

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie (SNV)

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

THEME

**Etude de l'activité antioxydante des anthocyanes des graines de
Vigna mungo L.**

Présenté par :

M^{lle}. DJAMAAI Oumelkheir

M^{lle}. KOUIDRI Zineb

Devant le jury :

M. CHAIBI Rachid

M. SIFI Ibrahim

M. GOUZI Hicham

M. LEBOUKH Mourad

Professeur

MCA

Professeur

MCA

Université de Laghouat

Université de Laghouat

Université de Laghouat

Université de Laghouat

Président

Examineur

Rapporteur

Co-Rapporteur

Soutenu publiquement : 21Juin 2022.



DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents qui ont été amés cotes dans les moments difficile, ainsi que chaque un instant de bonheur qu'ils m'ont procure.

A mes belles-sœurs Amon beau-frère que j'ai vit avec aux toute ma

Joie ma tristesse.

A toute la famille : **Djamaai et Mahfodi**

A mes collègues : **Zineb**

A mes très chères amies : **Soumia, Imene, kheira, Nora, Senia, Rima, Naoual, Fatima, Karima**

Et tous les camarades sans exception.

A tous les professeurs et les messieurs dans chaque stade en ma éducative



119225441

Oumelkheir...



DEDICACES

En guise de reconnaissance, je dédie ce travail à

Mes chers parents qui n'ont pas cessé de m'encourager durant toutes mes années d'études

Ma cher sœur **Sara**

Mes beaux-frères

A tous les membres de la famille **Kouidri** et **Rachdi**

A binôme **Oumelkheir** pour sa patience avec moi et à sa famille

A mes amis : **Kheira, Senia, Soumia, Imene, Saida, Nora**



1192225441

ZINEB...

REMERCIEMENTS

Nous remercions le bon Dieu qui m'a donné la patience et la force qui m'ont aidé à préparer ce travail.

Nous tenons à remercier sincèrement Monsieur **GOUZI Hicham**, pour avoir dirigé ce travail, pour ses précieux conseils et son orientation qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas été mené au bon port. Nous voulons vraiment vous remercier car nous avons eu beaucoup de chance de vous avoir comme encadreur de notre mémoire.

Nous remercions également notre Co-Rapporteur, Monsieur **LEBOUKH Mourad** pour sa disponibilité et son encouragement.

Nos sincères remerciements vont également aux membres de jury Messieurs **CHAIBI Rachid** et **SIFI Ibrahim** qui ont accepté de présider et d'examiner ce travail.

Nous n'oublions pas de remercier les ingénieurs du laboratoire du département de biologie pour leurs aides.

Enfin nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Résumé

Dans ce travail l'activité antioxydante des graines de *Vigna mungo* a été étudiée en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. Un rendement d'extraction d'environ 1.55% a été obtenu par macération à froid pendant 24h. Les analyses quantitatives montrent que la teneur de l'extrait méthanolique des graine de *Vigna mungo* en polyphénols et en anthocyanes sont respectivement, $47,42 \pm 1,21$ (EAG mg /g_{RS}) et $5,87 \pm 0,54$ (EAG mg /g_{RS}).

La mesure de l'activité antioxydante et du pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et la méthode de phosphomolybdate d'ammonium montre respectivement qu'il possède une activité antioxydante considérable avec des valeurs IC₅₀ de 0,37mg/mL et 0,53 mg/mL.

L'analyse du spectre d'absorption UV-visible de l'extrait méthanolique aux pH acide, montre l'existence de deux pics qui correspondent à la cyanidin 3-O-rutinoside et à la pelargonidin 3-O-rutinoside (λ_{max} 540 nm à pH =1 ; λ_{max} 525nm à pH=3).

La graine de *Vigna mungo* L. est considérée donc être considéré comme une source naturelle prometteuse d'anthocyanes comme antioxydants d'intérêt biotechnologique.

Mot clés : *Vigna mungo*, extrait méthanolique ; anthocyanes, pouvoir antioxydant.

ABSTRACT

In this work, the antioxidant activity of *Vigna mungo* seeds was studied using methanol as extraction solvent. An extraction yield of about 1.55% was obtained by cold maceration for 24h. Quantitative analyses show that the content of polyphenols and anthocyanins in the methanolic extract of *Vigna mungo* seeds are 47.42 ± 1.21 (EAG mg /gRS) and 5.87 ± 0.54 (EAG mg /gRS) respectively.

Measurement of antioxidant activity and reducing power of methnolic extract by DPPH liber radical scavenging method and ammonium phosphomolybdate method shows that it has considerable antioxidant activity with IC₅₀ values of 0.37mg/mL and 0.53 mg/mL respectively.

The analysis of the UV-visible absorption spectrum of the methnolic extract at acidic pHs, shows the existence of two peaks which correspond to cyanidin 3-O-rutinoside and pelargonidin 3-O-rutinoside (λ_{max} 540 nm at pH =1; λ_{max} 525nm at pH=3).

The seed of *Vigna mungo* L. is therefore considered as a promising natural source of anthocyanins as antioxidants of biotechnological interest.

Key word: *Vigna mungo*, methanolic extract; anthocyanins, antioxidant power.

ملخص

في هذا العمل تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة لبذور فينا مونغو باستخدام الميثانول كمذيب استخلاص. تم الحصول على محصول استخلاص يبلغ حوالي 1.55٪ بالنقع البارد لمدة 24 ساعة. تظهر التحليلات الكمية أن محتوى المستخلص الميثانولي لبذور فينا مونغو في البوليفينول و الأنثوسيانين على التوالي 1.21 ± 47.42 (EAG mg / gRS) و ± 5.87 0.54 (EAG mg / gRS).

يُظهر قياس نشاط مضادات الأكسدة وتقليل قوة مستخلص الميثانول بواسطة طريقة المسح الجذري DPPH وطريقة فوسفوموليبيدات الأمونيوم على التوالي أن له نشاطًا كبيرًا مضادًا للأكسدة بـ IC_{50} 0 و 37 مجم / مل و 0.53 مجم / مل. يُظهر تحليل طيف الامتصاص المرئي للأشعة فوق البنفسجية للمستخلص الميثانولي عند الأس الهيدروجيني الحمضي وجود دروتين تتوافقان مع السياندين 3-O-rutinoside و pelargonidin 3-O-rutinoside (λ_{max} 540 نانومتر عند درجة الحموضة = 1 ؛ 525 نانومتر عند درجة الحموضة = 3).

لذلك تعتبر بذور فينا مونغو . مصدرًا طبيعيًا واعدًا لأنثوسيانين كمضادات أكسدة ذات أهمية في مجال التكنولوجيا الحيوية. **الكلمات الرئيسية:** فينا مونغو ، مستخلص الميثانول ؛ الأنثوسيانين ، مضادات الأكسدة .

LISTE DES ABREVIATIONS

ATP	: adénosine trie phosphate
BHA	: buthyl hydroxy anisol
BHT	: buthyl hydroxy toluène
ϵ	: coefficient molaire d'extinction
FD	: facteur de dilution
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	: équivalent acide gallique
EC50	: concentration effective à 50 %
ED	: l'eau distillé
ERE	: espèce réactive d'oxygène
FAD	: flavine adénine dinucléotide
GSH	: glutathionne
HCL	: acide chlorhydrique
KCL	: chlorure de potassium
LDL	: Low-density lipoprotein
MeOH	: méthanol
M	: masse moléculaire
NADH	: nicotinamide adénine dinucléotide
O₂•	: anion superoxyde
pH	: potentiel hydrogène
SOD	: superoxyde dismutase
TCP	: Teneur en composés phénoliques
UV	: Ultra-Violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1: la répartition géographique de <i>Vigna mungo</i> L	4
Figure 2: les feuille et gousses de <i>Vigna mungo</i> (original ; 02/04/2022).....	4
Figure 3: les fleurs de <i>Vigna mungo</i> L(Benladj, 2017).....	5
Figure 4: les graines de <i>Vigna mungo</i> L(Benladj,2017)	5
Figure 5 : Structure de cation flavium la base des anthocyane (Chem Draw).....	12
Figure 6: mécanisme d'oxydation des polyphénols oxydase(Chem Draw)	14
Figure 7: shéma de la biosynthèse des anthocyanes (Zagadou, 2016).....	16
Figure 8: déséquilibre de la blance entre pro-oxydants et antioxydants (Achat, 2013).....	20
Figure 9: origine des espèces réactives de l'oxygène (Camille.Met.,2011)	21
Figure 10: origine extracellulaire et intracellulaire des espèces réactives (Hamma et al.,2015)	21
Figure 11: la chaine respiratoire mitochondrial (Camille, 2018).....	22
Figure 12: origine déférents radicaux libres(favier,2003).....	24
Figure 13: les familles antioxydants naturelles	29
Figure 14: (a) les graines de <i>Vigna mungo</i> ; (b) la poudre obtenu après le broyage des graines (original , 14/02/2022).....	28
Figure 15: les étape de protocole expérimental (original,14;15/02/2022)	29
Figure 16: courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux ...	30
Figure 17: principe de test du DPPH (Mannallah, 2012).....	32
Figure 18: le résultat de dosage d'anthocyane du différent pH	35
Figure 19 : Les résultats après 30min d'incubation de test DPPH	36
Figure 20 : Courbes représentants la variation du pourcentage de la réduction de DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique et de l'extrait des graines de <i>Vigna mungo</i>	36
Figure 21: résultat après 90min d'incubation de phosphomolybdate	38
Figure 22: courbes représenta variation du pourcentage de réduction de phosphomolybdate en fonction de la concentration de l'extrait de <i>Vigna mungo</i> (A) et la concentration (B).....	38
Figure 23: le résultat obtenu à différent pH	39
Figure 24: spectre UV-Vis des anthocyanestotaux de l'extrait de vigna mungo en (a) pH=1 et (b) pH=3	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : propriétés physique de <i>Vigna mungo</i>	7
Tableau 2 : composition chimique des graines de <i>Vigna mungo</i> par 100g de partie comestible (Haytowitz et Matthews, 1986).....	8
Tableau 3 : les facteurs antinutritionnels dans les graines de <i>Vigna mungo</i> sec et mures (Shweta et al., 2017).....	9
Tableau 4: structure et couleur des six principaux anthocyanidines en fonction de la substitution sur l'ion flavylium (Beye et al., 2015).....	12
Tableau 5: principales sources alimentaires d'anthocyanes (Sahraoui, 2015).....	15
Tableau 6: la teneur en anthocyanes de quelques fruits et légumes (Attoumi et al., 2006)	15
Tableau 7: Rôle protecteur des anthocyanes dans la santé humaine (Nguyen, 2018).....	18
Tableau 8: les teneurs en polyphénols totaux et en anthocyanes de l'extrait méthanolique des graines de <i>Vigna mungo</i> L.....	34
Tableau 9: Les valeurs d'EC ₅₀ des activités antioxydantes de l'extrait méthanolique des graines de <i>Vigna mungo</i> L et l'acide ascorbique obtenues par les tests DPPH, phosphomolybdate	37

TABLE DES MATIERES

RESUME	I
liste des abreviations.....	IV
LISTE DES FIGURES.....	V
LISTE DES TABLEAUX	VI
INTRODUCTION :	1
Chapitre I : Généralité sur Vigna mungo L.	3
1. Définition :	3
2. Nom de Vigna mungo L :	3
3. Taxonomie	3
4. Origine et répartition géographique :	3
5. Description :	4
6. Condition de cultures :	6
7. Cycle végétale :	6
8. Les principaux phénomènes au cours de germination des graines de Vigna mungo :	6
8.1 Dégradation des sucres :	6
8.2 La réduction de taux de composés phénoliques totaux	7
9. propriétés physiques de <i>Vigna mungo</i> :	7
10. composition chimique de <i>Vigna mungo</i> :	8
10.1 Facteur nutritionnels :	8
10.2 Facteur antinutritionnels :	9
11. l'utilisation de <i>Vigna mungo</i> :	9
➤ En cuisine indienne :	9
➤ En notre cousine de Timimoune :	9
➤ En alimentation des animaux :	9
➤ Autre usage :	10
12. L'intérêt de <i>vigna mungo</i> :	10
12.1 Intérêt agronomique :	10
12.2 Intérêt biologique :	10
Chapitre II: Les anthocyanes	13
1. Définition :	14
2. Répartition et localisation dans la plante :	14
3. Structure de l'anthocyane :	14
4. Propriétés des anthocyanes :	15
5. Les facteurs influent la stabilité d'anthocyane :	16
6. Sources et teneurs d'anthocyanes :	18
7. Biosynthèses des anthocyanes.....	18

8. Absorption et biodisponibilité :.....	19
9. Utilisation des anthocyanes	17
9.1. Chez l'homme	17
9.2. Chez les plantes :	19
9.3. Dans l'industrie :	19
Chapitre III : Les antioxydants	20
1- Le stress oxydant :	24
1.1- Définition :	24
1.2- Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) :	24
1.3- L'origine de stress oxydatif :	25
2. Les radicaux libres :	27
2.1- Les types des radicaux libres :	27
3. Activité antioxydants :	28
3.1- Définition :	28
3.2- Les antioxydants endogènes ou cellulaires :	29
3.3- Les antioxydants exogènes :	26
3.4- Les antioxydants synthétiques :	27
Matériel et méthode	28
1. Matériel :	28
1.1 Matériel biologique :	28
2- Méthodes	28
2.1. Préparation de l'extrait méthanolique (selon M. Gouzi)	28
2.2- Calculé de rendement :	28
3. Dosage des composés phénoliques et anthocyanes	29
3.1 Dosage des polyphénols totaux	29
3.2- Dosage les anthocyanes :	30
5. Evaluation de l'activité antioxydant	31
5.1-Méthode de piégeage du radical libre DPPH	37
5.2- Méthode au phosphomolybdate pour l'activité antioxydante :	33
6-Spectre d'absorption UV- visible d'anthocyanine de <i>Vigna mungo</i>	38
Résultat et discussion	34
1. Rendement d'extraction :	340
2. Dosage de composés phénoliques et des anthocyanes	34
3. Evaluation des activités antioxydant :	35
3.1 Teste du radical DPPH :	35
3. 2-dosage de phosphomolybdate (la capacité antioxydant totale) :	37
4. Spectre d'absorption UV- visible d'anthocyanine de <i>Vigna mungo</i> :	39
Conclusion et perspectives	41

Référence bibliographiques	42
---	-----------

INTRODUCTION

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille botanique des Fabacées, qui représente la troisième famille de plante par le nombre d'espèces (**Schneider et al., 2015**), ils sont largement cultivées dans le monde et considérées comme un groupe très important d'aliments végétale, en tant que source de protéines bon marché lorsque les protéines animales sont rares.

