg/ml et 80,33µg/ml équivalent d'acide ascorbique (EAA) respectivement pour *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*. La déficience en soufre entraine une baisse de l'activité antioxydante totale des extraits des trois plantes avec des pourcentages respectifs de 20%, 21% et 35% pour *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa* ($P < 0.0$) (fig. 42A, 42B et 42C).

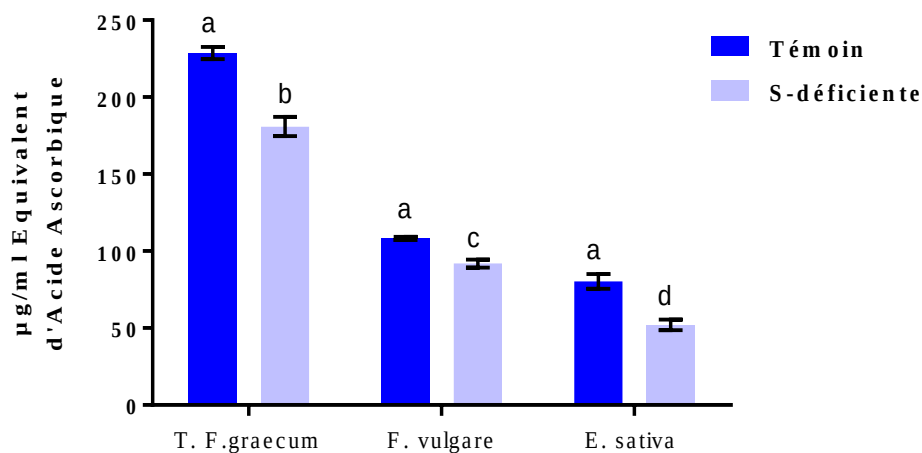


Figure 42 : Effet de la carence en soufre sur la capacité antioxydante totale des extraits méthanoliques des graines de *Trigonella foenum-graecum*, des graines de *Foeniculum vulgare* et des feuilles d'*Eruca sativa* en équivalent d'acide ascorbique. Témoin : Extrait témoin (1mM de S), S-déficiente : Extrait déficient en soufre (0.05mM de S).

3. Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits des graines des trois plantes montre que les deux extraits, témoin et S-déficient, présentent une activité antibactérienne contre les quatre souches étudiées.

Chez *Trigonella foenum-graecum*, pour l'extrait témoin, la concentration minimale inhibitrice (CMI) enregistrée est de 25mg/ml pour *Escherichia coli* et de 50 mg/ml pour *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, dans l'extrait S-déficient, la CMI a augmenté significativement; une concentration inhibitrice de 100mg /ml est requise pour *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* et 200 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* (Tableau 8).

Pour *Foeniculum vulgare*, la concentration minimale inhibitrice (CMI) enregistré dans le dans l'extrait des graines témoin est de 250mg/ml pour *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et de 300mg/ml pour *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* (Tableau 9). Cependant, dans l'extrait S-déficient, la CMI a augmenté significativement pour

Enterococcus faecalis, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* une concentration de 600mg/ml, cependant aucun changement n'a été enregistré dans la CMI pour *E. coli* (Tableau 9).

Concernant *Eruca sativa* (Tableau 10), dans l'extrait témoin, la concentration minimale inhibitrice (CMI) enregistrée est de 300mg/ml chez *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* ; alors que pour *Pseudomonas aeruginosa*, la CMI est de 600mg/ml. Pour l'extrait S-déficient, la CMI augmente jusqu'à 600mg/ml pour *Staphylococcus aureus* alors qu'elle est restée la même pour les autres trois souches (Tableau 10).

Tableau 8: Effet de la carence en soufre sur la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait méthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum*

Puits	Extract Conc. mg/ml	Extrait +S				Extrait -S			
		<i>E. coli</i>	<i>E. f</i>	<i>S.a</i>	<i>Ps</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. f</i>	<i>S.a</i>	<i>Ps</i>
1	400	-	-	-	-	-	-	-	-
2	200	-	-	-	-	-	-	-	-
3	100	-	-	-	-	-	-	+	-
4	50	-	-	-	-	+	+	+	+
5	25	-	+	+	+	+	+	+	+
6	12,5	+	+	+	+	+	+	+	+
7	6,25	+	+	+	+	+	+	+	+
8	3,125	+	+	+	+	+	+	+	+
9	1,5625	+	+	+	+	+	+	+	+
10	0,78125	+	+	+	+	+	+	+	+
11	0,390625	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Control [0]	+	+	+	+	+	+	+	+

+: présence de croissance; -: Absence de croissance; Conc. Concentration; +S extrait: extrait témoin (1mM de S); -S extrait: S-déficient (0.05mM de S), *E.coli* : *Escherichia coli* , *E.f*: *Enterococcus faecalis*; *S.a*: *Staphylococcus aureus*; *Ps*: *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 9: Effet de la carence en soufre sur la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait méthanolique des graines de *Foeniculum vulgare*.

puits	Extract Conc. mg/ml	+S Extract				-S Extract			
		<i>E. coli</i>	<i>S.a</i>	<i>E.f</i>	<i>Ps</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. a</i>	<i>E. f</i>	<i>Ps</i>
1	600	-	-	-	-	-	-	-	-
2	300	-	-	-	-	-	+	+	+
3	250	-	-	+	+	-	+	+	+
4	125	+	+	+	+	+	+	+	+
5	62,5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	31,25	+	+	+	+	+	+	+	+
7	15,625	+	+	+	+	+	+	+	+
8	7,8125	+	+	+	+	+	+	+	+
9	3,90625	+	+	+	+	+	+	+	+
10	1,953125	+	+	+	+	+	+	+	+
11	0,9765625	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Control [0]	+	+	+	+	+	+	+	+

+: présence de croissance; -: Absence de croissance; Conc. Concentration; +S extrait: extrait témoin (1mM de S); -S extrat: S-déficient (0.05mM de S), *E.coli* : *Escherichia coli* , *E.f*: *Enterococcus faecalis*; *S.a*: *Staphylococcus aureus*; *Ps*: *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 10: Effet de la carence en soufre sur la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait éthanolique des graines d'*Eruca sativa*

puits	Extract Conc. mg/ml	+S Extract				-S Extract			
		<i>E. coli</i>	<i>S.a</i>	<i>E.f</i>	<i>Ps</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. a</i>	<i>E. f</i>	<i>Ps</i>
1	600	-	-	-	-	-	-	-	-
2	300	-	-	-	+	-	+	-	+
3	250	+	+	+	+	+	+	+	+
4	125	+	+	+	+	+	+	+	+
5	62,5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	31,25	+	+	+	+	+	+	+	+
7	15,625	+	+	+	+	+	+	+	+
8	7,8125	+	+	+	+	+	+	+	+
9	3,90625	+	+	+	+	+	+	+	+
10	1,953125	+	+	+	+	+	+	+	+
11	0,9765625	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Control [0]	+	+	+	+	+	+	+	+

+: présence de croissance; -: Absence de croissance; Conc. Concentration; +S extrait: extrait témoin (1mM de S); -S extrat: S-déficient (0.05mM de S), *E.coli* : *Escherichia coli* , *E.f*: *Enterococcus faecalis*; *S.a*: *Staphylococcus aureus*; *Ps*: *Pseudomonas aeruginosa*.

Chapitre IV

Discussion Générale et Conclusion

I Discussion générale

Dans nos investigations, l'effet de la carence en soufre sur les trois espèces étudiées, *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*, a été évalué à travers l'étude de quatre aspects : i) La croissance en termes de rendement en biomasse ii) La morphologie à travers l'analyse des paramètres morphologiques iii) La composition biochimique par la quantification de certaines métabolites primaires et secondaires vi) et l'évaluation de la qualité médicinale des extraits des plantes étudiées.

Pour le diagnostic de l'état de déficience en S, nous nous sommes basés sur un diagnostic foliaire par la teneur en soufre total dans les feuilles. La quantification de la teneur en soufre total chez les plantes témoins a montré qu'*Eruca sativa* contient la teneur en S la plus élevée (13%) suivie de *Trigonella foenum-graecum* (0,15%) puis *Foeniculum vulgare* (0,1%). Ceci est associé essentiellement à la nature botanique de chaque plante. En tant que *Brassicaceae*, *Eruca sativa* exige plus de soufre pour son métabolisme et la synthèse des composés soufrés essentiels à sa croissance et son développement (Bennett *et al.*, 2002; Kim, *et al.*, 2004). *Trigonella foenum-graecum* qui appartient à la famille des *Fabaceae* est une légumineuse dont la présence du soufre est essentielle entre autres pour la fixation de l'azote (Scherer 2001, Scherer *et al.*, 2008).

Dans les conditions de culture et en réponse à un apport réduit en soufre, les concentrations de sulfates et du soufre total dans les feuilles des plantes S-déficientes diminuent de manière significative. Les teneurs des feuilles S-déficientes en soufre total sont de 0,05% et 0,04% respectivement chez *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare*. Ces valeurs sont inférieures à 0,12%. Ceci présente le niveau critique commun de la teneur en soufre dans les feuilles matures des plantes autres que les *Brassicaceae* (Haneklaus *et al.*, 2007). Pour les *Brassicaceae*, la valeur critique de la teneur en S au-dessous de laquelle la plante peut être considérée S-déficiente est de 0,75% (Haneklaus *et al.*, 2007). Ce qui est le cas pour *Eruca*

sativa ou la teneur en soufre total des feuilles des plantes S-déficientes est de 0,14%. Ce résultat montre clairement le statut de déficience en S chez les trois espèces étudiées soumises à une réduction de S dans le milieu de culture.

Le sulfate est souvent le premier métabolite dont la teneur change en réponse à la limitation de l'approvisionnement en soufre. En effet, il a été montré que son absorption et sa distribution aux différentes organes de la plante sont étroitement régulées (Thomas *et al.*, 2000). Dans notre étude, la réduction de l'apport en sulfate ($0,05 \text{ mol.m}^{-3}$) a montré une diminution de 50%, 55% et 52% dans les teneurs en sulfates des feuilles, respectivement chez *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Juszczuk *et al.* (2011) observés chez des plantes d'haricot, et ceux de Blake-Kalff *et al.* (1998) chez le colza soumis à la carence en soufre. Cette réduction de la concentration en SO_4^{2-} dans les feuilles pourrait s'expliquer par la libération des ions sulfates à partir des vacuoles de cellules mésophylliennes sous stress soufré prolongé, mais cette libération est supposée trop lente pour soutenir une nouvelle croissance des plantes (Clarkson *et al.*, 1983; Zhao *et al.*, 1999).

