

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Université Ammar Thledji-Laghouat

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



**Département de Biologie
Mémoire de Master En Biologie**

Spécialité : Biochimie appliqué

Date de soutenance:24/09/2020

Titre :

**Etude phytochimique et évaluation de
l'activité antioxydante de *Vigna mungo*. L**

Présenté par : M^{lle}. BOULLAHI aicha

M^{lle}. CHEIKHI fadila

Jury d'évaluation :

**Président M. BEN DEHGANE Soumia MCA Université de
Laghouat**

**Examineur M. ZERROUKI Mohammed Houcine MCA Université de
Laghouat**

Promoteur M. GOUZI Hicham Professeur Université de Laghouat

Année Universitaire 2019 - 2020

Dédicace

A Allah

Tout puissant ,Qui m'a inspiré ,Qui m'a guidé dans le bon chemin

Louanges et remerciements, Pour votre clémence et miséricorde

﴿وَقَالُوا الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي هَدَانَا لِهَذَا وَمَا كُنَّا لِنَشْكُرَ لَوْ لَوْلَا أَنْ هَدَانَا اللَّهُ﴾

A mes parents

Mes très chers parents ; sans votre affection, vos conseils, vos sacrifices, vos encouragements, vos prières et vos efforts que vous avez déployés durant toute ma vie, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Je vous présente ma pleine gratitude et mon profond respect, j'espère que Dieu vous donne la longue vie et la bonne santé, je vous aime.

- *A mon amie et binôme Fadila pour son patient et son soutien et sa famille.*
- *A mes chers frères et sœurs chaque 'un à son nom*
- *A ma chère amie Aicha pour son soutien durant toutes mes années scolaires et dans ma vie.*

➤ A ma famille

A tout la famille Boullahi et Tahri surtout ma chère grand-mère et mes tantes, les filles de mon oncles Yamina et Zahra pour le soutien et le dévouement dont vous m'avez fait preuve le long de mes études et au cours de la réalisation de ce travail

- *A mes sœurs de l'organisation UGL et L'association de El Bachir El Ibrahimy surtout Maria, Siham, Fatima et Sara.*
- *A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce mémoire soit possible*
- *A Tous mes collègues d'étude, de la promotion de 2eme année master biochimie appliquée. *Aicha**

Dédicace

*Tout au début, je tiens à remercier le bon **Dieu** de m'avoir donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à*

Mes chers parents :

A la mémoire de mon père

Ce travail est dédié à mon père ,décédé plus tôt ,qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études .

J'espère que ,du monde qui est sien maintenant ,il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme .puisse Dieu , le tout puissant , l'avoir en sa sainte miséricorde.

A ma chère mère

Aucun dédicace ne serait exprimer mon respect ,mon amour éternel et ma considération pour la sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfanceet j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Puisse Dieu, le très haut ,vous accorder santé ,bonheur et longue vie.

*A mon chère frère **mohammed salem** .que Dieu le protège*

*Ama chère amour sœur **sacia** ,merci pour ton grand couer ,pour ton amour et ton sacrifice afin que rien n'entrave le déroulement de mes études . de plus à son marie **mohammed** merci beaucoup.*

A ma famille

*A tout famille ***cheikhi et boullahi** *chaque un à son nom et surtout les fille de ma tante **saida ,kheira et zohra** .*

À toute ma famille proche et loin pour leur soutient et sacrifices.que Dieu les protège.

*A mon amie et binôme ***Aicha*** pour son patient et son soutien et sa famille. Que Dieu les protège.*

*Mes chères amours d'amies de plus mes sœurs ***milouda et salima****

Merci énormément pour votre plus que précieux ,ma vie ne serait pas magique sans votre présence .que Dieu le protège .

*A mes sœurs de l'organisation UGL et L'association de El Bachir El Ibrahimi surtout **Maria, Siham, Fatima.***

*A Mes adorables sœur des années master **hafsa,fatiha ,zolaikha,mabroka, khawlaet fadila.***

A Tous mes collègues d'étude, de la promotion de 2eme année master biochimie appliquée.et les toutes les années universitaires.

****fadila****

Remerciements

tout d'abord nous exprimons nos remerciements à ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

*Nous tenons particulièrement à remercier notre promoteur, **Pr. Gouzi Hicham**, Professeur à l'université de Laghouat pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, nous le remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'il a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect*

*Nos remerciements s'adressent également au **Dr. Ben Dehgane Soumia** d'avoir accepté de présider ce jury et d'avoir donné de son temps pour examiner ce travail.*

Soyez assurée de notre respect le plus profond.

*A cette même occasion nous tenons à remercier **Dr. Zerrouki Mohammed Houcine**, enseignant à l'université de Laghouat, pour avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de leurs nombreuses autres obligations.*

***Nous** adressons, enfin et surtout, notre plus profonde gratitude et tout notre amour à nos familles, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances, ainsi qu'à tous*

Nos proches amis qui nous ont toujours soutenu et encouragé même dans les périodes les plus difficiles.

Nous exprimons notre gratitude à tous les enseignants rencontrés lors de notre cycle universitaire.

Merci

à ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

Liste d'abréviation

ABTS: 2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzotriazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADP : adénosine di-phosphate

ATP : adénosine tri-phosphate

CHI : chalcone invertase

CHS : la chalcone synthase

DPPH• : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAG/gE : Equivalent acide gallique par gramme d'extrait

EC₅₀ : Concentration effective à 50%

ERN : Espèces réactives de l'azote

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FAO: Food and Agriculture Organisation

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

H₂O₂ : peroxyde hydrogène

LDL : Low Density Lipoprotein

MeOH: Méthanol

NADPH : Nicotinamide Adénosine Dinucléotide Phosphate

NO: monoxyde d'azote

O₂•-: Anion Superoxyde

OH•: Radical hydroxyle

PAL: Phénylalanine AmoniaLyase

ROO-: Radical peroxyde

SOD : Superoxyde dismutase

TCP : taux de composés phénoliques

Liste d'abréviation

UI : unité international

UV : Ultra-violet

Sommaire

Listes des tableau

Listes des figures

Introduction.....01

Partie I : synthèse bibliographique

Chapitre I : généralité sur *vigna mungo*

1. Noms de <i>vigna mungo</i>	03
2. Taxonomie.....	03
3. Origine et répartition géographique.....	04
4. Description.....	04
5. Les Conditions de cultures.....	05
6. Cycle végétale.....	05
7. Les Principales phénomènes au cours de germination des grains de <i>vigna mungo</i>	06
7.1 Dégradation des sucres.....	06
7.2 La réduction de taux de composés phénoliques totaux.....	06
8. Propriétés physiques de <i>vigna mungo</i>	07
9. Composition chimique de <i>vigna mungo</i>	07
9.1 Facteurs nutritionnels.....	07
9.2 Les facteurs antinutritionnels.....	08
10. L'utilisation en vie quotidienne.....	09
11. L'intérêt de <i>vigna mungo</i>	10

Chapitre II : les polyphénols

1. Définition de Composés phénolique	13
2. Structure.....	13
3. Source.....	13

Sommaire

4.	4. Classification	13
	4.1 Phénols simples et les acides phénoliques.....	14
	4.2 Les flavonoïdes	15
	4.3 Les tanins.....	15
	4.4 Les anthocyanes	16
5.	La biosynthèse.....	16
	5.1 La voie de l'acide shikimique.....	16
	5.2. La voie de l'acétate malonate	16
6.	Les fonctions de polyphénols.....	17
	6.1 Chez les plantes.....	17
	6.2 Chez l'homme.....	18

Chapitre III : les anthocyanes

1.	Définition.....	20
2.	Répartition et localisation dans la plante	20
3.	Structure des anthocyanes.....	20
4.	Propriétés.....	21
5.	Les facteurs influents la stabilité des anthocyanes.....	22
6.	Sources et teneurs d'anthocyanes.....	23
7.	Biosynthèse.....	24
8.	absorption et biodisponibilité.....	25
9.	Utilisation des anthocyanes.....	26
	9.1 chez l'homme.....	26
	9.2 Chez les plantes.....	29
	9.3 Dans l'industrie	29

Chapitre VI : antioxydant, stress oxydatif et radicaux libre

1-	Qu'est-ce qu'un antioxydant.....	31
	1-les antioxydants enzymatiques	31
	1.2-Les antioxydants non enzymatiques.....	32
	1.3 Les antioxydants synthétiques	33

Sommaire

2-Le stress oxydant	33
2.1-Les espèces réactives de l’oxygène (ERO).....	34
2.2-L’origine de stress oxydatif	35
2.2 1-Endogène	35
2.2.2-Exogène	37
3-les radicaux libres.....	37
3.1-Les types des radicaux libres.....	37

Partie II : partie expérimental

Matériel et méthodes

1. Matériel	41
1.1 .Matériel biologiques.....	41
1.2. Matériel chimiques.....	41
2-.Méthodes.....	41
2.1préparation de l’extrait méthanolique	41
2-2.Calcul de rendement.....	42
3.Test phytochimiques.....	42
4.Dosage des composés phénoliques et d’anthocyane	44
4.1Dosage des polyphénols totaux	44
4.2Dosage des anthocyanes.....	45
5.Evaluation de l’activité antioxydante	46
5-1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH.....	47
5-2.Méthode de piégeage du radical libre ABTS.....	48
5.3 Réduction du fer par la méthode FRAP	49

Sommaire

Partie III : résultats et discussion

1. Rendement d'extraction.....	50
2. Criblage phytochimique.....	50
3. Dosage des composés phénoliques et des anthocyanes.....	51
4. Evaluation de l'activité antioxydant	52
4.1 Piégeage du radical libre DPPH•.....	52
4.2 piégeage du radical libre ABTS.....	54
4.3 Réduction du fer (FRAP).....	56
Conclusion.....	57
Références bibliographiques.....	59