L'homme cultive les légumes secs depuis l'aube de l'agriculture, c'est l'une des premières plantes dans le monde à avoir été domestiquée. Les légumes secs sont des graines comestibles déshydratées de ces légumineuses qui produisent entre un et douze grains de différentes tailles, formes et couleurs au sein d'un même groupe. Leurs graines peuvent être utilisées pour la consommation humaine ou comme aliments pour animaux. Ces plantes riches d'un point de vue nutritif sont non seulement saines mais également bonnes pour la terre. Elles peuvent pousser dans des sols arides nécessitant très peu d'eau, concentrée aux premiers stades de croissance. Elles ont la capacité de fixer l'azote un processus naturel qui a été et continue d'être important pour l'enrichissement des sols (**FAO, 2016**).

La population humaine dépend des légumineuses jouent un rôle crucial dans une alimentation saine et équilibrée, dans la production alimentaire durable et avant tout dans la sécurité alimentaire (**FAO, 2016**).

Les graines de légumineuses sont d'excellentes sources de nutriments essentiels comme les protéines, les glucides complexes, les minéraux et les vitamines (**Kaprielou et al., 2020**).

Vigna mungo L est également connu sous le nom de purée de haricots qui appartient à la famille des légumineuses. L'Inde est le principal producteur et consommateur de gramme noir avec une production de 1.82 millions de tonnes par an. Le gramme noir est cultivé non seulement en Inde, mais aussi dans d'autres pays asiatiques et certaines parties de l'Afrique. Il a été démontré que la teneur en lipides du *Vigna mungo* réduisait le cholestérol chez les humains. Les propriétés fonctionnelles affectent directement ou indirectement les applications de traitement et la qualité des aliments. Il est également rapporté que les légumineuses contiennent certains composés phytochimiques comme les polyphénols. Les flavonoïdes, les phytostérols qui procurent divers bienfaits pour la santé (**Arockianathan et al., 2019**).

Tous les travaux qui ont été réalisé sur l'activité antioxydante d'une graine de *Vigna mungo* est confirmé l'intérêt biologique de cette graine. L'objectif principal de ce travail c'est tout d'abord estimer les teneurs en composés phénoliques et en anthocyane de l'extrait méthanolique des graines de *Vigna mungo*. Ensuite, le pouvoir antioxydant et antiradicalaire de l'extrait méthanolique ont été évalué à l'aide de deux tests, le test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) et le phosphomolybdate d'ammonium. Enfin, la caractérisation des anthocyanes par balayage spectrale UV-visible en milieu acide.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralité sur *Vigna mungo* L.

1. Définition :

Haricot mungo c'est une graine de la famille des Fabaceae. Ces petites graines ovales de couleur noir sont principalement cette légumineuse cultivées aujourd'hui en Inde, en Chine et en Asie du sud-Est mais sont largement consommée sous leur forme germée communément. (Pedro J et al., 2016)

2. Nom de Vigna mungo L :

- Synonymes : phaeolus mungo L.
- Noms vernaculaires :
 - ✓ Haricot urd, urd, gramme noir (en français). (PROTA)
 - ✓ Black gram, urdbean, urad bean (en anglais) (PROTA)
 - ✓ Tadallaght تدلاغت (en région de Timimoune).

3. Taxonomie :

Régne : végétal

Embranchement : spermaphytes

Sous- embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Fabales

Super famille : léguminosea.

Famille : Fabaceae

Sous-famille : Faseolese

Tribu : Faseolease

Sous- Tribu : phaseolinea

Genre : *Vigna*

Espèce : *Vigna mungo*. (Rémy.S 1994).

4. Origine et répartition géographique :

Indes c'est le pays d'origine des graines de *Vigna mungo*, ce dernier a été très probablement Domestique en inde de son ancêtre sauvage que l'on trouve également au Bangladesh.

(PROTA).A partir de inde, elle est répandue dans de nombreux pays comme africains ;

européens et autre. (jansen.2006). En Afrique il est cultivé au Gabon, en R.D du Congo, au

Kenya, en Ouganda, en Tanzanie, au Malawi, au Mozambique, en Afrique du sud, à

Madagascar et à l'île Maurice. Il est Cultivé surtout comme plante fourragère aux Etats-Unis et en Australie. (Jansen2006 ; PROTA).

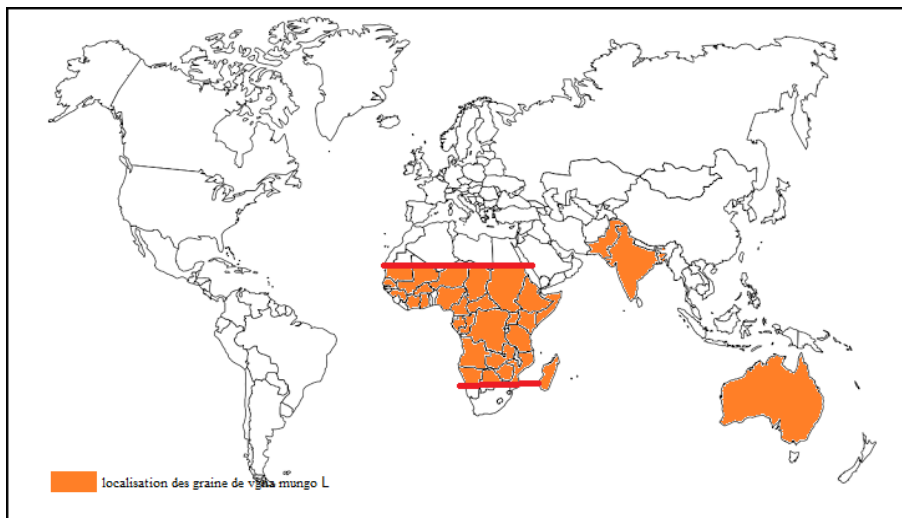


Figure 01 : la répartition géographique de *Vigna mungo* L

5. Description :

Vigna mungo L est une plante annuelle érigée de famille herbacée, A croissance rapide, atteignant 30a100 cm de haut, parfois volubile, Il a racine pivotante bien développée et tige abondamment Ramifiée à partir de la base

- Feuilles alternes, 3-foliolées ; stipules peltées, ovales ; pétiole de 6–20 cm de long ; stipelles falciformes ; folioles ovales ou rhombiques-ovales, de 4–10 cm × 2–7 cm, entières, acuminées.



Figure02 : les feuille et gousses de *Vigna mungo*(original ; 02/04/2022)

- Inflorescence : fausse grappe axillaire ; pédoncule jusqu'à 18 cm de long.

- Fleurs bisexuées, papilionacées, petites ; bractéoles linéaires à lancéolées, dépassant le calice ; calice campanulé ; corolle jaune, étendard de 12–16 mm de large, ailes presque aussi longues que l'étendard, carène enroulée en spirale avec un appendice terminal en forme de corne ; étamines 10, dont 9 soudées et 1 libre ; ovaire supère, style courbé en spirale.



Figure03 : les fleurs de *Vigna mungo* L (Benlaldj, 2017)

- Fruit : gousse cylindrique de 4–7 cm × 0,5 cm, érigée ou presque, avec de longs poils et un bec crochu et court, contenant 4–10 graines.
- Graines ellipsoïdes, jusqu'à 5 mm de long, à bouts carrés et à hile en relief et concave, généralement noires ou tachetées, parfois vertes.
- Plantule à germination épigée. (PROTA)



Figure 04 : les graines de *Vigna mungo* L

6. Condition de cultures :

Vigna mungo L. est également cultivé pour le fourrage et le foin (Göhl, 1982). Ses résidus de culture constituent un aliment important pour le bétail dans certaine région l'Inde (Sandeep Saran et al, 2000). Il peut être cultivé pendant la période sèche de l'humidité résiduelle, il pousse mieux sur les sols limoneux, sols bien drainés avec un pH 6-7 (ARORA et al, 1989 ; BALIGARE et al, 2007). Il peut supporter des sols acides (jusqu'à pH 4,5) si de la chaux et du gypse sont ajoutés au sol (Baligar et al, 2007), Il est tolérant à la sécheresse et convient donc Aux zones semi-arides des. Le principal producteur de haricot noir est l'Inde, qui produit environ 1,5 million de tonnes de graines par an. À l'échelle mondiale, le gramme noir représente plus de 40 % du total des graines de légumineuses comme rcialisées (**ARORA et al., 1989**).

7. Cycle végétale :

- La germination des vigna mungo prend une période entre 7_10 jours
- La floraison débute 30_60 jours après le semis
- Les fleurs sont généralement autofécondation, le pollen étant libéré avant que les fleurs ne s'ouvrent
- La maturité est atteinte en 60_140 jours après le semis. L'Urd nodule efficacement avec les bactéries *bradyhizobium* (**Benlaldj, 2017**)

8. Les principaux phénomènes au cours de germination des graines de *Vigna mungo* :

8.1 Dégradation des sucres :

Lors de la germination, les principales matières de réserve (amidon, protéine et lipide) de cotylédon sont dégradées et les produits libérés sont transférés vers l'axe de développement. Pendant ce temps, la germination précédée par trempage des graines dans l'eau active les enzymes hydrolytiques, et cause la dégradation les matières de réserve des graines. la principale enzyme impliquée dans la dégradation initiale de l'amidon en formes plus solubles c'est α -amylase, tandis que β -amylase et phosphorylase aider à la conversion en sucre libre dans le cotylédon des graines germées de *Vigna mungo*. Au cours de la germination des graines de *Vigna mungo*, l'activité de l'amylase contribue de manière significative au sucre soluble du cotylédon. Ont signalé que la germination des graines de *Vigna mungo* a conduit à une augmentation progressive de la teneur totale en sucre (glucose, saccharose, fructose) dans les germes .Les réserves dégradées sont en partie utilisées pour la respiration et

La synthèse des nouveaux constituants cellulaires de l'axe embryonnaire en développement pendant la germination. En revanche, il est important de noter que ce processus provoque des changements importants dans les caractéristiques biochimiques, nutritionnelles et sensorielles des germes (Choon et al, 2014)

8.2 La réduction de taux de composés phénoliques totaux

L'estimation des TCP est importante pour déterminer l'activité antioxydant des germes produits. Des études déclarent que les composées phénoliques produits le 1^{er} jour de germination. Noté que les phénols plus élevés produit le jour 1 ont été utilisés pour la polymérisation par peroxydase de guaiacol pour former des phénols polymériques et de la lignine pendant la germination. Ont signalé dans haricot communs, la perte de TCP augmentait avec l'augmentation du taux d'hydratation. Pendant ce temps, le temps de trempage plus long a causé l'hydrolyse et la diffusion de certains polyphénols dans le tégument (choon et al, 2014).

9. propriétés physiques de *Vigna mungo* :

La connaissance des propriétés physiques telle que la taille, la forme, la masse, aération des grains est nécessaire pour la conception d'équipement de manutention et de traitement efficace. Le diamètre moyen géométrique augment avec l'augmentation de teneur en humidité (Theertha et al, 2014), les résultats ont été présentés dans le tableau 1

Tableau 01 : propriétés physique de *Vigna mungo*

Paramètre	humidité d.b %	Longueur (mm)	largeur (mm)	épaisseur (mm)	diamètre moyenne (mm)
Mesure	10,23 à	3,97 à	3,03 à	3,33 à	3,38 à
	19,73	4,45	3,30	3,66	3,72

10. composition chimique de *Vigna mungo* :

10.1 Facteur nutritionnels :

Tableau 02 : composition chimique des graines de Vignamungo par 100g de partie comestible (Haytowitz et Matthews, 1986).

Minérale	Calcium	Potassium	Magnésium	Zn	Fer
Quantité	196 mg	575 mg	260 mg	3,1 mg	6,8 mg

Vitamine	Vit B1 (thiamine)	Vit B2 (riboflavine)	Vit B3 (niacine)	Vit B6 (pyridoxine)	Vit B9 (folates)	Acide ascorbique	Vit A
Quantité	0 ,36 mg	0,28 mg	1,8 mg	0,28 mg	628 µg	4,8 mg	114 UI

Acide aminé	tryptophane	Lysine	méthionine	phénylalanine	thréonine	valine	Leucine	Isoleucine
Quantité (par g d'azote)	65 mg	415 mg	91 mg	365 mg	217 mg	351 mg	518 mg	319 mg

10.2 Facteur antinutritionnels :

Tableau 03 : les facteurs antinutritionnels dans les graines de *Vigna mungo* sec et matures (Shweta et al., 2017).

Acide physique (mg /100g)	Les saponines(%)	Les (%) oligosaccharides	Les inhibiteurs de protéases	
645,40	2,9	- Raffinose 1.181*	Inhibiteur de trypsine (mg /g)	Inhibiteur de α – amylase (Unit/g)
		- Stachyose 1.541*	21.805*	853.004*
		- Verbascose 2.411*		

11. l'utilisation de *Vigna mungo* :

➤ En cuisine indienne :

Les graines mungo sont consommées comme légume sec, directement ou dans diverses Préparations (entière ou cassé, bouillie ou grillées, moulues en farine pour la transformation en Gâteau, pain ou bouillie). En Inde avec la farine on fait les galettes “papadum”. Les graines germées sont également consommées. Les gousses vertes sont utilisées comme légume cuit. Excellente source de protéine végétale, vous pourrez servir cette légumineuse en remplacement la Viande ou poisson ; en plat chaud accompagné de légume ou en purée froid, ces vigna sont également délicieux en salade agrémentées d’une sauce bien relevée. En Inde les graines sont réduites en poudre et elles sont mélangées à la pâte de riz pour confectionner des kozhukattai (**PROTA**).

➤ En notre cousine de Timimoune

Dans notre région les grammes noirs sont utilisés dans nombreux plats traditionnelle, comme la Sos de couscous. D’autre part, les mères de notre région ont servi la poudre de vigna mungo avec le lait pour les personnes qui ont une anémie et comme une source d’énergie.

➤ En alimentation des animaux :

De petites quantités de gousses et de feuillage sont utilisées pour compléter l’alimentation animale ou bien comme fourrage. Quelquefois, les cosse servent à nourrir le bétail.

➤ **Autre usage :**

La farine de graines remplace le savon, elle rend la peau douce et lisse. En médecine traditionnelle les graines sont utilisées pour leurs propriétés suppuratives, rafraichissantes astringentes. Pilées et appliquées en cataplasme sur les abcès (**Benlaldj, 2017**).

12. L'intérêt de *vigna mungo* :

12.1 Intérêt agronomique :

Les agriculteurs exploitent le *vigna mungo* comme plante de couvertures et comme engrais vert. il joue un rôle indispensable dans l'agriculture indienne car il restaure la fertilité des sols en fixant l'azote atmosphérique par leur association symbiotique avec des bactéries comme *Rhizobium fixatrice* (**Basavarajappa et al, 2013**).

12.2 Intérêt biologique :

De nombreuses études récentes sont menées sur la qualité nutritionnelle de *Vigna mungo* L.

