

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

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

**Étude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques
de deux variétés de lentille « *Lens culinaris* » de la région
de Sidi –makhlouf.**

Présenté par : DJEDID Aicha

Devant le jury :

Président : BERRAMDANE Tayeb (MAA)

Rapporteur : BOUSSOUSSA Hadjer (MCA)

Co-Rapporteur : KHACHEBA Ihen (MCA)

Examinatrice : KRAZA LAMIA (MAA)

Année universitaire 2018/2019.

Dédicace

Ce mémoire représente l'aboutissement du soutien et des encouragements que tous mes proches m'ont prodigués je la dédie spécialement.

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à :

Mon marié, ma mère et mon père pour son amour et son encouragement depuis toujours, je dit merci ma mère, tu es la meilleure j'en suis sûr. A mon père qui m'a su encouragée pour les efforts considérables fournis pour mon éducation.

Mes frères (chacun à son nom)

Mes amies : Rym, Djahida, Sabrine, Fadila, Fatima, Halima et Aicha

Tout le nombre de ma famille DJEDID et MAACHE

Tous mes collègues de la promotion de Master II Biochimie appliquée 2019

Tout personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études

Merci de faire partie de ma vie

Remerciement

Tout d'abord, je rends grâce à Dieu le tout puissant qui m'a donné la force, le courage, la santé et la patience d'accomplir ce travail.

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés

Le thème de ce mémoire a été proposé par Mme **BOUSSOUSSA Hadjer**, maitre de conférences à l'université de Laghouat. Je la remercie vivement pour avoir accepté d'encadrer ce sujet, ainsi pour ses orientations, ses judicieux conseils et sa disponibilité tout au long de l'évaluation de mon projet.

Mes remerciements vont aussi aux membres de jury, Monsieur Berramdane Tayeb et Madame Kraza Lamia pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je remercie vivement le Dr **CHAIBI Rachid** chef de département de biologie à l'université de Laghouat.

Ces remerciements ne peuvent se terminer sans remercier ma famille, mon mari pour toute sa patience, A ma Maman, merci d'avoir toujours été derrière moi et de m'avoir soutenue toutes ces années. A mon Papa, merci d'avoir été là et de m'avoir poussé à persévérer dans cette voie.

Table des matières

Résumé

Listes des tableaux

Listes des figures

Listes des abréviations

Introduction.....	02
CHAPITRE I : La synthèse bibliographique.....	04
I. Présentation de l'espèce étudiée.....	05
I.1 Définition.....	05
I.2 Taxonomie.....	05
I.3 Description botanique.....	06
I.4 Les valeurs nutritionnelles dans les lentilles.....	07
I.5 Les métabolites secondaires dans les lentilles.....	08
II. L'activité antioxydante.....	09
II.1 Le stress oxydant.....	09
II.2 Les radicaux libres.....	10
II.3 Les antioxydants.....	11
CHAPITRE II : Matériels et méthodes.....	13
I. Le matériel végétale.....	14
II. Méthode d'extraction.....	14
III. Dosage des polyphénols totaux.....	17
IV. Dosage des flavonoïdes.....	18
V. Evaluation du pouvoir antioxydant.....	19
V.1 Test de DPPH.....	19
V.2 Test de phosphomolybdate PPM.....	20
CHAPITRE III : Résultats et discussion.....	21
I. Détermination du rendement d'extraction.....	22
II. Résultats de dosage des composés phénoliques.....	23

II.1 Teneur en phénols totaux.....	23
II.2 Teneur en flavonoïdes.....	25
III. L'étude du pouvoir antioxydant.....	27
Conclusion	38
Références bibliographiques	41
Annexe	45

ملخص

تحتوي المستخلصات الطبيعية من النباتات على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية التي تمتلك قدرات مضادة للأكسدة.

تحقيقاً لهذه الغاية، تم تكريس العمل الحالي تقدير المستخلصات الطبيعية لأنواع

من خلال دراسة قوتها المضادة للأكسدة *Lens culinaris*.

الجزء الأول من هذا العمل، مكرس لاستخراج المكونات النشطة باستخدام المذيبات العضوية المختلفة، وأظهرت مقتطفات أن لدينا غلة متغيرة للغاية. في المقام الثاني، قمنا بتحديد كمية المركبات الفينولية و الفلافونويدات في خلاصتنا. النتائج التي تم الحصول عليها تعكس أن هذا النوع غني نسبياً بالمركبات الفينولية.

في الجزء الأخير درسنا قوة مضادات الأكسدة في مقتطفات لدينا عن طريق الاختبارات الكيميائية:

و DPPH PPM تؤكد النتائج أن المستخلصات لدينا لها نشاط مضاد للأكسدة منخفض.

Résumé

Les extraits naturels, issus des végétaux contiennent une variété de composés phénoliques qui possèdent des capacités antioxydantes.

A cet effet, le présent travail a été consacré à la valorisation des extraits naturels de l'espèce de *Lens culinaris* par l'étude de son pouvoir antiradicalaire.

La première partie de ce travail, est consacrée à l'extraction des principes actifs en utilisant différents solvants organiques, nos extraits ont montré des rendements très variables. Dans un second lieu, nous avons procédé à la quantification des composés phénoliques et des flavonoïdes de nos extraits. Les résultats obtenus reflètent que cette espèce est relativement riche en composés phénoliques.

Dans la dernière partie nous avons étudié le pouvoir antioxydant de nos extraits par les tests chimiques : DPPH et le PPM. Les résultats confirment que nos extraits possèdent des activités antioxydantes faibles.

Mots clés : Lentille (*Lens culinaris*), Composés phénoliques, Activité antioxydante, DPPH, Phosphomolybdate.

Abstract

Natural extracts from plants contain a variety of phenolic compounds that possess antioxidant capabilities.

To this end, the present work was devoted to the valorisation of the natural extracts of the *Lens culinaris* species by the study of its antiradical power.

The first part of this work, is devoted to the extraction of active ingredients using different solvent, our extracts showed very variable yields. In a second place, we proceed to the quantification of the phenolic compounds and flavonoids of our extracts. The results obtained reflect that this specie is relatively rich in phenolic compounds.

In the last part we studied the antioxidant power of our extracts by the chemical tests DPPH and PPM. The results confirm that our extracts possess low antioxidant activity.

Keywords : Lentil (*Lens culinaris*), Phenolic compounds, Antioxidant activity, DPPH, Phosphomolybdate.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification de l'espèce (<i>Lens culinaris</i>).....	06
Tableau 02: Valeurs de certains composés phytochimiques bioactifs de lentilles.....	08
Tableau 03 : Les principaux radicaux libres.....	10
Tableau 04: Rendement et couleur des différents extraits.....	22
Tableau 05 : Teneurs en phénols totaux des différents extraits de <i>Lens culinaris</i>	24
Tableau 06 : Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de <i>Lens culinaris</i>	26
Tableau 07 : Les valeurs d'EC50 en (mg/mL) des différents extraits et les antioxydants standards.....	31
Tableau 08 : Les valeurs des VCEAC en (mg/mL) des différents extraits et les antioxydants standards.....	36

Liste des figures

Figure 01 : Les différentes étapes de la description morphologique de la lentille.....	07
Figure 02 : Produits phytochimiques bioactifs et essentiels nutriments des graines de lentille.....	09
Figure 03 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.....	11
Figure 04 : Photo illustrant les graines de lentille verte et rouge (original 2019)	14
Figure 05: Photos de l'extraction et le fractionnement des lentille (original 2019)	15
Figure 06 : protocole résumant les différentes étapes de l'extraction	16
Figure 07 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	18
Figure 08 : : La courbe d'étalonnage de la quercétine.....	19
Figure 09 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	20
Figure 10 : Histogramme des rendements d'extraction des quatre échantillons de lentille.....	23
Figure 11: Histogramme des teneurs en phénols totaux.....	25
Figure 12 : Histogramme des teneurs en flavonoïdes.....	27
Figure 13 : % d'inhibition de DPPH en fonction de concentration pour la L.V.....	28
Figure 14 : % d'inhibition de DPPH en fonction de concentration pour la L.R.....	28
Figure 15 : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en antioxydants standards choisis pour l'étude.....	29
Figure 16 : Histogramme les % d'inhibition des deux extraits DCM et ACT pour les quatre échantillons de lentille.....	30
Figure 17 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols de L.R issus d'une extraction hexanique.....	32
Figure 18 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction dichlorométhane.....	33

Figure 19 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction d'acétate d'éthyle.....34

Figure 20 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en antioxydants de référence.....35

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

ADN : Acide désoxyribonucléique

AlCl₃ : chlorure d'aluminium

DPPH : 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EAG : équivalent en acide gallique

EQ : équivalent en quercétine

g : gramme

IC 50 : concentration inhibitrice de 50 % de l'activité

L : litre

L.R C : lentille rouge cuisson

L.R : lentille rouge

L.V C : lentille vert cuisson

L.V : lentille vert

M : mol

MeOH : méthanol

mg : Milligramme

min : Minutes

ml : Millilitre

PPM : phosphomolybdate

s.sp : sous espèce

UV : Ultraviolet

V : volume

VCEAC : Vitamine C Equivalent Antioxydant Capacity

Introduction générale

INTRODUCTION :

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches. Dans le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires (Kanoun,2011).

La flore algérienne regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologique. La maîtrise totale et parfaite des différentes propriétés de ces plantes, qui passe par la détermination de l'ensemble des groupes physiologiques capables d'engendrer un ou plusieurs effets pharmacologiques, est aujourd'hui un objectif qui occupe un ordre de première place dans le monde entier (Bentabet et *al*, 2014).

Les légumineuses ont une grande importance au niveau agricole. Elles sont classées au deuxième rang mondial derrière les céréales. Elles sont cultivées pour leurs graines et constituent une part importante de l'alimentation dans le monde, particulièrement dans les pays en développement où elles sont une source de protéines pour l'Homme (Annane et Haddad, 2015).

Les grains secs comme le haricot (*Phaseolusvulgaris*), la lentille (*Lens culinaris*), le pois (*Pisumsativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), et la fève (*Vicia faba*) sont les légumineuses les plus consommées à travers la région méditerranée (Bouزيد, 2017).

Dans le corps humain, les produits chimiques exogènes et les processus métabolique pourraient produire fortement des radicaux libres, particulièrement les espèces réactives à l'oxygène (ERO), capable d'oxyder les biomolécules, ayant pour résultat la mort des cellules et la destruction des tissus (Ben Tireche et Achour, 2014).

INTRODUCTION :

Dans cette étude, notre travail sera divisé en trois principales parties :

Dans le premier chapitre nous avons commencé par une étude bibliographique qui regroupe une description détaillée de l'espèce étudiée, ainsi qu'un aperçu globale sur l'étude des radicaux libres et le stress oxydant, ceci est suivi par un rappel sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante.

Le deuxième chapitre est consacré aux méthodes expérimentales utilisées dans ce travail qui porte sur l'extraction et le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes et finalement l'étude de l'activité antioxydante des extraits de cette plante, par deux tests :le piégeage du radical libre DPPH et le test de phosphomolybdate.

Enfin dans le troisième chapitre nous avons présenté les résultats obtenus et leurs discussions suivi d'une conclusion générale et perspectives de ce travail.

CHAPITRE I :

La synthèse bibliographique

CHPITRE I : La synthèse bibliographique

I. Présentation de l'espèce étudiée

I.1 Définition

Le nom scientifique « *Lens culinaris* » a été donné à la plante (lentille cultivée), en (1787) par le botaniste et physicien Allemand : **MEDIKUS (Aissani et Achi, 2018)**.

Cette espèce est classée en deux sous espèces selon la taille de la graine :

- Le s.sp ***macrosperma*** (diamètre supérieur à 6 mm) est prédominant principalement en Afrique du Nord, en Europe et en Amérique.
- Le s.sp ***microsperma*** (diamètre inférieur à 6 mm) domine en Asie, en Egypte, et en Ethiopie (**Hammouda et Khalfallah, 2015**).

Lens culinaris (*Leguminosae*) est une plante annuelle buissonnante et herbacée cultivée dans le monde entier pour ses graines comestibles. Les humains ont connu les lentilles (*Lens culinaris* L.) depuis l'aube de la civilisation. Ils sont constituent une source importante de aliments pour l'homme dans les pays méditerranéens. Trônant parmi les légumineuses ayant la plus petite taille, la lentille a l'avantage de nécessiter un temps de cuisson plus court que la majorité des légumineuses.

Durant la dernière décennie; on estime que la consommation mondiale de lentilles a augmenté d'environ 3% par année. La lentille est surtout cultivée pour ses graines mûres qui sont consommées principalement en sauce et en soupe. Les jeunes gousses, les graines germées et les feuilles se consomment comme légume (**Annane et Haddad, 2015; Bartolome, 1997; Mohammad et al, 2015; Mo'ez Al-Islam Ezzat et al. 2013**).

I.2 Taxonomie

L'espèce *Lens culinaris* (lentille cultivée) appartient au genre *Lens*, classé dans la tribu des *Viciae*. Lors d'une révision récente du genre *Lens* (**Riah, 2014**).

CHPITRE I : La synthèse bibliographique

Tableau 01: Classification de l'espèce (*Lens culinaris*) (Almi, 2016; Bouzid, 2017).

Règne	<i>Plantae</i>
Super division	<i>Spermatophyta</i> – semences de plantes
Division	<i>Magnoliophyta</i> – plante en floraison
Classe	<i>Magnoliopsida</i> – dicotylédones
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>- légumineuse
Genre	<i>Lens</i>
Espèce	<i>Lens culinaris</i>

I.3 Description botanique

Plante dicotylédone, herbacée annuelle de **20 à 40 cm** de hauteur, fait partie des légumes secs.

Racine: Pivotante mince.

Tige : Dressée et très rameuse, carrée mince, atteinte rarement plus de **45 cm** de hauteur et a une croissance indéfinie.

Feuilles: alternes, composés et pennées à **5-16** folioles, généralement terminées par une vrille ou une soie.

Fleurs et floraison : à la corolle papilionacée typique de la sous-famille des

Fabaceae, sont de couleur blanche ou bleue pâle et groupées par petites grappes de deux à quatre. La floraison estivale intervient entre mai et juillet.

Fruit : Gousse rhomboïde aplatie, courte, contenant deux graines aplaties en forme caractéristique de disque faiblement bombé.

CHPITRE I : La synthèse bibliographique

La couleur des graines varie selon les variétés des plus pâles (vert pâle, blond, rose) au plus foncé (vert foncé, brun, violacé...) (Aissani et Achi, 2018; Bouzid, 2017).



Plante



Fleur



Gousse



Graines

Figure 01 : Les différentes parties de la lentille (Aissani et Achi, 2018; Bouzid, 2017).

I.4 La valeur nutritionnelle des lentilles

La lentille présente plusieurs intérêts nutritionnels, parmi ces intérêts on distingue :

- Les lentilles sont considérées comme une bonne source de protéines.
- Les glucides totaux représentent la principale composante de graines de lentilles avec amidons occupant la majeure partie de la masse glucidique. Parmi les 23 grains de

CHPITRE I : La synthèse bibliographique

légumineuses à grains, le rendement en amidon provenant des lentilles est le deuxième plus élevé, avec **47,1%**.

- Leur richesse en minéraux – notamment en Fer, Magnésium, Phosphore et Potassium – contribue à couvrir les besoins quotidiens. Au même titre qu’elles représentent une bonne source de vitamines du groupe B (**Annaneet Haddad, 2015; Mo’ez Al-Islam Ezzat. F et al. 2013**).

La lentille fait partie de l’alimentation de base, elle est surtout cultivée pour ses graines mûres. Sur le plan nutritionnel, la lentille constitue une composante importante de la ration alimentaire de nombreuses familles vers le monde, pour lesquelles elle fournit des protéines essentielles et des calories (**Aissani et Achi, 2018**).

I.5 Les métabolites secondaires dans les lentilles

Les lentilles ont le contenu phénolique total (**CTP**) le plus élevé en comparaison avec six autres impulsions courantes. Par milles polyphénols, les tanins et les composés apparentés aux tanins sont principal chez les lentilles. leur teneur en tanins condensés, jusqu’à **915 mg / 100 g** (**Mo’ez Al-Islam Ezzat et al. 2013**).

Tableau 02: Valeurs de certains composés phytochimiques bioactifs de lentilles(**Mo’ez Al-Islam Ezzat et al. 2013**).

Composé phytochimique bioactif	Contenu (pour 100 g)
Polyphénols totaux	26 mg (GAE / 100 g poids frais)
Flavonoïdes	221 mg de catéchine équivalent.
Glycosides de flavonones	33,1–186,0 lg
Glycosides de flavonoles	9.6–241 lg
Procyanidines tétramères	18,5–59,5 lg
Tanins condensés	870 mg de catéchines équivalent.
Catéchine	919–1 633 lg

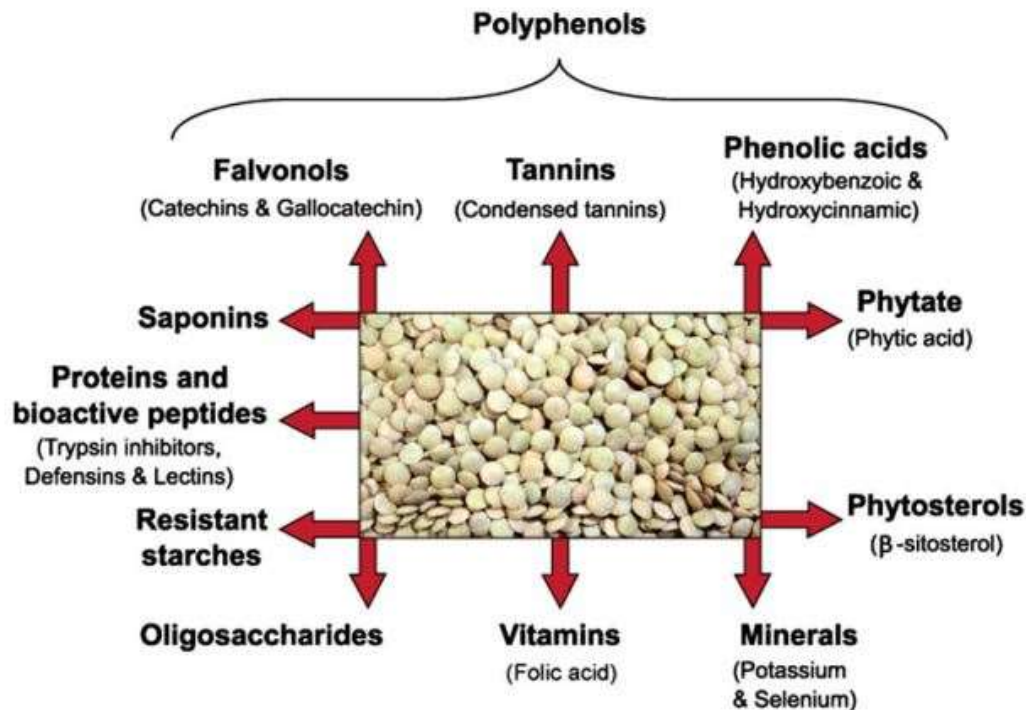


Figure 02 : Produits phytochimiques bioactifs et essentiels nutriments des graines de lentille (Mo'ez Al-Islam Ezzat et al. 2013).

II. L'activité antioxydante

II.1 Le stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs.

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines provoquant des altérations bases, des pontages ADN protéines, de lipides (peroxydation lipidique) et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Demmana et al, 2018).

CHPITRE I : La synthèse bibliographique

II.2 Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et que leur durée de vie est courte(Hocine et Gorine, 2017).

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (**ERO**). Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée), etc. Les radicaux libres sont des espèces chimiques très instables qui jouent un rôle dans l'action de certains traitements anticancéreux, de même qu'à l'origine du vieillissement (**Manallah, 2012**).

Tableau 03 : Les principaux radicaux libres (Hocine et Gorine, 2017).

Oxygène	O ₂
Oxygène singulet	¹ O ₂
Anion super oxyde	O ₂ . -
Radical hydroxyle	OH
Radical hydroperoxyde	HOO
Radical peroxyde	ROO
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyle	RO .
Peroxyde d'hydrogene	H ₂ O ₂
Radical oxyde nitrique	NO .

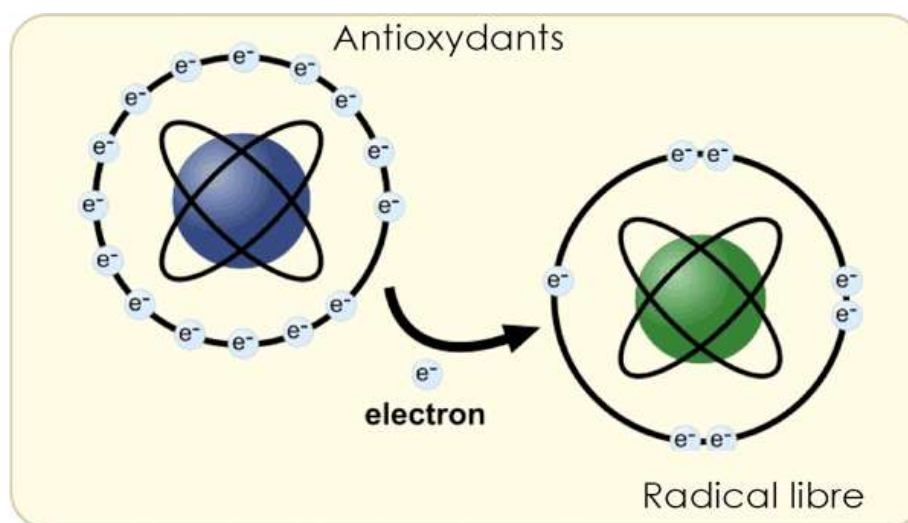


Figure 03 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.

II.3 Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances qui inhibent ou ralentissent l'oxydation d'un substrat. Ils sont présents sous de nombreuses formes et peuvent intervenir en prévention de la formation des radicaux libres, aussi bien que pour participer à leur élimination (antioxydants primaires et secondaires) (**Guillouty, 2016**).