L'étude de la croissance des plantes cultivées dans un milieu pauvre en soufre a montré qu'en plus de l'effet négatif de la carence en soufre sur le rendement en biomasse et la morphologie, une différence dans les niveaux de la tolérance de la plante par la limitation en S entre les trois espèces a été enregistrée. En termes de rendement en biomasse de la plante entière, *Foeniculum vulgare* est l'espèce la moins affectée par la carence en soufre (-29%) suivie de *Trigonella foenum-graecum* (-32%), puis *Eruca sativa* étant l'espèce la plus influencée par la limitation en S (-83%). La réduction de la biomasse est à la fois enregistrée dans la partie aérienne et dans la partie racinaire. Toutefois, il faut signaler que la diminution la plus prononcée est enregistrée dans la partie aérienne des trois plantes S-déficientes par rapport à la matière sèche des racines. Cette réduction différentielle de la matière sèche dans les racines

et les feuilles des plantes S-déficientes a entraîné une augmentation du rapport partie racinaire / partie aérienne (R/S). Plusieurs autres travaux ont montré l'effet négatif de la déficience en S sur le développement global d'*Arabidopsis thaliana* (Kutz *et al.*, 2002, Akiko *et al.*, 2005), de *Medicago truncatula* (Casieri *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2015) et de *Trifolium repens* L (Varin *et al.*, 2010). Ce ralentissement dans le développement de la plante reflète principalement l'importance du soufre dans les processus biochimiques et métaboliques des plantes en générale. L'effet de la carence en soufre qui est plus prononcée dans la partie aérienne que dans les racines concorde avec l'hypothèse d'une allocation plus importante de métabolites attribués à la partie racinaire dans les conditions de carence en S (Sherer *et al.*, 2008, Gao *et al.*, 2015). Cette modification morphologique du rapport R/S a été également observée chez les plantes soumises à la carence en N, P ou Mg et pourrait être associée aux besoins de la plante à maintenir la capacité des racines à acquérir des nutriments minéraux (Kutz *et al.*, 2002, Lopez-Bucio *et al.*, 2003 ; Nikiforova *et al.*, 2003, Hermans *et al.*, 2006 Dan *et al.*, 2007). Juszczuk et Ostaszewska (2011) ont signalé que la diminution marquée des feuilles en termes de matières sèches en réponse à la carence en soufre pourrait s'expliquer par une diminution importante dans la production d'ATP dans les feuilles (-48%) que dans les racines (-20%). D'après ces auteurs, la faible disponibilité de l'énergie dans les tissus foliaires limiterait probablement la croissance des feuilles alors que dans les racines, la demande en énergie pour une croissance proche à celle du contrôle est suffisamment couverte. L'impact de la déficience en soufre sur la croissance racinaire ne constituerait pas une réponse systématique chez toutes les plantes soumises à une réduction de l'approvisionnement en S. Contrairement à nos résultats, aucun effet n'a été observé sur la biomasse racinaire chez les plantes de *Medicago truncatula* après une exposition à une carence en S pendant 18 jours (Gao *et al.* 2015), par contre un changement dans l'architecture des racines a été rapporté par Kutz *et al.* (2002) chez *Arabidopsis thaliana* où la proportion de la biomasse racinaire a

augmenté en réponse à la carence en S. En outre, chez cette dernière espèce, Dan *et al.*, (2007) ont rapporté la diminution de la croissance des racines latérales chez *Arabidopsis thaliana* suite à un déficit en S. Ces observations contrastées au niveau des racines des plantes soumises à une déficience en S restent néanmoins sans explication convaincante, mais il est essentiel de noter qu'un tel changement dans l'architecture racinaire et du rapport R/S résulterait sans aucun doute des changements dans l'expression de nombreux gènes et dans l'activité de certaines enzymes.

La morphologie des feuilles, site principale de la fixation du carbone et des échanges gazeux, influence directement la croissance de la plante entière et elle pourrait être liée aux conditions environnementales et à l'état nutritif des plantes. La surface foliaire constitue un facteur déterminant de l'interception de la lumière et de la productivité de la plante (Koester *et al.*, 2014). La relation entre la croissance foliaire et la croissance en masse dépend non seulement du taux de photosynthèse, mais aussi de la répartition du carbone entre les nouvelles feuilles, la masse foliaire, la masse racinaire et la respiration (Weraduwaga *et al.*, 2015). Dans notre travail, la carence en soufre a affecté significativement la morphologie des feuilles de *Trigonella foenum-graecum* et d'*Eruca sativa*. Les diminutions enregistrées dans la surface foliaire des deux espèces sont étroitement associées au déclin de la biomasse de la plante entière observée après l'exposition à une carence en S. La réduction de la surface foliaire est probablement due à une réduction de la division des cellules du mésophyle. Burke (1986) a rapporté que la carence en soufre chez le blé était accompagnée d'une diminution du nombre de cellules de mésophiles d'un facteur de 10.

Le poids foliaire massique (LWR) et la surface foliaire spécifique (SLA) ont également été affectés par la carence en soufre chez *Trigonella foenum-graecum* et *Eruca sativa*. SLA qui indique l'épaisseur des feuilles est liée à l'efficacité de l'acquisition des ressources; ceci étant supposé avoir un impact sérieux sur les fonctions de la feuille. En effet, la lumière absorbée

par les feuilles, la voie de diffusion du CO₂ à travers les tissus foliaires, la photosynthèse et le taux de croissance dépendent de l'épaisseur des feuilles (Syvertsen *et al.*, 1995, Nielsen *et al.*, 1996, Garnier *et al.*, 1999). Le poids de la feuille exprimé par unité de biomasse végétale (LWR) diminue également en réponse à une déficience en soufre minéral dans le milieu, ce qui entraîne une augmentation de la SLA et une réduction de l'épaisseur des feuilles. Ces résultats suggèrent qu' *Eruca sativa* et *Trigonella foenum-graecum* soumises à une carence en S changent de morphologie foliaire en diminuant le LWR et en réduisant l'épaisseur de la feuille afin de s'adapter aux fluctuations environnementales.

Cette inhibition de la croissance associée aux changements dans la morphologie des trois plantes étudiées est principalement associée au rôle crucial que joue le soufre dans la voie biochimique des plantes. Plusieurs études ont montré que les teneurs en protéines, en sucres, en acides aminés et en chlorophylle étaient déséquilibrées à cause du déficit en S, ce qui est indéniablement associé à une réduction générale de l'activité métabolique (Thomas *et al.* 2000, Nikiforova *et al.*, 2004, 2005, Juszczuk et Ostaszewska, 2011, Gao *et al.*, 2015). Dans nos investigations, des diminutions significatives de l'ordre de 59%, 30% et 68% ont été enregistrées dans la concentration totale en chlorophylle respectivement chez *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa* suite à la déficiences en S. Cette réduction a été observée à la fois dans les concentrations en chlorophylle *a* et en chlorophylle *b* et pourrait être associée à la diminution de la teneur de nombreux composés soufrés tels que la cystéine, la méthionine et le S-adénosylméthionine (SAM) (Prosser *et al.* 2001, Hoefgen et Nikiforova 2008). Le SAM est un dérivé de la méthionine qui intervient dans la voie de la synthèse de la chlorophylle en tant que donneur de groupement méthyle (Hoefgen et Nikiforova 2008, Varin *et al.*, 2010). Les deux acides aminés soufrés, la cystéine et la méthionine, jouent le rôle d'éléments structuraux et fonctionnels des protéines chloroplastiques (Droux, 2004 ; Juszczuk et Ostaszewska, 2011). Lunde *et al.* (2008) ont

rapporté que dans les plantes soumises à une carence en soufre, le taux de la *Rubisco* enregistre une diminution d'un facteur de 6 par rapport au témoin, la teneur en chlorophylle est réduite de 48%, l'efficacité du PSII est inférieure de 31% et la capacité du PSI à produire du NADP^+ diminue de 61%. Toutes ces observations en plus de la dégradation des chloroplastes en réponse à la carence en S (Juszczuk et Ostaszewska 2011) suggèrent une perturbation potentielle des réactions de la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques et de la fixation du CO_2 . Ceci pourrait expliquer la faible production de matière sèche et la diminution observée dans le développement des plantes et les teneurs en sucres solubles. En effet, la carence en soufre entraîne une chute dans les teneurs en sucres solubles de 56%, 48% et 61% respectivement chez *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*. Les diminutions dans les concentrations en sucres solubles suite à une nutrition pauvre en soufre ont été observées par Varechon (1971) chez des cultures d'arachide, Rendig *et al.* (1976) chez le maïs et Zuber *et al.* (2013) chez *Medicago truncatula*.

L'analyse de la composition minérale des feuilles et des racines des trois espèces étudiées a montré une augmentation dans les teneurs en calcium suite à la carence en soufre. Ce résultat concorde bien avec celui de Tewari *et al.* (2010) chez *Morus alba* et Gao *et al.* (2015) chez *Medicago Truncatula* cultivés dans des conditions de carence en soufre. Il est admis que Ca^{2+} joue un rôle crucial dans la détermination de la rigidité de la paroi cellulaire (Burstrom, 1968 ; Hepler 2005). Les faibles concentrations de calcium devraient donc rendre la paroi cellulaire plus souple et facilement rompue. Il a été prouvé que la modification de la concentration en Ca produisait un effet prononcé sur la croissance cellulaire. Ainsi, l'augmentation de la concentration en Ca conduit à une inhibition de la croissance des pousses ou des coléoptiles, tandis que la réduction de sa concentration favorise l'allongement cellulaire et tissulaire (Bennet-Clark, 1956). Ceci peut être une explication supplémentaire de la diminution du développement et de la croissance des plantes S-déficientes. Plusieurs autres travaux ont

montré une perturbation significative dans la composition minérale des plantes soumises à la déficiencence en soufre (Xu *et al.*, 1996 ; Gao *et al.*, 2015 ; Kassem *et al.*, 2015), et parallèlement à nos résultats, Kassem *et al.*, (2015) ont noté une augmentation dans la teneur en potassium chez des tomates soumises à la carence en soufre. Cependant, Gao *et al.*, (2015) ont montré une diminution dans le taux de K dans les cultures de *Medicago sativa* cultivées dans un milieu déficient en soufre alors que Gunes *et al.*, (2009) ont montré qu'il n'y avait pas de changement dans les concentrations de K dans les conditions de la carence en S, l'ensemble de ces résultats contradictoires de la réponse des ions K à la faible nutrition soufrée restent sans explication convaincante. D'un autre côté, et en concordance avec nos résultats, plusieurs études ont montré une accumulation de magnésium (Mg) dans les plantes dans des conditions de carence en soufre (Xu *et al.*, 1996, Zuchi *et al.*, 2009, Tewari *et al.*, 2010, Kassem *et al.*, 2015). L'antagonisme entre les ions Mg^{2+} et SO_4^{2-} est probablement la cause de cette accumulation (Kassem *et al.*, 2015).

L'analyse de la composition minérale des plantes étudiées a montré une accumulation dans les teneurs en molybdène dans les trois espèces. Il est largement connu que l'absorption et l'assimilation de sulfates sont contrôlées par le statut nutritionnel de la plante (Smith *et al.*, 1995, 1997; Buchner *et al.*, 2004) et que l'expression de certains transporteurs du sulfate est prononcée en cas de la déficiencence en soufre (Shinmachi *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été montré que les transporteurs à forte affinité responsables de l'absorption des ions sulfates du sol présentent une affinité pour le Mo. Ce dernier serait transporté et accumulé dans les tissus foliaires et racinaires des plantes en cas de carence en soufre (Leggett et Epstein, 1956; Smith *et al.*, 1995; Fitzpatrick *et al.*, 2008; Shinmachi *et al.*, 2010).

La privation en soufre engendre par ailleurs, une chute considérable dans les teneurs en acides aminés libres dans les feuilles et les racines des trois plantes étudiées. Thomas *et al.*, (2000) ont noté qu'une concentration inférieure à 70 μM en S dans le milieu de culture peut

causer une chute significative dans la teneur en acides aminés chez la Betterave à sucre. Cette diminution dans les teneurs en acides aminés peut être due spécifiquement à une chute dans la synthèse des acides aminés soufrés (Cysteine et Methionine) mais aussi des acides aminés non soufrés. En général, la carence en soufre engendre des modifications importantes dans l'activité des enzymes clés du métabolisme de l'azote, du soufre et du carbone (Zhao *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000; Nikiforova *et al.*, 2004 et 2005; Juszczuk et Ostaszewska 2011; Gao *et al.*, 2015). La synthèse des acides aminés étant tributaire de la disponibilité en squelettes carbonés produit lors de la photosynthèse, elle-même fortement inhibée par la déficience en soufre. La photosynthèse est un processus source d'énergie nécessaire à l'absorption et l'assimilation de l'azote minéral. Dans nos investigations, l'évaluation de l'effet de la carence en soufre sur l'activité nitratre réductase (NR) montre que : i) l'assimilation des ions nitrate se déroule principalement au niveau des racines chez *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare* alors que chez *Eruca sativa* cette réaction se déroule au niveau des feuilles et des racines ; ii) la carence en soufre affecte significativement l'activité NR des trois plantes étudiées, résultats similaires à ceux observés chez le Colza (Kopriva et Rennenberg 2004), l'épinard (Prosser *et al.*, 2001) et le tabac (Migge *et al.* 2000), cultivés dans un milieu pauvre en soufre. La diminution de l'activité NR sous la carence en soufre reflète le rôle primordial du S dans l'assimilation de l'azote (Scherer, 2001 ; Scherer *et al.*, 2008) sans négliger l'impact de la faible disponibilité des glucides solubles. Cheng *et al.* (1992) et Vincentz *et al.* (1993) ont rapporté que la transcription du gène NR est induite par les glucides dont la biodisponibilité est influencée par la déficience en soufre. D'autre part, il est admis que l'activité de la NR est positivement contrôlée par la photosynthèse (Foyer *et al.*, 1998).