Liste des tableaux

Tableau 1: Propriétés physiques de <i>vigna mungo</i>	07
Tableau 2: la composition chimique des grains de <i>vigna mungo</i> par 100 g de partie comestible.....	07
Tableau 3: Les facteurs antinutritionnels contenus dans les grains de <i>vigna mungo</i> secs et matures	08
Tableau 4: les principales classes des polyphénols.....	14
Tableau 5: Structure et couleur des six principaux anthocyanidines en fonction de la substitution sur l'ion flavylium	21
Tableau 6: principales sources alimentaires en anthocyanes.....	24
Tableau 7: La teneur en anthocyanes de quelques fruits et légumes	24
Tableau 8: Rôle protecteur des anthocyanes dans la santé humaine	28
Tableau 9: numéros de certains anthocyanes au niveau d'industrie	29
Tableau10 : Les principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.....	38
Tableau11: résultats des testes phytochimiques	50
Tableau 12: Les teneurs en polyphénols totaux et en antocyanes de l'extrait méthanolique des graines de <i>Vigna mungo</i> L.....	51
Tableau 13: Les valeurs d'EC ₅₀ des activités antioxydantes de l'extrait méthanolique des graines de <i>Vigna mungo</i> L. et de l'acide ascorbique obtenues par les tests DPPH, ABTS et FRAP.....	58

Listes des figures

Figure 1: Les feuilles et les gousses de <i>vigna mungo</i>	04
Figure 2: les fleurs de <i>vigna mungo</i>	05
Figure 3 : les grains de <i>vigna mungo</i>	05
Figure 4 : Structure chimique des acides gallique et ellagique	15
Figure 5: Les grandes lignes du métabolisme phénoliques	17
Figure 6: structure de cation flavylum la base des anthocyanes	21
Figure7: Mécanisme d'oxydation des polyphénols par la polyphénol oxydase.....	23
Figure 8 : la biosynthèse des anthocyanes.....	25
Figure 9 : les familles d'antioxydants naturelles.....	31
Figure 10: Déséquilibre de la balance des espèces prooxydants et des systèmes de défense antioxydants	34
Figure 11: Origine des espèces réactives de l'oxygène	35
Figure12 : Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène	35
Figure 13 : la chaîne respiratoire mitochondriale	36
Figure14 : récapitulatif du protocole expérimental.....	41
Figure 15: Les graines de <i>vigna mungo</i> et la poudre obtenue après le broyage des graines	41
Figure16 : l'extrait obtenu après filtration	42
Figure 17: Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	45
Figure 18 : principe de test du DPPH	47
Figure19 : ... principe de test d'ABTS	49
Figure 20 : principe de test (FRAP).	41
Figure 21 : Les résultats après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière du radical DPPH en présence de l'extrait méthanolique de <i>vigna mungo</i> à différentes concentrations.....	53
Figure 22: courbe de Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH' en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique des graines de <i>Vigna mungo L.</i> (A) et d'acide ascorbique (B).....	53

Figure 23 : Les résultats après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière du radical ABTS en présence de l'extrait méthanolique de <i>vigna mungo</i> à différentes concentrations.....	55
Figure 24 : Courbes représentant la variation du pourcentage de réduction du radical ABTS en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique des graines de <i>Vigna mungo</i> L. (A) et de l'acide ascorbique (B).....	56
Figure 25 : Les résultats après 20 min d'incubation au bain marie du complexe ferricyanure en présence de l'extrait méthanolique de <i>vigna mungo</i> à différentes concentrations	56
Figure 26 : courbe du pouvoir réducteur du fer par l'extrait méthanolique des graines de <i>Vigna mungo</i> L. (A) et de l'acide ascorbique (B).....	57

Résumé

Les travaux présentes dans cette mémoire contribuent à la valorisation des grains de *vigna mungo*.L. une plante qu'est utilisé dans notre cuisine traditionnelle, de plus dans la thérapie traditionnelle.au notre région d'Adrar.

. Sont articulent autour de l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante d'extrait méthanolique des grains de vigna mungo L.

Les grains de cette plante ont été soumis à une extraction par macération dans le méthanol pendant 24 h. L'extrait obtenu est soumis à une analyse phytochimique, ensuite un dosage quantitatif des polyphénols totaux suivi la méthode de Folin-Ciocalteu. et des anthocyanes, et cela par les méthodes de différenciation de ph.

L'évaluation de la capacité antioxydante a été effectuée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, par ABTS et par la méthode de réduction de fer FRAP

Le screening phytochimique nous a révélé la présence des composés réducteurs, Acides aminés, Terpénoïdes, Flavonoïdes, Tannins, Coumarines, Stérols et Leucoanthocyanes. Une analyse quantitative revele que l'extrait methanolique est plus riche en polyphenols totaux et en anthocyanes. contient un apport de $49,95 \pm 0,31$ mg EAG/g_{RS} polyphénols totaux et de $42,56 \pm 1,57$ (mg/100 g_{MS}) d'anthocyanes.

Concernant l'évaluation de la capacité antioxydant on trouve que l'effet de notre extrait méthanolique sur le piégeage du radical DPPH• a révélé une forte activité antioxydant par rapport à l'acide ascorbique avec des EC₅₀ de $57,35 \pm 2,40$ µg/ml et $120 \pm 0,00$ µg/mL respectivement .Dans le test ABTS les résultats montre que l'acide ascorbique possède une pouvoir du réduction de cation ABTS· Plus grand á celle de notre extrait méthanolique , avec des EC₅₀ $1.60 \pm 0,00$ µg/ml et $37,33 \pm 1,06$ µg/ml respectivement .Enfin, dans le test du pouvoir réducteur du fer, l'extrait méthanolique montre une activité inférieur à celui de l'acide ascorbique.

L'evaluation, in vitro de l'activite antioxydante a montre que l'extrait presentent des activites antiradicalaires et antioxydantes interessantes.

Ces travaux permettent de postuler que les grains de *vigna mungo* .L sont une source prometteuse de compose anti-oxydantes.

Mots clés : Vigna mungo, composés phénoliques, activité antioxydante (DPPH, ABTS, FRAP) , Santé publique .

Abstract

The works present in this memory contribute to the valorization of the grains of *vigna mungo*.L. a plant that is used in our traditional cuisine, moreover in the traditional therapy.au our region of Adrar.

. It is based on the phytochemical study and the evaluation of the antioxidant activity of methanolic extract of *vigna mungo* L grains.

The grains of this plant were extracted by maceration in methanol for 24 h. The extract obtained is subjected to a phytochemical analysis, then a quantitative determination of total polyphenols followed by the Folin-Ciocalteu method. and anthocyanins, and this by methods of differentiation of ph.

The evaluation of antioxidant capacity was carried out by the trapping method free radical DPPH, by ABTS and by FRAP iron reduction method

Phytochemical screening revealed the presence of reducing compounds, Amino acids, Terpenenoids, Flavonoids, Tannins, Coumarines, Sterols and Leucoanthocyanes. A quantitative analysis revealed that the methanolic extract is richer in total polyphenols and anthocyanins. contains 49.95 0.31 mg EAG/gRS total polyphenols and 42.56 1.57 (mg/100 gMS) anthocyanins.

Regarding the assessment of antioxidant capacity, it is found that the effect of our methanolic extract on the trapping of the DPPH radical• showed a high antioxidant activity compared to ascorbic acid with EC50 of 57.35 2.40 µg/ml and 120 0.00 µg/mL respectively. In the ABTS test the results shows that ascorbic acid has the power of ABTS cation reduction. Larger than that of our methanolic extract , with EC50 1.60 0.00 µg/ml and 37.33 1.06 µg/ml respectively. Finally, in the iron reducing power test FRAP, the methanolic extract shows a lower activity than that of ascorbic acid.

The in vitro evaluation of the antioxidant activity has shown that the extract presents anti-adicalar and antioxidant activities of interest.

This work makes it possible to postulate that the grains of *vigna mungo* . L are a promising source of antioxidant compounds.

Keywords: *Vigna mungo*, phenolic compounds, antioxidant activity, DPPH, ABTS, FRAP.

ملخص

الأعمال الموجودة في هذه المذكرة تساهم في تبيين قيمة Vigna Mungo.L وهي نبات يستخدم في مطبخنا التقليدي، بالإضافة إلى ذلك في الطب البديل في منطقة ادرا

وهو يستند إلى دراسة الكيمياء النباتية وتقييم النشاط المضاد للأكسدة من المستخلص الميثانولي من حبوب Vigna Mungo L.

يتم نفع مسحوق حبوب العينة في ميثانول لمدة 24 ساعة يخضع المستخلص الذي تم الحصول عليه لتحليل كيميائي، ثم تحديد كمي لإجمالي البوليفينول باتباع طريقة فولين-سيوكالتو، والأنتوسيانينس، وهذا عن طريق طرق التمايز في. ph تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة من قبل DPPH حرة الراديكالية طريقة التقاط ، من قبل ABTS فالحركة طريقة خفض الحديد

كشف الفحص الكيميائي للفيتوكيموويات عن وجود تقليل المركبات والأحماض الأمينية والتربينويدات والنكهات والتانينات والكومارين وكولز وستيرولوانثوسيانينز. كشف تحليل كمي أن المقطف الميثانولي أغنى في مجموع البوليفينول والأنتيانوسيانين. ويحتوي على 0.31 ± 49.95 ملغ إجمالي البوليموليول الغاثيون EAG/GRS و 1.57 ± 42.56 (ملغ/100 جي إم إس) أنثوسيانين. فيما يتعلق بتقييم القدرة المضادة للأكسدة، فقد وجد أن تأثير مستخلصنا الميثانولي على احتجاز دبريال بلوكيوم البولي إيثيلين ديركرايد. أظهر نشاطاً عالي مضاد للأكسدة مقارنة بحمض الاسكوربيك مع EC50 من 57.35 ± 2.40 ميكروغرام/مل و 120 ميكروغرام/مل على التوالي. في اختبار ABTS ، تظهر النتائج أن حمض الاسكوربيك له قوة من تقليل ABTS أكبر من مستخلص الميثانوليك، مع EC50 1.60 ± 00.0 ميكروغرام/مل و 1.06 ± 37.33 ميكروغرام/مل على التوالي. أخيراً ، في اختبار FRAP [بور تست] ، يبيد الاستخراج [مثوليك] نشاط [لوور] من حمض الاسكوربيك.