II.3.1 Les composés phénoliques comme antioxydants naturels

Une grande partie de ces molécules est présente dans l'alimentation. Les plus connus sont les acides phénoliques (benzoïque ou cinnamique), les flavonoïdes, et les tanins. Les stilbènes et le lignan sont moins connus(**Bouguerne, 2012**).

- **Les flavonoïdes :**

Le terme flavonoïde rassemble de nombreux composés naturels répartis en plusieurs familles dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanines.

- **Les acides phénoliques :**

Les acides phénoliques sont divisés en deux catégories : les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique ou vanillique et les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide caféique, coumarique, sinapique et férulique. Ces derniers ont une bonne activité antioxydante.

CHPITRE I : La synthèse bibliographique

- **Les tannins**

Les tannins sont des polyphénols de structure complexe, avec une activité antioxydante très puissante due au piégeage de O₂ •- grâce aux différents groupes phénoliques(**Bouguerne, 2012**).

CHAPITRE II :

Matériels et méthodes

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche d'antioxydants naturels afin d'évaluer les propriétés antioxydantes des polyphénols des légumes secs de deux variétés de lentille: verte et lentille rouge (*Lens culinaris*).

Cette évaluation est liée à la teneur totale en phénol et en antioxydant pour découvrir de nouvelles sources potentielles de ressources naturelles.

I- Le matériel végétal

Les graines de lentilles vertes et rouges utilisées dans ce travail ont été obtenus à partir d'un cultivateur dans la région de Sidi -makhlouf.



Figure 04 : Photo illustrant les graines de lentille verte et rouge (original 2019).

II- Méthode d'extraction

II.1 Préparation des échantillons

Nous avons utilisé dans notre étude quatre échantillons de lentille (figure 05) avec cuisson (15 min à 70°C) et sans cuisson, qui ont été broyés à l'aide d'un mixeur électronique (10 g de chaque échantillon de lentille) jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et par la suite cette poudre est tamisée à la même granulométrie et utilisée pour l'extraction.

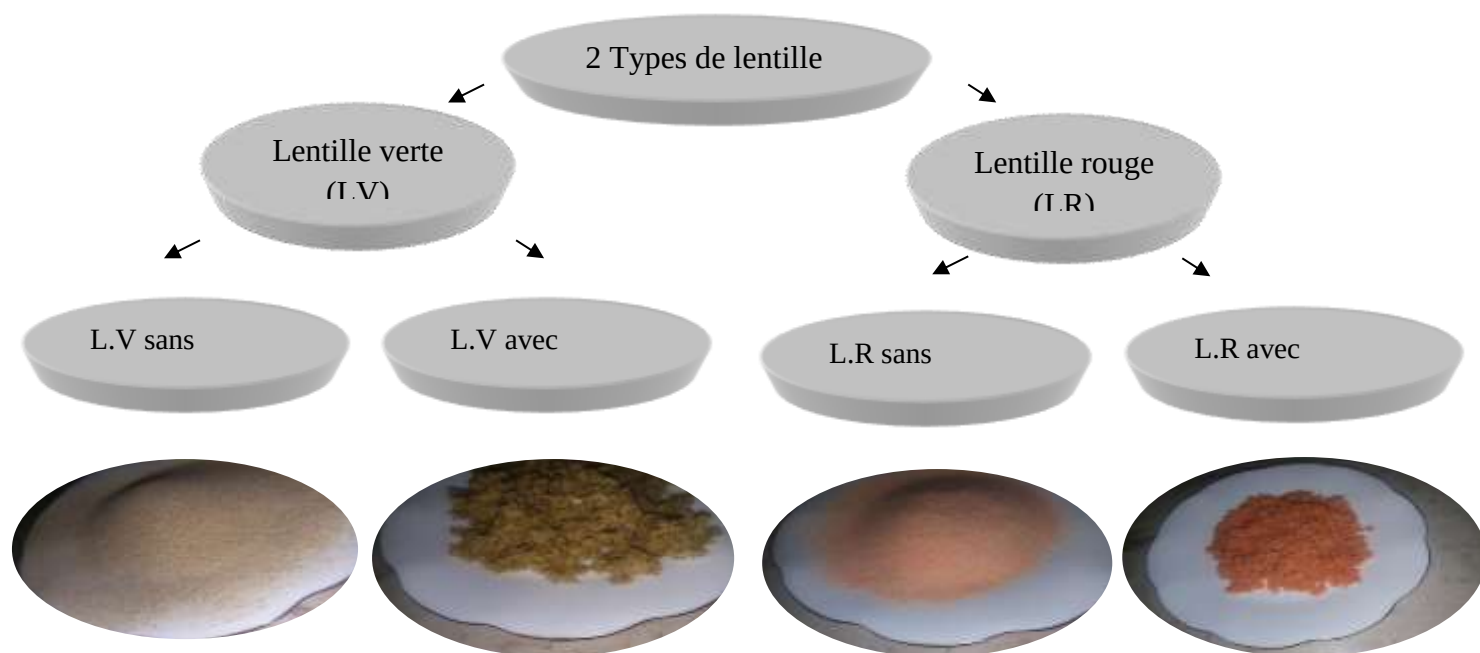


Figure 05 : Les quatre échantillons de lentille après le broyage (original 2019).

II.2 Préparation des extraits

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules contenues dans les lentilles en utilisant des solvants organiques de polarité croissante.

Le protocole consiste à des macérations successives à froid dans trois solvants organiques différents à savoir ; l'hexane **HEX**, le dichlorométhane **DCM** et l'acétate d'éthyle **ACT**.

La figure **06**, résume les différentes étapes d'extraction avec les solvants choisis pour les quatre variétés de lentilles.

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

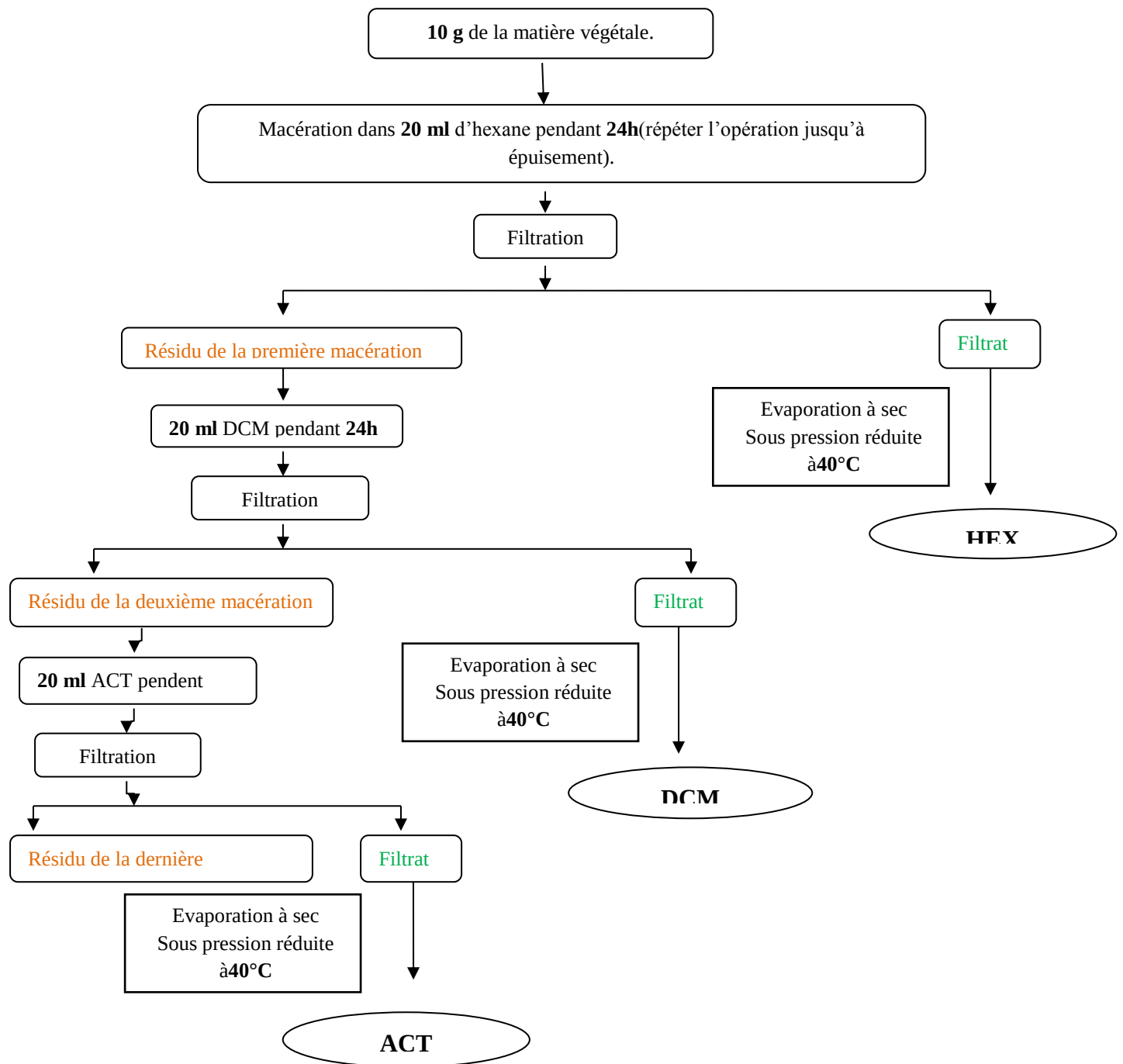


Figure 06 : protocole résumant les différentes étapes de l'extraction.

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

- **Calcul du rendement d'extraction**

Les rendements d'extraction ont été déterminés par la formule suivante :

$$R\% = (m / m_0) \times 100$$

R% : rendement exprimé en %

m : masse en gramme de l'extrait sec résultant.

m₀ : masse en gramme du matériel végétal à traiter.

III- Dosage des polyphénols totaux

III.1 Le principe

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu décrite en 1965 par Singleton et Ross (**Manallah, 2012**).

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Kanoun, 2011**). L'absorbance est proportionnelle à la quantité des phénols présents (**Ait Baziz et Chemali, 2017**).

III.2 Le protocole

100 µL de chaque solutions diluées ou d'extrait est ajouté **500µL** du réactif de Folin – Ciocalteu, après **2 min** d'incubation on additionne **2 ml** de Na_2CO_3 puis, le mélange **2%** est incubé dans l'obscurité pendant **30 min** à une température ambiante.

L'absorbance de chaque solution préparée est mesurée par un spectrophotomètre UV-Visible, à une longueur d'onde de **760 nm** contre un blanc.

III.3 La courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations (**mg/g**).

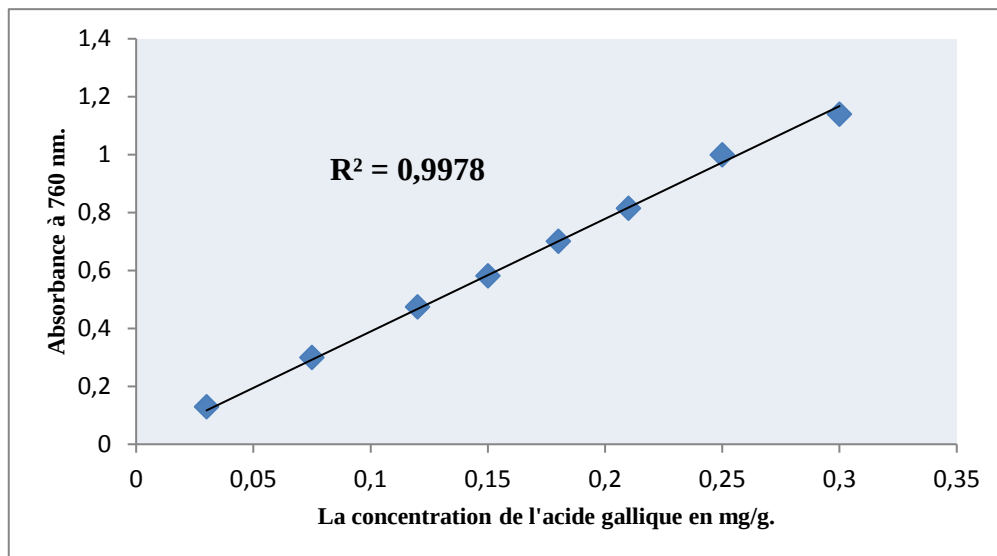


Figure 07 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

IV-Dosage des flavonoïdes

IV.1 Le principe

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits, et des différentes fractions a été déterminée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (**Ait Baziz et Chemali, 2017**).

Selon Lamaison et Carnat, cette méthode est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, ayant le maximum d'absorption à **430 nm** (**Djeridane et al, 2006**).

IV.2 Le protocole

500µL de chaque dilution ou extrait a été mélangé avec **500µL** de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à **2%**. Après incubation dans l'obscurité pendant **20 min** et à une température ambiante, on mesure l'absorbance à **430 nm**.

IV.3 La courbe d'étalonnage

La quercétine a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. La concentration du mélange réactionnel a été mesurée à **430 nm**. Avec un spectrophotomètre UV – Visible et la teneur en flavonoïdes a été exprimée en **mg** par **g** d'équivalent quercétine.

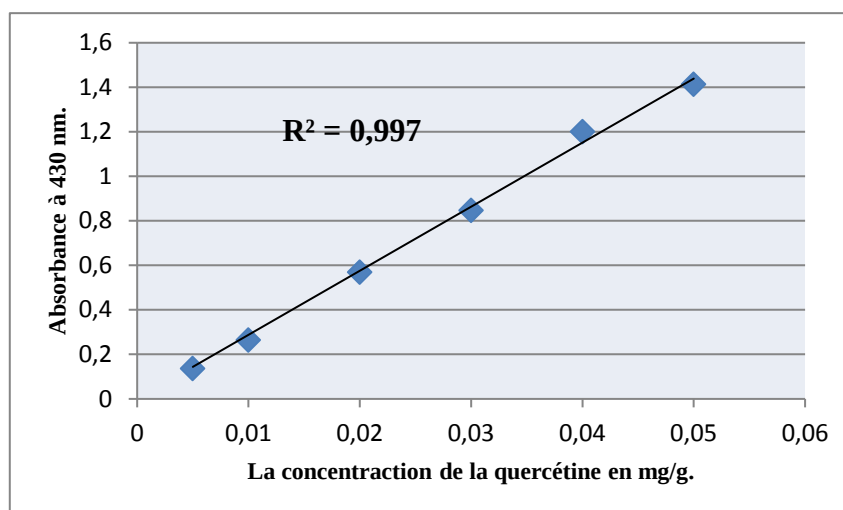


Figure 08 : La courbe d'étalonnage de la quercétine.

V- Evaluation du pouvoir antioxydant

Dans notre travail, pour étudier la capacité antioxydante des extraits de lentille, les tests utilisés sont le DPPH et le PPM.

V.1 Test de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle(DPPH)

Le composé chimique 2,2- diphényl -1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation en solution provoque aussi la couleur bleue violette bien caractéristique de la solution de DPPH (**Ait Baziz et Chemali, 2017**).

Le test au radical DPPH est généralement utilisé pour les composés, qui contiennent les groupements donneurs d'hydrogène, comme R 2 -NH, R-OH et R-SH. Lorsque le DPPH• réagit avec un antioxydant, un atome d'hydrogène vient se fixer sur le radical, ce qui entraîne une perte de couleur. C'est ce qui permet le suivi de l'efficacité d'un antioxydant par spectrophotométrie (**Guillouty, 2016**).

Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH par les extraits a été calculé comme suit :

$$I\% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Ac: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

AE: absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

La concentration inhibitrice de 50 % du DPPH (IC₅₀) de chaque extrait a été par la suite calculée : (**Trabsa, 2015**)

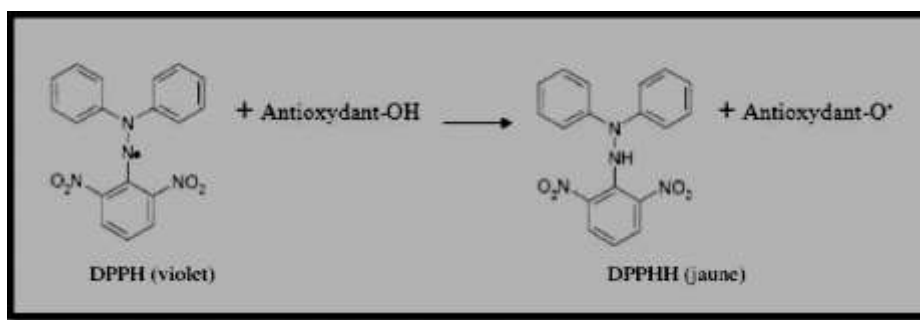


Figure 09 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Rolland, 2004).

V.1.1 Le protocole

0.5 ml de la solution DPPH ($C=250\mu\text{M}$ solubilisé dans le méthanol) + **0.5 ml** de chaque échantillon dilué ou standards.

V.2 Test de phosphomolybdate (PPM)

Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait phénolique – antioxydant) vers le complexe oxydant phosphomolybdate (PPM). Ce transfert dépend de potentielle redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

En effet le test du (PPM) est basé sur la réduction du molybdate de l'étage d'oxydation (VI) à l'étage de l'oxydation (V) en présence de l'antioxydant. Cette réduction, se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate / Mo(V)) à un pH acide. La diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) est mesurée par spectroscopie UV-visible à une longueur d'onde de 695 nm (Benarous, 2014).

V.2.1 Le protocole

Réactifs :

- $\left\{ \begin{array}{l} \textbf{4 mM} \text{ molybdate d'ammonium} \\ \textbf{0.6 M} \text{ acide sulfurique} \\ \textbf{28 Mm} \text{ phosphate de sodium} \end{array} \right.$

$\Longrightarrow$ **2 ml** du réactif phosphomolybdate + **0.2 ml** de chaque échantillon dilué ou standards.

Chapitre III :

Résultats et discussion

I. Détermination du rendement d'extraction

Les rendements d'extraction obtenus ainsi que les couleurs des extraits sont présentés dans le tableau et la figure ci-dessous (Tableau 04 et figure 10).

Tableau 04 : Rendement et couleur des différents extraits.

	L'échantillon	Couleur	Rendement %
HEX	L.V	Jaune clair	1,8
	L.R	Jaune clair	2,2
	L.V C	Transparent	0,4
	L.R C	Transparent	0,4
DCM	L.V	Jaune clair	1,8
	L.R	Jaune clair	1,4
	L.V C	Transparent	1,6
	L.R C	Transparent	2,4
ACT	L.V	Jaune clair	1,2
	L.R	Jaune clair	0,6
	L.V C	Transparent	0,4
	L.R C	Transparent	2,7

Au regard du tableau précédent, nous avons remarqué que tous les extraits ont montré différentes couleurs variant du jaune claire pour les lentilles vertes et rouges, tandis que les échantillons de lentilles vertes et rouges utilisés après cuisson sont sans couleur (résidu transparent) pour tous les solvants organiques.

Sachant que la procédure d'extraction pour les quatre échantillons de lentille est effectuée dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats obtenus montrent des rendements

d'extraction différents. On a remarqué que les rendements des extraits hexaniques varient de **0,4 à 1,8 %** et pour les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle varient de **1,4 à 2,4 %** et **0,4 à 2,7 %** respectivement.

En analysant les résultats du Tableau (04), nous avons déduit aussi que les plus hauts rendements ont été enregistrés dans l'extrait d'acétate d'éthyle avec un rendement de **2,7 %**. Les solvants les moins polaires ont montré de faibles rendements de **1,4 à 2,4%** et **0,4 à 1,8 %** pour les extraits dichlorométhaniques et les extraits hexaniques respectivement.

Cette différence dans les rendements pourrait être due principalement à la richesse ou la pauvreté de l'échantillon en composés solubles dans les solvants utilisés ou bien à la taille des particules de la poudre végétale (Vermerris et Nicholson, 2006).

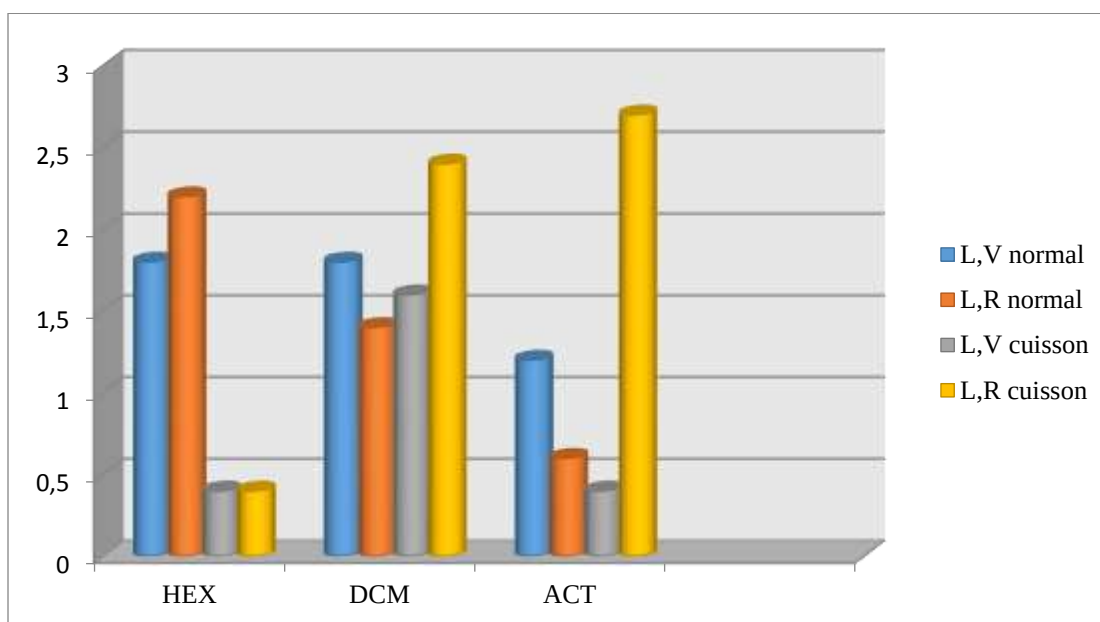


Figure 10 : Histogramme des rendements d'extraction des quatre échantillons de lentille.