La carence en soufre a également un effet sur la teneur en protéines solubles des plantes étudiées. Chez les trois espèces, la teneur en protéines ne varie pas de la même façon lors de

l'application d'une nutrition minérale limitée en soufre. Chez *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare*, la déficience en soufre cause une augmentation dans les concentrations en protéines dans les feuilles et les racines, alors que chez *Eruca sativa* les teneurs des feuilles en protéines diminuent considérablement. La diminution des teneurs en protéines semble être un résultat universel de la faible nutrition soufrée, il est bien connu que la majorité de l'azote organique des plantes se trouve sous forme d'acides aminés et de protéines. Lors de la carence en soufre, le métabolisme de l'azote diminue (prouvé dans notre étude par le déclin dans l'ANR) et donc le contenu en azote total de la plante diminue. Par exemple, il est divisé par deux dans l'ensemble des feuilles d'épinards cultivés sur un milieu dépourvu de soufre (Prosser *et al.*, 2001), et par conséquent la teneur en protéines diminue considérablement notamment dans les feuilles (Abdallah, 2010). La diminution du contenu protéique des plantes suite à la carence en soufre a été rapporté dans plusieurs travaux (Friedrich et Schrader, 1978 ; Nikiforova *et al.*, 2005 ; Lunde *et al.*, 2008 ; Juszczuk et Ostaszewska 2011 ; Carfagna *et al.*, 2016). Cependant il est difficile d'expliquer l'augmentation de la concentration en protéines observée chez *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare* avec les diminutions dans l'assimilation de l'azote et les réductions dans les teneurs en acides aminés observées chez les mêmes plantes suite à la déficience en soufre.

La quantification des Polyphénols totaux, des Flavonoïdes et des tanins condensés, des extraits méthanoliques des graines de *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare* et des feuilles d'*Eruca sativa* a montré que la carence en soufre affecte significativement la teneur phénolique des plantes S-déficientes. Ce résultat est en accord avec ceux rapportés par Brzozowska *et al.* (1973) et Vallejo *et al.* (2003) qui ont rapporté qu'un apport pauvre en soufre diminue la teneur en flavonoïdes des cultivars de brocoli et les teneurs en polyphénols et en particulier des flavonoïdes dans le Coton par rapport au contrôle fertilisé en soufre.

L'analyse qualitative de la composition flavonoïdes des graines de fenugrec et des feuilles de la roquette par HPLC/MS a montré des résultats qui corroborent ceux rapportés dans la littérature. Le profil phénolique des graines témoins de fenugrec montre la présence de quatre molécules de flavonoïdes, une flavonole et trois flavones. Ce résultat rejoint celui de Kite *et al.* (2011), Benayad *et al.* (2014) et Keskes *et al.* (2018) qui ont montré la présence des mêmes molécules dans les graines de *Trigonella foenum-graecum*. L'analyse des molécules de flavonoïdes dans les feuilles témoins de la roquette montre la présence de trois flavonoles précédemment identifiés chez *Eruca sativa* (Alruwaih *et al.*, 2017 ; Bell *et al.*, 2015 ; Bell *et al.*, 2014).

D'un autre côté, l'analyse qualitative par HPLC/MS de la composition des flavonoïdes des graines S-déficientes de *Trigonella foenum-graecum* a montré que la carence en S affecte significativement la composition flavonoïques. En effet, la limitation en soufre a causé la disparition de deux molécules de flavonoïdes du profil phénolique des graines de Fenugrec. Ceci explique la diminution des teneurs en polyphénols totaux et plus particulièrement des flavonoïdes dans l'extrait pauvre en soufre (-S) des graines de *Trigonella foenum-graecum*. Par contre, l'analyse qualitative par HPLC/MS de la fraction flavonoïques des feuilles d'*Eruca sativa* n'a pas montré de différence entre les feuilles des plantes témoins et les feuilles des plantes S-déficientes au niveau de la composition en flavonoïdes. Vu la diminution dans les teneurs en polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux analysés par spectrophotométrie dans les feuilles d'*Eruca sativa*, ce résultat peut être expliqué par une diminution dans la quantité en flavonoïdes synthétisé est non pas dans leur qualité, ou encore à des changements dans la composition des molécules phénoliques autres que les flavonoïdes.

Cette réduction en composés phénoliques, soit en termes de qualité ou de quantité, pourrait être associée à la diminution de la teneur en métabolites soufrés tels que la méthionine et la S-

adénosylméthionine (SAM) qui est un substrat clé pour de nombreuses enzymes comme la coenzyme A (Fontecave *et al.*, 2004 ; Roje, 2006). Le SAM est un donneur de groupement méthyle et source de groupements méthylène pour la synthèse des lipides, pectines, alcaloïdes, phytostérols, osmoprotecteurs, précurseurs de lignines, subérines, acides hydroxycinnamiques, flavonoïdes, stilbènes, divers composés volatils et aromatiques (Lewandowska et Sirko, 2008). De même, la biogenèse des polyphénols est associée au métabolisme des acides gras qui implique le coenzyme A (Brzozowska *et al.*, 1973). La méthionine participe à la formation de la S-adénosylméthionine, aux réactions de méthylation et à la production de composés phénoliques tels que la scopolétine, l'acide ferrique et de nombreuses anthocyanines (Brzozowska *et al.*, 1973).

Les diminutions des protéines, des sucres, des acides aminés et des teneurs en chlorophylle suite à la carence en soufre sont à l'origine des réductions dans les teneurs en composés phénoliques. Ces molécules étant des précurseurs de la biosynthèse des polyphénols (Zhao *et al.*, 1999 ; Thomas *et al.* 2000 ; Nikiforova *et al.*, 2004, 2005; Juszczuk et Ostaszewska, 2011 ; Gao *et al.*, 2015). La diminution de la teneur totale en flavonoïdes en cas de carence en soufre peut être également attribuée à une diminution dans la synthèse des flavonoïdes sulfatés et de leurs dérivés tels que l'apigénine, la lutéoline et le kaempférol clairement identifiés dans les graines de *Trigonella foenum-graecum* et de *Foeniculum vulgare* (Barron *et al.*, 1988 ; Parejo *et al.*, 2004 ; Benayad *et al.*, 2014).

Les changements dans la composition phénolique dans les extraits des trois plantes étudiées suite à une nutrition soufrée faible, a imposé une évaluation de la qualité de l'activité biologique des plantes. L'évaluation de l'activité antioxydante des quatre plantes montre une diminution dans l'activité antioxydante des extraits issus des plantes S-déficientes. Il est bien connu que la capacité antioxydante est associée à la présence de plusieurs composés phytochimiques biologiquement actives comme les composés phénoliques. Pak (2008) a

montré une corrélation significative entre le contenu en composés phénoliques de l'extrait des graines et leur capacité antioxydante. Par conséquent, une réduction dans les teneurs en composés phénoliques pourrait diminuer la capacité antioxydante des plantes étudiées. En parallèle avec l'effet de la déficience en S sur la capacité antioxydante, d'autres auteurs ont montré la relation entre la disponibilité des micronutriments et la capacité antioxydante des plantes. Huang *et al.* (2004) ont rapporté que la déficience en azote induit une forte diminution dans l'activité des enzymes antioxydante, conduisant à l'aggravation de la peroxydation des lipides membranaires dans les feuilles de riz. Evans et Halliwell (2001) ont rapporté que de nombreuses défenses antioxydantes dépendent des micronutriments et qu'une déficience dans certains éléments tels que Mg, Mn et Fe peut conduire à des réductions dans l'activité du système antioxydant de la plante.

L'effet négatif de la déficience en soufre sur la composition en molécules bioactives a été confirmé également par une diminution dans le pouvoir antibactérien des extraits chez les trois plantes. Étant donné que les polyphénols et les molécules flavonoïques sont biologiquement actifs contre les espèces pathogènes, cette réduction de l'activité antibactérienne peut être due à la réduction des composés phénoliques et particulièrement des flavonoïdes dans les graines de *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare* et les feuilles d'*Eruca sativa*.

II Conclusion générale et perspectives

Le but principal de ce travail est d'évaluer la réponse des plantes aromatiques et médicinales à une nutrition minérale limitée en soufre en prenant l'exemple de trois espèces médicinales cultivées : *Trigonella foenum-graecum*, *Foeniculum vulgare* et *Eruca sativa*. Lors de cette étude nous avons procédé, dans un premier temps, à un diagnostic foliaire de l'état de déficience des espèces étudiées en se basant sur la teneur en soufre totale dans le tissu foliaire comme paramètre de diagnostic, l'analyse des résultats a montré que la concentration de 0,05mM de soufre bascule les trois espèces dans un état de S-déficience. Dans un deuxième temps, nous avons mis l'accent sur la réponse morphologique des trois espèces cultivées dans des conditions de carence en soufre, l'analyse des résultats obtenus a montré que les plantes ayant reçu une alimentation pauvre en soufre (0,05mM) présentent des rendements en biomasse faibles par rapport aux plantes cultivées avec une nutrition adéquate en soufre (1mM). De plus, le calcul des paramètres morphologiques a mis en évidence l'effet négatif de la pauvre alimentation soufrée sur la répartition de la matière au sein de la plante, des modifications dans la morphologie des feuilles et dans l'architecture des racines ont été détectées chez les trois espèces étudiées, ces modifications morphologiques présentent une stratégie d'adaptation des plantes aux fluctuations environnementales.

Ensuite, nous nous sommes concentrés sur l'étude du métabolisme primaire des plantes étudiées en réponse à la déficience en soufre. Le dosage des pigments chlorophylliens a montré une diminution dans la synthèse de la chlorophylle reflétant des perturbations dans l'appareil photosynthétique chez les trois plantes. Les teneurs en sucres solubles ont également chuté suite à la faible alimentation soufrée, par contre, nous avons enregistré des accumulations dans les teneurs en protéines chez *Trigonella foenum-graecum* et *Foeniculum vulgare* ce qui paraît sans explication logique vu les diminutions enregistrées dans les teneurs en acides aminés et les diminutions détectées dans l'activité de la nitrate réductase.

Dans la troisième partie de cette étude nous avons fait ressortir l'effet de la carence en soufre sur la composition phénolique des graines de Fenugrec et Fenouil et les feuilles de la Roquette étant donné les parties communément utilisées pour leurs propriétés médicinales. Le dosage spectrophotométrique des composés phénoliques a révélé que la déficience en soufre cause des diminutions dans la teneur totale en polyphénols et plus particulièrement dans les teneurs en flavonoïdes totaux. L'analyse de la fraction flavonoïque des graines de *Trigonella foenum-graecum* et des feuilles d'*Eruca sativa* par HPLC/MS a montré que la déficience en soufre affecte la qualité des molécules flavonoïdes des graines de Fenugrec. Ces changements dans le profil phénolique des trois espèces ont été confirmés dans la dernière partie, où des baisses ont été enregistrées dans les activités antioxydantes et antibactériennes des extraits phénoliques issus des trois plantes étudiées.

L'ensemble de ces résultats obtenus a permis de mettre en évidence l'effet de la carence en soufre sur la physiologie, la phytochimie et la qualité thérapeutique des trois espèces étudiées et ils semblent être très prometteurs pour des éventuelles recherches plus approfondies.