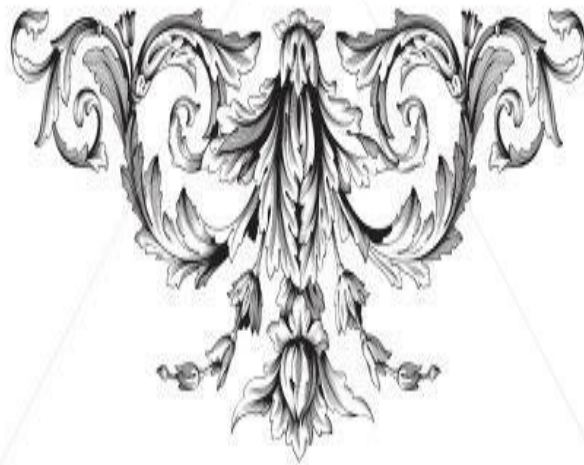
وقد أظهر التقييم المختبري للنشاط المضاد للأكسدة أن المقطف يقدم أنشطة مضادة للأكسدة ومضادة الأكسدة ذات أهمية.

وهذا العمل يجعل من الممكن أن نبوغ أن حبوب فيجنا مونغو L. مصدر واعد لمركبات مضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: Vigna Mungo ، المركبات الفينولية ، النشاط المضاد للأكسدة ، DPPH ، ABTS ، FRAP



Introduction



La culture des légumineuses à graines a été reconnue comme étant l'une des meilleures solutions et la moins coûteuse pour résoudre les problèmes de malnutrition et plus spécifiquement les carences protéiques en Afrique subsaharienne.

Les légumineuses appartiennent à la famille des *Fabacées*, le troisième plus grand groupe de plantes au monde. Elles sont considérées comme un groupe très important d'aliments végétaux, en particulier dans pays en développement, comme source de protéines bon marché lorsque les protéines animales sont rares (Tresina Soris et al, 2010)

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

La population humaine dépend des légumineuses comme aliment de base pour sa subsistance, en particulier en combinaison avec céréales. Ce sont des aliments uniques en raison de leur riche teneur en éléments nutritifs. Elles méritent mieux, car elles jouent un rôle crucial dans une alimentation saine et équilibrée, dans la production alimentaire durable et avant tout dans la sécurité alimentaire (FAO, 2016)

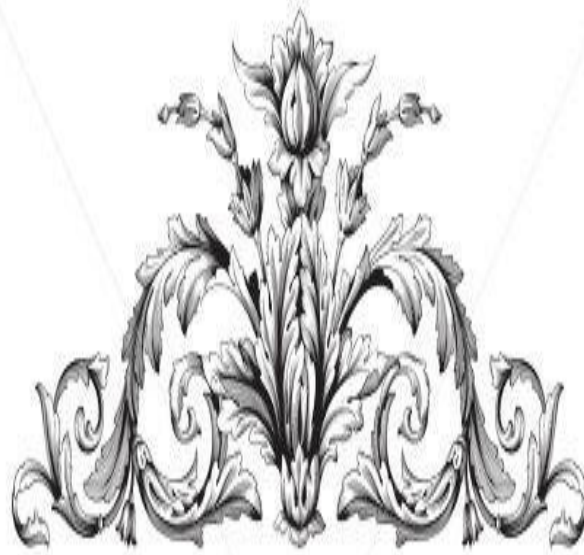
Les légumineuses produisent des métabolites primaires et secondaires et d'autres composés phytochimiques tels que les produits pharmaceutiques, les pesticides et les produits industriels. Elles sont également une excellente source de constituants nutraceutiques tels que les fibres, les inhibiteurs de protéase, l'acide phytique et les polyphénols tels que les flavonoïdes, les isoflavones, les lignanes et les tanins. Gramme noir (*Vigna mungo L.*) est une importante culture de légumineuses occupant une position unique dans l'agriculture indienne. Parmi les légumineuses, il se classe quatrième en termes de production et de superficie (Manisha et al, 2011). L'Inde est le principal producteur et consommateur de *Vigna mungo L.* avec une production annuelle de 1,82 million de tonnes. Cette plante considérée la plus saine par rapport à presque tous les autres haricots disponibles à la vente. Il peut être consommé quotidiennement car il a de nombreuses qualités incroyables qui sont grands pour

la santé. Outre son goût, il contient une large gamme de nutriments qui a un impact positif sur la santé de diverses façons.

Il contient environ 26 % protéine, dont son quantité est trois fois de son quantité dans les céréales (Theertha et al, 2014). Il est très nutritif et est recommandé pour les diabétiques, comme le sont d'autres légumineuses, également aphrodisiaque, lactagogue et tonique nerveux. La couleur du tégument est attribuée à la présence et à la quantité de polyphénols tels que les glycosides de flavonol, les tanins condensés et les anthocyanes. Ces composés ont des activités antioxydantes, antimutagènes et anticarcinogènes, ainsi que piégeage des radicaux libres. (Manisha et al, 2011).

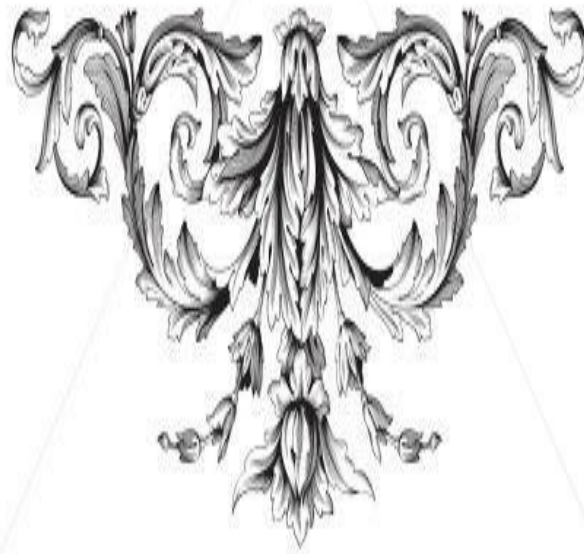
Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes naturelles qui agissent comme captureurs de radicaux libres. Dans ce contexte s'inscrit cette étude qui vise les objectifs suivants

- Une analyse phytochimique avec un dosage des polyphénols totaux et des anthocyanes.
- Une évaluation de l'effet antioxydant de chaque extrait par la méthode de piégeage du radical libre DPPH•, la méthode ABTS et la méthode de réduction du fer FRAP. Afin de réaliser les objectifs précédents nous allons procéder à une préparation d'un extrait brut à partir des grains de *vigna mungo L.*



Partie I : synthèse bibliographique

Chapitre I : généralité sur vigna mungo



1. Noms de vigna mungo

- ✓ **Synonymes** : Phaseolus mungo L.
- ✓ **Noms vernaculaires**
 - Haricot urd , urd, gramme noir (en français).
 - Black gram, urd bean, urad bean (en anglais) (Jansen, 2006).
 - Tadallagh تڨلاغ (en région d'Adrar)

2. Taxonomie

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Ordre : Fabales

Superfamille: Léguminosea

Famille : Fabaceae

Sous-famille : Faboideae

Tribu : Faseoleae :

Sous tribu : Phaseolina

Genre : *Vigna*

Espèce : *Vigna mungo* (Kimou, 2013)

- On distingue trois taxons à l'intérieur de *Vigna mungo* :
 - var. mungo, avec des cultivars précoces de grande taille et à graines noires ;
 - var. viridis Bose, avec des cultivars tardifs à graines verdâtres ternes ou brillantes ;
 - var. silvestris Lukoki, qui est le type sauvage ; comparé aux types cultivés, il est plus petit, plus grimpant, plus poilu, avec des inflorescences plus denses et de petitesgraines à arille en relief et proéminent ; il est considéré comme l'ancêtre de l'urd cultivé.

Pour les types cultivés, une classification en cultivars et groupes de cultivars serait plus appropriée (Jansen, 2006).

3. Origine et répartition géographique

Vigna mungo est originaire de l'Inde, où il a été domestiqué à partir de son ancêtre sauvage. A partir de l'Inde, elle est répandue dans de nombreux pays comme les pays africains, européens, américains et asiatiques. (Jansen, 2006). Elle est devenue une culture de légumineuses populaire au Pakistan, en Inde, au Bangladesh, en Birmanie, à Ceylan et dans la plupart des pays africains (PROTA).

En Afrique, il est cultivé au Gabon, en R.D. du Congo, au Kenya, en Ouganda, en Tanzanie, au Malawi, au Mozambique, en Afrique du Sud, à Madagascar et à l'île Maurice. Elle est cultivée surtout comme plante fourragère aux Etats-Unis et en Australie (Jansen, 2006)

4. Description

(*Vigna mungo* (L.) Hepper est une légumineuse herbacée annuelle érigée à croissance rapide atteignant 30 à 100 cm de hauteur. Il a une racine pivotante bien développée et des tiges ramifiées de façon diffuse à partir de la base.

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



Figure 01 :Les feuilles et les gousses de *vigna mungo*

- Inflorescence : fausse grappe axillaire ; pédoncule jusqu'à 18 cm de long. Fleurs bisexuées, papilionacées, petites ; bractéoles linéaires à lancéolées, dépassant le calice ; calice campanulé ; corolle jaune, étendard de 12–16 mm de large, ailes presque aussi longues que l'étendard, carène enroulée en spirale avec un appendice terminal en

forme de corne ; étamines 10, dont 9 soudées et 1 libre ; ovaire supère, style courbé en spirale.



Figure 02 : les fleurs de *vigna mungo*

- Fruit : gousse cylindrique de 4–7 cm × 0,5 cm, érigée ou presque, avec de longs poils et un bec crochu et court, contenant 4–10 graines ellipsoïdes, jusqu'à 5 mm de long, à bouts carrés et à hile en relief et concave, généralement noires ou tachetées (Jansen2006).



Figure 03 : les grains de *vigna mungo*

5. Les Conditions de cultures

Vigna mungo est une plante qu'on le trouve généralement dans les basses terres, mais il peut atteindre 1800 m d'altitude au-dessus du niveau de la mer (Heuzi et al, 2016). Elle est essentiellement une plante de saison chaude. Elle résiste bien à la sécheresse et donc adapté aux zones semi-arides Il a une faible tolérance aux climats tropicaux humides, mais dans les zones à fortes précipitations, elle peut être cultivé pendant la période sèche de

l'humidité résiduelle (Benlaldj, 2017) .Elle est cultivée dans des zones où la température moyenne est de 25–35°C et les précipitations annuelles de 600–1000 mm. Elle pousse mieux sur les sols lourds, bien drainés, tels que les verti-sols de pH 6–7, mais il est aussi cultivé sur des sols plus légers .*Vigna mungo* est sensible aux sols salins et alcalins (Heuzi et al, 2016).