Montrent que ce haricot contient les fonctions suivantes :

- ✓ Parmi les légumes, c'est plus utilisées car Il contient bonne source de protéines, de glucides, de minéraux et de très bonnes concentration de nombreuses vitamines du complexe B, ces vitamine fonctionne comme cofacteur des enzymes
- ✓ Il est connu pour posséder des antihypertenseurs et propriétés antidiabétiques
- ✓ Depuis les temps anciens, le *vigna mungo* a été utilisée comme matière médicinale ou Cosmétique
- ✓ Il est également considéré comme plus précieux en raison de leur haute digestibilité et moins l'effet flatulence
- ✓ *Vigna mungo* fonctionne comme un excellent diurétique. En conséquence, le corps peut se débarrasser des toxines nocives, l'acide uréique, l'excès d'eau, l'excès de graisse, et même le calcium stocké dans les reins.
- ✓ Une consommation régulière de cette légumineuse peut empêcher la formation des calculs rénaux (**Fery ,2002**).

Chapitre II: Les anthocyanes

1. Définition :

La notion des anthocyanes se divise par mots grec ; antho, fleur et kuanos, bleu violet. Regroupent les anthocyanidols (anthocyanidine) et leurs dérivés glycosylés. . **(Dangles et Deluzarche 1994).**

Les anthocyanes qui constituent le groupe le plus important de colorants visibles à l'œil humain, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Chimiquement, les anthocyanes sont des flavonoïdes, par conséquent ces structures présentent, un squelette de C₆C₃C₆. Portant, elles diffèrent des autres flavonoïdes naturels en absorbant fortement la lumière visible .la gamme de couleurs associées aux anthocyanes résulte de leur capacité à former des structures résonance **(NGUYEN ,2018)** Il existe 17 anthocyanidines naturelles, mais Six d'entre eux sont plus fréquente chez les plantes supérieures et contribuant à la pigmentation des plantes. Lesquelles sont : la pélagonidine (Pg), la péonidine (Pn), la cyanidine (Cy), la malvidine (Mv), la pétunidine (Pt) et le delphinidé (Op). Les glycosides des trois anthocyanidines non méthylés (Cy, Op et Pg) .ces pigment sont présents dans 80 % des feuilles pigmentées, 69 % des fruits et 50 % de fleurs. L'anthocyane la plus répandue est la cyanidine 3-glucoside. **(Zagadou 2016).**

2. Répartition et localisation dans la plante :

Les anthocyanes sont rares chez les gymnospermes, très répandus dans plusieurs familles d'angiospermes,**(Dr, Sahraoui,2015).**ces substance se localisent dans les vacuoles des cellule épidermique dans divers type de tissus végétaux , comme ceux des fruits (raisin, framboire, mure, fraise , cassis,...), des légumes (chou violette , aubergine, ...) , des racines (radis , betteraves rouges ,...) des feuilles (feuilles de maïs violet , feuilles de cassis. , ...) , des fleurs (hibiscus , artichaut , ...) ou dans des céréales (riz noir , maïs violet ,...) . Ils sont également présents dans les tissus verts de certaines feuilles mais leur couleur est masquée par celle de la chlorophylle dont la dégradation en automne dévoile l'existence de pigments d'anthocyanes. **(Nguyen 2018).**

3. Structure de l'anthocyane

Les anthocyanes sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium ou cation flavylium **(Dr sahraoui 2015)** .ces dernières sont caractérisées par le squelette C₆-C₃-C₆ et sont formés de l'association d'un aglycone (ou génine) appelé anthocyanidine (constitue le groupe ment chromophore du pigment) et d'un sucre substitué en position 3et 5 avec le plus fréquemment

des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose) et des di- et tri-saccharides formés par la combinaison des monosaccharides précédents. Ce qui augmente leur solubilité et leur stabilité (**Zagadou 2016**). Les sucres peuvent aussi être acylés par l'acide cinnamique, Pcoumarique, acétique, caféique, ferulique sinapique et malonique, ce qui augmente la diversité de ces molécule (**Gomez, 2009**).

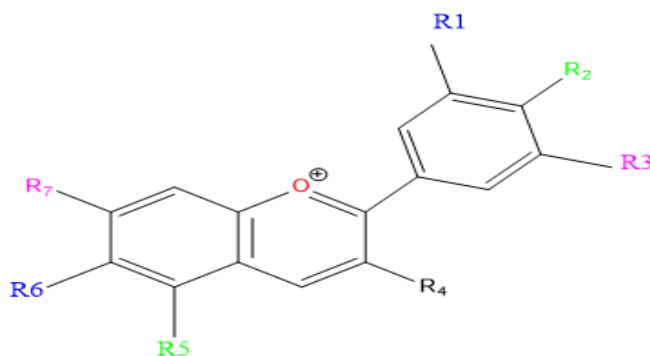


Figure 05 : Structure de cation flavylum la base des anthocyanes (**Chem Draw**)

Tableau 04 : structure et couleur des six principaux anthocyanidine en fonction de la substitution sur l'ion flavylum (**Beye et al.,2015**)

	Substitution en 3'	substitution en 5'	R1	R2	$\lambda_{\max}^*(\text{nm})$	couleur
Pélgargonidine	H	H	H	H	516	orange-rouge
Cyanidine	H	H	OH	H	530	rouge
Delphinidine	OH	OH	OH	OH	541	bleu-violet
Péonidine	OCH3	H	OCH3	H	528	rose-rouge
Pétunidine	OCH3	OH	OH	OCH3	540	bleu-pourpre
Malvidine	OCH3	OCH3	OCH3	OH3	538	pourpre

*R3= Glucose, $\lambda_{\max}$ mesuré dans du méthanol avec 0.01% Hcl

4. Propriétés des anthocyanes :

❖ Changement de couleur :

Le caractère principale des anthocyanes est leur diversité de couleur de anthocyanidines est déterminée par le degré d'hydroxylation du noyau B, produisant un effet bathochrome. Au contraire, les réactions de méthylation et de glycosylation produisant un effet hypsochrome

(Gomez ,2009) le noyau flavylum est un diacide faible et un électrophile et selon le PH du milieu on observe les changements suivant :

- En milieu acide fort (pH=3) : le cation est stable et coloré en rouge
- En milieu acide faible (pH entre 4 et 6) le cation est de couleur bleue
- En milieu neutre (pH >7) : le cation est instable et devient incolore (sahraoui, 2015).

❖ **Dégradation des anthocyanes :**

Les anthocyanes se dégradent en présence d'oxygène, d'ions métalliques d'enzymes et de lumière, dans certaines conditions de pH et température. Cette dégradation est accompagnée d'une augmentation de la concentration de composés formés par la condensation entre les produits de dégradation des anthocyanes et d'autres polyphénols présents dans le milieu. (Beye et al 2015)

❖ **La solubilité :**

Les anthocyanes sont solubles dans l'alcool et l'eau mais insolubles dans le solvant organique apolaire (sahraoui2015).

5. Les facteurs influent la stabilité d'anthocyane :

Comme la plupart des colorants naturels, les anthocyanes peuvent subir d'instabilité inhérente. Ils sont plus stables dans des conditions acides. Alors qu'ils peuvent se dégrader de nombreuses manières, allant de la perte de couleur à une prise de couleur brune. Les principaux facteurs influençant la stabilité des anthocyanes sont le pH, la température et la présence d'oxygène et lumière, mais la dégradation enzymatique et les interactions avec des composants alimentaires (par exemple l'acide ascorbique, les ions métalliques, les Co pigments) ne sont pas moins importantes.

5.1 La couleur des anthocyanes

Leur caractéristique la plus notable est le changement de couleur qui accompagne les variations de pH de leur milieu. Lorsque le pH augmente, des changements de structure résultant de la réaction d'hydratation et de transfert de protons entraînent des changements de structure et de couleur (Beye et al ,2015)

5.2 L'effet d'acidité du milieu

Elle a un effet sur la couleur, mais également sur la réactivité des anthocyanes. L'augmentation du pH a pour effet l'ouverture de l'anneau C par une attaque nucléophile

donnant la forme hémiacétale dont la réactivité est supérieure à celle de l'ion flavylum (Beye et al, 2015).

5.3 Effet de la température

Les anthocyanes sont thermolabiles et se dégradent à une vitesse qui augmente considérablement avec la température (Beye et al, 2015)

5.4 Effet de la lumière

Les anthocyanes deviennent instables lorsqu'elles sont exposées aux UV ou à la lumière visible u à d'autres sources de rayonnement ionisant. Elle substitués au groupe hydroxyle en C-5, connues pour être fluorescentes, sont plus sensible à la décomposition photochimique que celles non substituées à cette position (Nguyen ,2018)

5.5 L'effet de l'oxygène

La présence d'oxygène entraine une dégradation des anthocyanes par un mécanisme qui peut être une oxydation chimique ou une réaction enzymatique en présence de polyphénol oxydase (Beye et al., 2015).

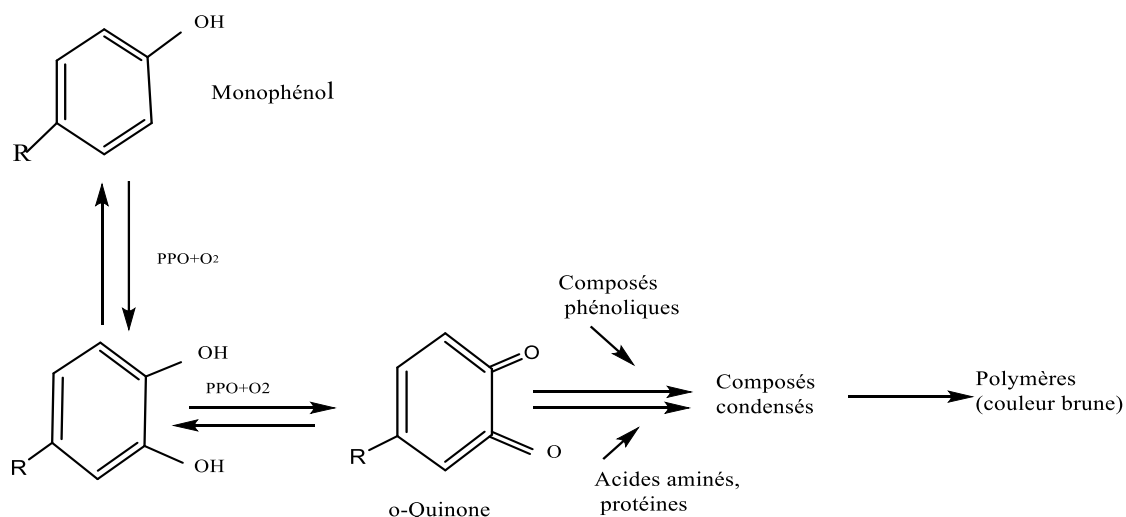


Figure 06 : mécanisme d'oxydation des polyphénols oxydase (Beye et al., 2015).

6. Sources et teneurs d'anthocyanes

Tableau 05 : principales source alimentaire anthocyanes (Sahraoui,2015).

Anthocyane	Sources végétales
Pélgargonidine	Fraise, banane, pomme de terre
Cyanidine	Pomme, mure, sureau, pêche, poire, figue, cerise, oignon, groseille, chou rouge, rhubarbe
Cyanidine et Delphinidine	Cassis, orange sanguine, chou rouge, groseille carotte pourpre
Delphinidine	Fruit de la passion, haricot vert, grenade, aubergine
Cyanidine et péonidine	Canneberge, prune, prunelle
Pétunidine et Malvidine	Myrtille, raisin

Tableau 06 : la teneur en anthocyanes de quelques fruit et légumes (Attoumi et al., 2006).

Fruit/légume	Concentration en anthocyanes Mg/100g
Maïs	1640
Mure	145-607
Chou	322
Raisin	27-120
Carotte violet	38-98
Radi	11-60
Fraise	13-55
Pomme	1-7

7. Biosynthèses des anthocyanes

Pour la biosynthèse des anthocyanes se fait par deux voies métaboliques. D'une part, vois acétates et vois shikimate, se dernière est responsable de la synthèse de la phénylalanine (précurseur direct de l'acide cinnamique). La deuxième vois métabolique c'est par la vois acétates qui fait intervenir la condensation de trois malonyl-CoA pour former le cycle A des structure flavonoïdes. Ces deux voies se croisent pour former sous l'action d'une enzyme, la chacone se produit des différent type des anthocyanes (Zagadou, 2016).

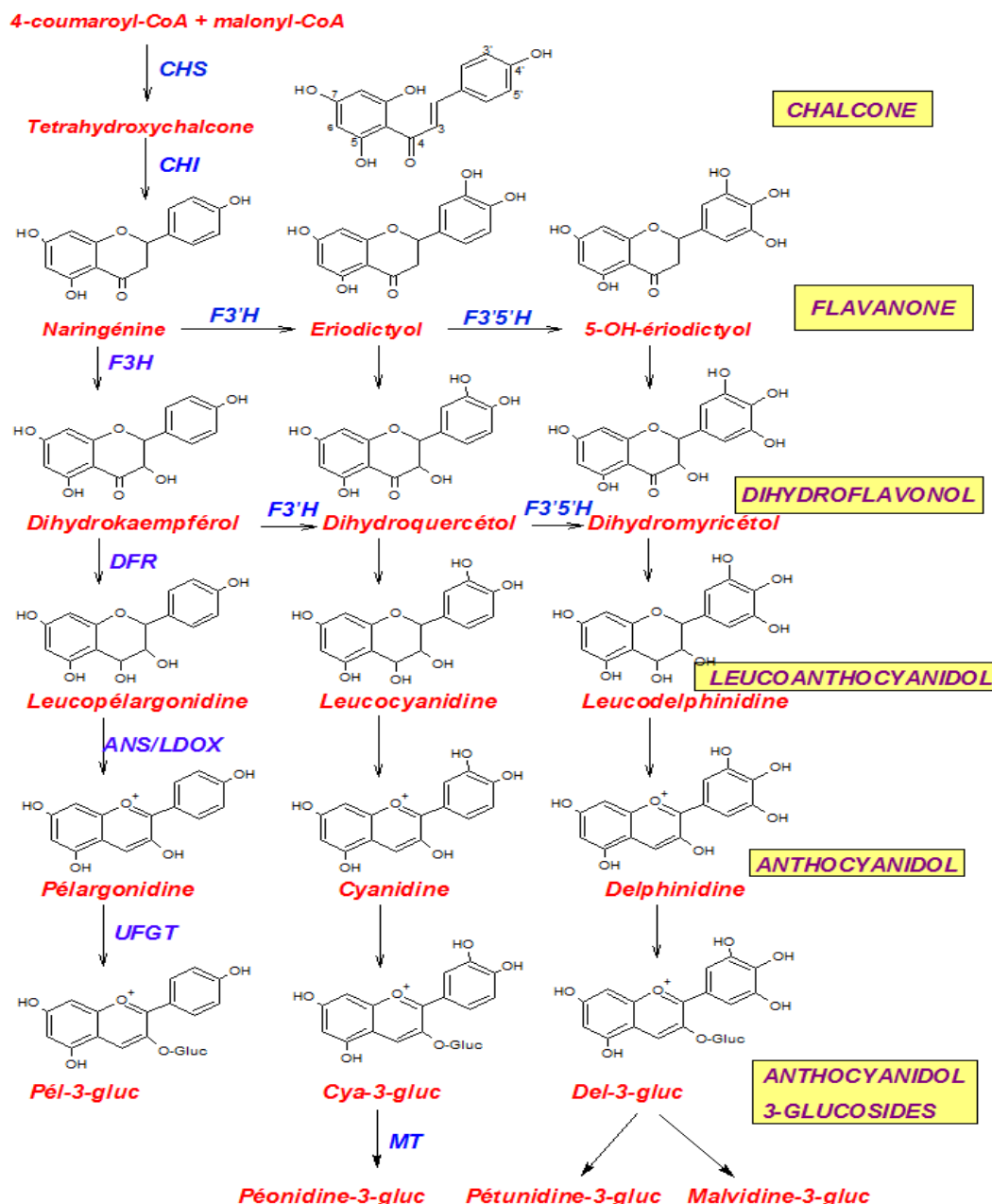


Figure 07 : schéma de la biosynthèse des anthocyanes (Zagadou, 2016).