En perspectives, il serait intéressant de :

- Effectuer une étude quantitative plus poussée des molécules flavonoïdes chez les trois espèces.
- Utiliser des techniques plus performantes pour identifier plus de molécules bioactives et évaluer l'effet de la déficience en soufre sur leurs synthèses et leur qualité médicinales.
- Étudier l'effet de la limitation en soufre sur la synthèse d'autres molécules à intérêt médicinaux.
- Élargir les études sur d'autres espèces aromatiques et médicinales à intérêt économique, en mettant l'accent sur l'impact de la déficience en S sur le chémotype des huiles essentielles. Il serait également intéressant de mener des études sur l'efficacité

d'utilisation du soufre afin de sélectionner des espèces végétales plus appropriées à des environnements pauvres en S.

Références bibliographiques

Abdallah M., Dubousset L., Meuriot M., Etienne P., Avice J.C. Ourry A. 2010. Effect of mineral sulfur availability on nitrogen and sulfur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *J. Exp. Bot.* 61(10): 2635-2646.

Abdallah M. 2010. Etudes de l'allocation et de la mobilisation du soufre (S) chez le colza d'hiver (*Brassica napus* L.) en situation d'oligotrophisation en S. Thèse de doctorat en Physiologie, Biologie des Organismes, Populations. Institut de biologie fondamentale et appliquée École Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé et Environnement. 249p.

Abdul-Ghani A.S., Amin R. 1988. The vascular action of aqueous extracts of *Foeniculum vulgare* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 24(2): 213-8.

Abeed A.L., Mashkor D.M. 2014. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Fenugreek Seeds Extract. *Int. J. Pharmac Phytochem. Res.* 6(4): 841-844.

Aggarwal B.B., Shishodia S. 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem.Pharmacol.* 71: 1397-1421.

Ahmad A., Abdin M.Z. 2000. Photosynthesis and its related physiological variables in the leaves of *Brassica* genotypes as influenced by sulphur fertilization. *Physiol. planta.* 110:144-149.

Ahmadi A., Nasiri N.F., Parivar K. 2007. Effect of aqueous extract of the aerial part of the *Ruta graveolens* on the spermatogenesis of immature Balb/C mice. *Razi. J. Med. Sci.* 14(56): 13-20.

Ait Youssef M. 2006. *Plantes médicinales de kabylie*, Ibis Press, Paris. p.349.

Akiko M.N., Yumiko N., Akiko W.T., Eri I., Tomoyuki Y., Hideki T. 2005. Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 42: 305-314.

Alhendawi R.A., Kirkby E.A., Pilbeam D.J. 2005. Evidence that sulfur deficiency enhances molybdenum transport in xylem sap of tomato plants. *J. Plant Nutr.* 28: 1347–1353.

Alqasoumi S., Blažević I., Al-Sohaibani M., Al-Howiriny T., Al-Yahya M., Rafatullah S. 2009. Rocket “*Eruca sativa*”: A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. *World J. Gastroenterol.* 15(16): 1958-1965.

Inal A., Günes A., Alpaslan M., Adak M.S., Taban S., Eraslan F. 2003. Diagnosis of Sulfur Deficiency and Effects of Sulfur on Yield and Yield Components of Wheat Grown in Central Anatolia, Turkey: *J. Plant Nutr.* 26 (7) 1483-1498.

Alruwaih N.A., Yaylayan V.A. 2017. Comparative evaluation of bioactive compounds in lyophilized and tray-dried rocket (*Eruca sativa*). *J. Food Process Preserv.* e13205.

Alruwaih N.A., Yaylayan V.A. 2016. Comparative evaluation of bioactive compounds in lyophilized and tray-dried rocket (*Eruca sativa*). *J. Food Process Preserv.* 41(5).

- Arnon D.I. 1949. Copper enzymes isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24(1): 1-15.
- Asimi O.A., Sahu N.P., Pal A.K. 2013. Antioxidant capacity of crude water and ethyl acetate extracts of some Indian spices and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*. *J. Med. Plant Res.* 7 (26): 1907–1915.
- Astolfi S., Zuchi S. 2013. Adequate S supply protects barley plants from adverse effects of salinity stress by increasing thiol contents. *Acta Physiol. Planta.* 35(1):175-181.
- Badgujar S.B. Patel V.V., Bandivdekar A.H. 2014. *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. *BioMed Research International*. Volume ID 842674: 32
- Badgujar S.B., Patel V.V., Bandivdekar A.H. 2014. *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *Bio. Med. Res. Int.* ID 842674: 32.
- Bahmani M., Rafieian-Kopaei M. 2014. Medicinal plants and secondary metabolites for leech control. *Asian. Pac. J. Trop. Dis.* 4:315-316.
- Bajilan S.I., Al-naqeeb A.A. 2011. Effect of the aqueous extract of rocket (*Eruca sativa*) leaves on the histological structure of some organs in male mice. 17 (90): 13-20.
- Balik J., Kulhanek M., ýerný J., Szakova J., Pavlikova D., ýermak P. 2009. Differences in soil sulfur fractions due to limitation of atmospheric deposition. *Plant Soil Environ.* 55 (8): 344–352.
- Baradaran A., Madihi Y., Merrikhi A., Rafieian-Kopaei M., Nasri H. 2013. Serum lipoprotein (a) in diabetic patients with various renal function not yet on dialysis. *Pak. J. Med. Sci.* 29: 354-357.
- Barber L., Joern B.C., Volenec J.J., Cunningham S.M. 1997. Supplemental nitrogen effects on alfalfa regrowth and nitrogen remobilization from roots. *Crop. Sci.* 36: 1217-1223.
- Bardsley C.E., Lancaster J.D. 1960. Determination of reserves sulphur and soluble sulfate in soil. *Proc. Soil Sciety Am. proc.* 24: 265-268.
- Barkai H., Elabed S., Guissi S., Ibensouda K.S. 2017. Evaluation of the antifungal activities of three essential oil components against *Penicillium expansum* spores. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9 (8): 56-59.
- Barros L., Carvalho A.M., Ferreira Isabel C.F.R. 2010. The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT - Food Science and Technology.* 43 :814–818.
- Bekkara F., Jay M., Viricel M.R, Rome S. 1998. Distribution of phenolic compounds withi seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant Soil.* 203: 27-36.
- Bell C.I, Clarkson D.T, John C.W. 1995. Partitioning and redistribution of sulphur during S stress in *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro. *J. Exp. Bot.* 46 (282): 73-81.

- Bell L., Oruna-Concha M.J., Wagstaff C. 2015. Identification and quantification of glucosinolate and flavonol compounds in rocket salad (*Eruca sativa*, *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*) by LC–MS: Highlighting the potential for improving nutritional value of rocket crops. *Food Chem.* 172:852–861.
- Bell L., Wagstaff C. 2014. Glucosinolates, Myrosinase Hydrolysis Products, and Flavonols Found in Rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J. Agric. food chem.* 62: 4481–4492
- Benayad Z., Gomez-Cordoves C., Es-Safi N.E. 2014. Identification and quantification of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) germinated seeds by LC-DAD-ESI/MS analysis. *J. Food Comp. Analy.* doi:10.1016/j.jfca.2014.04.002
- Bennet-Clark T.A. 1956. Salt accumulation and mode of action of auxin. A preliminary hypothesis. In *Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances*. Wain R.L., Wightman F. Eds. (London: Butterworths. pp. 284–291.
- Bennett R.N., Mellon F.A., Botting N.P., Eagles J., Rosa E.A.S., Williamson G. 2002. Identification of the major glucosinolate (4-mercaptobutyl glucosinolate) in leaves of *Eruca sativa* L. (salad rocket). *Phytochem.* 61: 25-30.
- Bennett R.N., Fred A.M., Nigel P.B., John E., Eduardo A.S.R., Gary W. 2002. Identification of the major glucosinolate (4-mercaptobutyl glucosinolate) in leaves of *Eruca sativa* L. (salad rocket). *Phytochem.* 61:25-30.
- Bennett R.N., Rosa E.A.S., Mellon F.A., Kroon P.A. 2006. Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids, and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (Salad Rocket), *Diplotaxis erucoides* (Wall Rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (Wild Rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish Rocket). *J. Agric. Food Chem.* 54(11): 4005-4015.
- Bergmann W. 1992. *Nutritional Disorders of Plants—Visual and Analytical Diagnosis*. Gustav Fischer Verlag: Jena. Stuttgart.
- Bhandari D.C., Chandel K.P.S. 1996. Status of rocket germplasm in India: research accomplishments and priorities. In: *Rocket: A Mediterranean crop for the world*. pp. 66-67.
- Bharose R., Chandra S., Thomas T., Dhan D. 2011. Effect of different levels of phosphorus and sulphur on yield and availability of N P K, protein and oil content in toria (*Brassica sp.*) VAR. *J. Agric. Biol. Sci.* 6(2):31–33.
- Bhatia K., Kaur M., Atif F., Ali M. Rehman H. 2006. Aqueous extract of *Trigonella foenum-graecum* L. ameliorates additive urotoxicity of buthionine sulfoximine and cyclophosphamide in mice. *Food Chem. Toxicol.* 44: 1744-1750.
- Blake-Kalff M.M.A., Harrison K.R., Hawkesford M.J., Zhao F.J., McGrath S.P. 1998. Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiol.* 118(4) : 1337–1344.
- Blake-Kalff M.M.A., Harrison K.R., Hawkesford M.J., Zhao F.J., McGrath S.P. 1998. Distribution of Sulfur within Oilseed Rape Leaves in Response to Sulfur Deficiency during Vegetative Growth. *Plant Physiol.* 118 (4): 1337-1344.

Blažević I., Mastelić J. 2008. Free and bound volatiles of rocket (*Eruca sativa* Mill.). *Flavour Fragr. J.* 2008; 23: 278–285.

Bozokalfa M.K., Esiyok D., Yagmur B. 2011. Use of multivariate analysis in mineral accumulation of rocket (*Eruca sativa*) accessions. *Genetika-Belgrade.* 43(3): 437–448.

Brennan R.F., Bolland M.D.A. 2008. Significant nitrogen by sulfur interactions occurred for canola grain production and oil concentration in grain on sandy soils in the Mediterranean-type climate of southwestern Australia. *J. Plant Nutr.* 31(7):1174–1187.

Brunold C. 1993. Regulatory interactions between sulfate and nitrate assimilation. In *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants: Regulatory, Agricultural and Environmental Aspects*. De Kok L.J., Stulen I., Rennenberg H., Brunold C., Rauser W. Eds. SPB Academic Publishing: The Hague, pp. 125–138.

Brunold C., Von Ballmoos P., Hesse, H., Fell D., Kopriva S. 2003. Interactions between sulfur, nitrogen and carbon metabolism. The plant sulfate transporter family. In *Specialized Functions and Integration with Whole Plant Nutrition*. Davidian J.C., Grill D., De Kok L.J., Stulen I., Hawkesford M.J., Schnug E., Rennenberg H., Eds. Backhuys Publishers: Leiden, pp. 45–46.

Brzozowska J., Hanower P., Tanguy J. 1973. Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochem.* 12 : 2353–2357.

Buchner P., Parmar S., Kriegel A., Carpentier M., Hawkesford M.J. 2010. The sulfate transporter family in wheat: Tissue-specific gene expression in relation to nutrition. *Mol. Plant.* 3(2):374–389.

Buchner P., Prosser I.M., Hawkesford M.J. 2004. Phylogeny and expression of paralogous and orthologous sulphate transporter genes in diploid and wheats hexaploid. *Genome.* 47:526–34.

Bukhari S.B., Bhanger M.I., Memon S. 2008. Antioxidative Activity of Extracts from Fenugreek Seeds (*Trigonella foenum-graecum*). *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 9(2):78–83.

Burke J.J., Holloway P., Dalling M.J. 1986. The effect of sulfur deficiency on the organisation and photosynthetic capability of wheat leaves. *J. Plant Physiol.* 125: 371–375.

Burström H.G. 1968. Calcium and plant growth. *Biol. Rev. Camb.* 43: 287–316.

Carfagna S., Bottone C., Cataletto P.R., Petriccione M., Pinto G., Salbitani G., Vona V., Pollio A., Ciniglia C. 2016. Impact of Sulfur Starvation in Autotrophic and Heterotrophic Cultures of the Extremophilic Microalga *Galdieria phlegrea* (Cyanidiophyceae). *Plant Cell Physiol.* 57(1): 1890–1898.