6. Cycle végétale

- ✓ La germination du *vigna mungo* prend une période entre 7–10 jours.
- ✓ La floraison débute 30–60 jours après le semis.
- ✓ Les fleurs sont généralement autofécondées, le pollen étant libéré avant que les fleurs ne s'ouvrent.
- ✓ La maturité est atteinte en 60–140 jours après le semis. L'urd nodule efficacement avec les bactéries *Bradyrhizobium* (Benlaldj, 2017).

7. Les Principales phénomènes au cours de germination des grains de *vigna mungo*

7.1 Dégradation des sucres

Au cours de la germination, les principales matières de réserve de cotylédon (amidon, protéines et lipides) sont subir une dégradation et les produits libérés sont déplacés vers l'axe de développement. Les enzymes hydrolytiques sont activées pendant la germination précédée par trempage des graines dans l'eau ce qui provoque la dégradation des matériaux de réserve des graines.la principale enzyme impliquée dans la dégradation initiale de l'amidon (47,9 %) sous les formes les plus solubles c est' α -amylase , alors que la β -amylase et la phosphorylase contribuent à la conversion en sucres libres dans le cotylédon des graines germées de *vigna mungo* . On signalé que la germination des graines *vigna mungo* a conduit à une augmentation progressive de la teneur totale en sucre (glucose, saccharose et fructose) dans les germes.

Cette 'augmentation est le résultat de la mobilisation des oligosaccharides et de l'amidon en sucre simple par des enzymes.

Les réserves dégradées sont en partie utilisées pour la respiration et la synthèse des nouveaux constituants cellulaires de l'axe embryonnaire en développement pendant la germination. En revanche, il résulte des changements importants dans les caractéristiques biochimiques, nutritionnelles et sensorielles des germes dans ce processus (Choon et al, 2014).

7.2 La réduction de taux de composés phénoliques totaux

L'estimation de TCP est importante pour déterminer l'activité antioxydant des germes produits. Les variations de TCP dans les germes ont apparemment été influencées par les cultivars, la méthode d'essai et les contraintes environnementales, comme la température de germination et la sécheresse. Des études déclarent que la germination entraîne une diminution du TCP des graines mung bées après 1 jour de germination. Noté que, Les phénols plus élevés produits le Jour 1 ont été utilisés pour la polymérisation par peroxydase de guaiacol pour former des phénols polymériques et de la lignine pendant la germination. D'une part, la réduction de la TCP dans les germes mung bées au stade ultérieur de germination était due à la répartition des lignifications et d'autres besoins de développement. D'autre part, cette réduction se passe à cause de la forte demande d'oxygène et de composés phénoliques utilisés pour protéger les cellules contre la détérioration induite par l'oxydation. Ont signalé que dans les haricots communs, la perte de TCP augmentait avec le taux d'hydratation. Pendant ce temps, le temps de trempage plus long a causé l'hydrolyse et la diffusion de certains polyphénols dans le tégument (Choon et al, 2014).

8. Propriétés physiques de vigna mungo

Les résultats suivants sont tirés de l'enquête sur les propriétés physiques du *vigna mungo* dans la gamme de teneur en humidité de 10,23 à 19,73 % d.b. Les grains utilisés sont bien nettoyer pour éliminer toute trace indésirable. Puis, les grains cassés sont éliminés (Theertha et al, 2014).

Tableau 01 : Propriétés physiques de *vigna mungo*

paramètre	humidité	longueur moyenne	Largeur	épaisseur	diamètre moyen
mesure	10,23 à 19,73 % d.b.	3,97 à 4,45 mm	3,03 à 3,30	3,33 à 3,66 mm	3,38 à 3,72 mm,

9. Composition chimique de vigna mungo

9.1 Facteurs nutritionnels

Tableaux 02 : la composition chimique des grains de *vigna mungo* par 100 g de partie comestible (Jansen, 2006).

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

matière	eau	énergie	protéines	lipides	glucides	fibres brutes
Quantité	8,6 g	1470 kJ (351 kcal)	25,1 g	1,8 g	61 g	4,4 g

Vita mine	Vit B1 (thiamine)	Vit B2 (riboflavine)	Vit B3 (niacine)	vitB6 (Pyridoxine)	Vit B9 (folates)	acide ascorbique	VitA
Quantité	0,36 mg,	0,28 mg	1,8 mg	0,28 mg	628 µg	4,8 mg	114 UI

Acide aminé	tryptophane	lysine	méthionine	phénylalanine	thréonine	valine	leucine
Quantité (par g d'azote)	65 mg	415 mg	91 mg	365 mg	217mg	351 mg	518 mg

9.2 Les facteurs antinutritionnels

Tableau 03 : Les facteurs antinutritionnels contenus dans les grains de *vigna mungo* secs et matures (Shweta et al, 2017).

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

* Signifié en CD 1%

10.L'utilisation en vie quotidienne

➤ En cuisine

Cuisine indienne et asiatique

Les graines de *vigna mungo* sont consommées comme légume sec, directement ou dans diverses préparations (entières ou cassées, bouillies ou grillées, moulues en farine pour la transformation en gâteau, pain ou bouillie). C'est par exemple, avec la farine de *vigna mungo* qu'on fait en Inde les galettes "papadum". Les graines germées sont également consommées. Les gousses vertes sont utilisées comme légume cuit (PROTA).

Les gousses de gramme noir non matures sont très nutritives. Ils sont utilisés comme les haricots vert, souvent séchés, leur saveur est délicate, transformé en pâte par les asiatiques. Ils rentrent dans la confection de mets salés ou sucrés. Cette pâte peut remplacer la tomate et sert de substitut de café (Benlaldj, 2017).

Notre cuisine d'Adrar

Dans notre région les grains de *vigna mungo* souvent préparés comme sos comme tous les haricots. Ainsi, ces grains sont cuire avec la lentille et les œufs spécialement pour les femmes après l'accouchement. Aussi, ces grains sont ajoutés à la sos de couscous ou bien d'autre plat traditionnelle.

D'autre part, les mères de notre régions ont servit la poudre des grains de gramme noire avec le lait pour les personnes qui ont un anémie et comme une source d'énergie.

➤ En alimentation des animaux

De petites quantités de gousses et de feuillage sont utilisées pour compléter l'alimentation animale ou bien comme fourrage. Les gousses servent à nourrir le bétail (Benlaldj, 2017).

➤ Autre usages

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

11. L'intérêt de *vigna mungo*

11.1 Intérêt agronomique

Vigna mungo est semé comme plante de couverture et comme engrais vert. Il a une influence favorable sur la fertilité de sol grâce à l'association symbiotique avec des bactéries comme *Rhisobium* fixatrice d'azote. Cette symbiose contribue à un apport azoté, ce qui limite l'utilisation des engrais chimiques (Chekroune, 2018).

11.2 Intérêt biologique

Vigna mungo possède plusieurs merveilleux avantages pour la santé. Dont, on cite les fonctions suivantes :

1. bonne source de vitamines

Elle contient de très bonnes concentrations de nombreuses vitamines du complexe B comme la vitamine B6-22 %, la thiamine-23 %, l'acide pantothénique-18 %, la riboflavine-20 % et la niacine-9 % des valeurs recommandées quotidiennement. La plupart de ces vitamines fonctionne comme un cofacteur pour les enzymes (nutrition, 2019).

2. source d'isoflavones

Elle contient de petites concentration d'isoflavones, dont les quelles, la glyciteine, la genistein, la daidzéine et la formononétine. Ces isoflavones réduisent les cancers post-ménopausiques et l'ostéoporose (nutrition, 2019).

3. Abaisse la glycémie

Grace à sa richesse en fibres, elle aide à l'absorption lente des nutriments dans le sang et ralentit la libération de glucose sanguin. Ceci aide à maintenir l'équilibre de glucose dans le sang (Netmeds, 2019)

4. Améliore la digestion

L'un des plus grands bienfaits de consommer *vigna mungo* est qu'il contient une grande quantité de fibres alimentaire qui est connu pour améliorer la digestion. Les fibres alimentaires aident à gonfler les selles dans le tube digestif et à stimuler le mouvement péristaltique, la contraction et la libération des muscles de l'estomac pour déplacer les déchets (Food, 2018).

5. stimule l'énergie

Puisque, les grains de *vigna mungo* contiennent des niveaux très élevés de fer, ils sont vraiment bons pour augmenter les niveaux d'énergie globale de corps. Le fer est très important pour le corps car il stimule la production de globules rouges qui sont responsables du transport de l'oxygène vers tous les organes (Food, 2018).

6. Soin du cœur

Des études révèlent que la consommation régulière de *Vigna mungo* protège le système cardiovasculaire. Non seulement il abaisse le taux de mauvais cholestérol (LDL), mais il prévient aussi l'athérosclérose – une condition dans laquelle les artères se rétrécissent, se durcissent faisant place à la plaque autour de la paroi de l'artère (Netmeds, 2019). Ainsi, Comme il a une grande quantité de fibres, de magnésium et de potassium, il fournit de multiples avantages qui peuvent garder le système cardiovasculaire en bonne santé. Le potassium est connu pour réduire la tension dans les artères et les veines, ce qui abaisse considérablement la tension artérielle. Le magnésium peut aider à stimuler la circulation sanguine, apportant plus d'oxygène à tous les organes (Lybrate).

7. C'est un diurétique

Vigna mungo fonctionne comme un excellent diurétique. En conséquence, le corps peut se débarrasser des toxines nocives, l'acide uréique, l'excès d'eau, l'excès de graisse, et même le calcium stocké dans les reins. Une consommation régulière de cette légumineuse peut empêcher la formation des calculs rénaux (Netmeds, 2019).