8. Absorption et biodisponibilité

Leur absorption et biodisponibilité en contraste avec les propriétés qu'on leur reconnaissait, les anthocyanes ont longtemps été considérées comme faiblement biodisponibles. En effet les quantités retrouvées bien dans le sang que dans les urines, proportionnellement aux quantités ingérées. On considérait en revanche qu'ils pouvaient avoir un effet local en participant à la protection des muqueuses gastro-intestinales contre les effets des radicaux libres. Cependant, les études les plus récentes suggèrent qu'ils ne sont que faiblement absorbés sous leur forme d'origine dans l'estomac et dans l'intestin grêle.

On n'en retrouve donc que de faibles quantités dans le sang. Par contre, les métabolites résultant de l'assimilation des anthocyanes se retrouvent dans les urines en quantités proportionnelles aux quantités ingérées. Ils sont donc métabolisés par des enzymes dans l'intestin grêle et par la flore bactérienne du gros intestin, donnant des phénoliques et autres métabolites plus facilement assimilables par le système circulatoire. Ils modifieraient par ailleurs l'écologie du gros intestin, favorisant les bactéries à effets probiotique (**Beye et al, 2015**).

9. Utilisation des anthocyanes

9.1. Chez l'homme

➤ **Activités antioxydant**

Déterminée par leur structure, en particulier à position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatique. L'anthocyane exerce leur propriété antioxydante par le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO) .la suppression de la formation des ERO par inhibition de quelque enzyme ou par chélation des ions métallique implique dans la production et la protection des systèmes de défense antioxydant d'organisme. Les anthocyanes peuvent interférer avec les réactions en chaîne à l'interface des membranes et prévenir ainsi la propagation de ces réactions en chaîne. Comme antioxydants, les anthocyanes peuvent donc protéger les constituants cellulaires contre les dommages oxydatifs et, donc potentiellement limiter les risques de maladies dégénératives associées au stress oxydant.

➤ **Activité anti-inflammatoire**

Des plusieurs études dit que les anthocyanes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables d'inflammation (**Zagadou, 2016**).

➤ **Activités cardioprotectrices**

Les études réalisées in vitro et in vivo chez le rat ont permis de mettre en évidence des effets vasodilatateurs à court terme, des effets hypotenseurs protecteurs contre l'ischémie cardiaque et contre la fibrose myocardique, en considérant que cet effet contre les maladies cardiovasculaires. Est favorisé par leur habilité de prévenir l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL). Leur activité antiplaquettaires et anti-agrégation (inhibition de la plaque d'athérome) et leurs propriétés de vasorelaxation (**Zagadou, 2016**)

➤ Activités anti-cancérigènes

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde. **(BAYALA BAGRA)**.des essais de recherche ont démontré que les anthocyanes peuvent de réduire la prolifération des cellules cancéreuses et à inhiber la formation de tumeurs. Cette capacité des est liée à de multiples mécanismes d'action potentielle antioxydant puissant **(Zagadou, 2016)**.

❖ Augmentent la régénération du pourpre rétinien (favorise la vision nocturne) **(sahraoui ,2016)**.

Tableau 07 : Rôle protecteur des anthocyanes dans la santé humaine (Nguyen, 2018)

Anthocyanes principales	Effet	Source
Cyanidin-3-O-sophorose Cyanidin-3-O-(2G-O-glucosyl) rutinoside Cyanidine -3-O-glucoside Cyanidine-3-O-rutinoside.	Anti-inflammatoire	Frambiose Rubusidaeus Rubusoccidentalis
Cyanidine-3-glucoside chloride Cyanidine -3-rutinosided chloride Pelargonidine-3-glucooside	Anti-diabète, contre le stress oxydatif	Mure Morus alba L
Cyanidine3-o-galactoside Pelargonidine3-o-galactoside Delphinidine	Anti-diabète, anti-obésité	Cornouiller Sauvage cornus Mas
Delphinidine3-sambubioside Cyanidine 3-sambubioside Cyanidine 3-glucoside Delphinidine 3-glucoside	Contre le cancer du sein , antihypertenseur, anti-obésité	Hibiscus Hibiscus Sabdariffa
Malvidine-3-O-glucoside	Cardioprotecteur	Raisin
Pétunidine -3-O-glucoside Cyanidine -3-O-glucoside Delphinidine -3-O-glucoside Paeonidine-3-O-glucoside	Contre le stress oxydatif	Vitis viniferaL
Standaed C3G	Anti-inflammatoire, contre la maladie d'alzheimer	Canidine-3-O-b-glucoside
Péonidine -3-glucoside Malvidine -3-galactoside Delphinidine -3-glucoside Delphinidine -3-galactoside	Anti-inflammatoire, réduit le risqué de maladie cardiovasculaire, contre le stress oxydatif	Myrtille Vaccinium Angustifolium
Cyanidine -3-O-glucoside Péonidine-3-O-glucoside chloride	Réduit le stress oxydatif, augmente l'adaptabilité de l'activité des enzymes antioxydants tels que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT)	Riz noir Oryza sativa L.

9.2. Chez les plantes

Les anthocyanes sont parmi les plus importants groupes de pigment récent dans les plants.

- ❖ Plusieurs études ont suggéré que le contenu anthocyane et leur activité antioxydant contribuent aux effets protecteur des fruits et des légumes contre les maladies dégénératives et chronique (**Nguyen, 2018**).
- ❖ Les anthocyanes auraient un rôle protecteur pour la plante : n'en absorbant les UV. de plus, leur couleur attire les insectes et les oiseaux, qui jouent un rôle majeur dans la pollinisation des fleurs et la dispersion des graines (**Sava et al, 2006**)
- ❖ Le transport des monosaccharides
- ❖ La régulation de pression osmotique durant les périodes de sécheresse et de froid ou la régulation de la réponse anti-oxydative des plantes soumises à des facteurs de stress (**Beye et al, 2015**).

9.3. Dans l'industrie

Les anthocyanes sont de couleur intense et hydrosoluble, ce qui simplifie leur incorporation dans les systèmes alimentaire liquide. Ce sont des bons colorants alimentaires et antioxydants (**Sava et al., 2006**). Les majeures sources d'anthocyanes autant que colorant alimentaire sont :

- Feuilles de chou rouge
- Jus de fruit du sureau
- Le moût de raisin (**Sahraoui, 2015**).

Les anthocyanes utilisés dans l'industrie sont par exemples : delphindines (E163b), Cyanidine(E163a), pelargonine (E163d), peonidine (E163e), petunidine(E163f).et Malvidine (E163c). (**Nguyen, 2018**)

Chapitre III : Les antioxydants

1- Le stress oxydant

Dans les conditions quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans ce cas, on dit que la balance antioxydants / peroxydants est un équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux appelé «stress oxydant» (Favier, 2003).

1.1-Définition

Le stress antioxydant est un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants, résultant de l'augmentation de la production d'oxydants et/ou la réduction des antioxydants, génère un état de stress dans la cellule. Il est nécessaire pour la stimulation de la prolifération et peut-être la suppression des composants cellulaires sénescents. Lorsqu'il est excessif, il nuit à la structure et la fonction des tissus entraînant apoptose ou nécrose. Le stress oxydant joue un rôle important dans la genèse et l'entretien de nombreuses pathologies humaines (Hamma et al., 2015).

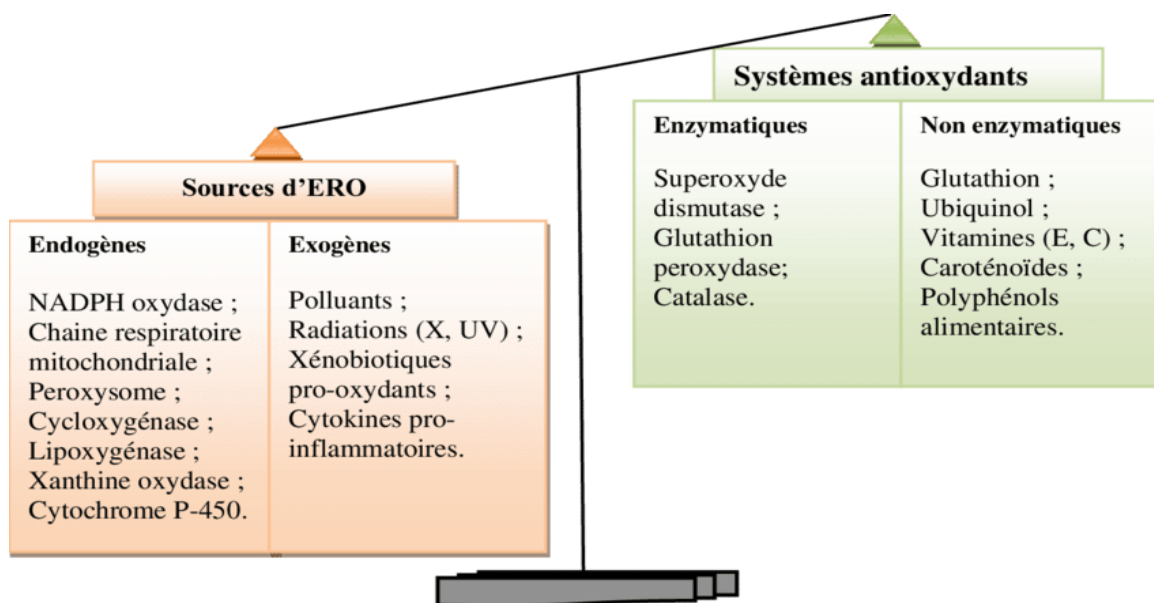


Figure 08 : déséquilibre de la balance entre pro-oxydants et antioxydants (Achat, 2013).

1.2- Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Le dioxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une faible partie de O_2 en métabolites potentiellement toxiques : les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Achat, 2013).

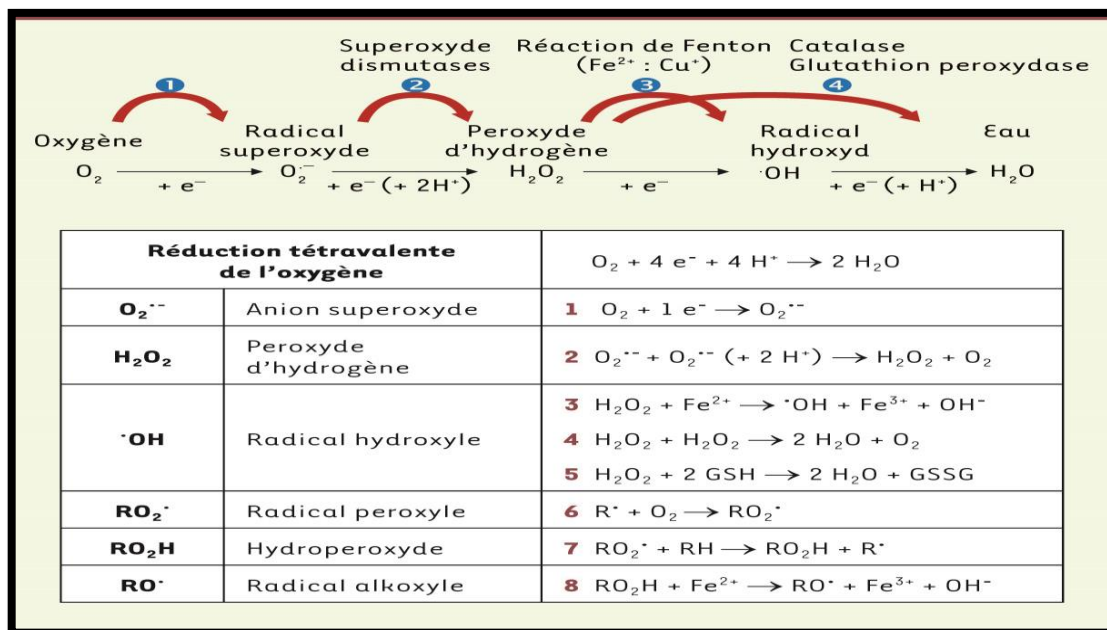


Figure 09 : origine des espèces réactives de l'oxygène (Camille et al., 2011).

1.3-L'origine de stress oxydatif

Les ER sont produits dans les mitochondries, les peroxysomes, les lysosomes, le réticulum endoplasmique, le plasma, les membranes et de nombreux sites dans le cytosol.. Cette production est induite par un grand nombre de mécanismes biochimiques tant endogènes qu'exogènes (Goudable et Favier, 1997).

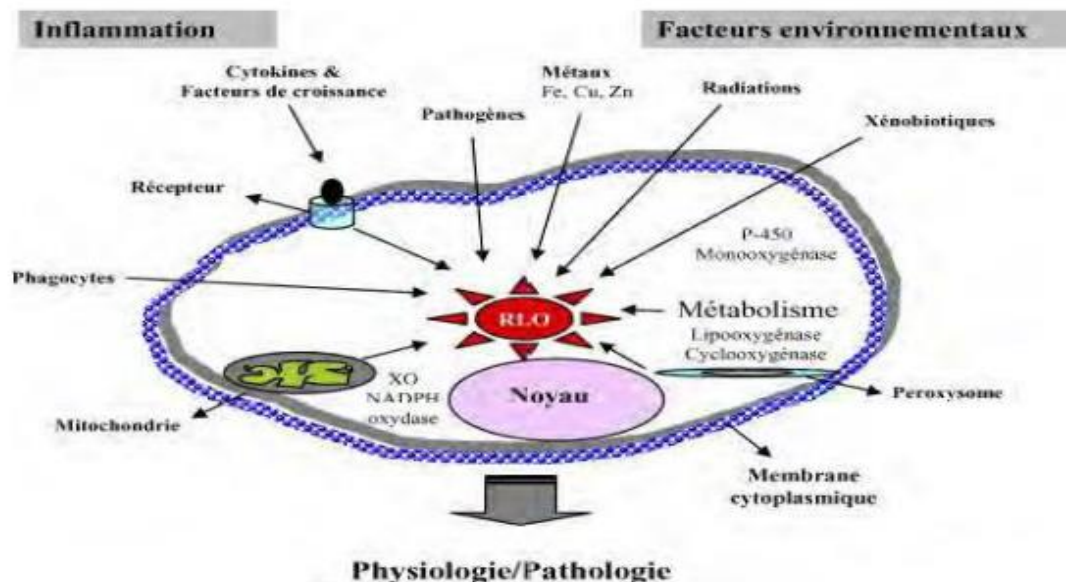


Figure10 : Origine extracellulaire et intracellulaire des espèces réactives (Hamma et al.,2015).