Carfagna S., Vona V., Di Martino V., Esposito S., Rigano C. 2011. Nitrogen assimilation and cysteine biosynthesis in barley: Evidence for root sulphur assimilation upon recovery from N deprivation. *Environ. Environ. Exp. Bot.* 71(1) :18–24.

Casieri L., Gallardo K., Wipf D. 2012. Transcriptional response of *Medicago truncatula* sulfate transporters to arbuscular mycorrhizal symbiosis with and without sulphur stress. *Planta.* 235:1431–1447.

- Cerda A., Martinez V., Caro M., Fernandez F.G. 1984. Effect of sulfur deficiency and excess on yield and sulfur accumulation in tomato plants. *J. Plant Nut.* 7:1529-1543.
- Cheng C.L., Acedo G.N., christinson M., Conkling M.A. 1992. Sucrose mimics the light induction of Arabidopsis nitrate reductase gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:1861-1864.
- Choi E.M., Hwang J.K. 2004. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia.* 75(6): 557-65.
- Chung L.Y. 2006. The antioxidant properties of garlic compounds: Ayl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *J. Med. Food.* 9(2):205–213.
- Clarkson D.T., Saker L.R., Purves J.V. 1989. Depression of nitrate and ammonium transport in Barley plants with diminished sulphate status: Evidence of co-regulation of nitrogen and sulphate intake. *J. Exp. Bot.* 40: 953-963.
- Clarkson D.T., Smith F.W., Vanden B.P.J. 1983. Regulation of sulfate transport in a tropical legume, *Macroptilium atropurpureum*, cv. Sirato. *J. Exp. Bot.* 34: 1463–1483.
- Cobbett C. Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:159-182.
- Cobbett C.S. 2000. Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123:825–33.
- Cram W.J. 1983. Sulphate accumulation is regulated at the tonoplast. *Plant Sci. Letters.* 31: 329-338.
- Curtis H., Noll U., Stormann J., Slusarenko A.J. 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65(2):11–11.
- Dan H., Yang G., Zheng Z.L. 2007. A negative regulatory role for auxin in sulphate deficiency response in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* 63: 221–235.
- Davidian J.C., Kopriva S. 2010. Regulation of sulfate uptake and assimilation-the same or not the same? *Mol Plant.* 3: 314-325.
- De Kok L.J. 1990. Sulfur metabolism in plants exposed to atmospheric sulfur. In *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants: Fundamental, Environmental and Agricultural Aspects*. Rennenberg H., Brunold C., De Kok L.J., Stulen, I. Eds. SPB Academic Publishing: The Hague, pp. 111–130.
- De Kok L.J., Castro A., Durenkamp M., Koralewska A., Posthumus F.S., Stuiver C.E., yang L., Stulen I. 2005. Pathways of plant sulfur uptake and metabolism: an overview. *Landbauforschung Völknerode, Special Issue.* 283: 5-13.
- De Kok L.J., Stuiver C.E.E., Westerman S., Stulen I. 2002. Elevated levels of hydrogen sulfide in the plant environment: nutrient or toxin. In *Air Pollution and Biotechnology in Plants*. Omasa K., Saji H., Youssefian S., Kondo N., Eds. Springer-Verlag: Tokyo, pp. 201–213.

Dharajiya D., Jasani H., Khatrani T., Kapuria M., Pachchigar K., Patel P. 2016. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) extracts, *Int J Pharm Pharm Sci.* 8 (4) :0975-1491.

Díaz-Maroto M.C., Díaz-Maroto H.I.J., Sánchez- Palomo E., Perez-Coello M.S. 2005. Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction. *J. Agric. Food Chem.* 53(13): 5385-9.

Dietz K.J. 1989. Leaf and chloroplast development in relation to nutrient availability. *J. Plant Physiol.* 134: 540-550.

Dijkshoorn W., van Wijk A.L. 1966. The Sulphur Requirements of Plants as Evidenced by the Sulphur-Nitrogen Ratio in the Organic Matter: A Review of Published Data. *Plant Soil.* 26: 129-157.

Droux M. 2004. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynth. Res.* 79: 331-348.

Dua Anita, Garg G, Mahajan R. 2013. Polyphenols, flavonoids and antimicrobial properties of methanolic extract of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). (2013). *Eur. J. Exp. Biol.* 3(4):203-208.

Dudev T., Lim C. 2004. Oxyanion selectivity in sulfate and molybdate transport proteins: an ab initio/CDM study. *J. Am. Chem. Soc.* 126 (33): 10296–10305.

Duško B.L., Comiæ L., Sukdolak S. 2006. Antibacterial activity of some plants from family Apiaceae in relation to selected phytopathogenic bacteria. *Kragujevac J. Sci.* 28: 65-72.

El Bardai SE, Lyoussi B, Wibo M, Morel N. Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrubium vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Hypertens.* 2001; 23(4): 329-43.

El Kassis E., Cathala N., Rouached H., Fourcroy P., Berthomieu P., Terry N., Davidian J.C. 2007. Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant Physiol.* 143:1231-1241.

ElAzzouzi F., Zidane L. 2015. La flore médicinale traditionnelle de la région de BéniMellal (Maroc). *J. Appl. Biosci.* 91:8493- 8502.

El-Soud N., El-Laithy N., El-Saeed G., Wahby M., Khalil M., Morsy F. 2011. Antidiabetic activities of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil in streptozotocin-induced diabetic rats. *Maced J Med Sci*; 4(2): 139-46.

Esquivel-Ferriño P.C., Favela-Hernández J.M.J., Garza-González E., Waksman N., Ríos M.Y., Camacho-Corona Md.R. 2012. Antimycobacterial activity of constituents from *Foeniculum vulgare* var. dulce grown in Mexico. *Molecules.* 17(7): 8471-82.

Etienne P., Sorin E., Maillard A., Gallardo K., Arkoun M., Guerrand J., Cruz F., Yvin J.C. Ourry A. 2018. Assessment of Sulfur Deficiency under Field Conditions by Single Measurements of Sulfur, Chloride and Phosphorus in Mature Leaves. *Plants.* 7:37.

- Evans P, Halliwell B. 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Brit. J. Nutr.* 85: S67-S74.
- Fennane M. 2004. Propositions de zones importantes pour les plantes au maroc (ZIP Maroc), Atelier national « Zones Importantes de plantes au Maroc » .Rabat
- Finck A. 1979. *Duenger und Duengung*. Verlag Chemie Weinheim, New York.
- Fitzpatrick K.L., Tyerman S.D, Kaise B.N. Molybdate transport through the plant sulfate transporter SHST1. *FEBS. Letters*, 2008, 582: 1508-1513.
- Fontecave M., Atta M., Mulliez E. 2004. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci.* 29: 243–249.
- Foyer C.H., Valadier M.H., Migge A., Becker T.W. 1998. Drought-Induced Effects on Nitrate Reductase Activity and mRNA and on the Coordination of Nitrogen and Carbon Metabolism in Maize Leaves. *Plant Physiol.* 117: 283–292.
- Freney J.R., Spencer K. Jones M.B. 1978. Determining the sulphur status of wheat. *Sulphur in Agriculture* 2: 2-5, 22.
- Friedrich J.W., Schrader L.E. 1978. Sulfur deprivation and nitrogen metabolism in maize seedlings.
- Gao Y., Li X., Tiana Q.Y., Wang B.L., Zhang W.H., 2015. Sulfur Deficiency had Different Effects on Medicago Truncatula Ecotypes A17 and R108 in Terms of Growth, Root Morphology and Nutrient Contents. *J. Plant Nutr.* 39: 301-314.
- Gao Y., Li X., Tiana Q.Y., Wang B.L., Zhang W.H. 2015. Sulfur deficiency had different effects on Medicago Truncatula ecotypes A17 and R108 in terms of growth, root morphology and nutrient contents. *J. Plant Nutr.* 39: 301–314.
- Garnier E., Salager J.L., Laurent G., Sonie L. 1999. Relationships between photosynthesis, nitrogen and leaf structure in 14 grass species and their dependence on the basis of expression. *New Phytol.* 143: 119–129.
- Geisler G. 1983. *Ertragsphysiologie*. Verlag Parey, Hamburg, Berlin.
- Ghedira K., Goetz P., Le Jeune R. 2010. Fenugrec: *Trigonella fænum-græcum* L. (Fabaceae ex. Leguminosae). *Phytothérapie.* 8 (3): 180–184.
- Gilbert S.M., Clarkson D.T., Cambridge M., Lambers H., Hawkesford M.J. 1997. SO₄²⁻ deprivation has an early effect on the content of rubulose-1 ,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. *Plant Physiol.* 115: 1231-1239.
- Giordano M., Pezzoni V., Hell R. 2000. Strategies for the allocation of resources under sulphur limitation in the green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 124: 857-864.
- Giovanelli J. 1990. Regulatory aspects of cysteine and methionine synthesis. In *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*. Fundamental, Environmental and

Agricultural Aspects. Rennenberg H., Brunold C., De Kok L.J., Stulen I. Eds. SPB Academic Publishing: The Hague, pp. 33–48.

Grandy A.S., Erich M.S., Porter G.A. 2000. Suitability of the anthrone-sulfuric acid reagent for determining water soluble carbohydrate in soil water extracts. *Soil Biol. Biochem.* 32: 725-727.

Grant C., Hawkesford M.J. 2015. Sulfur in Handbook of plant nutrition, second edition, CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton.

Granth C, Hawkesford M.J. 2015. Sulfur In Handbook of Plant Nutrition. Barker A.V., Pilbeam D.J. Eds. Second Edition. New York : CRC Press Taylor and Francis Group. p: 261-301.

Grieve M. 1931. A Modern Herbal: the Medicinal, Culinary, Cosmetic and Economic Properties, Cultivation and Folk-lore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs & Trees with their Modern Scientific Uses. Brace & Company, Harcourt.

Grill D., Tausz M., De Kok L.J. 2001. Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.

Gulfranz M., Sadiq A., Tariq H., Imran M., Qureshi R., Asyia Z., Phytochemical A. 2011. Antibacterial activity of *Eruca sativa* seed. *Pak. J. Bot.* 43(2): 1351-1359.

Gulfranz M., Sadiq A., Tariq H., Imran M., Qureshi R., Zeenat A. 2011. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Eruca sativa* seed. *Pak. J. Bot.* 43(2): 1351-1359.

Gunes A., Inal A., Pilbeam D.J., Kadioglu Y.K. 2009. Effect of sulfur on the yield and essential and nonessential element composition of alfalfa determined by polarized energy dispersive x-ray fluorescence. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 40: 2264- 2284.

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. Physic. Ind.* 49: 1057-1061.

Hagel I. 2005. Sulfur and baking-quality of bread making wheat. *Land Völk.* 283.

Haneklaus S., Bloem E., Schnug E., De Kok L.J., Stulen I. 2007. Sulfur In Handbook of Plant Nutrition. Barker A.V., Pilbeam D.J., Eds. CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, pp. 183-238.

Haneklaus S., Bloem E., Schnug E. 2003. The Global Sulphur Cycle and Its Links to Plant Environment. In *Sulphur in Plants*. Abrol Y.P., Ahmad A., Eds. Springer, Dordrecht. pp, 1-28.

Haneklaus S., Bloem E., Schnug E. 2008. History of sulfur deficiency in crops, In *Sulfur: A Missing Link between Soils, Crops, and Nutrition*. Jez.J., Eds. Madison. WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, pp. 45-58.

Haneklaus S., Bloem E., Schnug E., De Kok, L.J., Stulen I. 2007. Sulfur, In Handbook of plant nutrition, Barker A.V., Pilbeam D. J. Eds, New York: Taylor and Francis Group. pp. 183–238.

Haneklaus S., Murphy D.P.L., Nowak G., Schnug E. 1995. Effects of the timing of sulphur application on grain yield and yield components of wheat. J. Plant Nutr. Soil Sci. 158(1): 83–85.