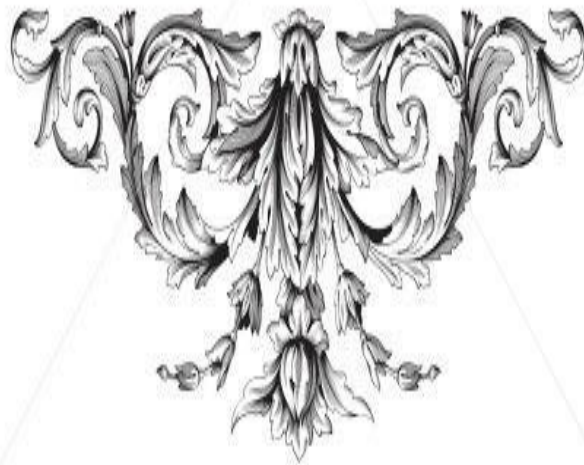
8. Les praticiens ayurvédiques recommandent à consommer le lait de *vigna mungo* pour améliorer la numération des spermatozoïdes, la motilité et améliorer la santé reproductive chez les hommes et corriger les déséquilibres hormonaux chez les hommes (Netmeds, 2019).

9. Bon pour les femmes enceintes

Les femmes enceintes sont les plus recommandées d'inclure *vigna mungo* dans leur alimentation en raison de sa valeur nutritionnelle plus élevée. Cette plante est très riche de fer, qui est nécessaire pour la production de l'hémoglobine et l'augmentation du flux sanguin. En outre, il est plein de protéines, de fibres alimentaires et aussi de l'acide folique qui est non seulement utile pour la mère enceinte, mais en plus pour le fœtus (Health). Un folate adéquat dans l'alimentation autour de la conception et pendant la grossesse peut aider à prévenir les anomalies du tube neural chez le nouveau-né (Nutrition, 2019).



Chapitre II: Généralités sur les polyphénols



Les plantes produisent un grand nombre de composés dont le rôle précis est encore ignoré. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse comme les métabolites primaires, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont donc appelés des métabolites secondaires et se trouvent dans de compartiments particuliers ou à des moments précis de la vie de la plante (Zagadou, 2016). Parmi ces composés on a les Composés phénoliques.

1. Définition de Composés phénolique

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. Ils représentent le groupes le plus varié et largement répandu dans le règne végétal (Zagadou, 2016). On les trouve dans tous les parties de plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales pour la survie de la plante. En revanche, ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème (Achat, 2014).

2. Structure

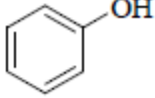
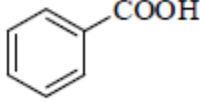
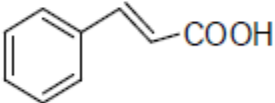
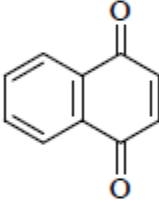
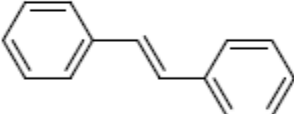
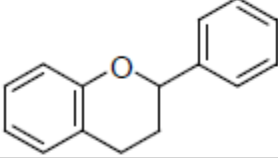
La structure de base des polyphénols est caractérisé par la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Achat, 2014). Ces espèces peuvent être des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (Benhammou, 2011).

3. Source

Les principales sources de polyphénols sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Dont, Les fruits et légumes assurent environ la moitié d'apport en polyphénols. Alors que les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé ou vin apportant le reste (Benhammou, 2011).

4. Classification

Tableau 04 : les principales classes des polyphénols (Rezaire, 2012).

Squelette carboné	Classe	Structures de base
C_6	Phénols simples	
C_6-C_1	Acides hydroxybenzoïques	
C_6-C_3	Acides hydroxycinnamique coumarines	
C_6-C_4	Naphtoquinones	
$C_6-C_2-C_6$	Stilbènes	
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes	
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	
$(C_6-C_3)_n$	Lignines	
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensés	

4.1 Phénols simples et les acides phénoliques

a. Acides phénoliques

Ces composés possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont dérivés principalement de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique (Benhammou, 2011).

b. les phénols simples

Le groupe des phénols simples se caractérise par un squelette de base composé d'un cycle aromatique portant au moins une fonction hydroxyle –OH (Desmier, 2016).

4.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes forment une grande famille de composés phénoliques. Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux.

Elles ont une squelette de base à quinze atomes de carbones, arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane, qui se divisent en plusieurs sous familles différent par le degré d'oxydation et la substitution en position 3 et 4 du cycle pyranique C (Benhammou, 2011).

4.3 Les tanins

Les tanins sont des substances ayant la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible.. Ces molécules présentent de nombreuses fonctions hydroxyles et phénoliques qui vont leur permettre de se complexer avec de nombreuses macromolécules telles que les protéines (Desmier, 2016).

a .Les tanins hydrolysables

Ce son des oligo ou polyester d'un hydrate de carbone (en général D glucose), sur lequel les groupements hydroxyles sont estérifiés avec l'acide gallique (cas des gallotanins) ou un dimère de l'acide gallique qui est l'acide ellagique ou l'acide hexahydroxydiphénique (cas des ellagitanins) (Figure.) (Desmier, 2016).

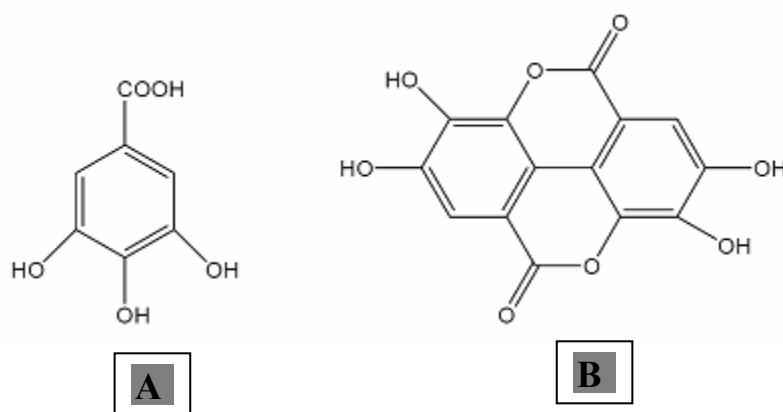


Figure 04 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)(Benhammou, 2011).

b.Tannins condensés ou tannins catechiques

Qui se diffèrent des tannins hydrolysables par l'absence de sucre dans leur molécule et par une structure voisine de celle des flavonoïdes. Ils sont constitués de deux à

plusieurs unités de **flavan-3-ols** liées entre elles par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent C4-C8 (Benhammou, 2011).

4.4 Les anthocyanes

Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes ,ils sont capables d'absorber la lumière visible .Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C3 et C5 avec le plus fréquemment des monosaccharides et des di et tri-saccharides formés par la combinaison des monosaccharides précédents(Zagadou, 2016).

5. La biosynthèse

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales qui sont :

5.1 La voie de l'acide shikimique

Cette voie conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques (Benhammou, 2011),dont les esters CoA sont à leur tour a l'origine de la plupart des classes de composés phénoliques (Macheix, 1996).

5.2. La voie de l'acétate malonate

C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques(réaction de condensation aldolique) obtenues par condensation répétée d'unités «Acétate» qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase .cette voie nous donne des composés souvent polycycliques.

Beaucoup d'autres composés ont une origine mixte, chacune des deux voies synthétise une partie, cela aboutit à l'élaboration des structures mixtes telles que les flavonoïdes, stilbène, pyrones, xanthones...ect

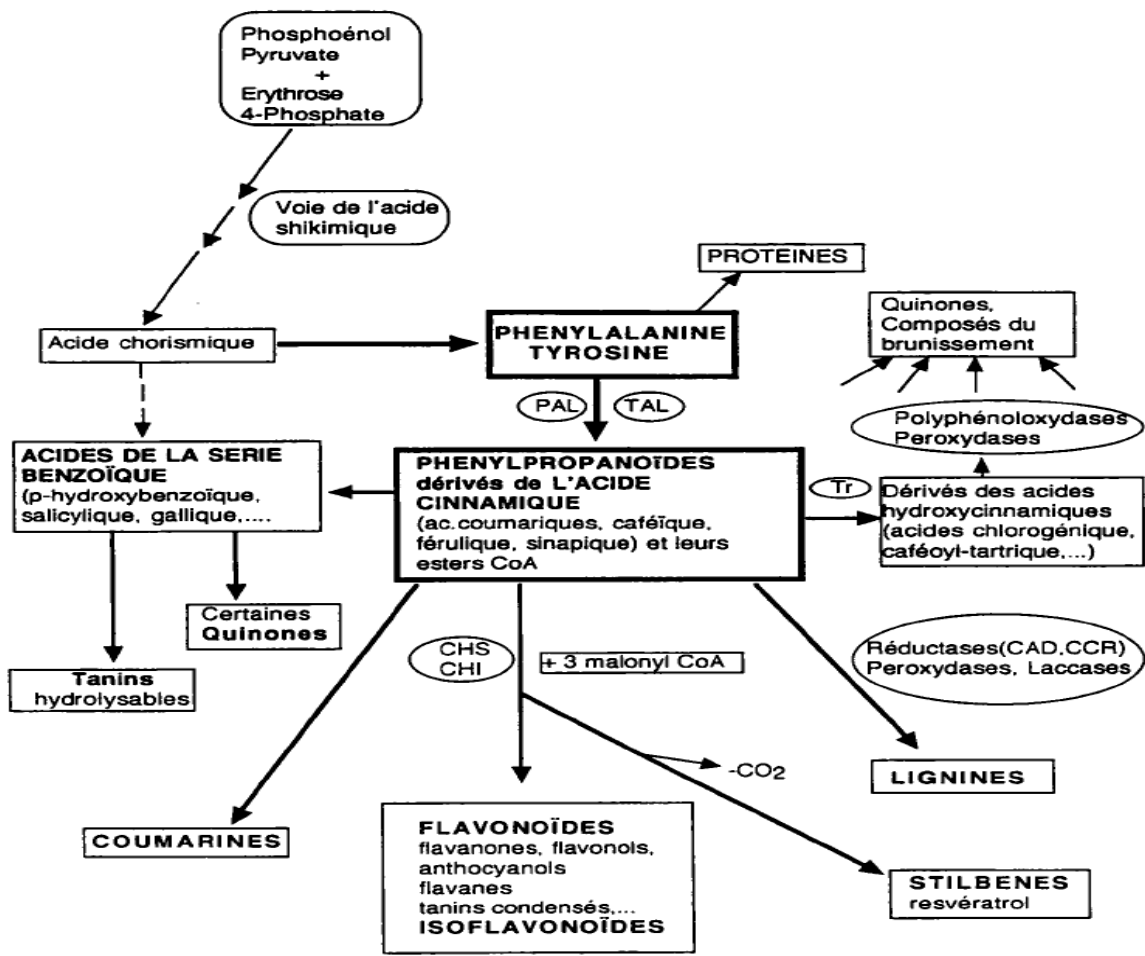


Figure 05 : Les grandes lignes du métabolisme phénoliques (Macheix, 1996).