II. Résultats de dosage des composés phénoliques

II.1 Teneur en phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux ont été déterminées en utilisant le réactif Folin Ciocalteu et les concentrations approximatives en phénols totaux des extraits sont calculées grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-après.

CHPITRE III : Résultats et discussion

Tableau 05 : Teneurs en phénols totaux des différents extraits de *Lens culinaris*.

Extrait	Nom de l'échantillon	Teneur en phénols totaux (mg EAG/g)
Hexane	L.V	0,147 ± 0,058
	L.R	0,151 ± 0,044
	L.V C	0,011 ± 0,001
	L.R C	0,007 ± 0,003
Dichlorométhane	L.V	0,33 ± 0,051
	L.R	0,178 ± 0,069
	L.V C	0,010 ± 0,012
	L.R C	0,0026 ± 0,003
Acétate d'éthyle	L.V	0,199 ± 0,019
	L.R	0,391 ± 0,089
	L.V C	0,15 ± 0,238
	L.R C	0,041 ± 0,039

Selon les résultats illustrés ci-dessus, les concentrations en polyphénols varient entre **0,0026 ± 0,003** et **0,391 ± 0,089 mg EAG/g** de la matière sèche.

Les teneurs des composés phénoliques les plus élevés ont été détectés dans l'extrait d'acétate d'éthyle avec une concentration de **0,391 ± 0,089 mg EAG/g**, suivi par l'extrait de dichlorométhane de concentration de **0,33 ± 0,051 mg EAG/g**. Tandis que, la teneur la plus basse a été remarquée dans l'extrait de dichlorométhane aussi avec une concentration de **0,0026 ± 0,003 mg EAG/g** de la matière sèche.

Dans l'extrait de l'acétate d'éthyle pour les lentilles normales sans cuisson les quantités des phénols totaux observées dans la lentille verte et rouge égalent à **0,199 ± 0,019** et **0,391 ± 0,089 mg EAG/g** respectivement. Ces valeurs sont importantes par rapport à celles trouvées dans les lentilles vert et rouge après cuisson a donné la valeur la plus faible égalent à **0,15 ± 0,238** et **0,041 ± 0,039 mg EAG/g** respectivement.

Nous pouvons déduire aussi que nos extraits présentent des teneurs élevées par rapport aux masses macérées (**10g**), ce qui explique que l'acétate d'éthyle est un solvant connu de son meilleur pouvoir d'extraire les composés phénoliques (**Benarous, 2014**).

Dans les extraits de dichlorométhane et hexanique les quantités des phénols totaux observées pour les lentilles vertes et rouges sans cuisson sont importantes par rapport à celles trouvées dans les deux variétés de lentilles utilisés après cuisson ce qui est pourrait être dû à l'influence du chauffage ou bien la cuisson sur les polyphénols.

Cette variabilité dans la concentration en polyphénols entre les différents extraits peut être expliquée par la présence des phénols de polarité différente / et ou la présence d'autres constituants (**Harbone et Williams, 2000**). Parce que, malgré la sensibilité et la simplicité de cette méthode, elle n'est pas spécifique pour les polyphénols. En effet, le réactif de Folin peut réagir avec des protéines, des sucres réducteurs, l'acide ascorbique et des composés soufrés (**Demmana et al, 2018**).

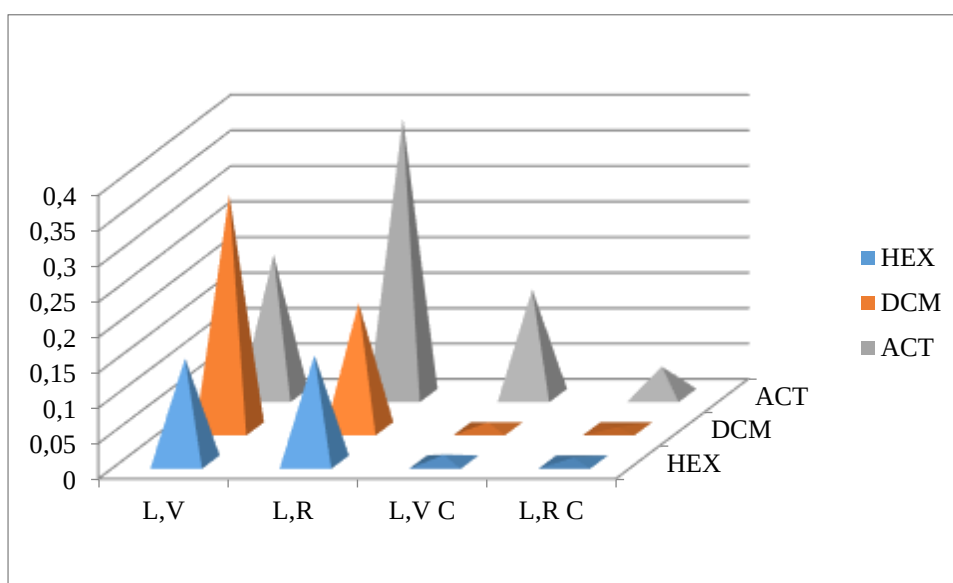


Figure 11 : Histogramme représentant les teneurs en phénols totaux dans les quatre variétés de lentilles.

II.2 Teneur en flavonoïdes

Le dosage spectrophotométrique des flavonoïdes a été effectué par la méthode de trichlorure d'aluminium à partir des extraits bruts des lentilles afin de déterminer la teneur totale en flavonoïdes. Pour cet objectif, une courbe d'étalonnage en utilisant la quercétine comme standard a été tracée. Les résultats des teneurs en flavonoïdes totaux sont représentés dans le tableau (06).

CHPITRE III : Résultats et discussion

Tableau 06 : Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de *Lens culinaris*.

Extrait	Nom de l'échantillon	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g)
Hexane	L.V	0,0038±0,0002
	L.R	0,0030±0,0001
	L.V C	0,0022± 0,0318
	L.R C	0,0032± 0,0225
Dichlorométhane	L.V	0,0039± 0,0009
	L.R	0,0030± 0,0002
	L.V C	0,0005± 0,0025
	L.R C	0,0021± 0,0298
Acétate d'éthyle	L.V	0,017± 0,0005
	L.R	0,005± 0,0011
	L.V C	0,0008± 0,0042
	L.R C	0,0017± 0,0050

D'après la synthèse de l'ensemble des résultats obtenus lors de la quantification en flavonoïdes, nous pouvons constater que les teneurs de ces composés varient entre **0,0005 ± 0,0025** et **0,017± 0,005 mg EQ/g** de la matière sèche.

Les taux en flavonoïdes les plus élevés ont été détectés dans : l'extrait de l'acétate d'éthyle avec une concentration de **0,017± 0,005 mg EQ/g**, suivi par l'extrait de dichlorométhane de **0,0039± 0,0009 mg EQ/g** et pour l'extrait hexanique avec un taux de **0,0038± 0,0002 mg EQ/g** de la matière sèche.

La teneur la plus basse a été remarquée dans l'extrait de dichlorométhane avec un taux de **0,0005 ±0,0025 mg EQ/g** de la matière sèche.

Dans les trois extraits (HEX, DCM, ACT) pour les deux variétés vertes et rouges de lentilles sans cuisson les quantités en flavonoïdes observées égalent à (**0,0038 – 0,0030 mg EQ/g**) ; (**0,0039 – 0,0030 mg EQ/g**) et (**0,017 – 0,005 mg EQ/g**) respectivement.

D'après la synthèse des différents résultats, nous pouvons dire que la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes est étroitement liée au solvant utilisé, ceci est dû à la présence des molécules avec différentes polarités, et une différence de concentration en composés phénoliques et flavonoïdes. Ainsi, la cuisson a influencé sur les compositions de l'échantillon utilisée c'est-à-dire la cuisson a diminué la teneur des polyphénols totaux.

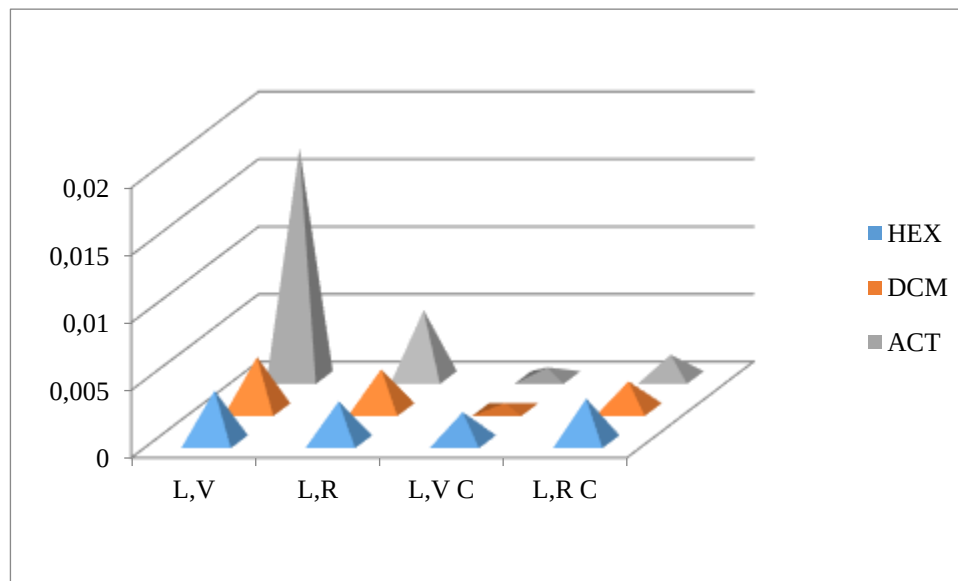


Figure 12 : Histogramme représentant les teneurs en flavonoïdes.

III. Résultats du pouvoir antioxydant

IV.1 Le test du DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée en suivant la réduction du radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à **517 nm**.

Les figures qui suivent représentent les tracés du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration des extraits (Figure 13 et Figure 14) ainsi que la Figure 15 qui représente la variation des pourcentages d'inhibition (%) en fonction des concentrations en mg/ml de antioxydant standards et les étalons choisis pour cette étude à savoir la vitamine C .

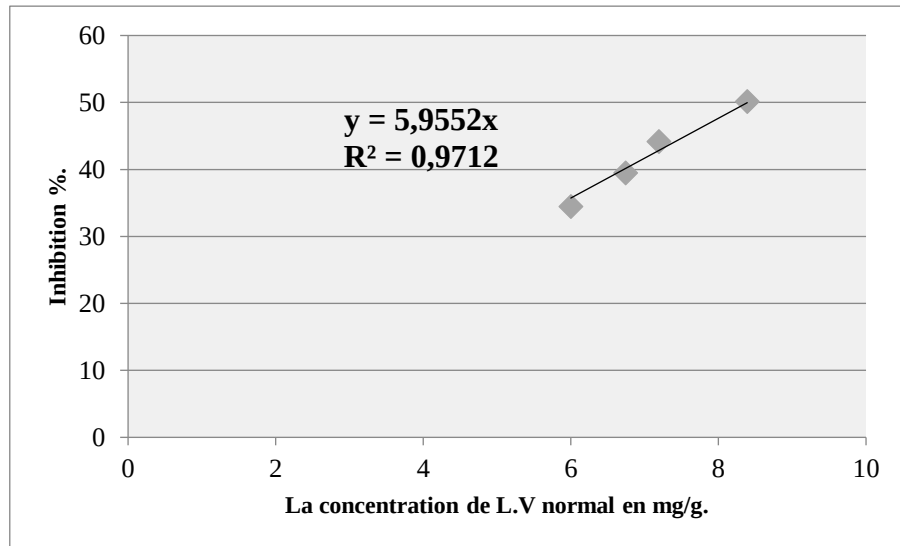


Figure 13 : % d'inhibition de DPPH en fonction de concentration pour la L.V (Extrait ACT).

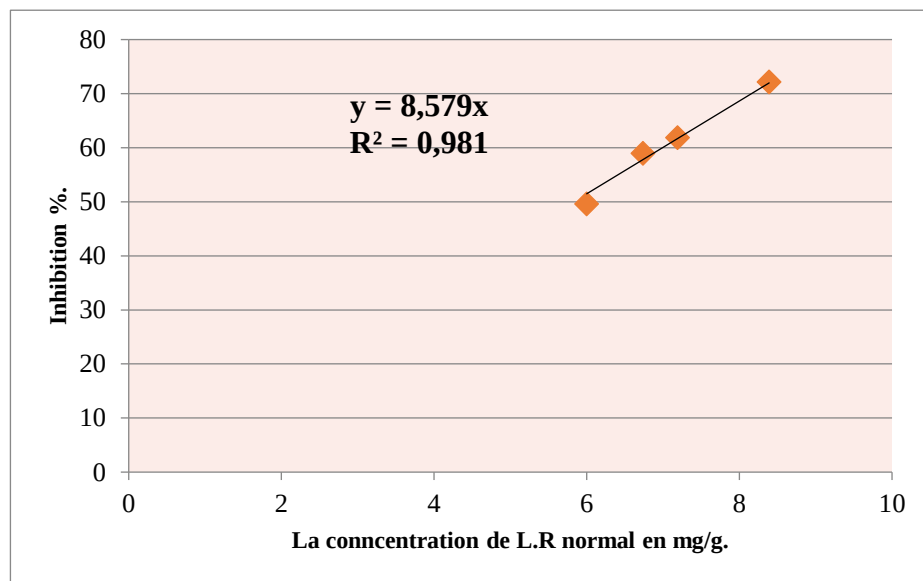


Figure 14 : % d'inhibition de DPPH en fonction de concentration pour la L.R (Extrait ACT).

CHPITRE III : Résultats et discussion

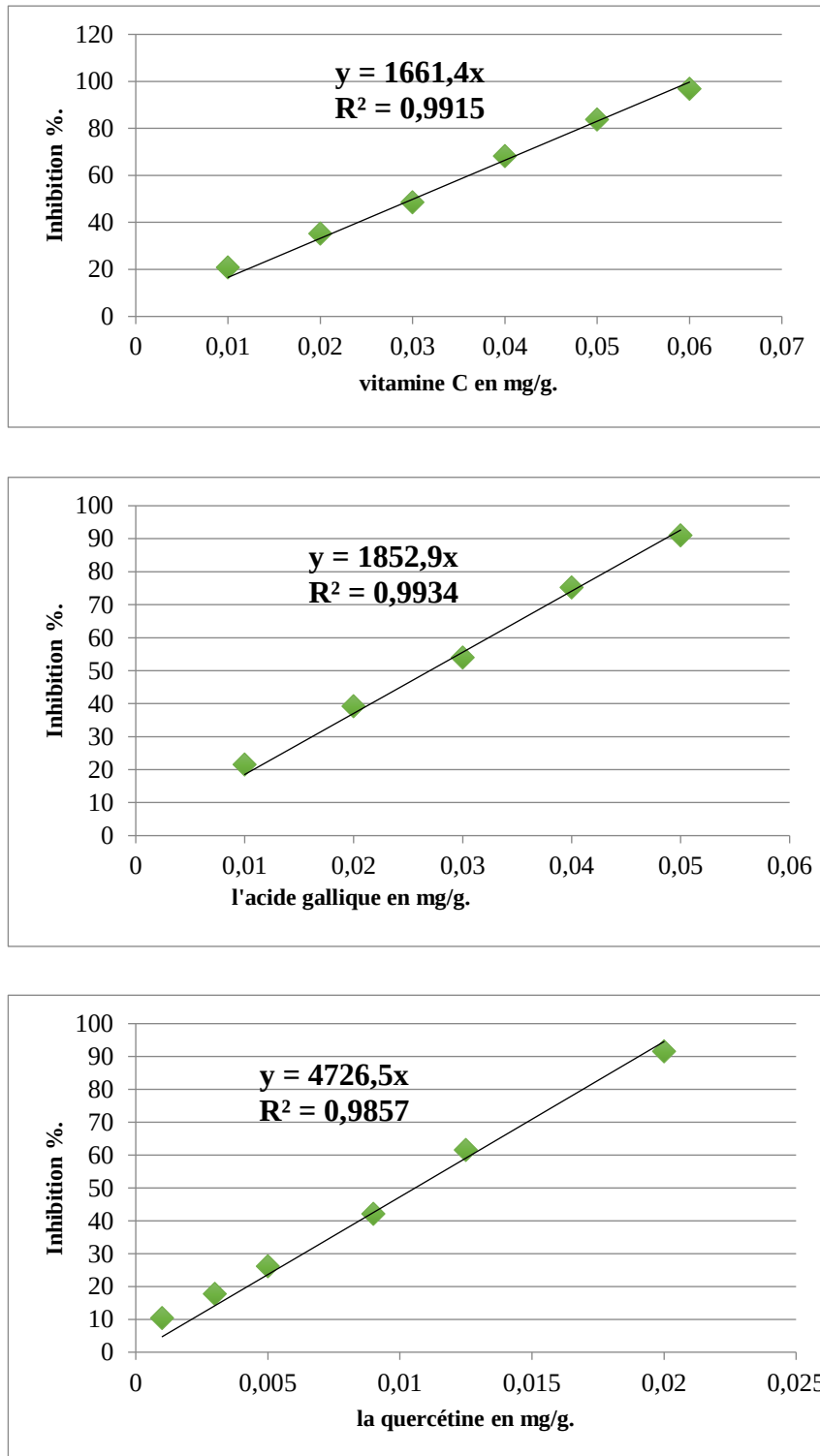


Figure 15 : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en antioxydants standards choisis pour l'étude.

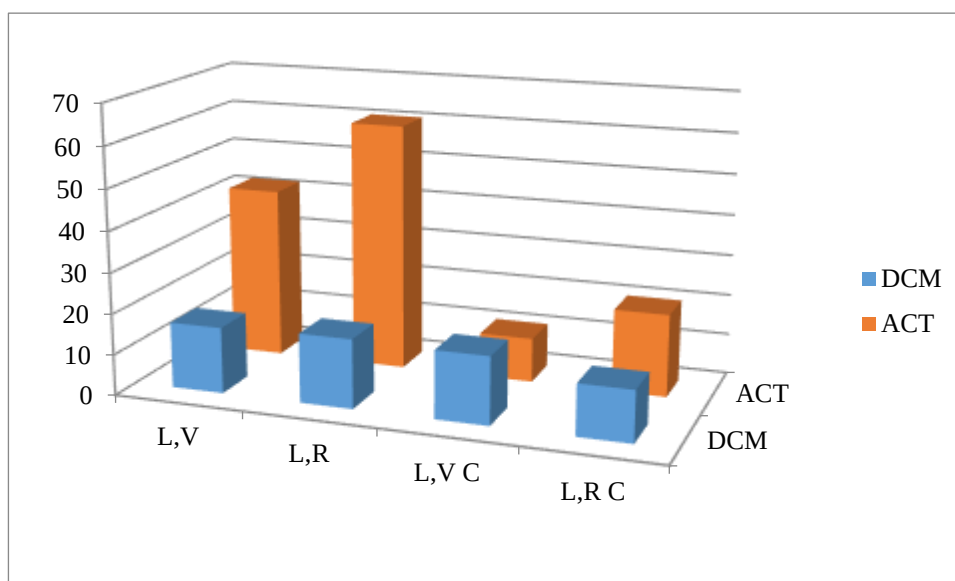


Figure 16 : Histogramme les % d'inhibition des deux extraits DCM et ACT pour les quatre échantillons de lentille.

Les pourcentages d'inhibition ainsi déterminés à partir des tracées précédents, nous ont permis de déterminer la concentration d'inhibition à **50%** (EC50) des antioxydants présents dans les extraits exprimés en mg/ml.

Le paramètre « **EC 50** » (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH[•]) a été calculé pour chaque extrait (**Boussoussa, 2011**). De même, nous avons calculé les **EC50** de la vitamine C (l'acide ascorbique), acide gallique et quercétine afin de les comparer avec ceux des différents extraits. Les valeurs d'**EC50** obtenues sont résumées dans le (tableau 07).

CHPITRE III : Résultats et discussion

Tableau 07 : Les valeurs d'**EC50** en (mg/mL) des différents extraits et les antioxydants standards.

Nom de l'extrait	Nom de la plante	EC50 en (mg/ml)
HEX	L.V	Pas d'activité
	L.R	
	L.V C	
	L.R C	
DCM	L.V	Faible activité
	L.R	
	L.V C	
	L.R C	
ACT	L.V	8,39 ± 0,214
	L.R	5,83 ± 0,138
	L.V C	Pas d'activité
	L.R C	Pas d'activité
Standards	Vitamine C	0,030 ± 0,0047
	L'acide gallique	0,027 ± 0,0004
	La quercétine	0,011 ± 0,068

Les résultats présentés dans le (tableau07) montrent que les valeurs de l'**EC50** de lentilles vertes et rouges de l'extrait l'acétate d'éthyle varié entre **8,39±0,214** et **5,83 ± 0,138mg/ml** respectivement. La plus forte activité a été enregistrée pour la lentille rouge. Par contre l'activité la plus faible a été enregistrée pour les autres extraits.

D'après les valeurs d'**EC₅₀** obtenues dans le (Tableau **07**), on s'aperçoit que tous les extraits testés ont montré des activités antiradicalaires inférieures à celles déterminées pour les antioxydants standards.

En analysant l'ensemble de résultats (Tableau **07**) et sachant que le paramètre **EC₅₀** est inversement proportionnel à l'activité antioxydante. Les résultats, montrent clairement que les extraits possèdent un potentiel antioxydant faible comparable avec celui des antioxydants utilisés comme référence. On compare notre résultat avec (**Florinda et al, 2014**) les lentilles ont démontré la plus haute activité antioxydante (**EC₅₀** ne dépassant pas **2,3 mg / g**), confirmant que les lentilles sont une excellente nourriture antioxydante.