Hannan J.M.A., Ali L., Rodeya B., Khaleque J., Alchter M., Flatt P.R., Abdel Wahab Y.H.A. 2006. Soluble dietary fibre fractions 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. Br. J. Nutr. 97: 514-521.

Haq K., Ali M. 2003. Biologically active sulphur compounds of plant origin. In Sulphur in Plants. Abrol Y.P., Ahmad A., Eds. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, pp. 375–386.

Hawkesford M.J. 2000. Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. J. Exp. Bot. 51 (342): 131-138.

Hawkesford M.J. 2003. Transporter gene families in plants: the sulfate transporter gene family – redundancy or specialization? Physiol. Plant. 117: 155-163.

Hawkesford M.J., De Kok L.J. 2006. Managing sulphur metabolism in plants. Plant Cell Environ. 29: 382-395.

Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M. 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chem. 105: 1126-1134.

Hceflcd (Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et à la lutte Contre la Désertification). 2008. Stratégie nationale de développement du secteur des plantes aromatiques et médicinales au maroc, juillet 2008.

Heimler D., Isolani L., Vignolini P., Tombelli S., Romani A. 2007. Polyphenol Content and Antioxidative Activity in Some Species of Freshly Consumed Salads. J. Agric. Food Chem. 55 (5): 1724-1729.

Helambe S.S., Dande R.P. 2012. Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.): an Overview. Int J. Curr. Pharm. Res. 2:169-187.

Hepler Peter K. 2005. Calcium: A Central Regulator of Plant Growth and Development. The Plant Cell. 17: 2142-2155.

Hermans C., Hammond J.P., White P.J., Verbruggen N. 2006. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? Trends Plant Sci. 11(12): 610–617.

Hesse H., Nikiforova V., Gakière B., Hoefgen R. 2004. Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: Integration of nitrogen and sulphur metabolism. J. Exp. Bot. 55(401):1283–1292.

Hirai M.Y., Fujiwara T., Awazuhara M., Kimura T., Noji M., Saito K. 2003. Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. Plant J. 33: 651–663.

- Hiscox, J. Israelstam D.G.F. 1949. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57: 1332-1334.
- Hoagland D.R., Arnon D.I. 1950. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. 2nd edition. California Agricultural Experiment Station Circular 347. College of Agriculture, University of California, Berkeley, CA. 32 pages.
- Hoefgen R., Nikiforova V.J. 2008. Metabolomics integrated with transcriptomics: Assessing systems response to sulfur deficiency stress. *Physiol Plant.* 132: 190–198.
- Hopkins L., Parmar S., Blaszczyk A., Hesse H., Hoefgen R., Hawkesford M.J. 2005. O-acetylserine and the regulation of expression of genes encoding components for sulfate uptake and assimilation in potato. *Plant Physiol.* 138: 433-440.
- Huang Z.A., Jiang D.A., Yang Y., Sun J.W., Jin S.H. 2004. Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica.* 42 (3): 357-364.
- Hussein Z.F. 2013. Study the effect of *Eruca sativa* leaves extract on male fertility in albino mice. *J. Al-Nahrain University.* 16(1):143-146.
- Iqbal S., Bhanger M.I., Farooq A. 2005. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chem.* 93: 265.
- Islam M., Mohsan S., Afzal S., Ali S., Akmal M., Khalid R. 2001. Phosphorus and sulfur application improves the chickpea productivity under rainfed conditions. *Int. J. Agric. Biol.* 13:713–718.
- Jafri S.M.H. 1973. Brassicaceae, In *Flora of Pakistan*. Nasir E., Ali S.I., Eds. Karachi, Pakistan: University of Karachi. 55: 127–148.
- Janzen H.H., Bettany J.R. 1984. Sulphur nutrition of rapeseed: influence of fertilizer nitrogen and sulphur ratio. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 8: 100-107.
- Jaworski E.G. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:1274-1279.
- Jones M.B., Oh J.H., Ruckman J.E. 1970. Effect of phosphorus and sulphur fertilization on the nutritive value of subterranean clover. *Proceedings N.Z. Archaeological Society.* 32: 69–75.
- Juszczuk I. M., Ostaszewska M. 2011. Respiratory activity, energy and redox status in sulphur-deficient bean plants. *Env. Exp. Bot.* 74, 245–254.
- Kaiser B.N., Gridley K.L., Brady J.N., Phillips T., Tyerman S.D. 2005. The role of molybdenum in agricultural plant production. *Ann. Bot.* 96:745–754.
- Karmoker J.L., Clarkson D.T., Saker L.R., Rooney J.M., Purves J.V. 1991. Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and the hydraulic conductivity of Barly (*Hordeum vulgare*) roots. *Planta.* 185: 269-278.

- Kasajima I., Ohkama-Ohtsu N., Ide Y., Hayashi H., Yoneyama T., Suzuki Y., Naito S., Fujiwara T. 2007. The BIG gene is involved in regulation of sulfur deficiency-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 129: 351–363.
- Kassem A.S., Mohammed H.F.A., EL-Sayed S.A.A. 2015. Influence of sulfur deprivation on biomass allocation, mineral composition and fruit quality of tomato plants. *Middle East J. Agric. Res.* 4: 42–48.
- Keskes H. Belhadj S. Jlail L. El Feki A. Sayadi S. 2018. Allouche N. LC–MS–MS and GC–MS analyses of biologically active extracts of Tunisian Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)Seeds.*J Food Meas Charact.*12 (1): 209–220.
- Khabbach A., Libiad M., Ennabili A., FLORA M. 2013; APICULTURE IN THE PRE-RIF OF THE PROVINCE OF TAZA (NORTH OF MOROCCO). *Luna Azul.* 36: 78-90
- Khalki L., BaM’hamed S., Bennis M. 2010. Evaluation of the developmental toxicity of the aqueous extract from *Trigonella foenum-graecum* (L.) in mice. *J. Ethnopharmacol.* 131(2): 321-325.
- Khanra R., Atanu C., Pal S.B., Ashutosh G. and Kalyan, S. 2010. Antimicrobial activity of ethanolic extract of *Trigonella foenum-graecum* Linn. *Int. Res.J. Pharmacy.* 1 (1): 181–183.
- Khoobchandani M., Ganesh N., Gabbanini S., Valgimigli L., Srivastava M.M. 2010. Phytochemical potential of *Eruca sativa* for inhibition of melanoma tumor growth.*Fitoterapia.* 82: 647–653.
- Kim S.J., Jin S., IshiiG. 2004. Isolation and structural elucidation of 4-(b-Dglucopyranosyldisulfanyl) butyl glucosinolate from leaves of rocket salad (*Eruca sativa* L.) and its antioxidative activity. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 68: 2444–2450.
- Kite G.C. Rowe E.R., Lewis G.P., Veitch N.C. 2011. Acylated flavonol tri- and tetraglycosides in the flavonoid metabolome of *Cladrastis kentukea* (Leguminosae). *Phytochem.* 72: 372–384.
- Klimont Z., Smith S.J., Cofala J. 2011. The last decade of global anthropogenic sulfur dioxide: 2000-2011 emissions. *Environ. Res. Lett.* 8:1.
- Koester R.P., Skoneczka J.A., Cary T.R., Diers B.W., Ainsworth E.A. 2014. Historical gains in soybean (*Glycine max* Merr.) seed yield are driven by linear increases in light interception, energy conversion, and partitioning efficiencies. *J. Exp. Bot.* 65(12): 3311–3321.
- Kooti W., Moradi M., Ali-Akbari S., Sharafi-Ahvazi N., Asadi-Samani M., Ashtary-Larky D. 2015. Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: a review. *J. Herb. Med. Pharmacol.* 4(1): 1-9.
- Kopriva A., Suter M., Opden-Camp C., Brunold C., Koprivova S. 2000.Regulation of sulphate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 737-746.
- Kopriva S., Koprivova A. 2004. Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *J. Exp. Bot.* 55: 1775-1783.

Kopriva S., Rennenberg H. 2004. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *J. Exp. Bot.* 55: 1831-1842.

Križman M., Baričević D., Prošek M. 2007. Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC–MS using a monolithic reversed-phase column. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis.* 43(2): 481-485.

Kutz A., Muller A., Hennig P., Kaiser W.M., Piotrowski M., Weiler E.W. 2002. A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 30: 95–106.

Lee B.R., Muneer S., Kim K.Y., Avice J.C., Ourry A., Kim T.H. 2013. S-deficiency responsive accumulation of amino acids is mainly due to hydrolysis of the previously synthesized proteins– not to de novo synthesis in *Brassica napus*. *Physiol. Plant* 147: 369-380.

Lee S., Korban S.S. 2002. Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (AtPCS1) by cadmium during early stages of plant development. *Planta.* 215(4):689–693.

Leggett J.E., Epstein E. 1956. Kinetics of Sulfate Absorption by Barley Roots. *Plant Physiol.* 31(3): 222–226.

Leustek T., Martin M.N., Bick J.A., Davies J.P. 2000. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 141-165.

Leustek T., Saito K. 1999. Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.* 120: 637-643.

Lewandowska M., Sirko A. 2008. Recent advances in understanding plant response to sulfur deficiency. *Acta Biochim. Pol.* 55: 457-471.

Lewis D.H. 1980. Are there interrelations between the metabolic role of boron, synthesis of phenolic phytoalexins and the germination of pollen? *New Phytol.* 84:261-270.

Lopez-Bucio J., Cruz-Ramirez A., Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280–287.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1): 265–275.

Lunde C., Zygadlo A., Simonsen H.T., Nielsen P.L., Blennow A., Haldrup A. 2008. Sulfur starvation in rice: The effect on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and oxidative stress protective pathways. *Physiol Plant.* 134, 508–521.

Maataoui B.S., Hmyene A., Hilati S. 2006. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de Barbarie (*Opuntia Ficus Indica*). *Liban. Sci. J.* 7(1): 3-7.

Madhava N.M., Shyamala B.N., Pura N.J., Sulochanamma G., Srinivas P. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *J. Food Sci. Technol.* 44: 451-456.

- Mahran G.H., Kadry H.A., Isaac Z.G., Thabet C.K., Alazizi M.M., Elolemy M.M. 1991. Investigation of diuretic drug plants 1. Phytochemical screening and pharmacological evaluation of *Anethum graveolens* L. *Apium graveolens* L. *Daucus carota* L. and *Eruca sativa* Mill. *Phytotherapy Res.* 5: 169–172.
- Maillard A., Sorin E., Etienne P., Diquélou S., Kopriva A., Kopriva S., Arkoun M., Gallardo K., Turner M., Cruz F., Yvin J.C., Ourry A. 2016. Non-specific root transport of nutrient gives access to an early nutritional indicator: The case of sulfate and molybdate. *Plos One*.11, e0166910.
- Manzocco L., Anese M., Nicoli M.C. 1998. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lebenson Wiss Technol.* 31 (7-8): 694-698.
- Marok A.S. Dev G. 1980. Phosphorus and sulphur inter-relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Indian Soc. Soil Sci.* 28(2):184–188.
- Marshner H. 2005. Mineral Nutrition of Higher Plants. Second edition. Elsevier Academic Press, London, UK.
- Martinez-Sanchez A., Marin A., Llorach R., Ferreres F., Gil M.I. 2006. Controlled atmosphere preserves quality and phytonutrients in wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*). *Postharvest Biol. Tec.* 40(1): 26–33.
- Maruyama-Nakashita A., Inoue E., Watanabe-Takahashi A., Yarnaya T., Takahashi H. 2003. Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiol.* 132: 597-605.
- Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Tohge T., Saito K., Takahashi H. 2006. *Arabidopsis* SLIM1 Is a Central Transcriptional Regulator of Plant Sulfur Response and Metabolism. *Plant Cell.* 18: 3235–3251.
- Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Watanabe-Takahashi A., Inoue E., Yamaya T., Takahashi H. 2005. Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 42: 305–314.
- Marwat S.K., Rehman F., Ali Khan A. 2016. Phytochemistry and Pharmacological Values of Rocket (*Eruca sativa* Miller) -- A Review. *Int. J. Horticul.* 6 (16).
- Marzouk M., Soliman A.M., Omar T.Y. 2013. Hypoglycemic and antioxidative effects of Fenugreek and termis seeds powder in streptozotocin-diabetic rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 17:559-56.
- Mastelić J. 2008. Free and bound volatiles of rocket (*Eruca sativa* Mill.). *Flavour Fragr. J.* 23(4): 278-285.
- Mathern J.R., Raatz S.K., Thomas W., Slavin J.L. 2009. Effect of fenugreek fiber on satiety, blood glucose and insulin response and energy intake in obese subjects. *Phytother. Res.* 23: 1543-1548.
- Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51(345): 659–668.