1.3.1- Endogène

a- La respiration mitochondriale

L'oxygène constitue le centre même du métabolisme énergétique des cellules en participant à la production d'adénosine triphosphate (ATP) mitochondriale à partir des nutriments (glucides, lipides et protéines), par le biais de la phosphorylation oxydative couplée à la chaîne respiratoire. L'ATP est produite grâce à l'énergie qui résulte du transfert des électrons du nicotinamide adénine diphosphate réduit (NADH) et de la flavine diphosphate réduite (FADH₂) à l'oxygène par l'intermédiaire d'une série de transporteurs d'électrons appelés collectivement la chaîne de transport d'électrons. Plus de 95% de l'oxygène présent dans la mitochondrie est consommé au niveau du complexe cytochrome oxydase (**Beaudeux et al., 2006 ; Finkel, 2011**). ce processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toutefois pas parfait, une fuite d'électrons au niveau du complexe (NADH-ubiquinone réductase, UQH₂-cytochrome réductase) est à l'origine de la transformation de 2 à 3% de l'oxygène en anion superoxyde (**Hamma et al., 2015**).

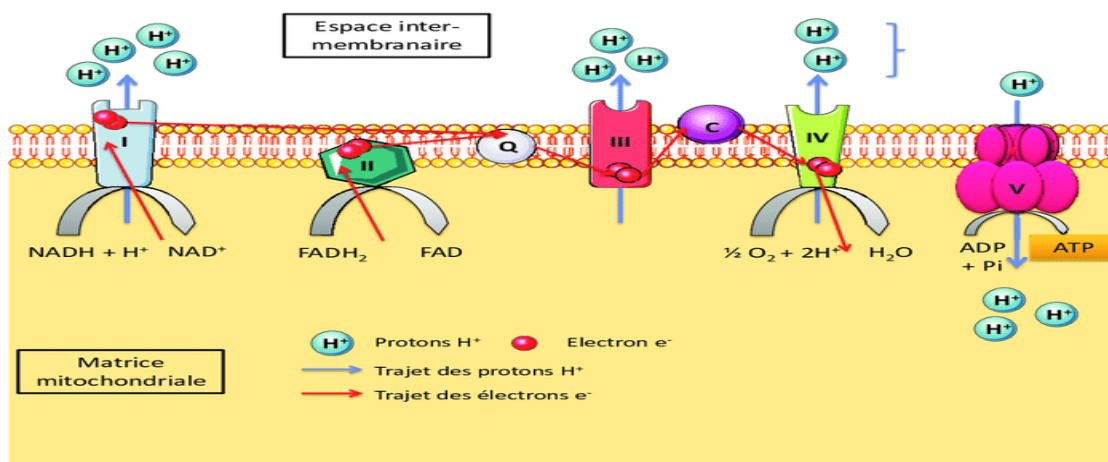


Figure 11: La chaîne respiratoire mitochondrial (**Villedieu, 2018**).

b- la phagocytose

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophage, polynucléaires, neutrophiles....ect) La plupart des cellules sont capables de produire des radicaux superoxyde O₂•- via une activité NAD(P)H oxydase membranaire (NOX). La NOX a été initialement

étudiée dans les cellules phagocytaires où elle joue un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes (**Favier, 2003**).

1.3.2-Exogène

Les sources exogènes sont majoritairement des pro-oxydants environnementaux tels que les pesticides, les métaux lourds, la fumée de cigarettes, les polluants, la poussière (d'amiante, de silice), et les composés induits par la prise de certains médicaments, par le rayonnement électromagnétique (radiation ionisante, lumière ultraviolette), ou lors d'un coup de chaleur (**Démarchez, 2012**)

2. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (<< libre >>) et contenant un ou plusieurs électrons célibataire (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable. Il va donc se réduire un autre composé (**Gaudable et Favier, 1997**).

2.1- Les types des radicaux libres

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules. Il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH) et monoxyde d'azote (NO). Les autres radicaux libres dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule tels l'oxygène singlet 1O_2 , peroxyde hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leur précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (**Yoshikawa et al., 2000**).

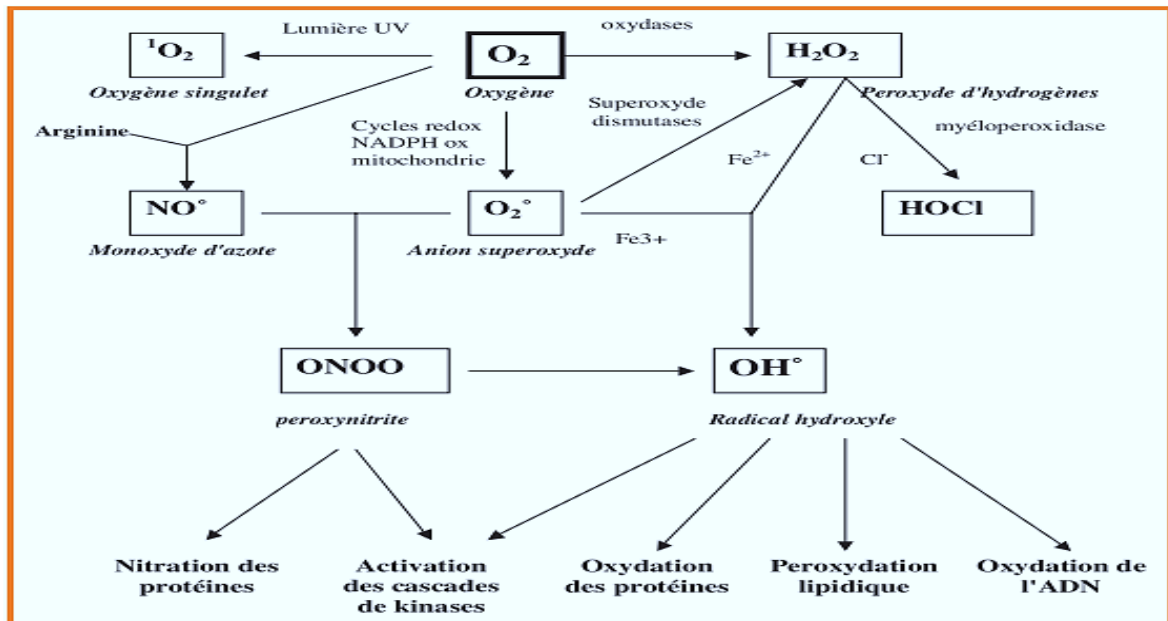


Figure 12 : origine des différents radicaux libres (Favier, 2003).

3. Activité antioxydants

Les organismes vivants ont au cours de leurs évolution développé des mécanismes de défense qui les protégé contre l'action oxydante des radicaux libres. Ces défenses antioxydants leur permettent de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux faible et de limiter les dommages liés à celle-ci (**Zagadou, 2016**).

3.1- Définition

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration faible relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autre substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher de l'oxydation de ces substrats. La plupart des antioxydants peuvent être divisés en 2 groupes : endogène et exogène (**Massarat, 2011**).

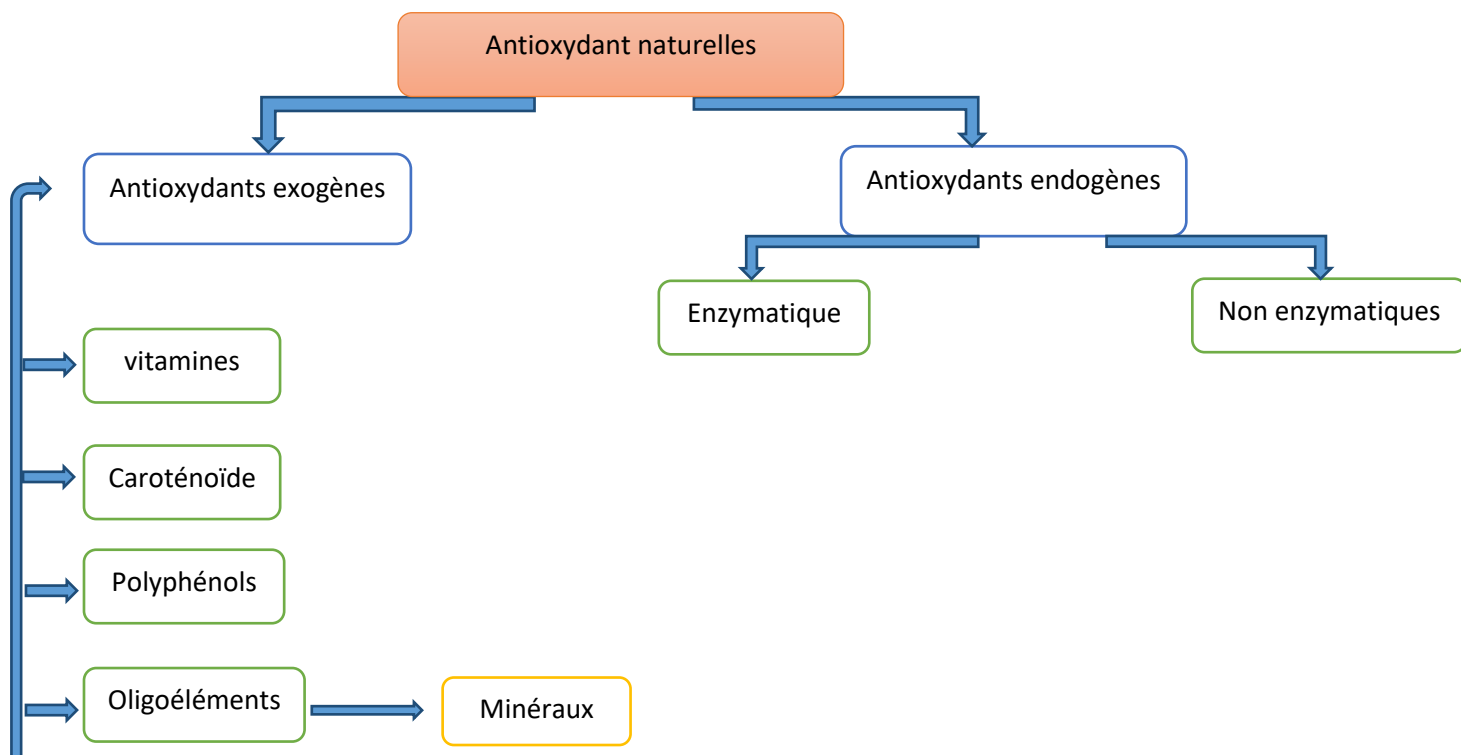


Figure 13 : les familles antioxydants naturelles.

3.2- Les antioxydants endogènes ou cellulaires

De nombreuses stratégies antioxydants sont utilisées par les cellules pour contrôler 1 niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Ces stratégies peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et non enzymatiques (**Favier et Goudable, 1997**).

3.2.1- les antioxydants enzymatiques

Les enzymes antioxydants constituent le premier niveau de défense en contrôlant la formation et la prolifération des espèces radicalaires. Des enzymes permettent à ce système de fonctionner, ce système de défense repose principalement sur 3 enzymes (**Lehucher-Michel et al., 2001**).

- **Superoxyde dismutase (SOD)** : Cette enzyme catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique (sont des enzymes utilisant des métaux comme cofacteurs) (Garait, 2006).
- **La catalase** : L'On retrouve principalement au sein des peroxysomes, dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. Elle catalyse la dismutation de peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (Valko et al., 2006)

- **La glutathion peroxydase** : Les glutathion peroxydases catalysent la réduction par le glutathion réduit (GSH) du peroxyde d'hydrogène en eau et de divers hydroperoxydes lipidiques produits (ROOH) en alcools et des espèces radicalaires en espèce non radicalaire (guillouty, 2016).

3.2.2- Les antioxydants non enzymatiques

Ce système est constitué par les molécules piègeuses intracellulaires qui agissent en seconde ligne de défense antioxydante en empêchant principalement la propagation des réactions radicalaires en chaînes. Il s'agit du glutathion, de l'acide urique, de la bilirubine, de la mélanine, de la mélatonine, de l'acide lipoïque, etc. De tous ces composés endogènes, le plus important est sans doute le glutathion (thiol majeur au niveau intracellulaire). A ces composés, s'ajoutent les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine qui agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydant comme les ions Fe^{2+} , Fe^{3+} ou Cu^{2+} et Cu^{+} , permettant par ce biais, de prévenir la production des radicaux libres (Zagadou, 2016).

3.3- Les antioxydants exogènes

Ce sont des composés chimiques extracellulaires qui exercent des effets protecteurs importants in vitro. Ils comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et les polyphénols présents dans certains fruits et légumes (Zagadou, 2016).

3.3.1- les vitamines : sont des petites molécules soit liposolubles qui sont représentées par la vitamine E est la molécule antioxydante liposoluble la plus abondante de l'organisme. Elle est présente dans les membranes cellulaires et circule dans le sang liée aux lipoprotéines (Vertuani et al., 2004).

La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble présente dans les fluides intra et extracellulaire (compartiment hydrophile). Elle possède une activité biologique, elle est aussi capable de recycler la vitamine E de façon à agir en synergie avec cette dernière dans la prévention de la peroxydation lipidique des biomembranes et des lipoprotéines (Vertuani et al., 2004).

3.3.2- les caroténoïdes

Les caroténoïdes et en particulier, le β -carotène et le lycopène, ont une action antioxydante directe vis-à-vis de l'oxygène singulet et protègent les membranes de la lipoperoxydation. Ils exercent une protection contre les dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Zagadou, 2016).

3.3.3- Les oligoéléments

Les oligoéléments tels le sélénium, le cuivre, le zinc et le manganèse sont des cofacteurs importants pour les enzymes antioxydants. Le sélénium est nécessaire à l'activité de certaines sélène enzymes notamment les glutathion peroxydase et les peroxydoxine. Le zinc (Zn) stabilise la CuZn-SOD et protège les groupements thiols et les membranes cellulaires contre l'oxydation (**Zagadou, 2016**).

3.3.4- les composés phénoliques

Sont une vaste classe de substance organiques comportant au moins un noyau aromatique et en plus d'autres constituants, un ou plusieurs groupes hydroxyles qui leur confèrent la propriété d'antioxydants. De tous les composés phénoliques, les flavonoïdes notamment les anthocyanes sont reconnus comme des molécules possédantes de fortes potentialités antioxydants (**Zagadou, 2016**).