Les modifications chimiques, physiques et enzymatiques qui se produisent pendant la cuisson modifieront la capacité et la digestibilité des antioxydants phytochimiques alimentaires (**Chao et al, 2019**).

La cuisson a diminué la teneur en métabolites antioxydants (acide gallique, catéchine et quercétine) ainsi que les activités antioxydantes (**Pal et al, 2017**).

IV.2 Le test de phosphomolybdate

Les courbes exprimant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en composés phénoliques issus d'une extraction hexanique, dichlorométhane et l'acétate d'éthyle de différentes polarités sont présentées dans les (Figure **17**, **18** et **19**). De plus, nous avons tracé les courbes des antioxydants de synthèse (vitamine C), (l'acide gallique) et (quercétine) (Figure **20**), afin de référer le pouvoir antioxydant de nos extraits à celui de la vitamine C.

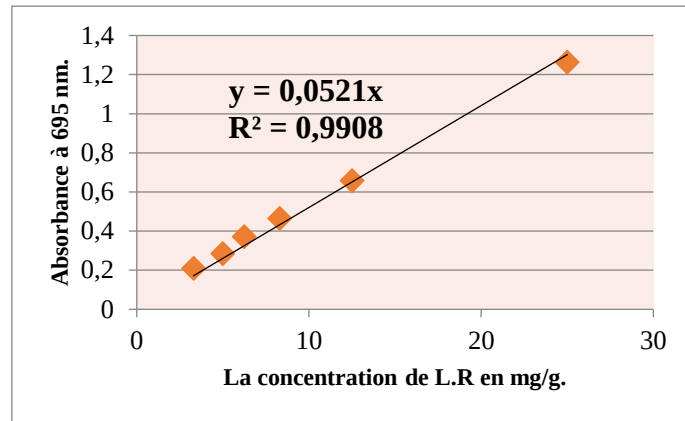


Figure 17 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols de L.R issus d'une extraction hexanique.

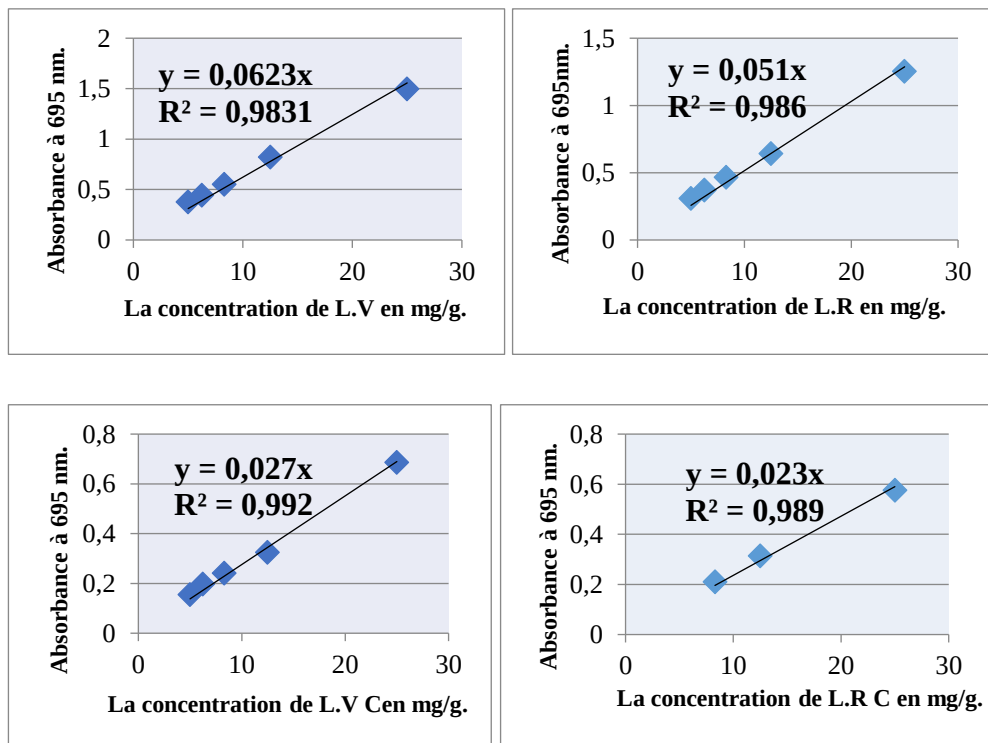


Figure 18 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction dichlorométhane.

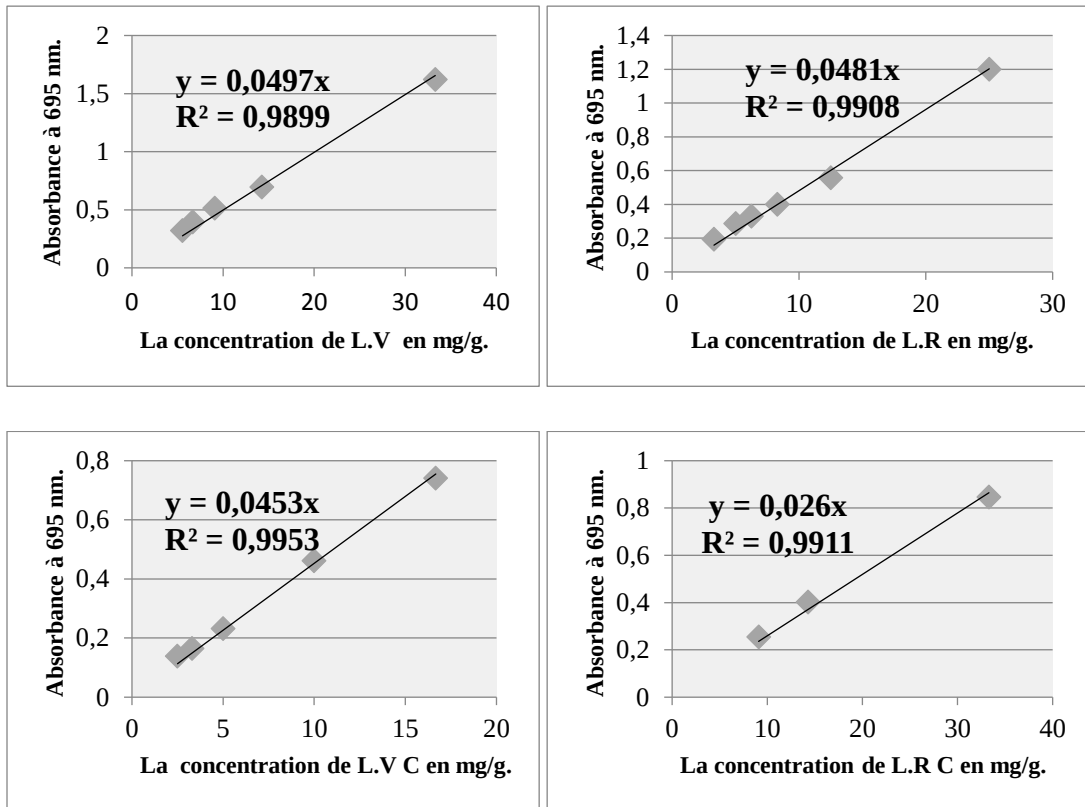


Figure 19 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction d'acétate d'éthyle.

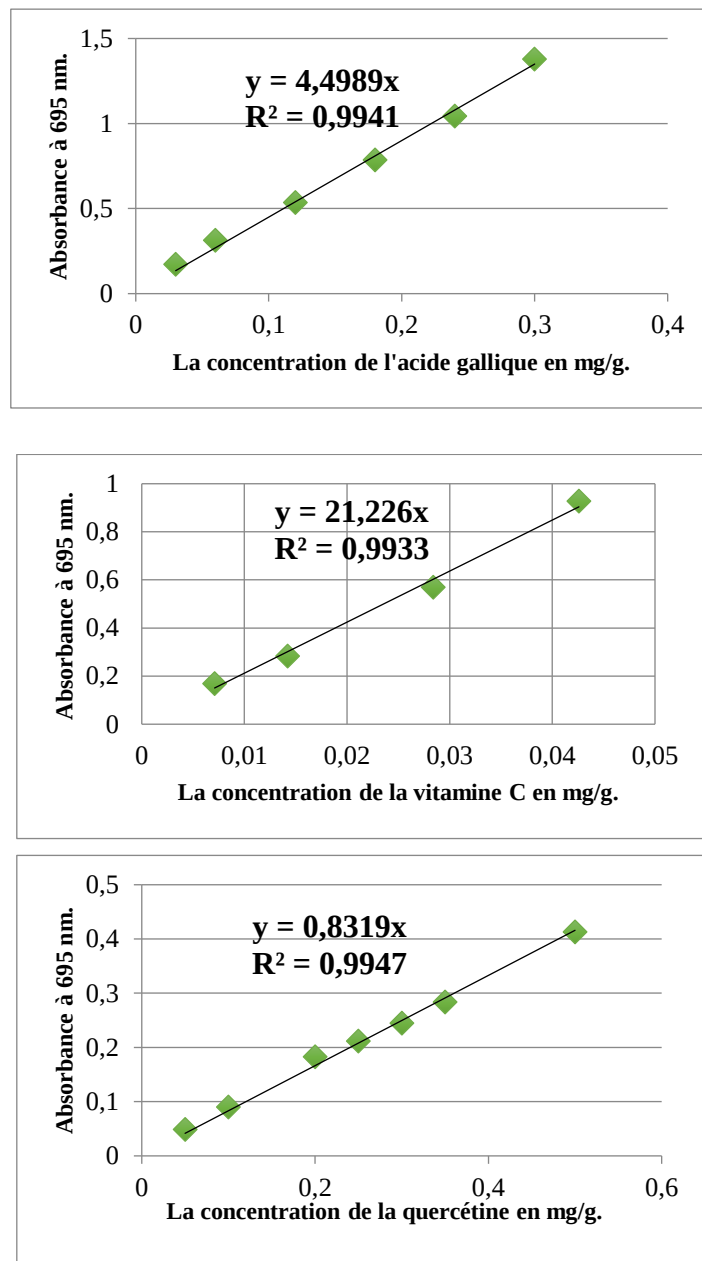


Figure 20 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en antioxydants de référence.

L'activité antioxydante de nos extraits a été référée à celle de la vitamine C en termes d'équivalence. Donc, à partir des pentes tirées des graphes ci-dessus, nous avons calculé le paramètre **VCEAC** (**V**itamin **C** Equivalent **A**ntioxydant **C**apacity) pour chaque extrait (Tableau 08)

CHPITRE III : Résultats et discussion

Tableau 08 : Les valeurs des **VCEAC** en (**mg/mL**) des différents extraits et les antioxydants standards.

Extrait	Nom de l'échantillon	« VCEAC »
Hexane	L.V	Pas d'activité
	L.R	0,0025± 0,0004
	L.V C	Pas d'activité
	L.R C	Pas d'activité
Dichlorométhane	L.V	0,0029 ± 0,0005
	L.R	0,0024 ± 0,0013
	L.V C	0,0012 ± 0,0023
	L.R C	0,0011 ± 0,0001
Acétate d'éthyle	L.V	0,0023 ± 0,0004
	L.R	0,0023 ± 0,0006
	L.V C	0,0021 ± 0,0006
	L.R C	0,0012 ± 0,0001
Standards	L'acide gallique	0,2119 ± 0,212
	La quercétine	0,0391 ± 0,0014

D'après les résultats obtenus (Tableau 08), nous avons observé que les valeurs de **VCEAC** varient globalement entre **0,0011± 0,0001** et **0,0029 ± 0,0005 mg/g VCE**.

On a constaté que l'extrait de dichlorométhane pour la lentille vert présente une activité antioxydante importante comparable à la quercétine (**0,039 mg/g VCE**).

CHPITRE III : Résultats et discussion

En revanche, les autres extraits nous ont montrée des pouvoirs antioxydants faibles par rapport aux composés standards étudiés (l'acide gallique et la quercétine)

Toutes les valeurs supérieures à un (1) indiquent une grande capacité antioxydante de nos composés phénoliques (**Boussoussa, 2011**). Mais dans notre cas toutes les extraits possèdent une capacité antioxydant très faible car les valeurs de **VCEAC** est inférieurs à un (1).

Le paramètre **VCEAC** est définit comme étant la concentration de la solution standard de la vitamine C possèdent la capacité antioxydante équivalente à une solution de 1 mg/ml de la solution étudiée (extrait), plus la valeur de **VCEAC** est importante, plus le pouvoir antioxydant des extraits est important (**Benarous, 2014**).

Conclusion et perspective

L'intérêt accordé à l'étude scientifique du pouvoir thérapeutique des plantes n'a cessé d'augmenter durant ces dernières années dans le but de rechercher des alternatives aux substances chimiques qui présentent des risques pour la santé humaine et pour l'environnement. Les plantes restent toujours une source inépuisable de substances bioactives.

L'objectif primordial assigné par ce travail est l'étude des métabolites secondaires (composés phénoliques) et évaluation des propriétés antioxydantes de l'espèce de *Lens culinaris*.

Lors de ce travail, les extraits des deux variétés de lentille, on fait l'objectif d'une étude détaillée, commençant par une extraction par des solvants organiques à polarité croissante **HEX**, **DCM** et **ACT** puis nous avons évalué la quantité des phénols totaux en adoptant la méthode de Singelton et Ros (1965), les résultats montrent que les quatre échantillons étudiés possède une quantité faible des composés phénoliques qui varie entre $0,0026 \pm 0,003$ et $0,391 \pm 0,089 \text{ mg EAG/g}$. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode de Lamaison et Carnat (1991) et nous avons constaté que les teneurs en ces composés varient entre $0,0005 \pm 0,0025$ et $0,017 \pm 0,005 \text{ mg EQ/g}$ de la matière sèche.

Nous avons évalué par la suite, l'activité antioxydante de nos extraits en utilisant deux tests à savoir : **DPPH** et **Phosphomolybdate**. Cependant pour le pouvoir antiradicalaire des extraits vis-à-vis du radical **DPPH**, nous avons enregistré des valeurs d'**EC50** différents comprises entre $5,83 \pm 0,138$ et $8,39 \pm 0,214 \text{ mg/ml}$ pour les lentilles vertes et rouges de l'extrait l'acétate d'éthyle et pour les autres extraits nous avons observé une faible activité antioxydante. Pour le test de phosphomolybdate les valeurs de **VCEAC** obtenues varient globalement de $0,0011 \pm 0,0001$ et $0,0029 \pm 0,0005 \text{ mg/g VCE}$.

Ce travail confirme que les activités antioxydantes des extraits phénoliques de la plante *Lens culinaris* qui sont plus au moins faible en particulier après la cuisson. En plus, nous pouvons déduire de ce modeste travail que la polarité du solvant d'extraction influe principalement sur le rendement des extraits bruts ainsi que sur les teneurs en composés phénoliques totaux et par conséquent sur l'activité antioxydante.

A travers ces expériences, nous concluons que l'efficacité antioxydante n'est pas liée à une grande quantité de composés phénoliques, et par conséquent d'autres études sont alors

nécessaires pour élucider les structures des composés phénoliques responsables de l'activité antioxydante.

Perspective

Cette étude réalisée sur les deux variétés de lentille (verte et rouge) de l'espèce *Lens culinaris*. Il serait donc intéressant de pousser et approfondir ce travail par :

- D'élargir la gamme des tests d'activités antioxydantes
- Etude des autres activités biologiques sur les lentilles.
- Caractériser les composés phénoliques en utilisant des méthodes plus précises comme HPLC, RMN pour identifier les composés bioactifs.

Références bibliographiques

- **Aissani C , Achi A. (2018).** Localisation des N.O.R (riches en gènes ribosomiques) chez des génotypes du *Lens culinaris* Medik. Mémoire master. Université des Frères Mentouri Constantine.
- **Ait Baziz H et Chemali A. (2017).** Evaluation de l'activité antioxydante et de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique d'une plante médicinale locale. Mémoire de Master. Université A. MIRA - Bejaia
- **Almi, H. (2016).** Etude des myco-pathogènes de *Lens culinaris* et évaluation de l'effet de deux souches de *Trichoderma harzianum* : cas de la Fusariose et de la Cylindrosporiose. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri. Constantine.
- **Annane I et Haddad H. (2015).** Caractérisation cytogénétique des deux espèces légumineuses (*Lens culinaris* Medik, *vicia faba* L.). Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantine.
- **BartolomeÂ. B , Estrella. I ,HernaÂndez. T. (1997).** Changes in phenolic compounds in lentils (*Lens culinaris*) during germination and fermentation. *Z Lebensm Unters Forsch A* 205, 290- 294 p.
- **Ben Tireche M et Achour F. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des extraits méthanolique de quelques algues marines d'Algérie. Mémoire de Master. Université de Amar Telidji Laghouat.
- **Benarous K. (2014).** Etude de l'activité antioxydante et de l'activité inhibitrice des extraits de *Pegunum harmala*, *Inonotus hispidus*, *Marrubium vulgare*, *Ziziphus lotus* et *Achillea santotina* sur la lipase de *candida rugosa*. Thèse de doctorat, L'école normale supérieure de Kouba-Alger.
- **Bentabet N, Boucherit- Otmani Z et Bouchreit K. (2014).** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Pharmacognosie Phytothérapie*. Springer- Verlag France :1-8 p
- **Bouguerne.B. (2012).** Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat. Université de Toulouse III- Paul Sabatier.
- **Boussoussa H.(2011).** Activités antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques des fleurs de *Rhanterium adpressum*. Mémoire de Magistère. Université Amar Telidji – Laghouat.

- **Bouزيد, S. (2017).** Etude de l'effet de l'interaction du molybdène avec l'azote chez les fabacées cultivées en milieu salin. Thèse doctorat. Université les Frères.
- **Demmana.T, Hebiche. R, Dassaa. I. (2018).** Contribution à l'étude de l'activité antioxydant des différents extraits des graines de *Nigella* et des tiges de gingembre. Mémoire de master. Université de Amar Telidji, Laghoaut.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., et Vidal N. (2005).**Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry: 97. 654-660 p.
- **Guillouty. A. (2016).** Plantes médicinales et antioxydants. Thèse doctorat. Université Toulouse III Paul Sabatier.
- **Hammouda D et Khalfallah N. (2015).** Étude comparative de la caryo-morphologie chez six génotype de *Lens culinaris* Medik. European Scientific Journal 24, 214-225 p
- **Harbone JB et Williams CA. (2000).**Advances in flavonoid reserch since 1992. Phytochemistry, Nov; 55(6): 481- 504p.
- **Hocine. F et Gorine. M. (2017).** Évaluation de l'exposition au plomb et cadmium et impact sur quelques paramètres du statut oxydant/ antioxydant chez les ouvriers exposés aux fumées de soudage. Mémoire de master. Université Abou Beker Belkaid. Tlemcen.
- **Kanoun K.(2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activité ntioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire de Magister. Université Abou bekr Belkaid Tlemcen.
- **Manallah. A. (2012).**Activité antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Magister. Université Ferhat Abbas- Sétif
- **Mo'ez Al-Islam Ezzat. F; Takruri. H; Ala Yousef. I. (2013).** Role of lentils (*Lens culinaris* L.) in human health and nutrition: a review. Mediterr J Nutr Metab 6, 3- 16 p.
- **Mohammad. J, Abuzer. A, Mohammed. A. (2015).** Isolation of antioxidant phytoconstituents from the seeds of *Lens culinaris* Medik. Food Chemistry 175. 358- 365 p.
- **Pal R, Anuradha B, Pradhuman Y, Lakshmi K, Mishra K, Aditya J, et Pattanayak A. (2017).** Effect of dehulling, germination and cooking on nutrients,anti-nutrients, fatty acid composition and antioxidant properties in lentil (*Lens culinaris*). J Food Sci Technol, 54(4):909–920 p.

- **Riah N.(2014).** Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum symbiovar viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien. Thèse de doctorat. Université Constantine 1.
- **Rolland Y. (2004).** Antioxydants naturels végétaux. OCL, 11 : 419-424p.
- **Trabsa H. (2015).** Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum* . Thèse de Doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- **Vermerris, W ; Nicholson, R.(2006).** Phenolic compound biochemistry. Springer science. Netherlands. 276P.
- **Chao Z, Yuanyuan L, Shanshan L, Hui C, Yi G, Wai San C, Bin L, Kewei Z, Song M, Céline R, Esra C, Jianbo X. (2019).** Effects of domestic cooking process on the chemical and biological properties of dietary phytochemicals. Trends in Food Science & Technology (85):55-66 p
- **Florinda F, Federica C, Autilia C, Tiziana G, Donatella A, Marisa D, Massimo Z, Raffaele C, Filomena N. (2014).** Polyphenol composition and antioxidant activity of different grass pea (*Lathyrus sativus*), lentils (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*) ecotypes of the Campania region (*Southern Italy*). ScienceDirect (7): 551- 557 p

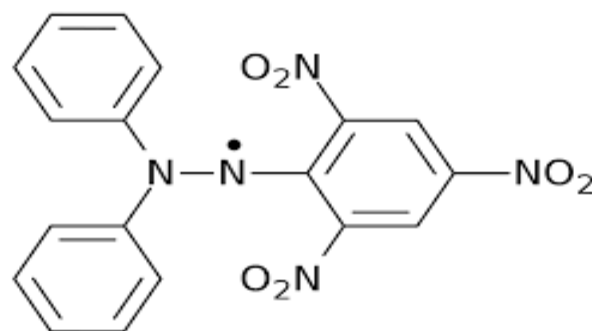
Annexe

Annexe

La structure de l'acide gallique.