- May M.J., Vernoux T., Leaver C., Montagu M.V., Inze D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implication for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* 49, 649-667.
- Maynard D.G., Stewart J.W.B., Bettany J.R. 1983. Use of plant analysis to predict sulfur deficiency in rapeseed (*Brassica napus* and *B. campestris*). *Can. J. Soil Sci.* 63: 387-396.
- McGrath S.P., Zhao F.J. 1996. Sulphur uptake, yield responses and the interactions between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *J. Agric. Sci.* 126(1):53–62.
- Mehani M., Segni L. 2012. Antimicrobial effect of Essential oil of plant *Trigonella foenum-graecum* on some bacteria Patogens. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 69: 358-360.
- Mehrafarin A., Rezazadeh S., Naghdi B.H. 2011. A Review on Biology, Cultivation and Biotechnology of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a Valuable Medicinal Plant and Multipurpose. *J. Med. Plants.* 10: (37)6–24.
- Messiha N.K., Ahmed S.A., El-Rokiek K.G., Dawood M.G., El-Masry R.R. 2013. The physiological influence of allelochemicals in two Brassicaceae plant seeds on the growth and propagative capacity of *Cyperus rotundus* and *Zea mays* L. *World Appl. Sci. J.* 26(9): 1142-1149.
- Michael H.N., Shafik R.E., Rasmy G.E. 2011. Studies on the chemical constituents of fresh leaf of *Eruca sativa* extract and its biological activity as anticancer agent in vitro. *J. Med. Plants Resear.* 5(7): 1184-1191.
- Migge A.C., Bork R., Hell T., Becker H. 2000. Negative regulation of nitrate reductase gene expression by glutamine or asparagine accumulation in leaves of sulfur- deprived tobacco. *Planta.* 211: 587-595
- Miguel M.G., Cruz C., Faleiro L., Simões M., Figueiredo A.C., Barroso J.G. 2010. *Foeniculum vulgare* essential oils: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat. Prod. Commun.* 5(2): 319-28.
- Mimica-Dukić N., Kujundžić S., Soković M., Couladis M. 2003. Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother. Res.* 17:368-371.
- Misra S.M., Patil B.D. 1987. Effect of boron on seed yield in lucern (*Medicago sativa* L.). *J. Agron. Crop Sci.* 158:34–37.
- Miyazawa M., Maehara T., Kurose K. 2002. Composition of the essential oil from the leaves of *Eruca sativa*. *Flavour Fragr. J.* 17(3): 187-190.
- Morris R.J., Tisdale S.L., Platou J. 1984. The importance of sulphur in crop quality. *J. of Fertilizer.* 1(4): 139-145.
- Murphy M.D., Boggan J.M. 1988. Sulphur deficiency in herbage in Ireland. *Irish J. Ag. Food Res.* 2: 83-90.
- Na G. Salt D.E. 2011. The role of sulfur assimilation and sulfur-containing compounds in trace element homeostasis in plants. *Environ. Exp. Bot.* 72(1):18–25.

- Nasri H. 2013. Impact of diabetes mellitus on parathyroid hormone in hemodialysis patients. *J. Parathyroid Dis.* 1: 9-11.
- Nathiya S., Durga M., Devasena T. 2014. Therapeutic role of *Trigonella foenum-graecum* [Fenugreek] – A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 27(2): 74-80.
- Nielsen S.L., Enriquez S., Duarte C.M., Sand-jensent K. 1996. Scaling maximum growth rates across photosynthetic organism. *Funct. Ecol.* 10: 167–175.
- Nikiforova V., Freitag J., Kempa S., Adamik M., Hesse H., Hoefgen R. 2003. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: Interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J.* 33: 633–650.
- Nikiforova V.J., Daub C.O., Hesse H., Willmitze L., Hoefgen R. 2005. Integrative gene-metabolite network with implemented causality deciphers informational fluxes of sulphur stress response. *J. Exp. Bot.* 56(417): 1887–1896.
- Nikiforova V.J., Gakiere B., Kempa S., Adamik M., Willmitzer L., Hesse H., Hoefgen R. 2004. Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism. *J. Exp. Bot.* 55: 1861-1870.
- Noji M., Saito K. 2003. Sulfur amino acids: biosynthesis of cysteine and methionine, In *Sulphur in Plants*. Abrol Y.P., Ahmad A. Eds. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, pp. 135–144.
- Oden S. 1968. Acidification of air and precipitation and its consequences on the natural environment. Sweden.
- Oktay M., Gülçin İ., Küfrevioğlu Ö.İ. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Sci. Technol.* 36(2): 263-71.
- Olaiya C.O., Soetan K.O.A. 2014. Review of the Health Benefits Of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): Nutritional, Biochemical and Pharmaceutical Perspectives. *American J. of Social Issues and Humanities*. Special issue.
- Ordonñez A.A.L., Gomez J.D., Vattuone M.A., Isla M.I. 2006. Antioxidant activities of *Sechiumedule* (Jacq), Swartz extracts. *Food Chem.* 97(3): 452-458.
- Oulmouden F., Ghalim N., El Morhit M., Benomar H., Daoudi E.M. 2014. Amrani S. Hypolipidemic and Anti-Atherogenic effect of methanol extract of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) in hypercholesterolemic mice. *Int. J. Sci. Knowl.* 3(1): 42-52.
- Oulmouden F., Saïle R., Gnaoui N., Benomar H., Lkhider M., Amrani S. 2011. Hypolipidemic and anti-atherogenic effect of aqueous extract of fennel (*Foeniculum Vulgare*) extract in an experimental model of atherosclerosis induced by triton WR-1339. *Eur. J. Sci. Res.* 52(1): 91-9.
- Pak J. 2008. Antioxidative activity of extracts from fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*). *Anal. Environ. Chem.* 9: 78-83.

- Pandey H., Awasthi P. 2013. Effect of processing techniques on nutritional composition and antioxidant activity of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed flour. *J. Food Sci. Technol.* 52(2) :1054–1060.
- Parejo I., Jauregui O., Sánchez-Rabaneda F., Viladomat F., Bastida J., Codina C. 2004. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 52(12): 3679-87.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Schmeda-Hirschmann G., Burillo J., Codina C. 2004. Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) waste. *J. Agric. Food. Chem.* 52(7): 1890-7.
- Parthasarathy V.A., Chempakam B., Zachariah T.J. 2008. *Chemistry of spices*, Cabi international, Oxfordshire (UK).
- Pasini F., Verardo V., Caboni M.F., D'Antuono L.F. 2012. Determination of glucosinolates and phenolic compounds in rocket salad by HPLC-DAD–MS: Evaluation of *Eruca sativa* Mill. and *Diplotaxis tenuifolia* L. genetic resources. *Food Chem.* 133: 1025–1033.
- Petropoulos G.A. 2002. *Fenugreek: The genus Trigonella*, Taylor & Francis, New York.
- Popovici C., saykova I., Tylkowski B. 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *e-Revue de génie industriel*, Vol 4, 25-39.
- Prieto P., Pineda M., Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269: 337-341
- Prosser I.M., Purves J.V., Saker L.R., Clarkson D.T. 2001. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *J. Exp. Bot.* 52: 113-121.
- Raffo A., Nicoli S., Leclercq C. 2011. Quantification of estragole in fennel herbal teas: Implications on the assessment of dietary exposure to estragole. *Food Chem. Toxicol.* 49(2): 370-375.
- Rahimi R., Ardekani M.R.S. 2013. Medicinal properties of *Foeniculum vulgare* Mill. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy. *Chin. J. Integr. Med.* 19(1): 73-9.
- Raju J., Dhananjay G., Araga R. R., Pramod K. Y., Najma Z. B. 2001. *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed powder improves glucose homeostasis in alloxan diabetic rat tissues by reversing the altered glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzymes. *Mol. Cell. Biochem.* 224(1–2): 45–51.
- Rani I., Akhund S., Suhail M., Abro H. 2010. Antimicrobial potential of seed extract of *Eruca sativa*, *Pak J. Bot.* 42(4): 2949-2953.
- Rashmi Y., Rahul K. 2011. Study of phytochemical constituents and pharmacological actions of *Trigonella foenum-graecum*: A Review. *Int. J. Pharm. Technol.* 3:1022-1028.

- Rasmussen P.E., Ramig R.E., Ekin L.G., Rhode C.R. 1977. Tissue analysis guidelines for diagnosing sulfur deficiency in white wheat. *Plant and Soil* 46: 153-163.
- Rather M.A., Dar B.A., Sofi S.N., Bhat B.A., Qurishi M.A. 2012. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arab J Chem.* 9 (2): S1574-S1583.
- Rausch T., Wachter A. 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci.* 10: 503-509.
- Rausser W.E. 1995. Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol.* 109:1141-49.
- Rausser W.E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell.Biochem.Biophys.* 31:19-48.
- Redovniković I.R., Glivetić T.D., Vorkapić-Furač J. 2008. Glucosinolates and their potential role in plant. *Period. Biol.* 110(4):297-309.
- Rendig V.V., Oputa C., McCOMB E.A. 1976. Effects of sulfur deficiency on Non-protein nitrogen, soluble sugars, and n/s ratios in young corn (*zea mays* l.) *Plants.Plant Soil.* 44: 423-437.
- Reuveny Z., Dougall D.K., Trinity P.M. 1980. Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 6670-6672.
- Ribereau-gayon P., stonestree T.E. 1966. Dosage des tanins du vin rouge et determination de leur structure *Chim. Analyt.* 48 (4): 188-196.
- Riga E., Pierce F., Collins H.P. 2006. Performance of arugula (*Eruca sativa*) as a green manure and trap crop for fungal pathogens and parasitic nematode suppression in potato, *Amer. Phytopathological Soc.* 96-97.
- Roje S. 2006. S-Adenosyl-l-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry.* 67: 1686-1698.
- Rosen H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Bioph.* 67:10-15.
- Ross J.V. Koppel A. 2000. Estimation of leaf area and its vertical distribution during growth period. *Agric. For. Meteorol.* 101: 237-246.
- Saito K. 2000. Regulation of sulphate transport and synthesis of sulfur containing amino acids. *Curr Opin Plant Biol.* 3: 188-195
- Saito K. 2004. Sulfur Assimilatory Metabolism. The Long and Smelling Road. *Plant Physiol.* 136: 2443-2450.
- Marwat S.K., Fazal R., Asghar A.K. 2016. Phytochemistry and Pharmacological Values of Rocket (*Eruca sativa* Miller) -- A Review. *Int. J. Hort.* 6 (16).

Sarwar A.M., Kaur G., Jabbar Z., Javed K., Athar M. 2007. *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. Food Chem. Toxicol. 45(6): 910-920.

Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 45(4): 287-306.

Schat H., Llugany M., Vooijs R., Hartley-Whitaker J., Bleeker P.M. 2002. The role of phytochelatin in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. J. Exp. Bot. 53(379):2381–2392.

Scherer H.W. 2001. Sulphur in crop production. Eur. J. Agron. 14: 81-111.

Scherer H.W., Pacyna S.R., Spoth K., Schulz M. 2008. Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N₂ fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. Biol. Fertil. Soils. 44:909–916.