6. Les fonctions de polyphénols

6.1 Chez les plantes

Parmi les fonctions principales de composés phénoliques, c'est la pigmentation des plantes qui présentent une vaste gamme de couleurs qui attirent les insectes apportant le pollen. Encore, ils contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (Benladjaj, 2017).

Ainsi, ils protègent les plantes contre les radiations UV en absorbant à la fois ces radiations et les espèces réactives de l'oxygène formées (Donatiene, 2009). En addition, ils contribuent à certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...etc.). comme ils peuvent intervenir dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV) (Muanda, 2018).

6.2 Chez l'homme

***Anti-oxydant :** les cellules vivantes produisent naturellement des composés oxydants comme les radicaux libres, présentant un électron singulet très réactif. Ces radicaux libres interviennent à la défense de l'organisme par des effets bactéricides ou antiviraux et la production des effets délétères en altérant les macromolécules essentielles de la vie. En revanche, leur effet toxique est à cause de la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses ainsi que du vieillissement cellulaire. Les polyphénols vont donc piéger les électrons singulets en les rendant mobiles à l'intérieur de la molécule du polyphénol, et donc beaucoup moins réactifs vis-à-vis des molécules voisines (Norbert, 2017).

***protecteur cardiaque :** beaucoup d'études ont montré que la prise de flavonols et de flavones était inversement corrélée aux taux de mortalité par maladies coronariennes. Il s'avère notamment que de fortes prises de quercétine et de kaempférol réduisent le taux de mortalité due à des accidents cardiaques de type ischémie, dans lesquels peuvent être mises en cause les plaques d'athérome (Achat, 2014).

***Anti-cancéreux :** les polyphénols modulent le métabolisme et la disponibilité des carcinogènes à fin de la réduction du nombre de tumeurs et de leur croissance. (David, 2010).

***Anti-diabétique :** les polyphénols peuvent contribuer à la réduction de taux de glycémie par différents mécanismes dont l'inhibition de l'absorption du glucose au niveau intestinal, ou encore son assimilation dans les tissus périphériques (inhibition de la gluconéogenèse, ou stimulation de la libération de l'insuline par les cellules β du pancréas) (Achat, 2014).

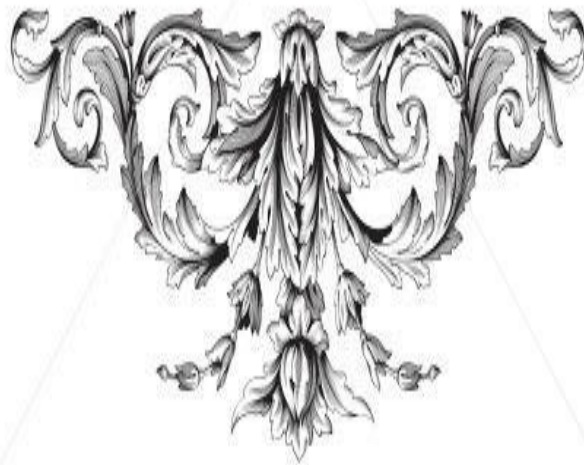
***Anti-inflamatoire :** les polyphénols fonctionnent également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation dans le plasma (Achat, 2014).

***antiparasitaires :** les composés phénoliques manifestent des activités contre un spectre de parasite exemple :

- le genre *Leishmania* : (les flavonoïdes, les lignanes les coumarines).
- le genre *Trypanosoma*: (les flavonoïdes ; les tanins, les lignanes) (Donatien, 2009) ;



Chapitre III : les anthocyanes



1. Définition

Le terme anthocyanes ou anthocyanines dérive des mots grecs anthos (fleur) et cyanus (bleu sombre) (Dangles et Deluzarche, 1994).

Ils sont des substances pigmentaires naturel qui sont faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible .ces substances sont solubles dans l'eau, et sont responsables des colorations oranges ,roses ,rouges ,violette et bleus brillantes des fruits de nombreuses plantes (Zagadou, 2016) . Il existe 17 anthocyanidines naturelles, mais Six d'entre eux sont plus fréquente chez les plantes supérieures et contribuant à la pigmentation des plantes (Sava et al, 2018) lesquelles sont : la pélargonidine (Pg), la péonidine (Pn), la cyanidine (Cy), la malvidinc (Mv), la pétunidine (Pt) et la delphinidine (Op). Les glycosides des trois anthocyanidines non méthylés (Cy, Op et Pg) .ces pigment sont présents dans 80 % des feuilles pigmentées, 69 % des fruits et 50 % de fleurs.L'anthocyane la plus répandue est la cyanidine 3-glucoside (Zagadou, 2016).

2. Répartition et localisation dans la plante

Les anthocyanes sont rare chez les Gymnospermes, mais Très répondeus dans plusieurs familles d'Angiospermes (**Sahraoui, 2015**). Ces substances se localisent dans les vacuoles des cellules épidermiques des végétaux : fruits (raisin, framboise, mûre, fraise, cassis,...), des légumes (chou violette, aubergine,...), des racines (radis, betteraves rouges,...), des feuilles (feuilles de maïs violet, feuilles de cassis,...), des fleurs (*Hibiscus*, artichaut,...) ou dans des céréales (riz noir, maïs violet,...). Ils sont également présents dans les tissus verts de certaines feuilles mais leur couleur est masquée par celle de la chlorophylle dont la dégradation en automne dévoile l'existence de pigments d'anthocyanes (Nguyen, 2018).

3. Structure des anthocyanes

Les anthocyanidols sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium ou cation **flavylium**. (Sahraoui, 2015) .ces dernières sont caractérisées par le squelette C6-C3-C6 et sont formés de l'association d'un aglycone (ou génine) appelé anthocyanidine (constitue le groupement chromophore du pigment)et d'un sucre substitué en position 3 et 5 avec le plus fréquemment des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose) et des di- et tri-saccharides formés par la combinaison des monosaccharides précédents .Ce qui augmente leur solubilité et leur stabilité (Zagadou, 2016) .

Les sucres peuvent aussi être acylés par l'acide cinnamique, *p*coumarique, acétique, caféique, ferulique, sinapique et malonique, ce qui augmente la diversité de ces molécules (Gomez, 2009).

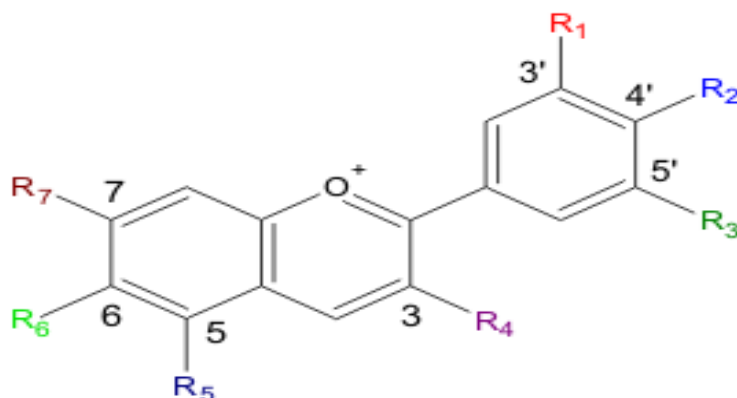


Figure 06 : structure de cation flavylum la base des anthocyanes

Tableau 05 : Structure et couleur des six principaux anthocyanidines en fonction de la substitution sur l'ion flavylum (Beye et *al*, 2015).

	Substitution en 3'	Substitution en 5'	R1	R2	λ max* (nm)	Couleur
Pélagonidine	H	H	H	H	516	Orange-rouge
Cyanidine	H	H	OH	H	530	Rouge
Delphinidine	OH	OH	OH	OH	541	Bleu-violet
Péonidine	OCH ₃	H	OCH ₃	H	528	Rose-rouge
Pétunidine	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	540	Bleu-pourpre
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	538	Pourpre

* R3 = Glucose, λ max mesuré dans du méthanol avec 0,01 % HCl

4. Propriétés des anthocyanes

➤ **Changement de couleur :** La principale caractéristique des anthocyanes est leur diversité. En milieu aqueux acide, la couleur de l'anthocyanidine est déterminée par le degré d'hydroxylation du noyau B, produisant un effet bathochrome. Au contraire, les réactions de méthylation et de glycosylation produisent un effet hypsochrome (Gomez, 2009) Le noyau flavylum est un diacide faible et un électrophile et selon le pH du milieu on observe les changements suivantes :

- en milieu acide fort (pH= 3): le cation est stable et coloré en rouge
- en milieu acide faible (pH entre 4 et 6) le cation est de couleur bleue

- En milieu neutre ($\text{pH} > 7$) : le cation est instable et devient incolore (Sahraoui, 2015)
- **Dégradation des anthocyanes** : Dans certaines conditions de pH et température, les anthocyanes se dégradent en présence d'oxygène, d'ions métalliques, d'enzymes et de lumière. Cette dégradation est accompagnée d'une augmentation de la concentration de composés formés par la condensation entre les produits de dégradation des anthocyanes et d'autres polyphénols présents dans le milieu (Beye et al, 2015).
- **La solubilité** : Les anthocyanes sont solubles dans l'alcool et l'eau mais insolubles dans les solvants organiques apolaires (Sahraoui, 2015).

5. Les facteurs influents la stabilité des anthocyanes

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

5.1 Effet de l'acidité du milieu

L'acidité a un effet sur la couleur et la réactivité des anthocyanes. L'augmentation du pH entraîne l'ouverture de l'anneau C par une attaque nucléophile donnant la forme hémiacétale, dont la réactivité est supérieure à celle de l'ion flavylium (Beye et al, 2015).

5.2 Effet de la température

Les anthocyanes sont thermolabiles et se dégradent à une vitesse qui augmente considérablement avec la température. Elles sont cependant relativement stables pour des températures inférieures à 70 °C. Dans une température 95 °C et $\text{pH} = 1$ la thermodégradation commence au bout de 4 h par une déglycosilation suivie d'un clivage ce qui résulte la libération des anneaux A et B de l'anthocyanidine (Beye et al, 2015).