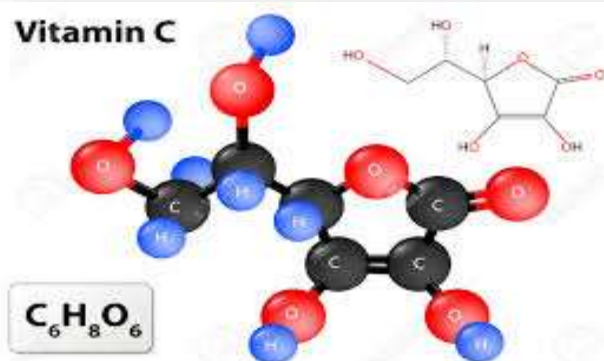
La structure de DPPH



La structure de la quercétine.



La structure de l'acide ascorbique



Dédicace

Ce mémoire représente l'aboutissement du soutien et des encouragements que tous mes proches m'ont prodigués je la dédie spécialement.

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à :

Mon marié, ma mère et mon père pour son amour et son encouragement depuis toujours, je dit merci ma mère, tu es la meilleure j'en suis sûr. A mon père qui m'a su encouragée pour les efforts considérables fournis pour mon éducation.

Mes frères (chacun à son nom)

Mes amies : Rym, Djahida, Sabrine, Fadila, Fatima, Halima et Aicha

Tout le nombre de ma famille DJEDID et MAACHE

Tous mes collègues de la promotion de Master II Biochimie appliquée 2019

Tout personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études

Merci de faire partie de ma vie

Remerciement

Tout d'abord, je rends grâce à Dieu le tout puissant qui m'a donné la force, le courage, la santé et la patience d'accomplir ce travail.

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés

Le thème de ce mémoire a été proposé par Mme **BOUSSOUSSA Hadjer**, maitre de conférences à l'université de Laghouat. Je la remercie vivement pour avoir accepté d'encadrer ce sujet, ainsi pour ses orientations, ses judicieux conseils et sa disponibilité tout au long de l'évaluation de mon projet.

Mes remerciements vont aussi aux membres de jury, Monsieur Berramdane Tayeb et Madame Kraza Lamia pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je remercie vivement le Dr **CHAIBI Rachid** chef de département de biologie à l'université de Laghouat.

Ces remerciements ne peuvent se terminer sans remercier ma famille, mon mari pour toute sa patience, A ma Maman, merci d'avoir toujours été derrière moi et de m'avoir soutenue toutes ces années. A mon Papa, merci d'avoir été là et de m'avoir poussé à persévérer dans cette voie.

Table des matières

Résumé

Listes des tableaux

Listes des figures

Listes des abréviations

Introduction.....	02
CHAPITRE I : La synthèse bibliographique.....	04
I. Présentation de l'espèce étudiée.....	05
I.1 Définition.....	05
I.2 Taxonomie.....	05
I.3 Description botanique.....	06
I.4 Les valeurs nutritionnelles dans les lentilles.....	07
I.5 Les métabolites secondaires dans les lentilles.....	08
II. L'activité antioxydante.....	09
II.1 Le stress oxydant.....	09
II.2 Les radicaux libres.....	10
II.3 Les antioxydants.....	11
CHAPITRE II : Matériels et méthodes.....	13
I. Le matériel végétale.....	14
II. Méthode d'extraction.....	14
III. Dosage des polyphénols totaux.....	17
IV. Dosage des flavonoïdes.....	18
V. Evaluation du pouvoir antioxydant.....	19
V.1 Test de DPPH.....	19
V.2 Test de phosphomolybdate PPM.....	20
CHAPITRE III : Résultats et discussion.....	21
I. Détermination du rendement d'extraction.....	22

II. Résultats de dosage des composés phénoliques...	23
II.1 Teneur en phénols totaux.....	23
II.2Teneur en flavonoïdes.....	25
III.L'étude du pouvoir antioxydant.....	27
Conclusion.....	38
Références bibliographiques.....	41
Annexe.....	45

ملخص

تحتوي المستخلصات الطبيعية لنباتات على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية التي تمتلك قدرات مضادة للأكسدة. تحقيقاً لهذه الغاية، تم تكريس العمل الحالي لتقدير المستخلصات الطبيعية لأنواع *Lens culinaris* من خلال دراسة قوتها المضادة للأكسدة. الجزء الأول من هذا العمل، مكرس لاستخراج المكونات النشطة باستخدام المذيبات العضوية المختلفة، وأظهرت مقتطفات أن لدينا غلة متغيرة للغاية. في الجزء الثاني، قمنا بتحديد كمية المركبات الفينولية و الفلافونويدات في خلاصتنا. النتائج التي تم الحصول عليها تعكس أن هذا النوع غني نسبياً بالمركبات الفينولية.

في الجزء الأخير درسنا قوة مضادات الأكسدة في مقتطفات لدينا عن طريق الاختبارات الكيميائية:

PPM و DPPH تؤكد النتائج أن المستخلصات لدينا لها نشاط مضاد للأكسدة منخفض.

كلمات مفتاحية: العدس (*Lens culinaris*)، المركبات الفينولية، نشاطية مضادة للأكسدة، PPM، DPPH.

Résumé

Les extraits naturels, issus des végétaux contiennent une variété de composés phénoliques qui possèdent des capacités antioxydantes.

A cet effet, le présent travail a été consacré à la valorisation des extraits naturels de l'espèce de *Lens culinaris* par l'étude de son pouvoir antiradicalaire.

La première partie de ce travail, est consacrée à l'extraction des principes actifs en utilisant différents solvants organiques, nos extraits ont montré des rendements très variables. Dans un second lieu, nous avons procédé à la quantification des composés phénoliques et des flavonoïdes de nos extraits. Les résultats obtenus reflètent que cette espèce est relativement riche en composés phénoliques.

Dans la dernière partie nous avons étudié le pouvoir antioxydant de nos extraits par les tests chimiques : DPPH et le PPM. Les résultats confirment que nos extraits possèdent des activités antioxydantes faibles.

Mots clés : Lentille (*Lens culinaris*), Composés phénoliques, Activité antioxydante, DPPH, Phosphomolybdate.

Abstract

Natural extracts from plants contain a variety of phenolic compounds that possess antioxidant capabilities.

To this end, the present work was devoted to the valorisation of the natural extracts of the *Lens culinaris* species by the study of its antiradical power.

The first part of this work, is devoted to the extraction of active ingredients using different solvent, our extracts showed very variable yields. In a second place, we proceed to the quantification of the phenolic compounds and flavonoids of our extracts. The results obtained reflect that this specie is relatively rich in phenolic compounds.

In the last part we studied the antioxidant power of our extracts by the chemical tests DPPH and PPM. The results confirm that our extracts possess low antioxidant activity.

Keywords : Lentil (*Lens culinaris*), Phenolic compounds, Antioxidant activity, DPPH, Phosphomolybdate.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification de l'espèce (<i>Lens culinaris</i>).....	06
Tableau 02: Valeurs de certains composés phytochimiques bioactifs de lentilles.....	08
Tableau 03 : Les principaux radicaux libres.....	10
Tableau 04: Rendement et couleur des différents extraits.....	22
Tableau 05 : Teneurs en phénols totaux des différents extraits de <i>Lens culinaris</i>	24
Tableau 06 : Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de <i>Lens culinaris</i>	26
Tableau 07 : Les valeurs d'EC50 en (mg/mL) des différents extraits et les antioxydants standards.....	31
Tableau 08 : Les valeurs des VCEAC en (mg/mL) des différents extraits et les antioxydants standards.....	36

Liste des figures

Figure 01 : Les différentes étapes de la description morphologique de la lentille.....	07
Figure 02 : Produits phytochimiques bioactifs et essentiels nutriments des graines de lentille.....	09
Figure 03 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.....	11
Figure 04 : Photo illustrant les graines de lentille verte et rouge (original 2019)	14
Figure 05: Photos de l'extraction et le fractionnement des lentille (original 2019)	15
Figure 06 : protocole résumant les différentes étapes de l'extraction	16
Figure 07 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	18
Figure 08 : : La courbe d'étalonnage de la quercétine.....	19
Figure 09 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	20
Figure 10 : Histogramme des rendements d'extraction des quatre échantillons de lentille.....	23
Figure 11: Histogramme des teneurs en phénols totaux.....	25
Figure 12 : Histogramme des teneurs en flavonoïdes.....	27
Figure 13 : % d'inhibition de DPPH en fonction de concentration pour la L.V.....	28
Figure 14 : % d'inhibition de DPPH en fonction de concentration pour la L.R.....	28
Figure 15 : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en antioxydants standards choisis pour l'étude.....	29
Figure 16 : Histogramme les % d'inhibition des deux extraits DCM et ACT pour les quatre échantillons de lentille.....	30
Figure 17 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols de L.R issus d'une extraction hexanique.....	32

Figure 18 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction dichlorométhane.....	33
Figure 19 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction d'acétate d'éthyle.....	34
Figure 20 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en antioxydants de référence.....	35

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

ADN : Acide désoxyribonucléique

AlCl₃ : chlorure d'aluminium

DPPH : 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EAG : équivalent en acide gallique

EQ : équivalent en quercétine

g : gramme

IC 50 : concentration inhibitrice de 50 % de l'activité

L : litre

L.R C : lentille rouge cuisson

L.R : lentille rouge

L.V C : lentille vert cuisson

L.V : lentille vert

M : mol

MeOH : méthanol

mg : Milligramme

min : Minutes

ml : Millilitre

PPM : phosphomolybdate

s.sp : sous espèce

UV : Ultraviolet

V : volume

VCEAC : Vitamine C Equivalent Antioxydant Capacity

Introduction générale

Introduction

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches. Dans le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires **(Kanoun, 2011)**.

La flore algérienne regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques. La maîtrise totale et parfaite des différentes propriétés de ces plantes, qui passe par la détermination de l'ensemble des groupes physiologiques capables d'engendrer un ou plusieurs effets pharmacologiques, est aujourd'hui un objectif qui occupe un ordre de première place dans le monde entier **(Bentabet et al, 2014)**.

Les légumineuses ont une grande importance au niveau agricole. Elles sont classées au deuxième rang mondial derrière les céréales. Elles sont cultivées pour leurs graines et constituent une part importante de l'alimentation dans le monde, particulièrement dans les pays en développement où elles sont une source de protéines pour l'Homme **(Annane et Haddad, 2015)**.

Les grains secs comme le haricot (*Phaseolus vulgaris*), la lentille (*Lens culinaris*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), et la fève (*Vicia faba*) sont les légumineuses les plus consommées à travers la région méditerranéenne **(Bouziid, 2017)**.

Dans le corps humain, les produits chimiques exogènes et les processus métaboliques pourraient produire fortement des radicaux libres, particulièrement les espèces réactives à l'oxygène (ERO), capable d'oxyder les biomolécules, ayant pour résultat la mort des cellules et la destruction des tissus **(Ben Tireche et Achour, 2014)**.

Dans cette étude, notre travail sera divisé en trois principales parties :

Dans le premier chapitre nous avons commencé par une étude bibliographique qui regroupe une description détaillée de l'espèce étudiée, ainsi qu'un aperçu global

Introduction

sur l'étude des radicaux libres et le stress oxydant, ceci est suivi par un rappel sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante.

Le deuxième chapitre est consacré aux méthodes expérimentales utilisées dans ce travail qui porte sur l'extraction et le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes et finalement l'étude de l'activité antioxydante des extraits de cette plante, par deux tests : le piégeage du radical libre DPPH et le test de phosphomolybdate.

Enfin dans le troisième chapitre nous avons présenté les résultats obtenus et leurs discussions suivi d'une conclusion générale et perspectives de ce travail.

CHAPITRE I :

La synthèse bibliographique

I. Présentation de l'espèce étudiée

I.1 Définition

Le nom scientifique « *Lens culinaris* » a été donné à la plante (lentille cultivée), en (1787) par le botaniste et physicien Allemand : **MEDIKUS (Aissani et Achi, 2018)**.

Cette espèce est classée en deux sous espèces selon la taille de la graine :

- Le s.sp ***macrosperma*** (diamètre supérieur à 6 mm) est prédominant principalement en Afrique du Nord, en Europe et en Amérique.
- Le s.sp ***microsperma*** (diamètre inférieur à 6 mm) domine en Asie, en Egypte, et en Ethiopie (**Hammouda et Khalfallah, 2015**).

Lens culinaris (*Leguminosae*) est une plante annuelle buissonnante et herbacée cultivée dans le monde entier pour ses graines comestibles. Les humains ont connu les lentilles (*Lens culinaris* L.) depuis l'aube de la civilisation. Ils sont constituent une source importante de aliments pour l'homme dans les pays méditerranéens. Trônant parmi les légumineuses ayant la plus petite taille, la lentille a l'avantage de nécessiter un temps de cuisson plus court que la majorité des légumineuses.

Durant la dernière décennie; on estime que la consommation mondiale de lentilles a augmenté d'environ **3%** par année. La lentille est surtout cultivée pour ses graines mûres qui sont consommées principalement en sauce et en soupe. Les jeunes gousses, les graines germées et les feuilles se consomment comme légume (**Annane et Haddad, 2015; BartolomeÂ, 1997; Mohammad et al, 2015; Mo'ez Al-Islam Ezzat et al. 2013**).

I.2 Taxonomie

L'espèce *Lens culinaris* (lentille cultivée) appartient au genre *Lens*, classé dans la tribu des *Viciae*. Lors d'une révision récente du genre *Lens* (**Riah, 2014**).

CHPITRE I : La synthèse bibliographique.

Tableau 01: Classification de l'espèce (*Lens culinaris*) (Almi, 2016; Bouzid,2017).

Règne	<i>Plantae</i>
Super division	<i>Spermatophyta – semences de plantes</i>
Division	<i>Magnoliophyta – plante en floraison</i>
Classe	<i>Magnoliopsida – dicotylédones</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae- légumineuse</i>
Genre	<i>Lens</i>
Espèce	<i>Lens culinaris</i>

I.3 Description botanique

Plante dicotylédone, herbacée annuelle de **20 à 40 cm** de hauteur, fait partie des légumes secs.

Racine: Pivotante mince.

Tige : Dressée et très rameuse, carrée mince, atteinte rarement plus de **45 cm** de hauteur et a une croissance indéfinie.

Feuilles: alternes, composés et pennées à **5-16** folioles, généralement terminées par une vrille ou une soie.

Fleurs et floraison : à la corolle papilionacée typique de la sous-famille des Fabaceae, sont de couleur blanche ou bleue pâle et groupées par petites grappes de deux à quatre. La floraison estivale intervient entre mai et juillet.

Fruit : Gousse rhomboïde aplatie, courte, contenant deux graines aplaties en forme caractéristique de disque faiblement bombé.

CHPITRE I : La synthèse bibliographique.

La couleur des graines varie selon les variétés des plus pâles (vert pâle, blond, rose) au plus foncé (vert foncé, brun, violacé...) (Aissani et Achi, 2018; Bouzid, 2017).



Plante



Fleur



Gousse



Graines

Figure 01 : Les différentes parties de la lentille (Aissani et Achi, 2018; Bouzid, 2017).

I.4 La valeur nutritionnelle des lentilles

La lentille présente plusieurs intérêts nutritionnels, parmi ces intérêts on distingue :

- Les lentilles sont considérées comme une bonne source de protéines.

CHPITRE I : La synthèse bibliographique.

- Les glucides totaux représentent la principale composante de graines de lentilles avec amidons occupant la majeure partie de la masse glucidique. Parmi les 23 grains de légumineuses à grains, le rendement en amidon provenant des lentilles est le deuxième plus élevé, avec **47,1%**.
- Leur richesse en minéraux – notamment en Fer, Magnésium, Phosphore et Potassium – contribue à couvrir les besoins quotidiens. Au même titre qu’elles représentent une bonne source de vitamines du groupe B (**Annanet Haddad, 2015; Mo’ez Al-Islam Ezzat. F et al. 2013**).

La lentille fait partie de l’alimentation de base, elle est surtout cultivée pour ses graines mûres. Sur le plan nutritionnel, la lentille constitue une composante importante de la ration alimentaire de nombreuses familles vers le monde, pour lesquelles elle fournit des protéines essentielles et des calories (**Aissani et Achi, 2018**).

I.5 Les métabolites secondaires dans les lentilles

Les lentilles ont le contenu phénolique total (CTP) le plus élevé en comparaison avec six autres impulsions courantes. Par miles polyphénols, les tanins et les composés apparentés aux tanins sont principal chez les lentilles. leur teneur en tanins condensés, jusqu’à **915 mg / 100 g (Mo’ez Al-Islam Ezzat et al. 2013)**.

Tableau 02: Valeurs de certains composés phytochimiques bioactifs de lentilles(**Mo’ez Al-Islam Ezzat et al. 2013**).

Composé phytochimique bioactif	Contenu (pour 100 g)
Polyphénols totaux	26 mg (GAE / 100 g poids frais)
Flavonoïdes	221 mg de catéchine équivalent.
Glycosides de flavonones	33,1–186,0 lg
Glycosides de flavonoles	9.6–241 lg
Procyanidines tétramères	18,5–59,5 lg
Tanins condensés	870 mg de catéchines équivalent.
Catéchine	919–1 633 lg

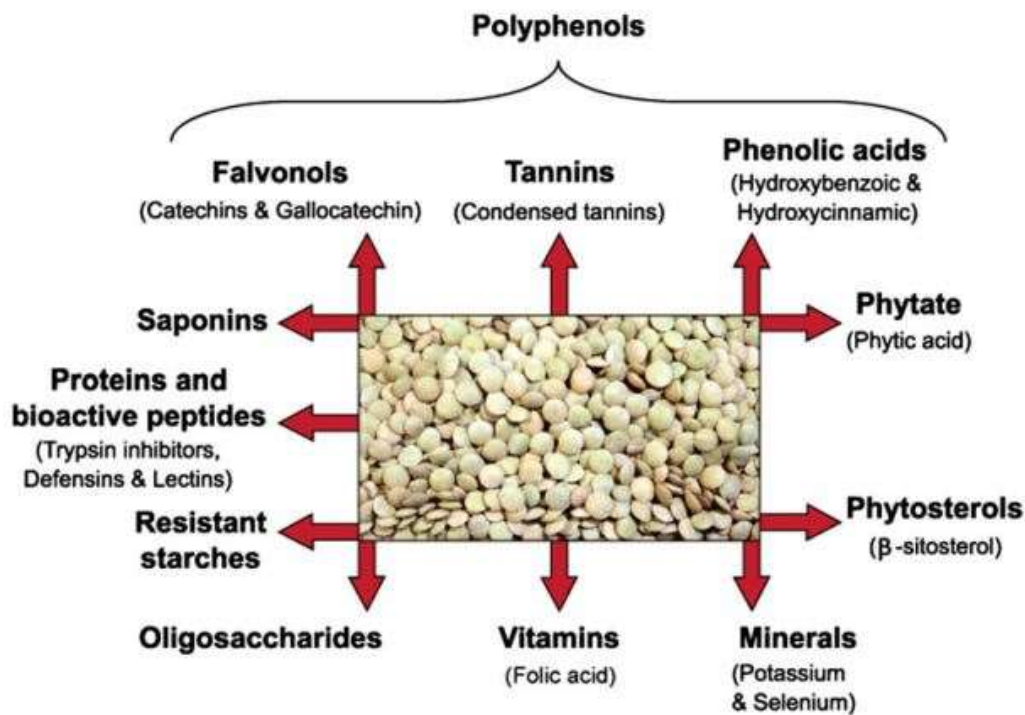


Figure 02 : Produits phytochimiques bioactifs et essentiels nutriments des graines de lentille (Mo'ez Al-Islam Ezzat et al. 2013).

II. L'activité antioxydante

II.1 Le stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs.

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines provoquant des altérations bases, des pontages ADN protéines, de lipides (peroxydation lipidique) et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Demmana et al, 2018).

II.2 Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et que leur durée de vie est courte (**Hocine et Gorine, 2017**).

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (**EAO**). Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée), etc. Les radicaux libres sont des espèces chimiques très instables qui jouent un rôle dans l'action de certains traitements anticancéreux, de même qu'à l'origine du vieillissement (**Manallah, 2012**).

Tableau 03 : Les principaux radicaux libres (Hocine et Gorine, 2017).

Oxygène	O ₂
Oxygène singulet	1O ₂
Anion super oxyde	O ₂ . -
Radical hydroxyle	OH
Radical hydroperoxyde	HOO
Radical peroxyde	ROO
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyle	RO .
Peroxyde d'hydrogene	H ₂ O ₂
Radical oxyde nitrique	NO .

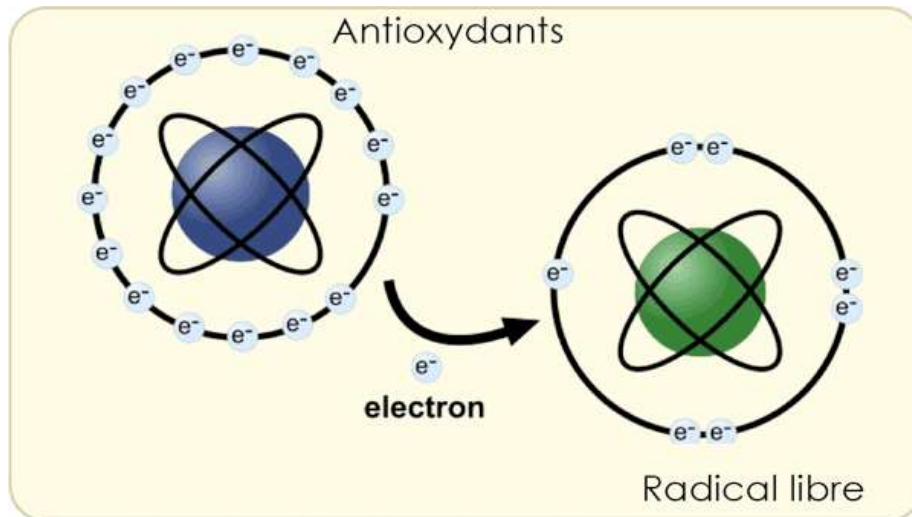


Figure 03 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.