Schnug E. 1997. Significance of sulphur for the quality of domesticated plants, In Sulphur Metabolism in Higher Plants: Molecular, Ecophysiological and Nutritional Aspects. Cram W.J., De Kok L.J., Brunold C., Rennenberg H. Eds. Backhuys Publishers: Leiden, pp. 109–130.

Schnug E., Haneklaus S. 1994. Sulphur deficiency in *Brassica napus*—biochemistry, symptomatology, morphogenesis. Landbauforschung Völkenrode. 144.

Shabbeer S., Michelle S., Ravi K.A., Sushant K., Manuel H., Antonio J., Nancy D., Michael A.C., Saeed R. Khan. 2009. Fenugreek A naturally occurring edible spice as an anticancer agent. Cancer Biol. Ther. 3: 272-278.

Shamkant B.B., Vainav V.P., Atmaram H.B. 2014. *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. Bio. Med. Res. Int. ID 842674: 32.

Sharma R.D., Raghuram T.C., Dayasagar R.V. 1991. Hypolipidaemic effect of fenugreek seeds. A clinical study. Phytother Res. 3:145-147.

Sharma R.D., Sarkar A., Hazra D.K., Misra B., Singh J.B., Maheshwari B.B., Sharma S.K. 1996. Toxicological evaluation of fenugreek seeds: a long term feeding experiment in diabetic patients. Phytother. Res. 10:519-520.

Sharma R.D., Sarkar A., Hazra D.K. 1996. Hypolipidaemic effect of fenugreek seeds: a chronic study in non-insulin dependent diabetic patients. Phytother. Res. 10:332- 334.

Shinmachi F., Buchner P., Stroud J.L., Parmar S., Zhao F.J., McGrath S.P., Hawkesford M.J. 2010. Influence of Sulfur Deficiency on the Expression of Specific Sulfate Transporters and the Distribution of Sulfur, Selenium, and Molybdenum in Wheat. Plant Physiol. 153: 327–336.

Shirzad H., Taji F., Rafieian-Kopaei M. 2011. Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice. J. Med. Food. 14:969-974.

- Smith F.W., Dolby G.R. 1977. Derivation of diagnostic indices for assessing the sulphur status of *Panicum Maximum* Var. *Trichoglume*. Commun. in Soil Sci. Plant Anal. 8:221-240.
- Smith F.W., Ealing P.M., Hawkesford M.J., Clarkson T. 1995. Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 9373–9377.
- Smith F.W., Hawkesford M.J., Ealing P.M., Clarkson D.T., Van den Berg P.J., Belcher A.R., Warrilow A.G.S. 1997. Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. Plant J. 12: 875–884.
- Snehata H.S., Payal. D.R. 2012. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): An Overview. Int. J. Curr. Pharm. Res. 2: 0976-822.
- Soliman M.F., Kostandi S.F., Van Beusichem M.L. 1992. Influence of sulfur and nitrogen fertilizer on the uptake of iron, manganese, and zinc by corn plants grown in calcareous soil. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 23(11–12):1289-1300.
- Sorin E., Etienne P., Maillard A., Zamarreno A.M., Garcia-Mina J.M., Arkoun M., Jamois F., Cruz F., Yvin J.C., Ourry A. 2015. Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: Identification of a new early indicator. J. Exp. Bot. 66: 6175–6189.
- Spencer K., Freney J.R. 1980. Assessing the sulfur status of field-grown wheat by plant analysis. Agron. J. 72: 469-472.
- Spencer K., Freney J., Jones M. 1984. A preliminary testing of plant analysis procedures for the assessment of the sulfur status of oilseed rape. Aust. J. Agric. Res. 35(2):163-175.
- Spencer K., Freney J.R. 1980. Assessing the sulfur status of field-grown wheat by plant analysis. Agron. J. 72: 469-472.
- Srichamroen A., Thomson A.B.R., Field C.J., Basu T.K. 2008. In vitro intestinal glucose uptake is inhibited by galactomannan from Canadian fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum* L) in genetically lean and obese rats. Nutr. Res. 29: 49-54.
- Stewart B.A., Porter L.K. 1969. Nitrogen-sulfur relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.), corn (*Zea mays*) and beans (*Phaseolus vulgaris*). Agron. J. 61: 267-271.
- Stewart B.A. 1969. N:S Ratios. A guideline to sulphur needs. The Sulphur Institute J. 5: 12-15.
- Stolt J.P., Sneller F.E.C., Bryngelsson T., Lundborg T., Schat H. 2003. Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. Environ. Exp. Bot. 49(1):21–28.
- Stuiver C.E.E., De Kok L.J., Westermann S. 1997. Sulfur deficiency in *Brassica oleracea* L.: development, biochemical characterization, and sulfur/nitrogen interactions. Russian J. Plant Physiol. 44, 505–513.
- Sur P., Das M., Gomes A., Vedasiromoni J.R. Sahu N.P. 2001. *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent. Phytother. Res. 15: 257-259.

Sushruta K., Satyanarayana S., Srinivas S., Sekhar J.R. 2007. Evaluation of the blood-glucose reducing effects of aqueous extracts of the selected umbelliferous fruits used in culinary practices. *Trop. J. Pharm. Res.* 5(2): 613-7.

Syers J.K., Skinner R.J. Curtin D. 1987. Soil and fertilizer sulphur in U.K. agriculture. *The Fertiliser Soc.* 264, 1-43.

Syvertsen J.P., Lloyd J., Meconchie C., Kriedbmann P.E., Garquhar G.D. 1995. On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant Cell Env.* 18: 149–157.

Tabatabai M.A. 1986. Sulfur in Agriculture. American Society of Agronomy: Madison, Wisconsin.

Takahashi H., Watanabe-Takahashi A., Smith F.W., Blacke-Kalff M.M., Hawkesford M.J., Saito K. 2000. The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 23: 171-182.

Takahashi H., Yammazayi M., Sasakura N., Watanabe A., Leustek T. De Almeida Engler J., Engler G, Van Montagu M., Saito K . 1997. Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 11102-11107.

Terry N., Zayed A.M., de Souza M.P. Tarun A.S. 2000. Selenium in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 401–432.

Tewari R.K., Kumar P., Sharma P.N. 2010. Morphology and oxidative physiology of sulfur-deficient mulberry plants. *Env. Exp. Bot.* 68: 301–308.

Thomas S.G., Bilsborrow P.E., Hocking T.J., Bennett J. 2000. Effect of sulphur deficiency on the growth and metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris* cv. Druid). *J. Sci. Food Agric.* 80: 2057–2062.

Tian J., Chen Y.X., Ma B.X., He J.S., Tong J., Wang Y.W. 2014. *Drosera peltata* Smith var. *lunata* (Buch.-Ham.) C. B. Clarke as a feasible source of plumbagin: phytochemical analysis and antifungal activity assay. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30(2): 737–745.

Uğur A., Süntar I., Aslan S., Orhan I.E., Kartal M., Şekeroğlu N., Esiyok D., Sener B. 2010. Variations in fatty acid compositions of the seed oil of *Eruca sativa* Mill. Caused by different sowing periods and nitrogen forms, *Pharmacogn. Mag.* 6(24): 305-308.

Vallejo F., Tomas-Barberan F., Garcia-Viguera A.C. 2003. Effect of climatic and sulphur fertilisation conditions, on phenolic compounds and vitamin C, in the inflorescences of eight broccoli cultivars. *Eur. Food Res. Technol.* 216:395-40.

Varechon C. 1971. Influence de la carence en soufre sur l'évolution des glucides chez l'arachide, de la germination à la floraison. *Rev. Gén. Bot.* 78 : 297-328.

Varin S., Cliquet J.B., Personeni E., Avise J.C., Lemauiel- Lavenant S. (2010). How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.)? *J. Exp. Bot.* 61: 225–234.

- Vidmar J.J., Tagmount A., Cathala N., Touraine B., Davidian J.C. 2000. Cloning and characterization of a root specific high-affinity sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 475: 65-69.
- Vincentz M., Moureaux T., Leydecker M.T., Vaucheret H., Caboche M. 1993. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana glauca* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.* 3:315-324.
- Weiping H., Baokang H. 2011. A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. *J. Med. Plant Res.* 5(16): 3595-3600.
- Weraduwa S.M., Chen J., Anozie F.C., Morales A., Weise E., Sharkey T.D. 2015. The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 6 : 167.
- WHO (World Health Organization). 2007. Monographs on selected medicinal plants, Vol 3, WHO Press, Geneva.
- Wichtl M., Anton R. 2003. *Plantes thérapeutiques : Traditions, pratique officinale, science et thérapeutique*. 2e Éditions Tech & Doc - médicales internationales, Paris 208, p, 2003
- Wink M. 1999. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In *Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology*, Wink M., Eds. CRC Press: Boca Raton, USA, *Ann. Plant Rev.* Vol. 3.
- Wirtz M., Droux M., Hell R. 2004. O-acetylserine (thiol) lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 55 :1785-1798.
- Xu H.L., Lopez J., Rachidi F., Tremblay N., Gauthier L., Desjardins Y., Gosselin A. 1996. Effect of sulphate on photosynthesis in greenhouse-grown tomato plants. *Physiol. Plant.* 96: 722–726.
- Yaniv Z. 1996. Traditions uses and research in Israel, In: *Rocket: a Mediterranean crop for the world*, pp.76.
- Yaniv Z., Schafferman D., Amar Z. 1998. Tradition, uses and biodiversity of rocket (*Eruca sativa*, *Brassicaceae*) in Israel. *Econ. Bot.* 52: 394–400.
- Yoshida S. 2003. Molecular regulation of leaf senescence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 79-84.
- Yoshida S., Chaudry M.R. 1979. Sulfur nutrition of rice. *Soil Sci. Plant Nutr.* 25: 121–134.
- Yoshimoto N., Inoue E., Watanabe-Takahashi A., Saito K., Takahashi H. 2007. Posttranscriptional regulation of high-affinity sulfate transporters in *Arabidopsis* by sulfur nutrition. *Plant Physiol.* 145: 378-388.
- Zenk M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants—a review. *Gene* .179:21–30.
- Zeven A.C., de Wet J.M.J. 1982. *Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. 107.

Zhao F., McGrath S.P., Crosland A.R. 1994. Comparison of three wet digestion methods for the determination of plant sulphur by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICPAES). *Soil Sci. Plant Anal.* 25(3-4):407-418.

Zhao F.J., Bilsborrow P.F., Evans E.J., McGrath S.P. 1997. Nitrogen to Sulphur Ratio in Rapeseed and in Rapeseed Protein and Its Use in Diagnosing Sulphur Deficiency. *J. Plant Nutr.* 20: 549-558.

Zhao F.J., Hawkesford M.J., McGrath S.P. 1999. Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *J. Cereal Sci.* 30(1):1-17.

Zhao F.J., McGrath S.P., Hawkesford M.J. 2001. Sulphur nutrition and the sulphur cycle. Institute of Arable Crops Research Report 2000-2001, 36-39.

Zhao F.J., Wood A.P., McGrath S.P. 1999. Effects of sulphur nutrition on growth and nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil*. 212: 207–217.

Zrira S. 2011. Les Plantes Aromatiques et Médicinales du Maghreb. 30 èmes Journées Internationales Huiles Essentielles et Extraits & Congrès PAM 6, 7 and 8 septembre 2011. DIGNE Les BAINS.

Zrira S. Neffati M. 2010. Le Marché des Plantes Aromatiques et Médicinales au Maroc. France Agri. Mer.-Centre d'Etude et de Développement Durable Euroméditerranéen (CEDDEM).

Zuber H., Poignavent G., Le Signor C., Aimé D., Vieren E., Tadla C., Lugan R., Belghazi M., Labas V., Santoni A.L., Wipf D.J., Buitink J., Avice C., Salon C., Gallardo K. 2016. Legume adaptation to sulfur deficiency revealed by comparing nutrient allocation and seed traits in *Medicago truncatula*. *The Plant J.* 76: 982-996.

Zuchi S., Cesco S., Varanini Z., Pinton R., Astolfi S. 2009. Sulphur deprivation limits Fe-deficiency responses in tomato plants. *Planta*. 230: 85.