5.3 Effet de la lumière

Les anthocyanes deviennent instables lorsqu'elles sont exposées aux UV ou à la lumière visible ou à d'autres sources de rayonnements ionisants. Les anthocyanes substitués au groupe hydroxyle en C-5, connues pour être fluorescentes, sont plus sensibles

à la décomposition photochimique que celles non substituées à cette position (Nguyen, 2018)

5.4 Effet de l’oxygène

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

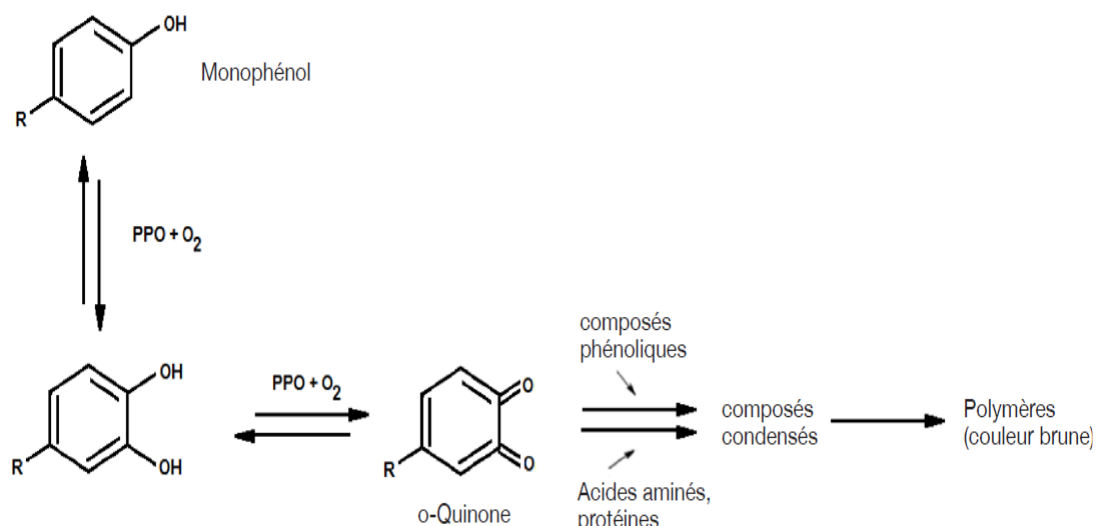


Figure 07 : Mécanisme d’oxydation des polyphénols par la polyphénol oxydase

6. Sources et teneurs d’anthocyanes

Tableau 06 : principales sources alimentaires en anthocyanes (Sahraoui, 2015).

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

Tableau 07: La teneur en anthocyanes de quelques fruits et légumes (Attoumi et Hadiouche, 2016)

Fruit /légume	Concentration en anthocyanes Mg/100g
Maïs	1640
Mure	145-607
Chou	322
Raisin	27-120
Carotte violet	38-98
Radi	11-60
Fraise	13-55
Pomme	1-17

7. Biosynthèse des anthocyanes

La biosynthèse des anthocyanes se fait par deux voies métaboliques. D'une part, via l'acide cinnamique qui se forme par la voie du shikimate également responsable de la synthèse de la phénylalanine (précurseur direct de l'acide cinnamique). La deuxième voie métabolique c'est par la voie acétates qui fait intervenir la condensation de trois malonyl-CoA pour former le cycle A des structures flavonoïdes. ces deux voies se croisent pour former sous l'action d'une enzyme, la chalcone se produit des différentes types des anthocyanes (Zagadou, 2016) .

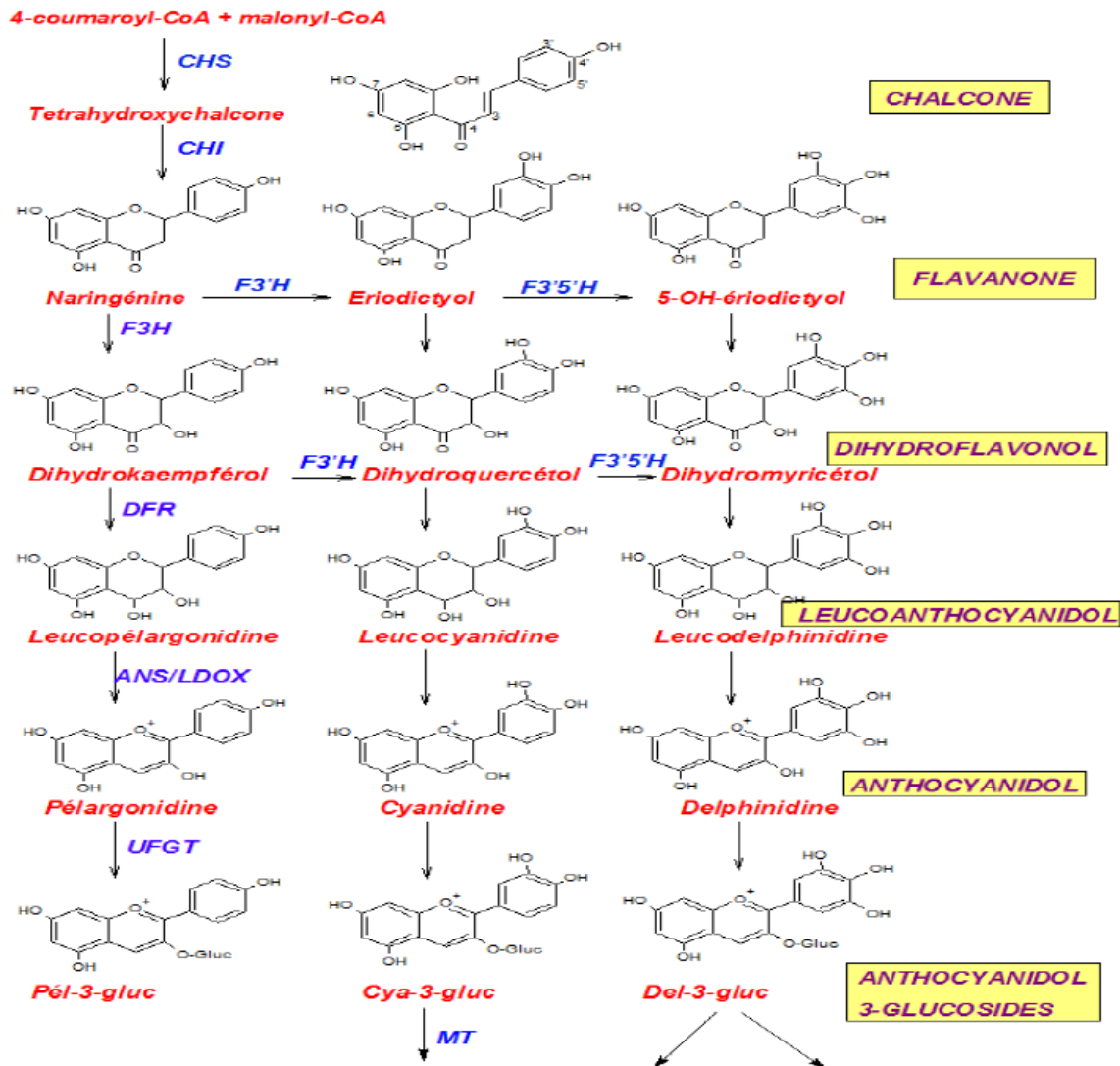


Figure 08 : Schéma de la biosynthèse des anthocyanes (Zagadou ,2016)

8. absorption et biodisponibilité

En contraste avec les propriétés qu'on leur reconnaissait, les anthocyanes ont longtemps été considérés comme faiblement biodisponibles. En effet, les quantités retrouvées sont faibles, aussi bien dans le sang que dans les urines, proportionnellement aux quantités ingérées. On considérerait en revanche qu'ils pouvaient avoir un effet local en participant à la protection des muqueuses gastro-intestinales contre les effets des radicaux libres. Cependant, les études les plus récentes suggèrent qu'ils ne sont que faiblement absorbés sous leur forme d'origine dans l'estomac et dans l'intestin grêle. On n'en retrouve donc que de faibles quantités dans le sang. Par contre, les métabolites résultant de l'assimilation des anthocyanes se retrouvent dans les urines en quantités proportionnelles aux quantités ingérées. Ils sont donc métabolisés par des enzymes dans l'intestin grêle et

par la flore bactérienne du gros intestin, donnant des acides phénoliques et autres métabolites plus facilement assimilables par le système circulatoire .Ils modifieraient par ailleurs l'écologie du gros intestin, favorisant les bactéries à effets probiotiques (Beye et al, 2015).

9. Utilisation des anthocyanes

9.1 chez l'homme

✓ Activités antioxydante

Les composés qui sont les plus faciles à oxyder sont souvent les meilleurs antioxydants (molécules qui peuvent donner un électron libre ou des atomes d'hydrogène à des radicaux libres réactifs). L'activité antioxydant des anthocyanes est favorisée grâce à leurs aglycones. Comme tous les polyphénols, elles possèdent des groupes hydroxyles pouvant fournir aux radicaux libres des H capables de les neutraliser (Nguyen et al, 2018).

Les anthocyanes expriment leurs propriétés antioxydantes par le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), la suppression de la formation des ERO par inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques impliqués dans la production et la protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme . Les anthocyanes sont ainsi capables d'inhiber la peroxydation lipidique causée par les ERO dans la bicouche phospholipidique.

Comme antioxydants, les anthocyanes peuvent donc protéger les constituants cellulaires contre les dommages oxydatifs et, donc potentiellement limiter les risques de maladies dégénératives associées au stress oxydant (Zagadou, 2016).

✓ Activités anti-inflammatoires

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

✓ Protecteur de lésion gastrique

Les anthocyanes participent à la protection des muqueuses gastro-intestinales contre les effets des radicaux libres. Ceci empêche l'apparition des maladies qui y étaient associées, telles que les cancers de l'estomac ou du côlon (Beye et al, 2015).