3.4- Les antioxydants synthétiques

Plusieurs antioxydants de synthèse sont autorisés en alimentation animale pour protéger les lipides insaturés alimentaires de l'oxydation. Parmi eux, l'exifone, le buthyl hydroxy toluène (BHT), le buthyl hydroxy anisol (BHA) (**De Wael, 2009**).

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1 Matériel biologique

Plusieurs études ont été effectuées sur la plante de «*Vigna mungo*» .dans notre travail, le matériel végétal a été constitué des graines de *vigna mungo* récoltées en décembre 2021 au niveau du jardin botanique de notre région Timimoune qui se situe à la wilaya d'Adrar. Les graines récoltées séchées à l'abri de la lumière et à température ambiante sont broyées à l'aide d'un mortier en poudre puis stockées dans un flacon en verre transparent. (**Figure14**).



Figure 14 :(a) les graines de *Vigna mungo* ; (b) la poudre obtenue après le broyage des graines

(Original. 14/02/2022)

Produit chimique :

Molybdate d'ammonium ; KCL ; Acide hydrochlorique ; Acide sulfurique ; Acide gallique ; Acide ascorbique DPPH ; Méthanol ; carbonate de sodium, Folin Ciocalteu ; acétate de sodium ; Hcl.

2- Méthodes

2.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Les graines broyées, peser 20g poudre de vigna mungo avec 100ml de Méthanol dans un flacon. Puis macération sous agitation 24h à température ambiante après filtrés 3 fois par papier de filtre. Peser le ballon vide. L'extrait est évaporé à sec à 40°C à l'aide d'un rotavapeur. Le résidu sec est récupéré dans un faible volume de méthanol pour obtenir une solution finale de 100 g/L. Le rendement d'extraction (%) est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$R(\%) = \{(P1 - P2)/Q\} \times 100$$

R(%) : rendement exprimé en %

P1 : poids de ballon vide

P2 : poids de ballon+résidu

Q : poids de la poudre végétale (g)

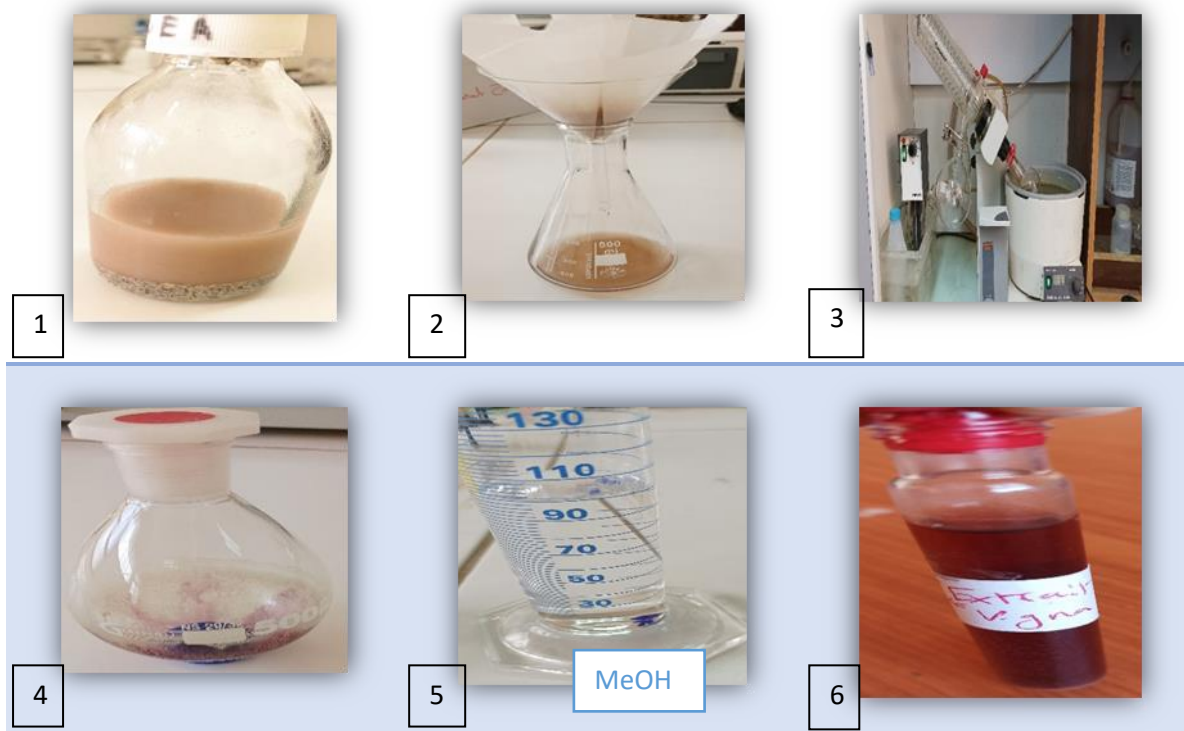


Figure 15 : les étape de protocole expérimental (original,14;15/02/2022)

3. Dosage des composés phénoliques et anthocyanes

3.1 Dosage des polyphénols totaux

a. principe

Parmi les méthodes de quantification des composés phénoliques, il s'agit une méthode de "Singleton et Rossi 1965" (**Biozot et Charpentier, 2006**) son principe repose sur le fait que les ions phénolate s formés par addition de carbonate de sodium à la solution d'extrait sont oxydés par le réactif de Folin- Ciocalteu (Kudaet et al ,2005), ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et molybdène (Rébireau-Gayon, 1968). la coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**)

b. Protocol expérimentale :

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode décrite par Waterhouse (2001). Dans un tube essai nous mettons 3.16ml l'eau distillée avec 40ul de l'extrait de plante convenablement dilué, 200 µl du réactif de Folin Ciocalteu est ajouté avec agitation à l'aide d'un vortex. Après 3s et 8min, on ajoute 600 µl carbonate de sodium (20%) au mélange, ensuit incubé à l'abri de la lumière pendant 30min. la lecture est réalisé à une longueur d'onde 765nm .contre un blanc (la même mélange excepté l'échantillon).

Tous les essais répétés au moins 4 fois, créez une courbe d'étalonnage qui a été réalisée en parallèle par l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons (**Figure15**).

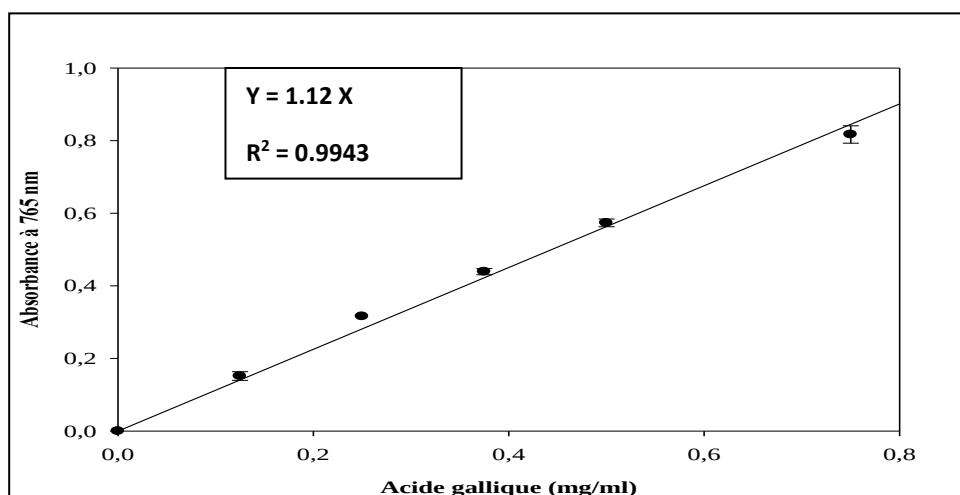


Figure 16 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

3.2- Dosage les anthocyanes**a. principe :**

Le dosage des anthocyanes de notre extrait a été déterminé par la méthode pH différentiel utilisée par plusieurs auteurs.

La méthode du pH- différentielle est basée sur le changement de la structure du chromophore d'anthocyane entre pH 1,0 et 4,5. Les anthocyanes monomériques subissent une transformation structurale réversible en fonction du pH (forme colorée d'oxonium à pH 1,0 et

forme hémiacétale incolore à pH 4,5). La différence dans l'absorbance de ces pigments à 520nm est proportionnelle à la concentration du colorant (Wrolstad et al., 2002).

b. Protocole expérimentale :

La teneur en anthocyanes totales est mesurée en utilisant deux tampons : le tampon de chlorure de potassium, pH= 1,0 (0,025 M) et le tampon d'acétate de sodium pH=4,5 (0,4M) .on prépare les deux tampons comme la suite :

- ✚ On mesure une quantité de 0,186g de KCl ajouté à 100ml d'eau distillé, mélangé bien jusqu'à l'homogénéité puis ajouté graduellement le HCL jusqu'à atteint pH=1.
- ✚ Pour le deuxième tampon introduire 5,44 g d'acétate de sodium dans 100 ml d'ED puis ajouté HCl jusqu'à atteint pH=4,5.
- ✚ Une prise de 2.98 ml de Kcl avec un volume de 20 µl d'extrait non dilué, et l'autre essai contient 2.98ml d'acétate de sodium avec 20µl de l'extrait non dilué.
- ✚ La mesure d'absorbance de la prise d'essai dilué avec un tampon pH=1.0 et un tampon à pH=4.5, à la fois 520 et 700 nm.
- ✚ Calculer l'absorbance de l'échantillon dilué (A) comme suit :
- ✚ $Abs = (Abs_{520} - Abs_{700})_{pH1} - (Abs_{520} - Abs_{700})_{pH4.5}$
- ✚ Calculer la concentration de pigment d'anthocyane monomère dans l'échantillon initial, en utilisant la formule suivante :
- ✚ $Pigment\ d'anthocyane\ monomère\ (mg/litre) = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l)$
- ✚ **A** : l'absorbance de l'échantillon ; **MW** :(masse moléculaire de la cyanidine 3-glucoside)= 449,2 g/mol ; **DF** : facteur de dilution de l'échantillon ; **ε** : coefficient d'extinction molaire=26900 $Cm^{-1}.M^{-1}$.

5. Evaluation de l'activité antioxydant

L'activité antioxydant a été évaluée par plusieurs tests .par exemple en retrouve le tests au radical libre DPPH • (2,2-Diphényle-1-picrylHydrazyle) ainsi que le test au radical libre ABTS• qui est obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'- azinobis -(3-éthylBenzoThiazoline-6-Sulfonique).ces deux test sont les plus utilisés mais on peut également retrouver d'autres méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant : FRAP (Guillouty, 2016).

5.1-Méthode de piégeage du radical libre DPPH

a- principe

Le radical DPPH en solution est coloré en violet, en présence d'antioxydant (donneurs de proton) il est réduit en formant une liaison moléculaire stable, le produit réduit présente une coloration qui tire vers le jaune. On mesure par la méthode spectrométrique UV, la diminution de coloration de la solution qui est proportionnelle à la quantité d'antioxydant (Ngakegni-Limbili, 2012).

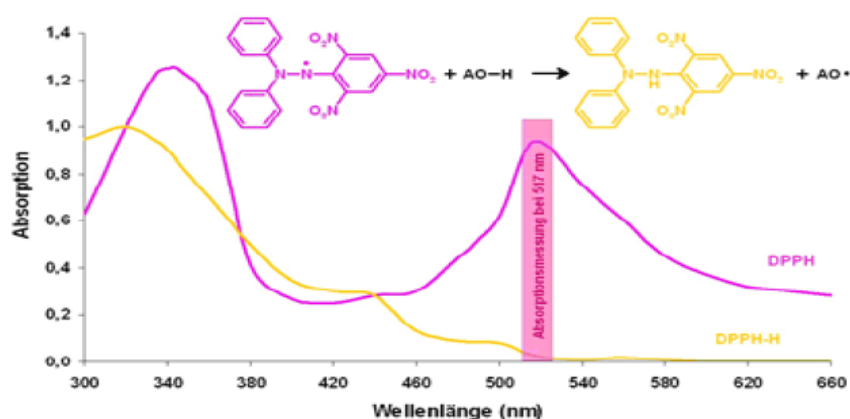


Figure 17 : principe de test du DPPH (Manallah, 2012).

b. protocole expérimentale

La préparation d'une solution mère par le mélange de 0.1ml d'extrait et 0.9ml méthanol.

On fait la manipulation avec deux dilutions d'échantillon d'essai avec des concentrations croissantes différentes, pour chaque essai introduit dans un 0.9ml méthanol une prise de 0.1ml de solution mère puis l'ajout d'un 2.9 ml de DPPH les mélange sont vigoureusement agités au vortex pendant 30min à la température ambiante. Après l'agitation au vortex, la lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre calibré par le méthanol à 517nm. Le contrôle négatif est composé de la solution de DPPH dans le méthanol seul, et le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le résultat du pouvoir anticadicalaire, de l'extrait méthanolique de la graine de *vigna mungo*

Etudiée, exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH qui calculer par la formule :

Pourcentage d'inhibition = $\{(Absc - AbsE) / Absc\} \times 100$

- Absc : absorbance de la solution de DPPH en absence de l'extrait
- AbsE : absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait (**Djeridane, 2006**).

5.2- Méthode au phosphomolybdate pour l'activité antioxydante :

a. principe

La méthode au phosphomolybdène est couramment appliquée dans notre laboratoire pour évaluer la capacité antioxydant totale d'extraits de plants et pour détermine la vitamine E dans une variété de céréales et de graines (**Pilaret al., 1998**). Le principe de dosage du phosphate est la formation e phosphomolybdique par molybdate d'ammonium, et la réduction complexe par l'acide ascorbique (**Keran, 2016**).

b. protocole expérimentale :

On préparer une réactifs mélangée de (0.6 M acide sulfurique ; 4 mM molybdate d'ammonium ; 28mM phosphate de sodium), on prend 2ml de ce dernier avec 0.2ml d'extrait dans les tubes fermé incubé à 95c° pondant 90min, la lecture à 659nm.

6-Spectre d'absorption UV- visible d'anthocyanine de vigna mungo

Principe :

Les balayages spectrophotométries (190 à 800 nm) des extraits bruts d'anthocyanes ont été effectués à l'aide de cuvettes de quartz dans un spectrophotomètre UV-vis de Shimadzu (modèle Multispec-1501, Kyoto, japon), en utilisant des solutions tampons citrate-phosphate de l'extrait brut d'anthocyane à différentes valeurs de PH (**Favaro et al., 2018**).