II.3 Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances qui inhibent ou ralentissent l'oxydation d'un substrat. Ils sont présents sous de nombreuses formes et peuvent intervenir en prévention de la formation des radicaux libres, aussi bien que pour participer à leur élimination (antioxydants primaires et secondaires) (**Guillouty, 2016**).

II.3.1 Les composés phénoliques comme antioxydants naturels

Une grande partie de ces molécules est présente dans l'alimentation. Les plus connus sont les acides phénoliques (benzoïque ou cinnamique), les flavonoïdes, et les tanins. Les stilbènes et le lignan sont moins connus(**Bouguerne, 2012**).

- **Les flavonoïdes :**

Le terme flavonoïde rassemble de nombreux composés naturels répartis en plusieurs familles dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanines.

- **Les acides phénoliques :**

Les acides phénoliques sont divisés en deux catégories : les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique ou vanillique et les dérivés de l'acide cinnamique

CHPITRE I : La synthèse bibliographique.

comme l'acide caféique, coumarique, sinapique et férulique. Ces derniers ont une bonne activité antioxydante.

- **Les tannins**

Les tannins sont des polyphénols de structure complexe, avec une activité antioxydante très puissante due au piégeage de $O_2^{\bullet -}$ grâce aux différents groupes phénoliques (Bouguerne, 2012).

CHAPITRE II :

Matériels et méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche d'antioxydants naturels afin d'évaluer les propriétés antioxydantes des polyphénols des légumes secs de deux variétés de lentille: verte et lentille rouge (*Lens culinaris*).

Cette évaluation est liée à la teneur totale en phénol et en antioxydant pour découvrir de nouvelles sources potentielles de ressources naturelles.

I- Le matériel végétal

Les graines de lentilles vertes et rouges utilisées dans ce travail ont été obtenus à partir d'un cultivateur dans la région de Sidi -makhlouf.



Figure 04 : Photo illustrant les graines de lentille verte et rouge (original 2019).

II- Méthode d'extraction

II.1 Préparation des échantillons

Nous avons utilisé dans notre étude quatre échantillons de lentille (figure 05) avec cuisson (15 min à 70°C) et sans cuisson, qui ont été broyés à l'aide d'un mixeur électronique (10 g de chaque échantillon de lentille) jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et par la suite cette poudre est tamisée à la même granulométrie et utilisée pour l'extraction.

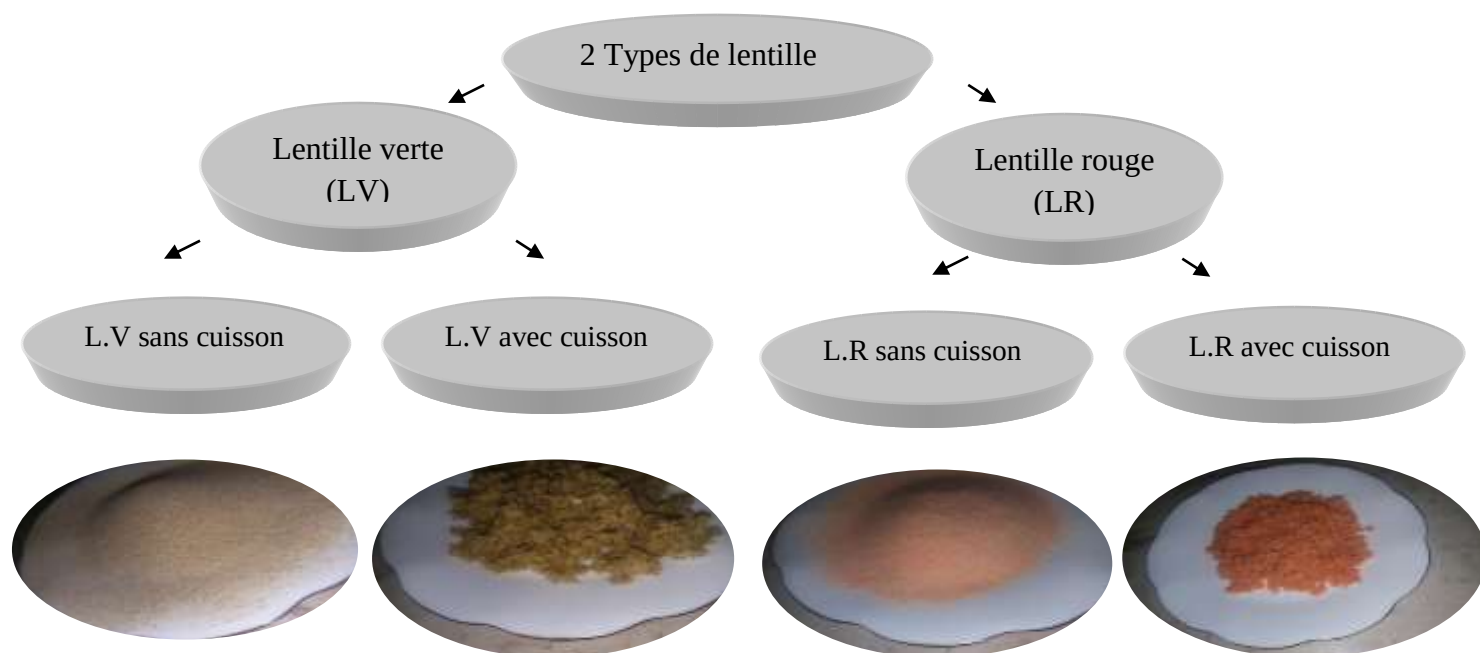


Figure 05 : Les quatre échantillons de lentille après le broyage (original 2019).

II.2 Préparation des extraits

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules contenues dans les lentilles en utilisant des solvants organiques de polarité croissante.

Le protocole consiste à des macérations successives à froid dans trois solvants organiques différents à savoir ; l'hexane **HEX**, le dichlorométhane **DCM** et l'acétate d'éthyle **ACT**.

La figure **06**, résume les différentes étapes d'extraction avec les solvants choisis pour les quatre variétés de lentilles.

Chapitre II : Matériels et méthodes.

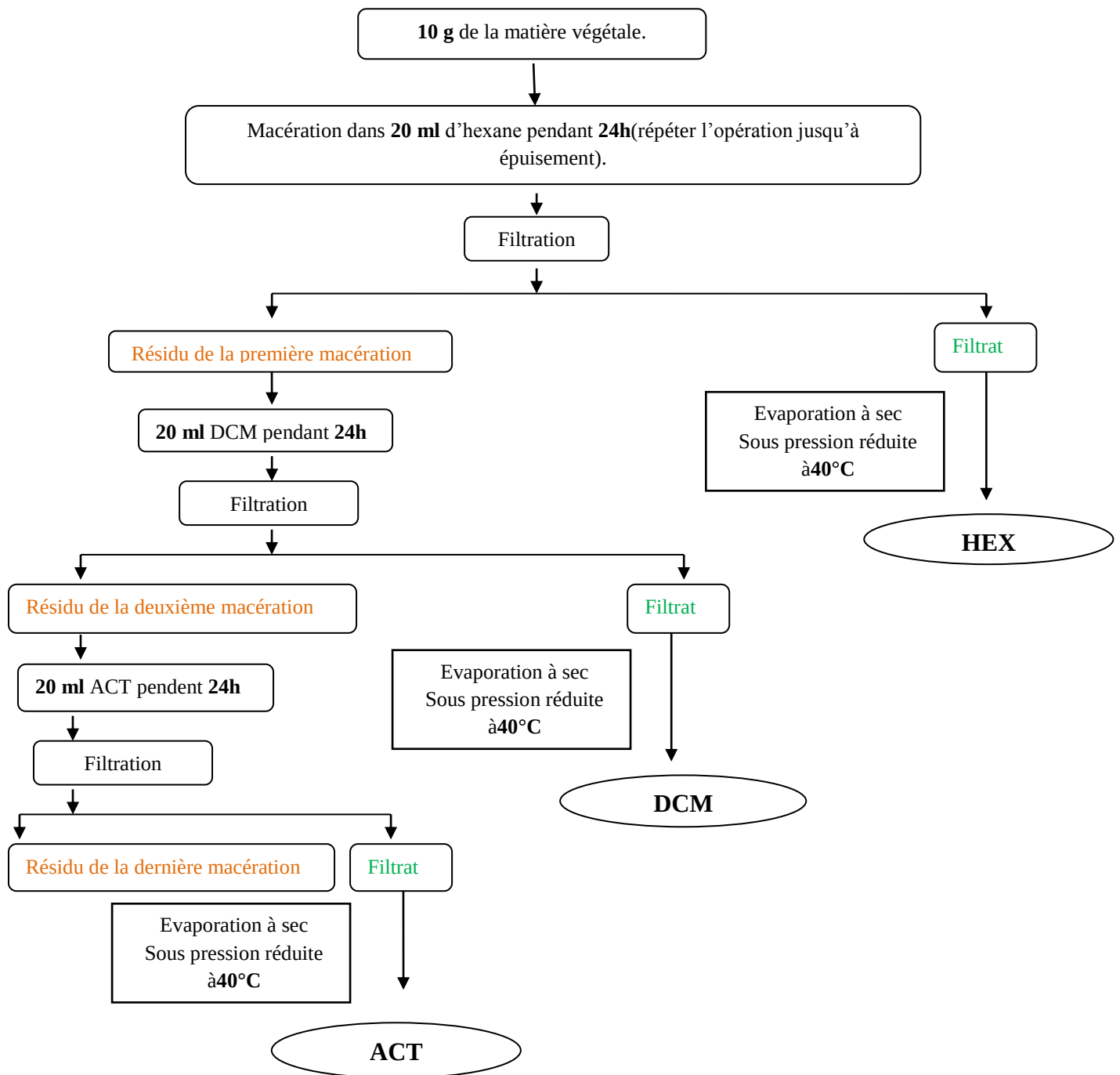


Figure 06 : protocole résumant les différentes étapes de l'extraction.

Chapitre II : Matériels et méthodes.

- **Calcul du rendement d'extraction**

Les rendements d'extraction ont été déterminés par la formule suivante :

$$R\% = (m / m_0) \times 100$$

R% : rendement exprimé en %

m : masse en gramme de l'extrait sec résultant.

m₀ : masse en gramme du matériel végétal à traiter.

III- Dosage des polyphénols totaux

III.1 Le principe

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu décrite en 1965 par Singleton et Ross (**Manallah, 2012**).

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃ PW₁₂ O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃ PMo₁₂ O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Kanoun, 2011**). L'absorbance est proportionnelle à la quantité des phénols présents (**Ait Baziz et Chemali, 2017**).

III.2 Le protocole

100 µL de chaque solutions diluées ou d'extrait est ajouté **500µL** du réactif de Folin – Ciocalteu, après **2 min** d'incubation on additionne **2 ml** de Na₂ CO₃ puis, le mélange **2%** est incubé dans l'obscurité pendant **30 min** à une température ambiante.

L'absorbance de chaque solution préparée est mesurée par un spectrophotomètre UV-Visible, à une longueur d'onde de **760 nm** contre un blanc.

III.3 La courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations (**mg/g**).

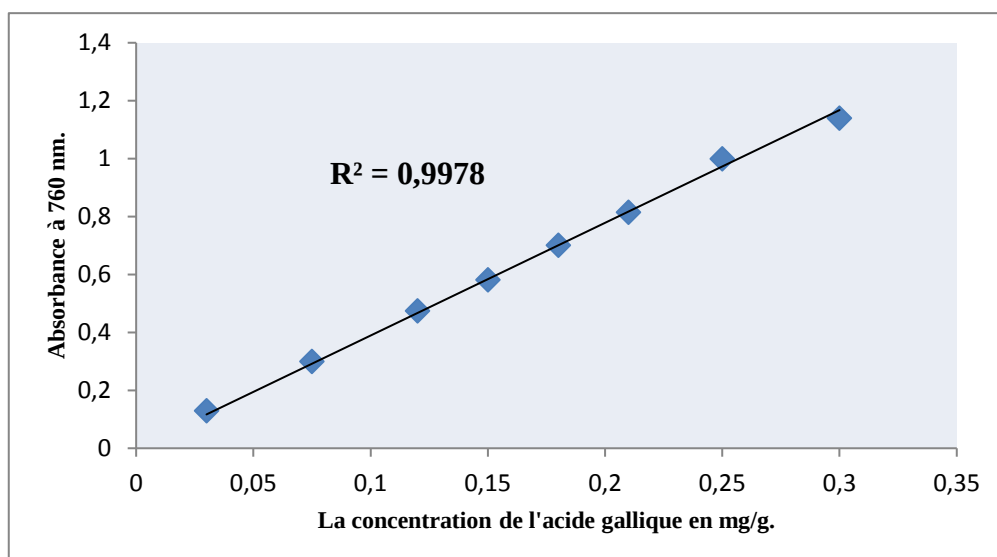


Figure 07 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

IV-Dosage des flavonoïdes

IV.1 Le principe

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits, et des différentes fractions a été déterminée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (**Ait Baziz et Chemali, 2017**).

Selon Lamaison et Carnat, cette méthode est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, ayant le maximum d'absorption à **430 nm** (**Djeridane et al, 2006**).

IV.2 Le protocole

500µL de chaque dilution ou extrait a été mélangé avec **500µL** de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à **2%**. Après incubation dans l'obscurité pendant **20 min** et à une température ambiante, on mesure l'absorbance à **430 nm**.

IV.3 La courbe d'étalonnage

La quercétine a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. La concentration du mélange réactionnel a été mesurée à **430 nm**. Avec un spectrophotomètre UV – Visible et la teneur en flavonoïdes a été exprimée en **mg** par **g** d'équivalent quercétine.

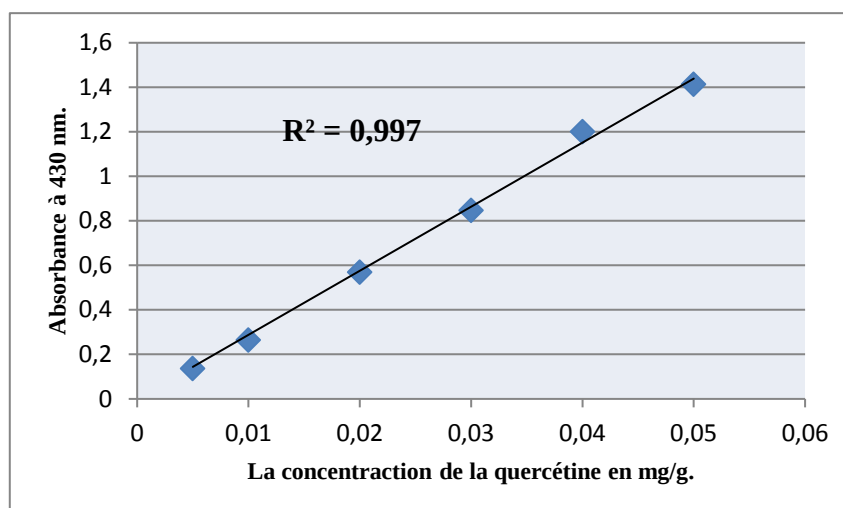


Figure 08 : La courbe d'étalonnage de la quercétine.

V- Evaluation du pouvoir antioxydant

Dans notre travail, pour étudier la capacité antioxydante des extraits de lentille, les tests utilisés sont le DPPH et le PPM.

V.1 Test de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle(DPPH)

Le composé chimique 2,2- diphényl -1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation en solution provoque aussi la couleur bleue violette bien caractéristique de la solution de DPPH (**Ait Baziz et Chemali, 2017**).

Le test au radical DPPH est généralement utilisé pour les composés, qui contiennent les groupements donneurs d'hydrogène, comme R² -NH, R-OH et R-SH. Lorsque le DPPH• réagit avec un antioxydant, un atome d'hydrogène vient se fixer sur le radical, ce qui entraîne une perte de couleur. C'est ce qui permet le suivi de l'efficacité d'un antioxydant par spectrophotométrie (**Guillouty, 2016**).

Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH par les extraits a été calculé comme suit :

$$I\% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Ac: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

Ae: absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

Chapitre II : Matériels et méthodes.

La concentration inhibitrice de **50 %** du DPPH (IC_{50}) de chaque extrait a été par la suite calculée : **(Trabsa, 2015)**

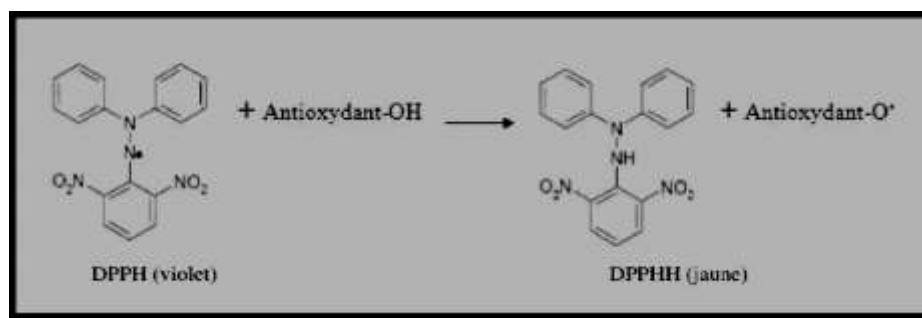


Figure 09 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH **(Rolland, 2004)**.

V.1.1 Le protocole

0.5 ml de la solution DPPH ($C=250\mu M$ solubilisé dans le méthanol) + **0.5 ml** de chaque échantillon dilué ou standards.

V.2 Test de phosphomolybdate (PPM)

Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait phénolique – antioxydant) vers le complexe oxydant phosphomolybdate (PPM). Ce transfert dépend de potentielle redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

En effet le test du (PPM) est basé sur la réduction du molybdate de l'étage d'oxydation (VI) à l'étage de l'oxydation (V) en présence de l'antioxydant. Cette réduction, se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate / $M(V)$) à un pH acide. La diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) est mesurée par spectroscopie UV-visible à une longueur d'onde de 695 nm **(Benarous, 2014)**.

V.2.1 Le protocole

Réactifs :

- 4 mM** molybdate d'ammonium
- 0.6 M** acide sulfurique
- 28 Mm** phosphate de sodium

⇒ **2 ml** du réactif phosphomolybdate + **0.2 ml** de chaque échantillon dilué ou standards.

Chapitre III :

Résultats et discussion

I. Détermination du rendement d'extraction

Les rendements d'extraction obtenus ainsi que les couleurs des extraits sont présentés dans le tableau et la figure ci-dessous (Tableau 04 et figure 10).

Tableau 04 : Rendement et couleur des différents extraits.

	L'échantillon	Couleur	Rendement %
HEX	L.V	Jaune clair	1,8
	L.R	Jaune clair	2,2
	L.V C	Transparent	0,4
	L.R C	Transparent	0,4
DCM	L.V	Jaune clair	1,8
	L.R	Jaune clair	1,4
	L.V C	Transparent	1,6
	L.R C	Transparent	2,4
ACT	L.V	Jaune clair	1,2
	L.R	Jaune clair	0,6
	L.V C	Transparent	0,4
	L.R C	Transparent	2,7

Au regard du tableau précédent, nous avons remarqué que tous les extraits ont montré différentes couleurs variant du jaune claire pour les lentilles vertes et rouges, tandis que les échantillons de lentilles vertes et rouges utilisés après cuisson sont sans couleur (résidu transparent) pour tous les solvants organiques.

Sachant que la procédure d'extraction pour les quatre échantillons de lentille est effectuée dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats obtenus montrent des rendements d'extraction différents. On a remarqué que les rendements des extraits hexaniques varient de **0,4** à **1,8** % et pour les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle varient de **1,4** à **2,4** % et **0,4** à **2,7** % respectivement.

En analysant les résultats du Tableau (04), nous avons déduit aussi que les plus hauts rendements ont été enregistrés dans l'extrait d'acétate d'éthyle avec un rendement de **2,7**

%. Les solvants les moins polaires ont montré de faibles rendements de **1,4 à 2,4%** et **0,4 à 1,8 %** pour les extraits dichlorométhaniques et les extraits hexaniques respectivement.

Cette différence dans les rendements pourrait être due principalement à la richesse ou la pauvreté de l'échantillon en composés solubles dans les solvants utilisés ou bien à la taille des particules de la poudre végétale (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

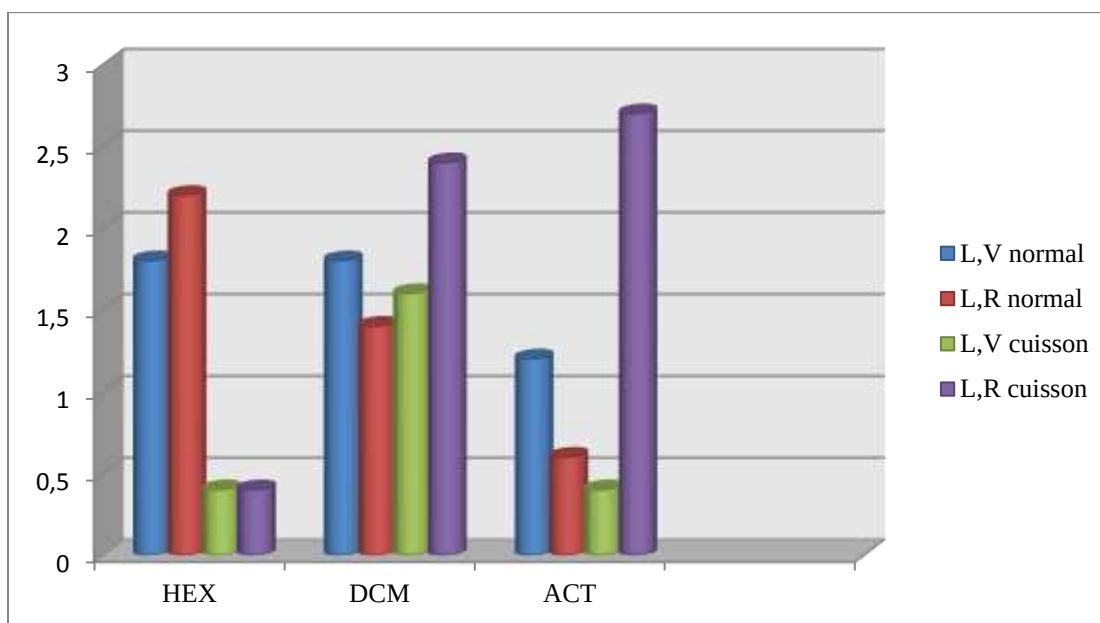


Figure 10 :Histogramme des rendements d'extraction des quatre échantillons de lentille.

II. Résultats de dosage des composés phénoliques

II.1 Teneur en phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux ont été déterminées en utilisant le réactif Folin Ciocalteu et les concentrations approximatives en phénols totaux des extraits sont calculées grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-après.

CHPITRE III : Résultats et discussion.

Tableau 05 : Teneurs en phénols totaux des différents extraits de *Lens culinaris*.

Extrait	Nom de l'échantillon	Teneur en phénols totaux (mg EAG/g)
Hexane	L.V	0,147 ± 0,058
	L.R	0,151 ± 0,044
	L.V C	0,011 ± 0,001
	L.R C	0,007 ± 0,003
Dichlorométhane	L.V	0,33 ± 0,051
	L.R	0,178 ± 0,069
	L.V C	0,010 ± 0,012
	L.R C	0,0026 ± 0,003
Acétate d'éthyle	L.V	0,199 ± 0,019
	L.R	0,391 ± 0,089
	L.V C	0,15 ± 0,238
	L.R C	0,041 ± 0,039

Selon les résultats illustrés ci-dessus, les concentrations en polyphénols varient entre **0,0026 ± 0,003** et **0,391 ± 0,089 mg EAG/g** de la matière sèche.

Les teneurs des composés phénoliques les plus élevés ont été détectés dans l'extrait d'acétate d'éthyle avec une concentration de **0,391 ± 0,089 mg EAG/g**, suivi par l'extrait de dichlorométhane de concentration de **0,33 ± 0,051 mg EAG/g**. Tandis que, la teneur la plus basse a été remarquée dans l'extrait de dichlorométhane aussi avec une concentration de **0,0026 ± 0,003 mg EAG/g** de la matière sèche.

Dans l'extrait de l'acétate d'éthyle pour les lentilles normales sans cuisson les quantités des phénols totaux observées dans la lentille verte et rouge égalent à **0,199 ± 0,019** et **0,391 ± 0,089 mg EAG/g** respectivement. Ces valeurs sont importantes par rapport à celles trouvées dans les lentilles vert et rouge après cuisson a donné la valeur la plus faible égalent à **0,15 ± 0,238** et **0,041 ± 0,039 mg EAG/g** respectivement.

Nous pouvons déduire aussi que nos extraits présentent des teneurs élevés par rapport aux masses macérées (**10g**), ce qui explique que l'acétate d'éthyle est un solvant connu de son meilleur pouvoir d'extraire les composés phénoliques (**Benarous, 2014**).

CHPITRE III : Résultats et discussion.

Dans les extraits de dichlorométhane et hexanique les quantités des phénols totaux observées pour les lentilles vertes et rouges sans cuisson sont importantes par rapport à celles trouvées dans les deux variétés de lentilles utilisés après cuisson ce qui est pourrait être dû à l'influence du chauffage ou bien la cuisson sur les polyphénols.

Cette variabilité dans la concentration en polyphénols entre les différents extraits peut être expliquée par la présence des phénols de polarité différente / et ou la présence d'autres constituants (**Harbone et Williams, 2000**). Parce que, malgré la sensibilité et la simplicité de cette méthode, elle n'est pas spécifique pour les polyphénols. En effet, le réactif de Folin peut réagir avec des protéines, des sucres réducteurs, l'acide ascorbique et des composés soufrés (**Demmana et al, 2018**).

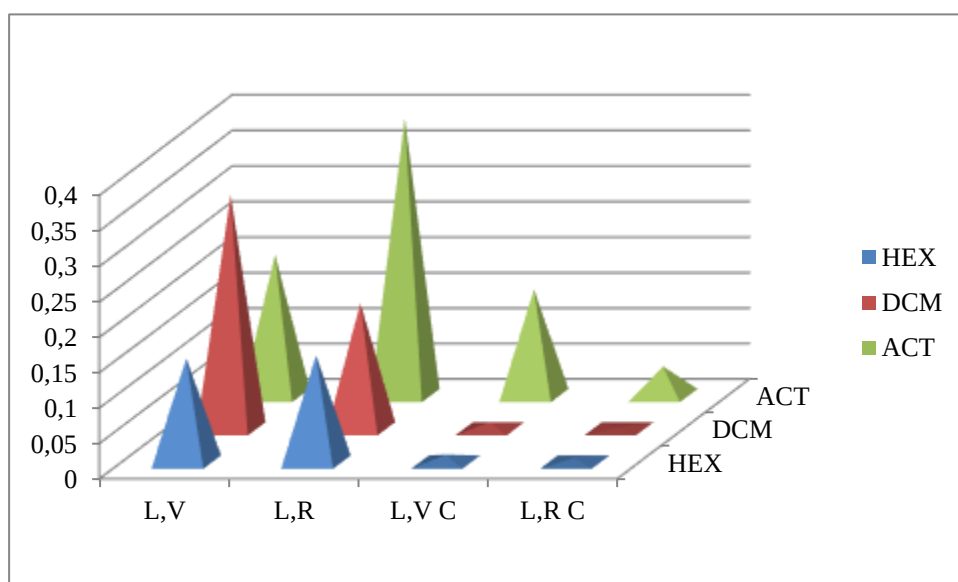


Figure 11 : Histogramme représentant les teneurs en phénols totaux dans les quatre variétés de lentilles.

II.2 Teneur en flavonoïdes

Le dosage spectrophotométrique des flavonoïdes a été effectué par la méthode de trichlorure d'aluminium à partir des extraits bruts des lentilles afin de déterminer la teneur totale en flavonoïdes. Pour cet objectif, une courbe d'étalonnage en utilisant la quercétine comme standard a été tracée. Les résultats des teneurs en flavonoïdes totaux sont représentés dans le tableau (06).

CHPITRE III : Résultats et discussion.

Tableau 06 : Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de *Lens culinaris*.

Extrait	Nom de l'échantillon	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g)
Hexane	L.V	0,0038±0,0002
	L.R	0,0030±0,0001
	L.V C	0,0022± 0,0318
	L.R C	0,0032± 0,0225
Dichlorométhane	L.V	0,0039± 0,0009
	L.R	0,0030± 0,0002
	L.V C	0,0005± 0,0025
	L.R C	0,0021± 0,0298
Acétate d'éthyle	L.V	0,017± 0,0005
	L.R	0,005± 0,0011
	L.V C	0,0008± 0,0042
	L.R C	0,0017± 0,0050

D'après la synthèse de l'ensemble des résultats obtenus lors de la quantification en flavonoïdes, nous pouvons constater que les teneurs de ces composés varient entre **0,0005 ± 0,0025** et **0,017± 0,005 mg EQ/g** de la matière sèche.

Les taux en flavonoïdes les plus élevés ont été détectés dans : l'extrait de l'acétate d'éthyle avec une concentration de **0,017± 0,005 mg EQ/g**, suivi par l'extrait de dichlorométhane de **0,0039± 0,0009 mg EQ/g** et pour l'extrait hexanique avec un taux de **0,0038± 0,0002 mg EQ/g** de la matière sèche.

La teneur la plus basse a été remarquée dans l'extrait de dichlorométhane avec un taux de **0,0005 ±0,0025 mg EQ/g** de la matière sèche.

Dans les trois extraits (HEX, DCM, ACT) pour les deux variétés vertes et rouges de lentilles sans cuisson les quantités en flavonoïdes observées égalent à (**0,0038 – 0,0030 mg EQ/g**) ; (**0,0039 – 0,0030 mg EQ/g**) et (**0,017 – 0,005 mg EQ/g**) respectivement.

D'après la synthèse des différents résultats, nous pouvons dire que la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes est étroitement liée au solvant utilisé, ceci est dû à la présence des molécules avec différentes polarités, et une différence de concentration en

CHPITRE III : Résultats et discussion.

composés phénoliques et flavonoïdes. Ainsi, la cuisson a influencé sur les compositions de l'échantillon utilisée c'est-à-dire la cuisson a diminué la teneur des polyphénols totaux.

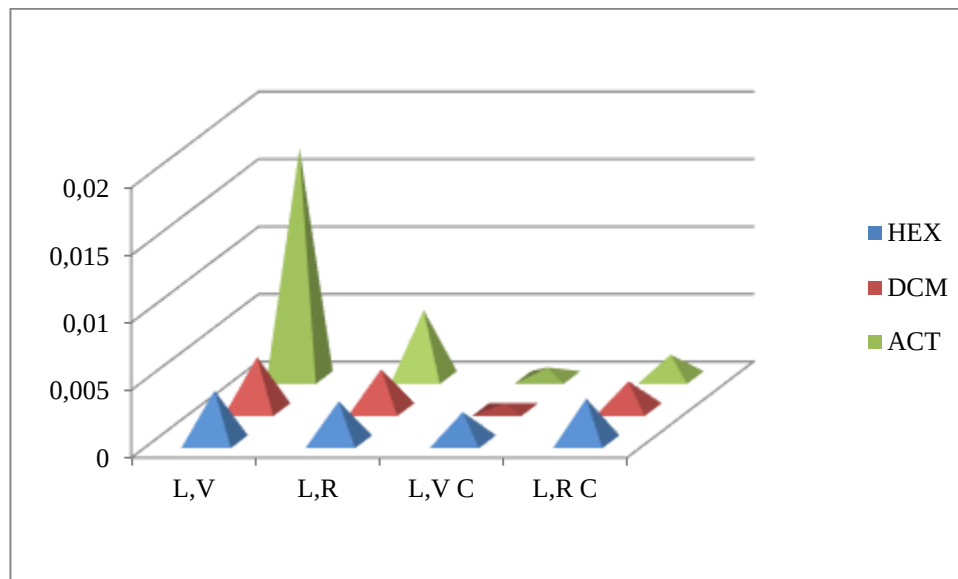


Figure 12 : Histogramme représentant les teneurs en flavonoïdes.

III. Résultats du pouvoir antioxydant

IV.1 Le test du DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée en suivant la réduction du radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à **517 nm**.

Les figures qui suivent représentent les tracés du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration des extraits (Figure 13 et Figure 14) ainsi que la Figure 15 qui représente la variation des pourcentages d'inhibition (%) en fonction des concentrations en mg/ml de antioxydant standards et les étalons choisis pour cette étude à savoir la vitamine C .

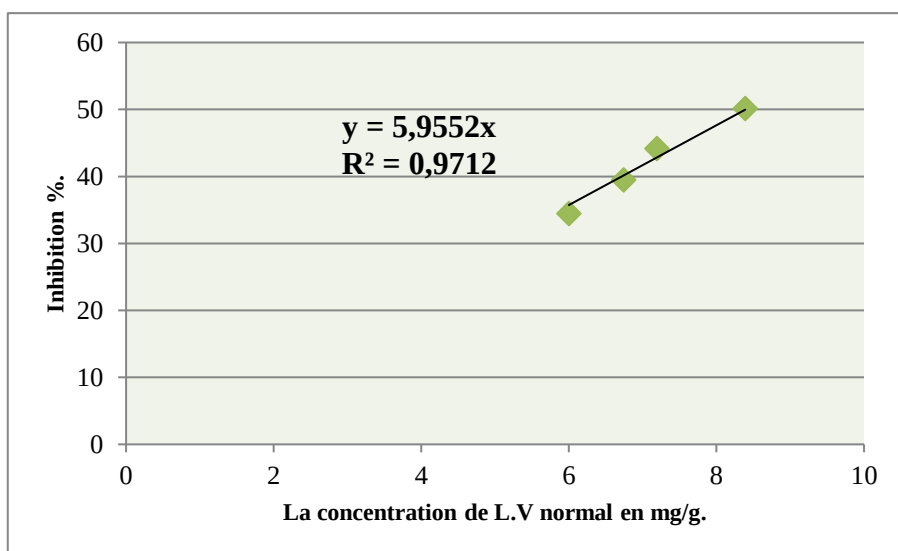


Figure 13 : % d'inhibition de DPPH en fonction de concentration pour la L.V (Extrait ACT).

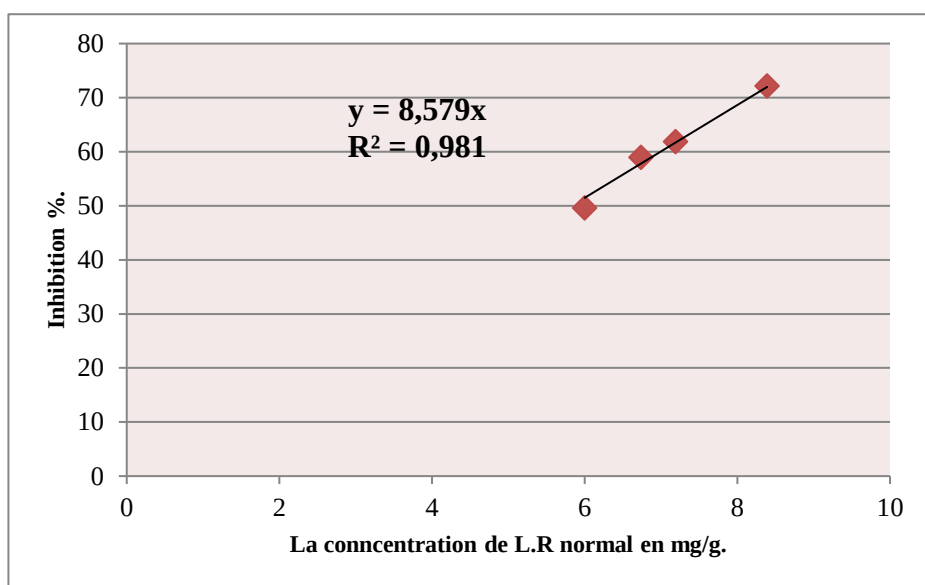


Figure 14 : % d'inhibition de DPPH en fonction de concentration pour la L.R (Extrait ACT).

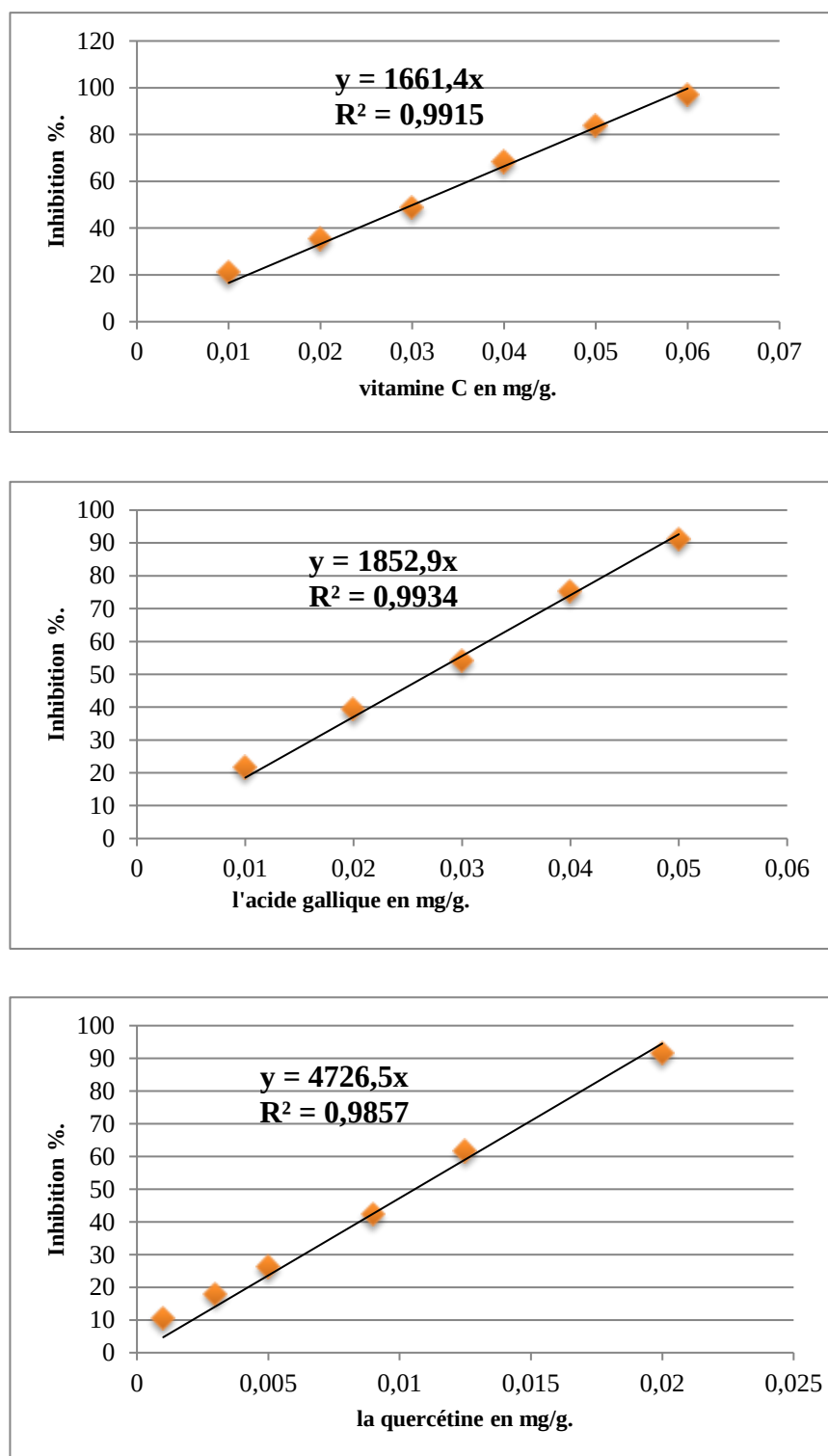


Figure 15 : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en antioxydants standards choisis pour l'étude.

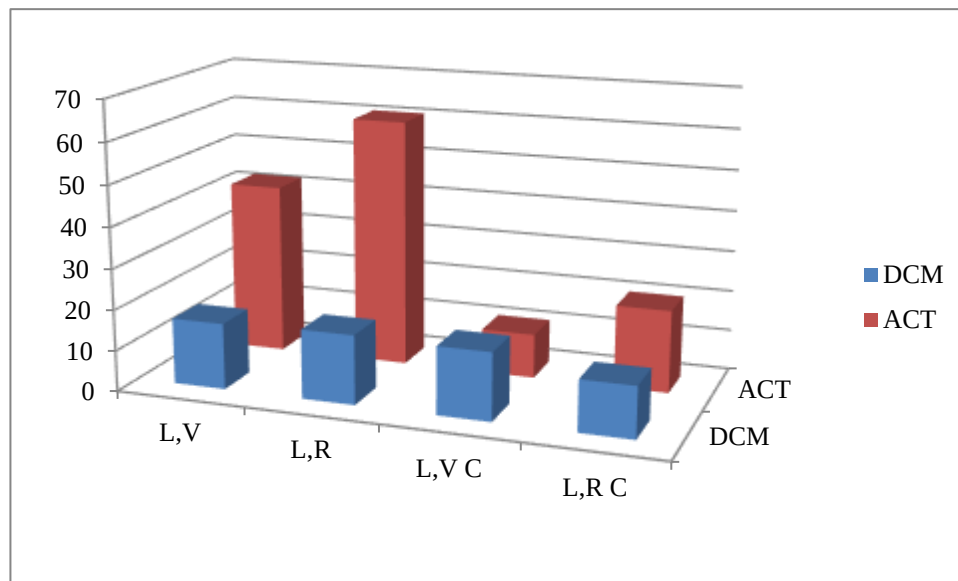


Figure 16 : Histogramme les % d'inhibition des deux extraits DCM et ACT pour les quatre échantillons de lentille.

Les pourcentages d'inhibition ainsi déterminés à partir des tracées précédents, nous ont permis de déterminer la concentration d'inhibition à **50%** (EC50) des antioxydants présents dans les extraits exprimés en mg/ml.

Le paramètre « **EC 50** » (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH[•]) a été calculé pour chaque extrait (**Boussoussa, 2011**). De même, nous avons calculé les **EC50** de la vitamine C (l'acide ascorbique), acide gallique et quercétine afin de les comparer avec ceux des différents extraits. Les valeurs d'**EC50** obtenues sont résumées dans le (tableau 07).

CHPITRE III : Résultats et discussion.

Tableau 07 : Les valeurs d'**EC50** en (mg/mL) des différents extraits et les antioxydants standards.

Nom de l'extrait	Nom de la plante	EC50 en (mg/ml)
HEX	L.V	Pas d'activité
	L.R	
	L.V C	
	L.R C	
DCM	L.V	Faible activité
	L.R	
	L.V C	
	L.R C	
ACT	L.V	8,39 ± 0,214
	L.R	5,83 ± 0,138
	L.V C	Pas d'activité
	L.R C	Pas d'activité
Standards	Vitamine C	0,030 ± 0,0047
	L'acide gallique	0,027 ± 0,0004
	La quercétine	0,011 ± 0,068

Les résultats présentés dans le (tableau07) montrent que les valeurs de l'**EC50** de lentilles vertes et rouges de l'extrait l'acétate d'éthyle varié entre **8,39±0,214** et **5,83 ± 0,138mg/ml** respectivement. La plus forte activité a été enregistrée pour la lentille rouge. Par contre l'activité la plus faible a été enregistrée pour les autres extraits.

D'après les valeurs d'**EC50** obtenues dans le (Tableau 07), on s'aperçoit que tous les extraits testés ont montré des activités antiradicalaires inférieur à celles déterminées pour les antioxydants standards.