Protocole expérimentale :

Pour obtenir une solution a pH=1, on préparer (20 mL méthanol et 55 µL HCl (37%)), puis on prend 1,980 mL de cette solution avec 20 µL d'extrait. D'autre part on fait la deuxième solution avec un pH= 3 qui constituant à (20 mL méthanol ; 0,5 µL HCl), de cette solution nous prenons 1,980 ml et mélangé avec 20 µL de l'extrait. La lecture de l'absorbance se fait contre un blanc entre 200 à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Résultats et discussion

1.Rendement d'extraction

L'extraction est une étape très important pour l'isolement et l'identification des principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale. Beaucoup d'études ont montré l'influence des différentes conditions d'extraction sur les rendements d'extraction des composés phénoliques d'origine végétale, tel que le temps et la température d'extraction, le pH, la composition chimique de l'échantillon (**Lopez et al., 2011**). Le méthanol est un solvant très efficace pour l'extraction des composés phénoliques relativement polaires et des polyphénols des plantes (**Zeng et al., 2012**). Pour cela, nous avons utilisés ce solvant pour la préparation d'extrait de *Vigna mungo*.

Un rendement d'extraction d'environ 1,55 % a été obtenu avec le méthanol comme solvant d'extraction. Nos résultat sont relativement similaires par rapport à ceux trouvés par **Orak et al (2018)** qui ont trouvé respectivement des rendements d'extraction de 10,70% pour le solvant de méthanol et 7,97% pour le solvant de l'acétone.

2.Dosage de composés phénoliques et des anthocyanes:

Les résultats d'analyse quantitative polyphénols totaux et en anthocyanes ont été exprimés dans le tableau

Tableau08 : les teneurs en polyphénol totaux et en anthocyanes de l'extrait méthanolique des graines de *Vigna mungo* L

Constituants	Teneur (mgEAG /g _{RS})
Polyphénols totaux	47,42±1,21
Anthocyanines	5,87±0,54

Selon **Arockianathan et al. (2019)** ont signalé respectivement que la teneur de l'extrait éthanolique du *Vigna mungo* en polyphénol est 73,55±5,3 mg/g et 57,78± 3,1 mg/g en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction.

Selon **Kapraelou et al. (2020)** ont trouvé que les teneurs en polyphénols totaux est 29,44± 2,45 µg GAE /mg de l'extrait acétonique.

Selon **Orak et al. (2018)** ont obtenus les teneurs en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et acétonique de *Vigna radiata* L sont respectivement 47.16 ± 0.23, 66.05 ± 2.09 mgEAG/g.

D'après les résultats trouvés par **Arockianathan et al. (2019)** et **Kapravelou et al. (2020)** ; **Orak et al. (2018)** la teneur en polyphénol totaux de vigna varie selon la nature du solvant d'extraction utilisé.



Figure 18 : Le résultat de dosage d'anthocyane du différents pH.

D'après **Ouedraogoet al. (2021)** qui ont fait une étude sur les graines de *Vigna radiata* avec un teneur de 0.848 ± 0.063 mg/g et pour la *Vigna subterranea* teneur est de 0.535 ± 0.025 mg/g.

Par ailleurs, l'étude réalisée par **Mbaiogaou et al. (2013)** sur l'extrait méthanolique des grains de *Vigna subterranea* donnent la valeur suivante $0,331 \pm 0,0023$ mg/g.

Ce qui concernant les anthocyanes nos résultats restent nettement supérieur à celle reporté par **Ouedraogoet al. (2021)** ; **Mbaiogaou et al. (2013)**, donc on dit que les graines de *Vigna mungo* riche en anthocyanes par rapport *Vigna radiata* et *Vigna subterranea*

3. Evaluation des activités antioxydant:

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro in vivo, l'activité antioxydant des extraits des végétaux (**Senthilkumar et al., 2012**).

3.1 Test du radical DPPH :

L'activité antioxydant et anticadicalaire de l'extrait méthanolique *Vigna mungo* L a été mesurée vis-à-vis du radical DPPH par la méthode spectrométrique à 517 nm, la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune. Nos résultats montrent que l'extrait capable de piéger le radical DPPH qui se traduit par la disparition significative de la couleur la couleur violet de la solution DPPH surtout on présence des concentrations élevées d'extrait méthanolique de gramme noir.



Figure 19 :Les résultats après 30min d'incubation de test DPPH

Les résultats du pouvoir antiradicalaire, de l'acide ascorbique et de l'extrait méthanolique des graines de *Vigna mungo*, exprimés en pourcentage du radical DPPH résiduel sont illustré dans

la Figure 19

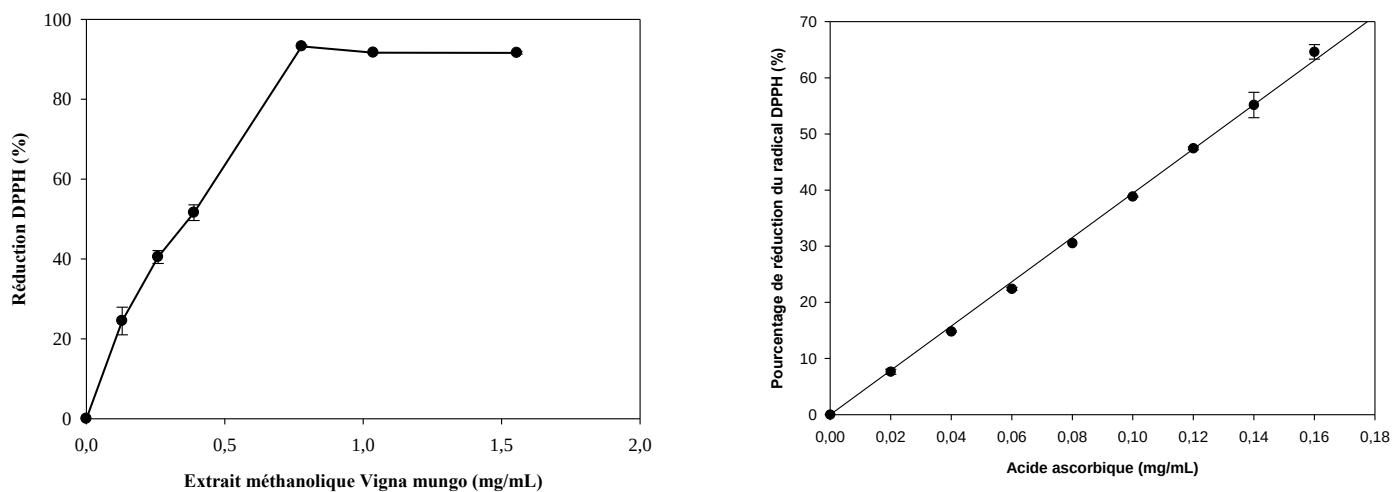


Figure20 : Courbes représentant la variation du pourcentage de la réduction de DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique et de l'extrait des graines de *Vigna mungo*.

On remarque que l'extrait méthanolique de *Vigna mungo* est capable de piéger le radical libre DPPH[•] de manière concentration-dépendante

On constate aussi que le taux de réduction du DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait MeOH dans le milieu.

Les valeurs IC_{50} déterminées en mg/ml expriment la concentration efficace de l'extrait antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de moles de DPPH en dissolution dans le méthanol (Tableau 11.). Selon les résultats enregistrés, l'extrait méthanolique *est* doté d'un pouvoir antioxydant le plus élevé, avec une valeur IC_{50} de 0,37 mg/mL et plus élevée également que celle d'acide ascorbique (IC_{50} = 1,20 mg/mL). La réduction et la décoloration du radical DPPH par notre extrait.

Selon Arockianathan et al. (2019) ont trouvé une EC_{50} de 49,75 et 245 µg/ml pour l'extrait de *vigna mungo*.

D'après les résultats trouvés par Arockianathan et al (2019). Notre l'extrait méthanolique a une activité antiradicalaire plus élevée (IC_{50} = 0,37 mg/mL) par rapport l'extrait éthanolique.

Tableau09 : Les valeurs d' EC_{50} des activités antioxydante de l'extrait méthanolique des graines de *Vigna mungo* L et l'acide ascorbique obtenues par les tests DPPH, phosphomolybdate

Test du pouvoir antioxydant	Acide ascorbique	Graines de <i>Vigna mungo</i> L
DPPH (EC_{50}; mg/ml)	1,20±0.00	0,37
phosphomolybdate (EC_{50} ; mg/mL)	0,095±0,008	0,53

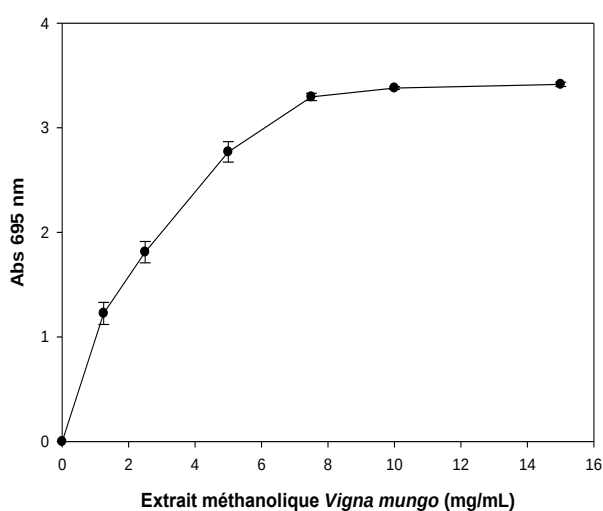
3. 2-dosage de phosphomolybdate (la capacité antioxydant totale) :

Le test phosphomolybdate est basé sur la réduction du Mo (IV) en Mo (V) par les substances antioxydants et la forme réduite du Mo forme un complexe avec le phosphate en milieu acide et à température élevée formant ainsi une solution de couleur vert foncé (Majid et al., 2015).

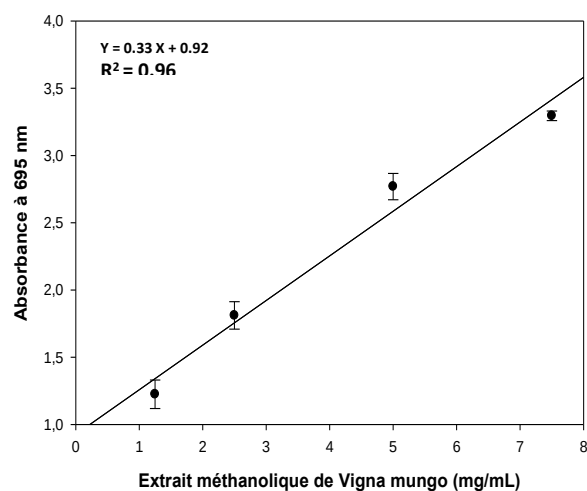


Figure 21 : Résultats du test de phosphomolybdate d'ammonium après 90 min d'incubation.

A partir des résultats indiqués dans la Figure 21 on s'aperçoit que l'extrait méthanolique des graines, exhibent une activité antioxydant remarquable qui augmente avec l'augmentation de leur concentration. Notre extrait méthanolique possède le plus grand pouvoir réducteur avec un IC_{50} 0,53 mg/ml, ce valeur est supérieur à celle obtenus par le standard utilisé (AC. ascorbique) de valeur 0.095 mg/ml.



(A)



(B)

Figure 22 : courbes représenta variation du pourcentage de réduction de phosphomolybdate en fonction de la concentration de l'extrait de *Vigna mungo* (A) et la concentration AC(B)

4. Spectre d'absorption UV- visible d'anthocyanine de *Vigna mungo* :

Les chercheurs ont caractérisé les anthocyanes sur la base de données spectrale UV-Vis. La couleur caractéristique de la molécule a été rapportée pour la première fois par Pauling en 1939, qui a proposé la structure résonante du cation flavylum. La spectroscopie UV-Vis, a été largement utilisée pour l'identification des anthocyanes, lorsqu'il est déchiffré de manière critique, le spectre peut fournir des informations utiles sur la composition structurale des anthocyanes (Saha et al ., 2019).

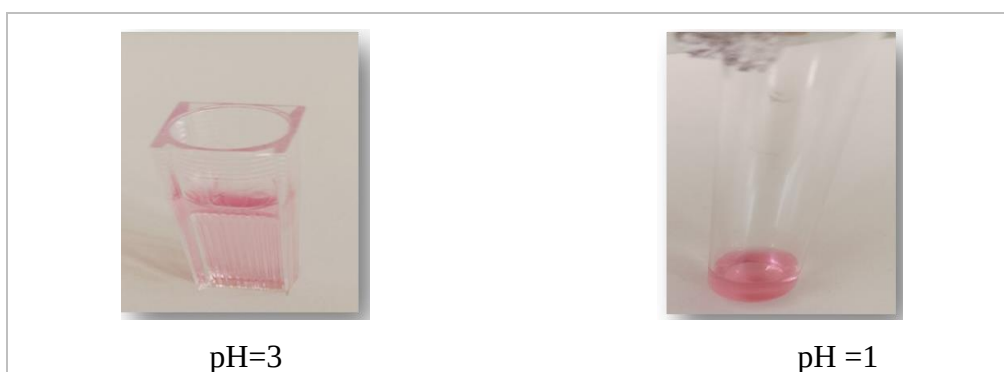


Figure 23 : le résultat obtenu à différent pH

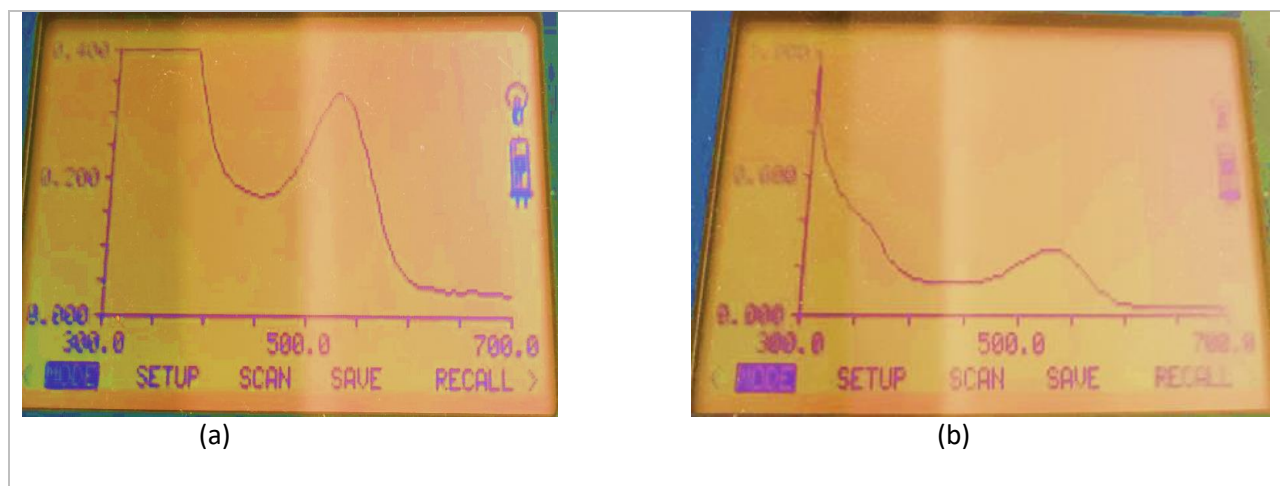


Figure 24 : spectre UV-Vis des anthocyanes totaux de l'extrait de vigna mungo en (a) pH=1 et (b) pH=3

La manière la plus courant d'indiquer les couleurs des anthocyanes est basée sur la présentation des couleurs visibles. D'après la figure 23, on remarque l'apparition d'un pic à pH=1 et pH=3 la longueur d'onde 550 nm ; 525 nm présent respectivement, le pic diminués lorsque le pH augmenté, ces résultats sont identique par rapport à se trouvée par (Laura et al ., 2018). Ces auteurs ont trouvés que les spectres de balayage UV-vis de

Résultat et discision

l'extrait brut d'anthocyane à différentes valeurs de PH permet d'observer le pic caractéristique de la cyanidine-3-glucoside à un PH acide. Nos résultats confirment également la présence de ce composé dans l'extrait méthanolique ($\lambda_{\text{max}} = 525-550 \text{ nm}$).