En analysant l'ensemble de résultats (Tableau 07) et sachant que le paramètre **EC50** est inversement proportionnel à l'activité antioxydante. Les résultats, montrent clairement

que les extraits possèdent un potentiel antioxydant faible comparable avec celui des antioxydants utilisés comme référence. On comparer notre résultat avec **(Florinda et al, 2014)** les lentilles ont démontré la plus haute activité antioxydante (**EC 50** ne dépassant pas **2,3 mg / g**), confirmant que les lentilles sont un excellent nourriture antioxydante.

Les modifications chimiques, physiques et enzymatiques qui se produisent pendant la cuisson modifiera la capacité et la digestibilité des antioxydants phytochimiques alimentaires **(Chao et al, 2019)**.

La cuisson a diminué la teneur en métabolites antioxydants (acide gallique, catéchine et quercétine) ainsi que les activités antioxydantes **(Pal et al, 2017)**.

IV.2 Le test de phosphomolybdate

Les courbes exprimant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en composés phénoliques issus d'une extraction hexanique, dichlorométhane et l'acétate d'éthyle de différentes polarités sont présentées dans les (Figure 17, 18 et 19). De plus, nous avons tracé les courbes des antioxydants de synthèse (vitamine C), (l'acide gallique) et (quercétine) (Figure 20), afin de référer le pouvoir antioxydant de nos extraits à celui de la vitamine C.

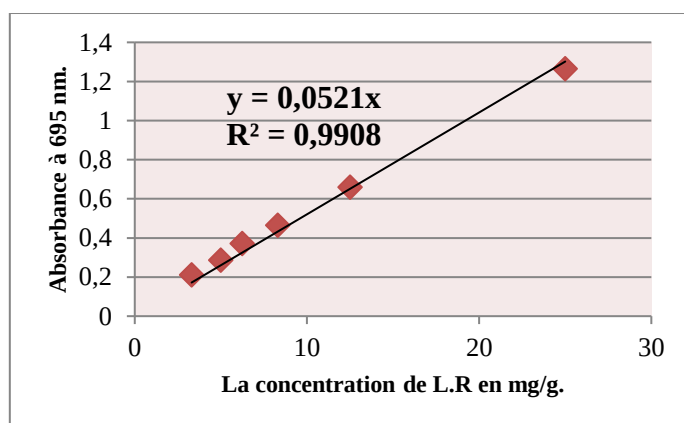


Figure 17 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols de L.R issus d'une extraction hexanique.

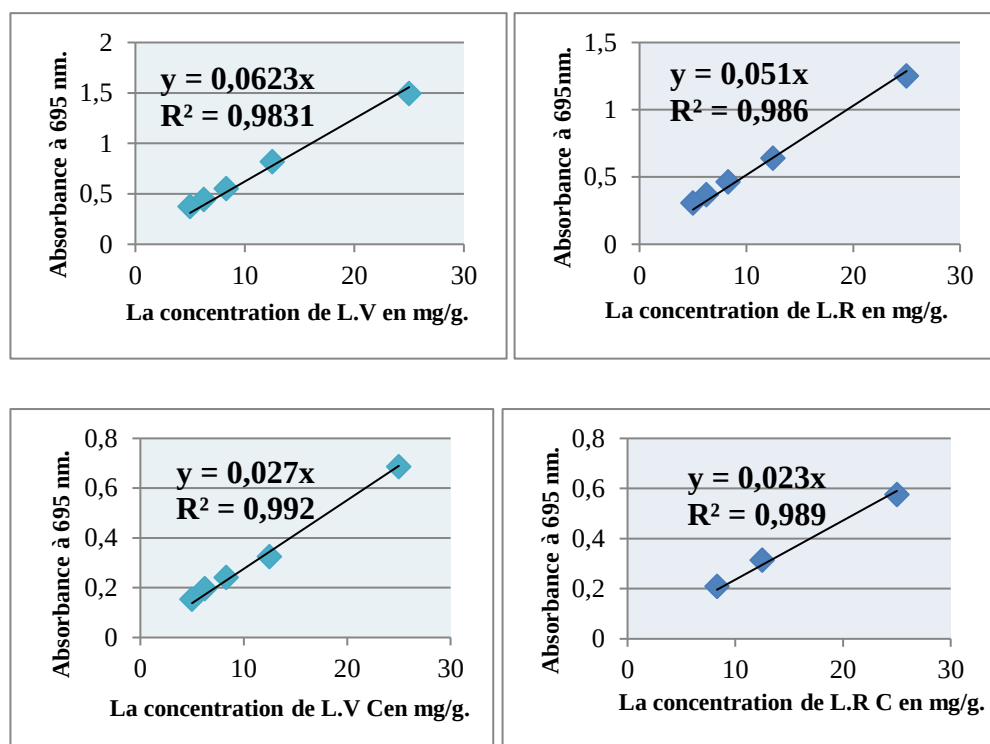


Figure 18 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction dichlorométhane.

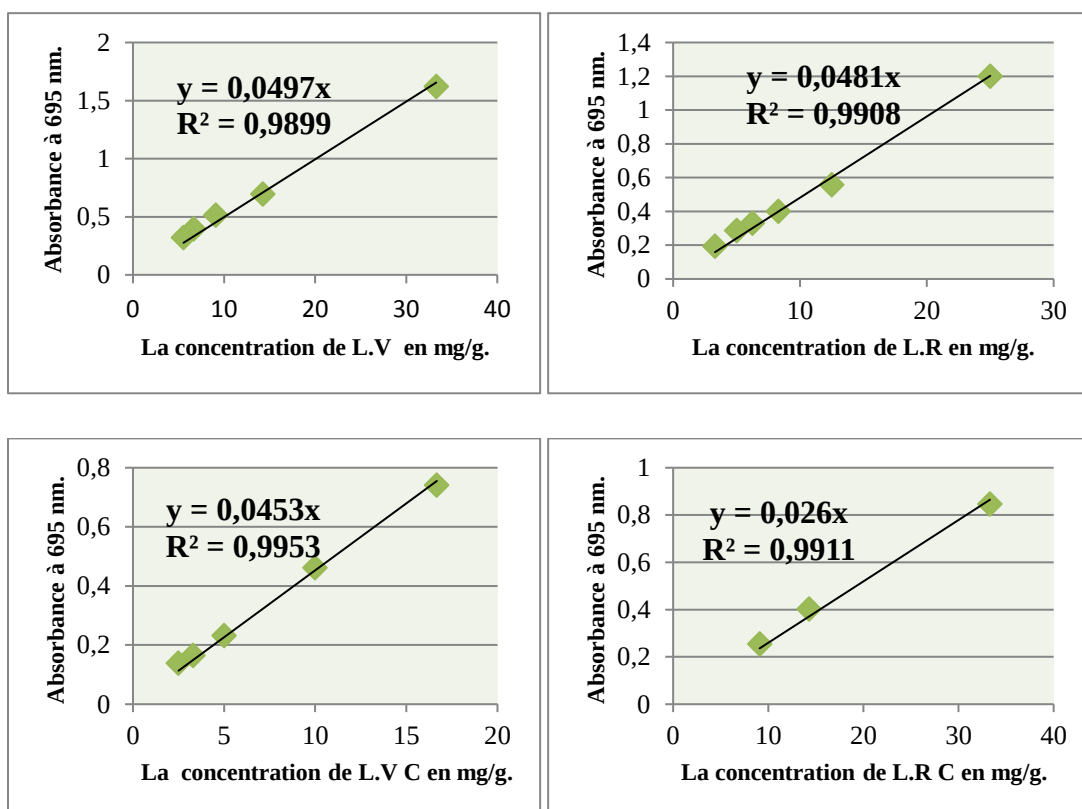


Figure 19 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction d'acétate d'éthyle.

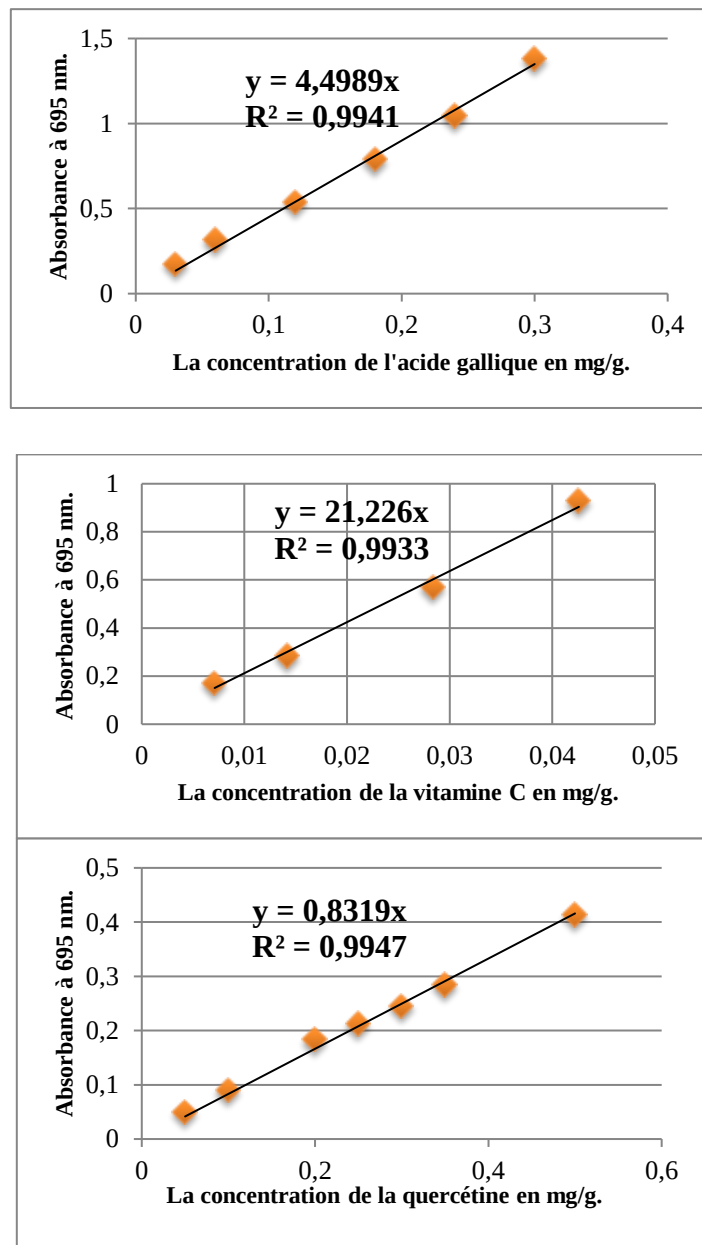


Figure 20 : Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en antioxydants de référence.

L'activité antioxydante de nos extraits a été référée à celle de la vitamine C en termes d'équivalence. Donc, à partir des pentes tirées des graphes ci-dessus, nous avons calculé le paramètre **VCEAC** (**V**itamin **C** **E**quivalent **A**ntioxydant **C**apacity) pour chaque extrait (Tableau 08)

CHPITRE III : Résultats et discussion.

Tableau 08 : Les valeurs des **VCEAC** en (**mg/mL**) des différents extraits et les antioxydants standards.

Extrait	Nom de l'échantillon	« VCEAC »
Hexane	L.V	Pas d'activité
	L.R	0,0025± 0,0004
	L.V C	Pas d'activité
	L.R C	Pas d'activité
Dichlorométhane	L.V	0,0029 ± 0,0005
	L.R	0,0024 ± 0,0013
	L.V C	0,0012 ± 0,0023
	L.R C	0,0011 ± 0,0001
Acétate d'éthyle	L.V	0,0023 ± 0,0004
	L.R	0,0023 ± 0,0006
	L.V C	0,0021 ± 0,0006
	L.R C	0,0012 ± 0,0001
Standards	L'acide gallique	0,2119 ± 0,212
	La quercétine	0,0391 ± 0,0014

D'après les résultats obtenus (Tableau 08), nous avons observé que les valeurs de **VCEAC** varient globalement entre **0,0011± 0,0001** et **0,0029 ± 0,0005 mg/g VCE**.

On a constaté que l'extrait de dichlorométhane pour la lentille vert présente une activité antioxydante importante comparable à la quercétine (**0,039 mg/g VCE**).

En revanche, les autres extraits nous ont montrée des pouvoirs antioxydants faibles par rapport aux composés standards étudiés (l'acide gallique et la quercétine)

Toutes les valeurs supérieures à un (1) indiquent une grande capacité antioxydante de nos composés phénoliques (**Boussoussa, 2011**). Mais dans notre cas toutes les extraits possèdent une capacité antioxydant très faible car les valeurs de **VCEAC** est inférieurs à un (1).

CHPITRE III : Résultats et discussion.

Le paramètre **VCEAC** est défini comme étant la concentration de la solution standard de la vitamine C possédant la capacité antioxydante équivalente à une solution de 1 mg/ml de la solution étudiée (extrait), plus la valeur de **VCEAC** est importante, plus le pouvoir antioxydant des extraits est important (**Benarous, 2014**).

Conclusion et perspective

Conclusion

L'intérêt accordé à l'étude scientifique du pouvoir thérapeutique des plantes n'a cessé d'augmenter durant ces dernières années dans le but de rechercher des alternatives aux substances chimiques qui présentent des risques pour la santé humaine et pour l'environnement. Les plantes restent toujours une source inépuisable de substances bioactives.

L'objectif primordial assigné par ce travail est l'étude des métabolites secondaires (composés phénoliques) et évaluation des propriétés antioxydantes de l'espèce de *Lens culinaris*.

Lors de ce travail, les extraits des deux variétés de lentille, on fait l'objectif d'une étude détaillée, commençant par une extraction par des solvants organiques à polarité croissante **HEX**, **DCM** et **ACT** puis nous avons évalué la quantité des phénols totaux en adoptant la méthode de Singelton et Ros (1965), les résultats montrent que les quatre échantillons étudiés possèdent une quantité faible des composés phénoliques qui varie entre $0,0026 \pm 0,003$ et $0,391 \pm 0,089 \text{ mg EAG/g}$. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode de Lamaison et Carnat (1991) et nous avons constaté que les teneurs en ces composés varient entre $0,0005 \pm 0,0025$ et $0,017 \pm 0,005 \text{ mg EQ/g}$ de la matière sèche.

Nous avons évalué par la suite, l'activité antioxydante de nos extraits en utilisant deux tests à savoir : **DPPH** et **Phosphomolybdate**. Cependant pour le pouvoir antiradicalaire des extraits vis-à-vis du radical **DPPH**, nous avons enregistré des valeurs d'**EC50** différents comprises entre $5,83 \pm 0,138$ et $8,39 \pm 0,214 \text{ mg/ml}$ pour les lentilles vertes et rouges de l'extrait l'acétate d'éthyle et pour les autres extraits nous avons observé une faible activité antioxydante. Pour le test de phosphomolybdate les valeurs de **VCEAC** obtenues varient globalement de $0,0011 \pm 0,0001$ et $0,0029 \pm 0,0005 \text{ mg/g VCE}$.

Ce travail confirme que les activités antioxydantes des extraits phénoliques de la plante *Lens culinaris* qui sont plus au moins faible en particulier après la cuisson. En plus, nous pouvons déduire de ce modeste travail que la polarité du solvant d'extraction influe principalement sur le rendement des extraits bruts ainsi que sur les teneurs en composés phénoliques totaux et par conséquent sur l'activité antioxydante.

Conclusion

A travers ces expériences, nous concluons que l'efficacité antioxydante n'est pas liée à une grande quantité de composés phénoliques, et par conséquent d'autres études sont alors nécessaires pour élucider les structures des composés phénoliques responsables de l'activité antioxydante.

Perspective

Cette étude réalisée sur les deux variétés de lentille (verte et rouge) de l'espèce *Lens culinaris*. Il serait donc intéressant de pousser et approfondir ce travail par :

- D'élargir la gamme des tests d'activités antioxydantes
- Etude des autres activités biologiques sur les lentilles.
- Caractériser les composés phénoliques en utilisant des méthodes plus précises comme HPLC, RMN pour identifier les composés bioactifs.

Références bibliographiques

Références bibliographique

- **Aissani C , Achi A. (2018).** Localisation des N.O.R (riches en gènes ribosomiques) chez des génotypes du *Lens culinaris* Medik. Mémoire master. Université des Frères Mentouri Constantine.
- **Ait Baziz H et Chemali A. (2017).** Evaluation de l'activité antioxydante et de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique d'une plante médicinale locale. Mémoire de Master. Université A. MIRA - Bejaia
- **Almi, H. (2016).** Etude des myco-pathogènes de *Lens culinaris* et évaluation de l'effet de deux souches de *Trichoderma harzianum* : cas de la Fusariose et de la Cylandrosporiose. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri. Constantine.
- **Annane I et Haddad H. (2015).** Caractérisation cytogénétique des deux espèces légumineuses (*Lens culinaris* Medik, *vicia faba* L.). Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantine.
- **BartolomeÂ. B , Estrella. I ,HernaÂndez. T. (1997).** Changes in phenolic compounds in lentils (*Lens culinaris*) during germination and fermentation. Z Lebensm Unters Forsch A 205, 290- 294 p.
- **Ben Tireche M et Achour F. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des extraits méthanolique de quelques algues marines d'Algérie. Mémoire de Master. Université de Amar Telidji Laghoaut.
- **Benarous K. (2014).** Etude de l'activité antioxydante et de l'activité inhibitrice des extraits de *Pegunum harmala*, *Inonotus hispidus*, *Marrubium vulgare*, *Ziziphus lotus* et *Achillea santotina* sur la lipase de *candida rugosa*. Thèse de doctorat, L'école normale supérieure de Kouba-Alger.
- **Bentabet N, Boucherit- Otmani Z et Bouchreit K. (2014).** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. Pharmacognosie Phytothérapie. Springer- Verlag France :1-8 p
- **Bouguerne.B. (2012).** Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat. Université de Toulouse III- Paul Sabatier.

Références bibliographique

- **Boussoussa H.(2011).** Activités antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques des fleurs de *Rhanterium adpressum*. Mémoire de Magistère. Université Amar Telidji – Laghouat.
- **Bouزيد, S. (2017).** Etude de l'effet de l'interaction du molybdène avec l'azote chez les fabacées cultivées en milieu salin. Thèse doctorat. Université les Frères.
- **Demmana.T, Hebiche. R, Dassaa. I. (2018).** Contribution à l'étude de l'activité antioxydant des différents extraits des graines de *Nigella* et des tiges de gingembre. Mémoire de master. Université de Amar Telidji, Laghouat.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., et Vidal N. (2005).**Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry: 97. 654-660 p.
- **Guillouty. A. (2016).** Plantes médicinales et antioxydants. Thèse doctorat. Université Toulouse III Paul Sabatier.
- **Hammouda D et Khalfallah N. (2015).** Étude comparative de la caryomorphologie chez six génotype de *Lens culinaris* Medik. European Scientific Journal 24, 214- 225 p
- **Harbone JB et Williams CA. (2000).**Advances in flavonoid reserch since 1992. Phytochemistry, Nov; 55(6): 481- 504p.
- **Hocine. F et Gorine. M. (2017).** Évaluation de l'exposition au plomb et cadmium et impact sur quelques paramètres du statut oxydant/ antioxydant chez les ouvriers exposés aux fumées de soudage. Mémoire de master. Université Abou Beker Belkaid. Tlemcen.
- **Kanoun K .(2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire de Magister. Université Abou bekr Belkaid Tlemcen.
- **Manallah. A. (2012).**Activité antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Magister. Université Ferhat Abbas- Sétif
- **Mo'ez Al-Islam Ezzat. F; Takruri. H; Ala Yousef. I. (2013).** Role of lentils (*Lens culinaris* L.) in human health and nutrition: a review. Mediterr J Nutr Metab 6, 3- 16 p.

Références bibliographique

- **Mohammad. J, Abuzer. A, Mohammed. A. (2015).** Isolation of antioxidant phytoconstituents from the seeds of *Lens culinaris* Medik. Food Chemistry 175. 358- 365 p.
- **Pal R, Anuradha B, Pradhuman Y, Lakshmi K, Mishra K, Aditya J, et Pattanayak A. (2017).** Effect of dehulling, germination and cooking on nutrients, anti-nutrients, fatty acid composition and antioxidant properties in lentil (*Lens culinaris*). J Food Sci Technol, 54(4):909–920 p.
- **Riah N.(2014).** Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum symbiovar viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien. Thèse de doctorat. Université Constantine 1.
- **Rolland Y. (2004).** Antioxydants naturels végétaux. OCL, 11 : 419-424p.
- **Trabsa H. (2015).** Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum* . Thèse de Doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- **Vermerris, W ; Nicholson, R.(2006).** Phenolic compound biochemistry. Springer science. Netherlands. 276P.
- **Chao Z, Yuanyuan L, Shanshan L, Hui C, Yi G, Wai San C, Bin L, Kewei Z, Song M, Céline R, Esra C, Jianbo X. (2019).** Effects of domestic cooking process on the chemical and biological properties of dietary phytochemicals. Trends in Food Science & Technology (85):55-66 p
- **Florinda F, Federica C, Autilia C, Tiziana G, Donatella A, Marisa D, Massimo Z, Raffaele C, Filomena N. (2014).** Polyphenol composition and antioxidant activity of different grass pea (*Lathyrus sativus*), lentils (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*) ecotypes of the Campania region (Southern Italy). ScienceDirect (7): 551- 557 p

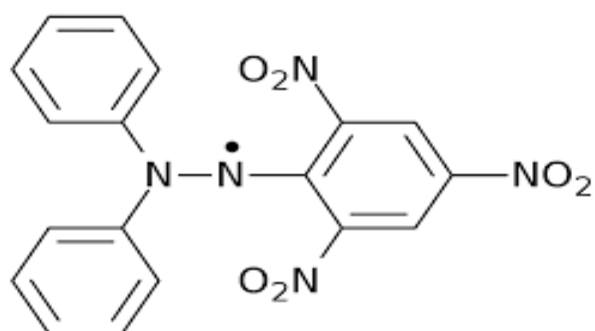
Annexe

Annexe

La structure de l'acide gallique.



La structure de DPPH



La structure de la quercétine.



La structure de l'acide ascorbique