Les anthocyanes absorbent fortement la lumière entre 460-550nm et présentent donc des couleurs. La pigmentation des anthocyanes est en grande partie due à la charge positive de l'anneau interne de la molécule, mais cette charge dépend du PH. à $\text{PH} < 5$ l'anneau porte la charge positive et à des valeurs de $\text{PH} \geq 5$ l'anneau interne est hydraté donc la charge positive est neutralisée et les anthocyanes perdent leur pigmentation et deviennent incolores (**Laura et al., 2018**).

Conclusion et perspectives

L'extrait méthanolique des graines de *vigna mungo* L. à fait l'objet de la présente étude. Différentes analyses sont appliquées : extraction de polyphénols et le dosage de ces différents composés (polyphénols totaux, anthocyanes) ainsi que l'évaluation des effets antioxydants des extraits de ces graines par deux moyens ; pouvoir réducteur (test de phosphomolybdate d'ammonium et pouvoir de chélation des métaux) d'une part et l'activité antiradicalaire à l'égard du DPPH d'autre part.

Il en ressort de l'analyse des résultats obtenus pour le rendement d'extraction, que le méthanol pur a permis d'obtenir un rendement le plus élevé qui est de 1,55% par rapport aux autres extraits à celui trouvé par d'autres auteurs.

La teneur en composés phénoliques totaux révèlent que la teneur de polyphénols est constatée dans l'extrait méthanolique du *vigna mungo* ($47,42 \pm 1,21$ mg /g). En deuxième lieu on a le dosage des anthocyanes qui a démontré que l'extrait méthanolique du *vigna mungo* présente la valeur la plus élevée $5,87 \pm 0,54$ mg/g par rapport aux autres extraits à ceux trouvés par les autres auteurs. Par la suite, l'activité antioxydante est estimée en déterminant le pouvoir réducteur et l'activité antiradicalaire. (DPPH, phosphomolybdate d'ammonium), L'extrait méthanolique de *vigna mungo* manifestent une activité antioxydante évaluée par le test du DPPH ($IC_{50} = 0,37$ mg/ml) et phosphomolybdate d'ammonium ($IC_{50} = 0,53$ mg/ml).

La spectroscopie UV-Vis, a été largement utilisée pour l'identification des anthocyanes, à différentes valeurs de pH permettent d'observer le pic caractéristique donc le spectre peut fournir des informations utiles sur la composition structurale des anthocyanes à partir de λ_{max} indique la présence de molécule (cyanidine-3-glucoside) qui est absorbée dans cette longueur d'onde.

Cette étude n'a pas exploré toutes les propriétés biologiques de cette graine. Il serait donc intéressant, dans un avenir plus ou moins proche, de compléter ce travail par :

- Une analyse chromatographique en phase liquide à haute performance couplée à une spectrométrie de masse de l'extrait méthanolique des graines de *vigna mungo* afin d'identifier les molécules responsables de l'activité antioxydante ;
- Déterminer d'autres activités biologiques de l'extrait méthanolique

Références bibliographiques

- **ABEDA Zagadou Hermane.** "Optimisation De La Production Des Anthocyanes Par Culture Cellulaire De L'oseille De Guinée [*Hibiscus Sabdariffa* L. (Malvaceae)], Isolment Et Étude De Quelques Activités Biologiques." NANGUI ABROGOUA, 2016.
- **Achat, S. (2013, November).** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Avignon.
- **Amel, B. E. N. L. A. L. D. J. (2017).** Intitulé (Doctoral dissertation, Université d'Oran).
- **Arockianathan, PM, Rajalakshmi, K., &Nagappan, P. (2019).** Composition approximative, composés phytochimiques, minéraux et activités antioxydantes du tégument de *Vigna mungo* L.. *Bioinformation* , 15 (8), 579 .
- **Arora, R. K., &Mauria, S. S. (1989).** *Vigna mungo* (L.) Hepper. Record from Proseabase. PROSEA (plant resources of South-East Asia) foundation. PROSEA Project, Bogor
- **Baligar, V. C., &Fageria, N. K. (2007).** Agronomy and physiology of tropical cover crops. *Journal of Plant Nutrition*, 30(8), 1287-1339.
- **Bansal, R., Sharma, S., Tripathi, K. et Kumar, A. (2019).** La tolérance à l'engorgement du gramme noir [*Vigna mungo* (L.) Hepper] est associée à la teneur en chlorophylle et à l'intégrité de la membrane.
- **Basavarajappa, R., Salakinkop, S. R., Hebbar, M., Basavarajappa, M. P., &Patil, H. Y. (2013).** Influence of foliar nutrition on performance of blackgram (*Vigna mungo* L.), nutrient uptake and economics under dry land ecosystems. *LegumeResearch-An International Journal*, 36(5), 422-428.
- **Bayala, B. (2014).** Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II; Université Ouaga 1 Professeur Joseph Ki-Zerbo (Ouagadougou, Burkina Faso)).
- **Beaudeau, J. L., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Delattre, J., & Legrand, A. (2006, November).** Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote: Implication dans la transcription et la régulation des gènes. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 373-381). Elsevier Masson.
- **Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82.
- **Boukeni, G., &Toum, T. (2020).** Activité antioxydantedes composés phénoliques d'*Asphodelusmicrocarpus* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- **Chastanet, M. (Ed.). (1998).** Plantes et paysages d'Afrique: une histoire à explorer. KARTHALA Editions.
- **Choon, SY, Ahmad, SH, Ding, P., Sinniah, UR et Hamid, AA (2010).** Caractéristiques morphologiques et chimiques des germes de gramme noir (*Vigna mungo* L.) produits dans une chambre à atmosphère modifiée à quatre densités de semis. *Pertanika J. Trop. Agric. Sei* , 33 (2), 179-191.
- **DANGLES, O., & DELUZARCHE, M.** Flavonoïdes et anthocyanes.
- **De Wael, F. (2009).** " Aminopyrazines et imidazopyrazinones: des hétérocycles d'intérêt potentiel en chimie médicinale (Doctoral dissertation, UCL-Université Catholique de Louvain).

- **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654-660.
- **Démarchez, M. (2012).** Le stress oxydant cutané.
- **FAO.(2016).**Légumineuses des grains nutritives pour un avenir durable. Livre ,189. p13.
- **Favaro, LI, Balcão, VM, Rocha, LK, Silva, EC, Oliveira Jr, JM, Vila, MM et Tubino, M. (2018).** Caractérisation physicochimique d'un extrait brut d'anthocyanes des fruits de Jussara (*Euterpe edulis*Martius) : potentiel pour des applications alimentaires et pharmaceutiques. *Journal de la société chimique brésilienne* , 29 , 2072-2088.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
- **Fery, R. L. (2002).** New opportunities in Vigna. *Trends in new crops and new uses*, 424-428.
- **Göhl, B. (1982).** Les aliments du bétail sous les tropiques. FAO, Division de Production et Santé Animale, Roma, Italy, 12, 543p.
- **Goudable.G.Favier.A. (1997).** Radicaux libres oxygen et antioxydant. *Nutre clin* *metabol*1997;11:115-20.
- **Guillouty, A. (2016).** Plantes médicinales et antioxydants (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- **Hamma, S. A., Nouri, N., Fergani, I., Lekhal, A., Cheriet, S., Abadi, N., ... & Benlatreche, C. (2015).** Biologie des espèces réactives et Stress oxydant. *journal algérien de médecine*, 23(2), 48-53.
- **Haytowitz, DB, & Matthews, RH (1986).** Composition des aliments. Manuel agricole , 8 .
- **Kapravelou, G., Martínez, R., Perazzoli, G., Sánchez González, C., Llopis, J., Cantarero, S., & Porres, JM (2020).** La germination améliore le profil polyphénolique et la valeur fonctionnelle du haricot mungo (*Vigna radiata* L.). *Antioxydants* , 9 (8), 746 .
- **Kaewwongwal, A., Kongjaimun, A., Somta, P., Chankaew, S., Yimram, T. et Srinives, P. (2015).** Diversité génétique du pool génétique du gramme noir [*Vigna mungo* (L.) Hepper] telle que révélée par les marqueurs SSR. *Sciences de l'élevage* , 65 (2), 127-137.
- **López, A., Rico, M., Rivero, A., & de Tangil, M. S. (2011).** The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulonscoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125(3), 1104-1109.
- **Mbaiogaou, A., Hema, A., Ouedraogo, M., Palé, E., Naitormbaide, M., Mahamout, Y., & Nacro, M. (2013).** Etude comparative des teneurs en polyphénols et en antioxydants totaux d'extraits de graines de 44 variétés de voandzou (*Vigna subterranea* (L.) Verdcourt). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(2), 861-871.
- **Majid, M., Khan, MR, Shah, NA, Haq, IU, Farooq, MA, Ullah, S., ...& Sajid, M. (2015).** Études sur les activités phytochimiques, antioxydantes, anti-inflammatoires et analgésiques d'*Euphorbiadracunculoides*. *BMC médecine complémentaire et alternative* , 15 (1), 1-15.
- **MANALLAH, A. (2012).** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive Président: Pr. BOURICHE Rapporteur: Pr. BELATTAR

- Nouredine. Pr. Examineur: Pr. BOUZIDI Pr. AMIRA Sétif! (Doctoral dissertation, Université de Sétif 1-Ferhat Abbas).
- **Migdal, C., & Serres, M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. médecine/sciences, 27(4), 405-412.
- **Ngakegni-Limbili, A. C. (2012).** Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserve et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale (Doctoral dissertation).
- **Nguyen, T. T. (2018).** Éco-extraction et encapsulation de pigments caroténoïdes et anthocyanes à partir de plantes tropicales (Doctoral dissertation, Université Bourgogne Franche-Comté).
- **Orak, H. H., Karamac, M., Orak, A., Amarowicz, R., & Janiak, M. (2018).** Phenolics content and antioxidant capacity of mung bean (*Vigna radiata* L.) Seed. YYU J. Agric. Sci, 28, 199-207.
- **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. Analytical biochemistry, 269(2), 337-341.
- **Qin, C., Li, Y., Niu, W., Ding, Y., Zhang, R. et Shang, X. (2010).** Analyse et caractérisation des anthocyanes du mûrier. Journal tchèque des sciences alimentaires , 28 (2), 117-126.
- **Saha, S., Singh, J., Paul, A., Sarkar, R., Khan, Z., & Banerjee, K. (2020).** Anthocyanin profiling using uv-vis spectroscopy and liquid chromatography mass spectrometry. Journal of AOAC International, 103(1), 23-39.
- **Sandeep, S., Singh, R. A., Rajvir, S., Rani, S. I., & Singh, K. K. (2000).** Feed resources for rearing livestock in the Bundelkhand region of Uttar Pradesh. Indian Journal of Animal Sciences, 70(5), 526-529.
- **Senthilkumar, P., & Sudha, S. (2012).** Antioxidant and antibacterial properties of methanolic extract of green seaweed *Chaetomorpha* from Gulf of Mannar: Southeast coast of India.
- **Shweta Katoch, R., & Kumari, M. (2017).** Proximate and anti-nutritional composition of underutilized and common *Vigna* species of Himachal Pradesh. Bull EnvPharmacol Life Sci, 6, 24-31.
- **Theertha, DP, Sujeetha, JARP, Abirami, CK et Alagusundaram, K. (2014).** Effet de la teneur en humidité sur les propriétés physiques et gravimétriques du gramme noir (*Vigna mungo* L.). Journal international des progrès de la recherche et de la technologie, 3 (3), 97-104.
- **Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-biological interactions, 160(1), 1-40
- **Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004).** The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. Current pharmaceutical design, 10(14), 1677-1694.
- **Villedieu, C. (2018).** Rôle de la SIRT3 et de la déacétylation des protéines mitochondriales dans la cardioprotection: effet du vieillissement (Doctoral dissertation, Université de Lyon).
- **Xue, Z., Wang, C., Zhai, L., Yu, W., Chang, H., Kou, X. et Zhou, F. (2016).** Composés bioactifs et activité antioxydante du haricot mungo (*Vigna radiata* L.), du soja (*Glycine max* L.) et du haricot noir (*Phaseolus vulgaris* L.) pendant le processus de germination. Journal tchèque des sciences alimentaires , 34 (1), 68-78.

- **Yoshikawa, T., Yamamoto, Y., & Naito, Y. (2000).** Free radicals in chemistry, Biology and Medicine, Ed. Oica International.
- **Zeng, X., Suwandi, J., Fuller, J., Doronila, A., & Ng, K. (2012).** Antioxidant capacity and mineral contents of edible wild Australian mushrooms. Food Science and Technology International, 18(4), 367-379.

RESUME

Dans ce travail l'activité antioxydante des graines de *Vigna mungo* a été étudiée en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. Un rendement d'extraction d'environ 1.55% a été obtenu par macération à froid pendant 24h. Les analyses quantitatives montrent que la teneur de l'extrait méthanolique des graine de *Vigna mungo* en polyphénols et en anthocyanes sont respectivement, $47,42 \pm 1,21$ (EAG mg /grs) et $5,87 \pm 0,54$ (EAG mg /grs).

La mesure de l'activité antioxydante et du pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et la méthode de phosphomolybdate d'ammonium montre respectivement qu'il possède une activité antioxydante considérable avec des valeur IC_{50} de 0,37mg/mL et 0,53 mg/mL.

L'analyse du spectre d'absorption UV-visible de l'extrait méthanolique aux pH acide, montre l'existence de deux pics qui correspondent à la cyanidin 3-O-rutinoside et à la pelargonidin 3-O-rutinoside (λ_{max} 540 nm à pH =1 ; λ_{max} 525 nm à pH=3).

La graine de *Vigna mungo* L. est considérée donc être considéré comme une source naturelle prometteuse d'anthocyanes comme antioxydants d'intérêt biotechnologique.

Mot clés : *Vigna mungo*, extrait méthanolique ; anthocyanes, pouvoir antioxydant.