✓ **Activités cardioprotectrices**

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

✓ **Activités anti-cancérigènes**

Des essais de recherche ont démontré que les anthocyanes peuvent réduire la prolifération des cellules cancéreuses et à inhiber la formation de tumeurs. Cette capacité est liée à de multiples mécanismes d'action potentiels, y compris l'inhibition des enzymes de cyclo-oxygénase et le potentiel antioxydant puissant (Zagadou, 2016).

✓ augmentent la régénération du pourpre rétinien (favorise la vision nocturne) (Sahraoui, 2015)

Tableau 08 : Rôle protecteur des anthocyanes dans la santé humaine (Nguyen, 2018)

Source	Anthocyanes principales	Effet
Framboise <i>Rubus idaeus</i> <i>Rubus occidentalis</i>	Cyanidin-3-O-sophoroside Cyanidin-3-O- (2G-O-glucosyl) rutinoside Cyanidin-3-O-glucoside Cyanidin-3-O-rutinoside.	Anti-inflammatoire,
Mûre <i>Morus alba L.</i>	Cyanidin-3-glucoside chloride Cyanidin-3-rutinoside chloride Pelargonidin-3-glucoside	Anti-diabète, contre le stress oxydatif
Cornouiller sauvage <i>Cornus mas</i>	Cyanidine 3-O-galactoside Pelargonidine 3-O-galactoside Delphinidine	Anti-diabète, anti-obésité
Hibiscus <i>Hibiscus sabdariffa</i>	Delphinidin 3-sambubioside Cyanidin 3-sambubioside Cyanidin 3-glucoside Delphinidin 3-glucoside	Contre le cancer du sein, antihypertenseur, anti-obésité
Raisin	Malvidine-3-O-glucoside	Cardioprotecteur,

<i>Vitis vinifera</i> L.	Pétunidine-3-O-glucoside Cyanidine-3-O-glucoside Delphinidine-3-O-glucoside paeonidine-3-O-glucoside	contre le stress oxydatif.
Cyanidin-3-O- b – glucoside	Standard C3G	Anti-inflammatoire, contre la maladie d' Alzheimer
Myrtille <i>Vaccinium angustifolium</i>	Peonidine-3-glucoside Malvidin-3-galactoside Delphinidine-3-glucoside Delphinidin-3-galactoside	Anti-inflammatoire, réduit le risque de maladie cardiovasculaire, contre le stress oxydatif.
Riz noir <i>Oryza sativa</i> L.	Cyanidine-3-O-glucoside Peonidine-3-O-glucoside chloride	Réduit le stress oxydatif, augmente l'adaptabilité de l'activité des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT)

9.2 Chez les plantes

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

9.3 Dans l'industrie

✓ Au contraire des colorants artificiels, dont la plupart sont toxiques pour l'organisme humaine, les anthocyanes possèdent plusieurs 'avantages: pas d'effets secondaires, couleur intense et étant hydrosoluble, ce qui simplifie leur incorporation dans les systèmes alimentaires liquides. Ce qui permet d'être un bon colorant alimentaire (Sava et al, 2006) .

Les principales sources d'anthocyanes autant que colorant alimentaire sont:

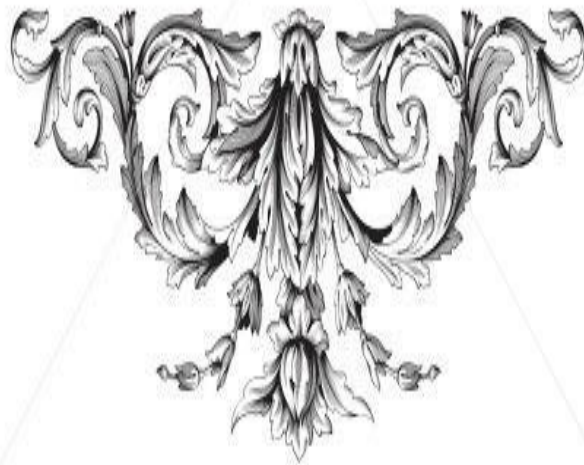
- Le mout de raisin
- Jus de fruit du sureau
- Feuilles de chou rouge (Sahraoui, 2015)

Tableau 09: numéros de certains anthocyanes au niveau d'industrie (Nguyen, 2018)

Antocya nes	Delphinid ine	Cyanid ine	Pelargoni dine	Petunid ine	Peonid ine	Malvid ine
numéro	E163b	E163a	E163d	E163f	E163e	E163c



Chapitre IV : antioxydant, stress oxydatif et radicaux libre



1-Qu'est-ce qu'un antioxydant ?

Un antioxydant est une molécule naturelle ou synthétique qu'est réagissent avec d'autre molécule pour inhiber leur oxydation .ce dernier intervient dans plusieurs procès d'oxydation.

Les antioxydants naturelles qui peuvent être classifiés en deux catégories : les antioxydants non enzymatiques et les antioxydants enzymatiques (Maurent,2017)

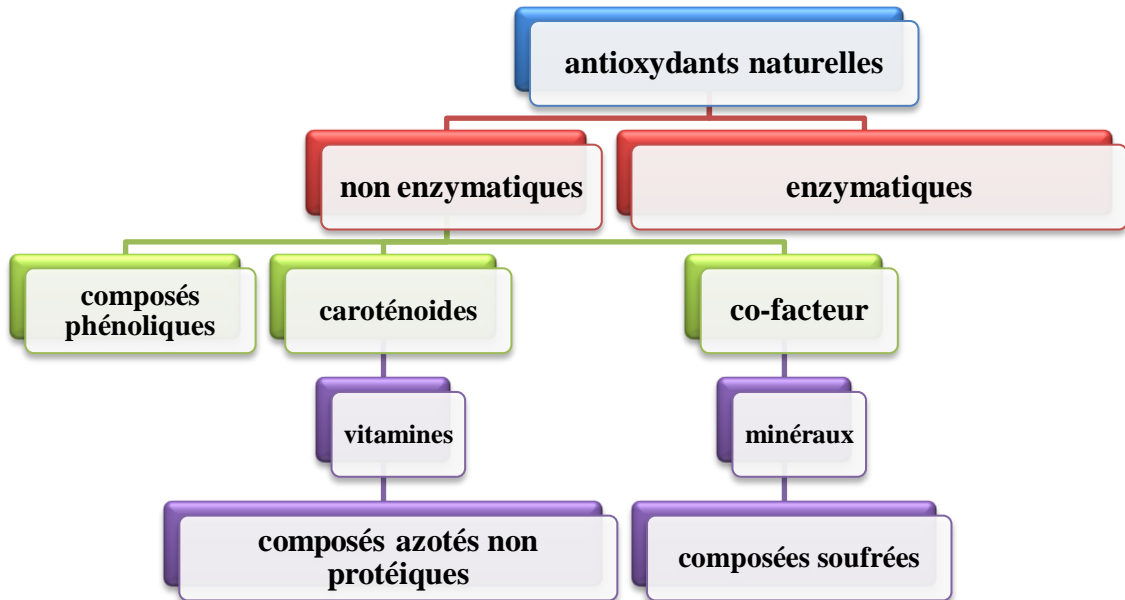


Figure09 : les familles d'antioxydants naturelles

1.1-les antioxydants enzymatiques

cette catégorie présente les enzymes produite par l'organisme humains et ayant une action antioxydante (:::) .ce système de défense repose principalement sur 3 enzymes.

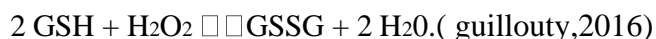
- **Superoxyde dismusate (SOD) :** Les superoxydes dismutases sont des métalloenzymes (ce sont des enzymes utilisant des métaux comme cofacteurs). Il s'agit d'une des premières lignes de défense contre les ERO. Leur cible privilégiée est l'anion superoxyde (O₂•-) qu'elle transforme en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :



- **catalase :** Les catalases sont localisées dans les peroxysomes et sa cible principale est le H₂O₂. Cette place est stratégique puisque c'est ici que des enzymes comme les flavines, l'urate oxydase, la glucose oxydase et les D-amino-oxydases produisent des radicaux libres H₂O₂. L'activité de la catalase est coordonnée avec la concentration en H₂O₂.



- **Glutathione peroxydase** : Les glutathion peroxydases sont localisées dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et dans la membrane interne des mitochondries. Elles permettent de réduire H_2O_2 en H_2O en parallèle de l'oxydation du glutathion.



1.2-Les antioxydants non enzymatique : sont divers

1.2.1-Les vitamines sont des petite molécules soit liposoluble qui sont représentés par la **vitamine E** est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (ensemble de 8 molécules dont 4 tocophérols et 4 tocotriénols. Ce sont de bons antioxydants alimentaires, mais surtout leur rôle physiologique chez l'Homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant, est très important. soit hydrosolubles sont principalement représentés par la **vitamine C** ou l'acide ascorbique.(maurent.2017).

La **vitamine C** ou **acide ascorbique** est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire(maurent,2017).

1.2.2-Les caroténoïdes

sont une familles de pigments naturels liposoluble responsable des coloration des végétaux (légumes et fruits)généralement présent par un couleur jaune orangé ou rouge violet(Béliveau,2009)

la capacité antioxydants des caroténoïdes telle que béta carotène et lycopène est dépendant sur leur structure de plus la forme conjuguée qui donne beaucoup de propriétés fondamentales à ces molécules.

L'activité des caroténoïdes comme antioxydants est aussi dépendant sur leurs interactions avec d'autres antioxydants surtout la vitamine E et C (Aberkane et Adnane,2012

1.2.3-Les composés phénoliques

sont des substances organique , classiquement considérés comme des dérivés aromatiques hydroxylés non azotés ,sont présentes chez tous les végétaux supérieurs .ils sont issues du métabolisme secondaire (Macheix,2013).

Le processus d'oxydation est de type radicalaire : les antioxydants vont intervenir comme "capteurs" de radicaux libres.(Aberkane et Adnane ,2012)

ces molécules ont une propriétés redox plus élevées, donc agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions (Benhammou ,2011)

les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes appartenant à la familles des poly phénols (Boudalia,2016) .généralement pigmenté différentes organe végétaux par les couleurs jaune, orange et rouge (Cherrak ,2016) caractérisés par leur structure de type 2 phenylbenzopyrane C₆-C₃-C₆.

Ces derniers ont une propriétés antioxydant efficace sont capable de neutralisé les radicaux libres par la donation d'atome d'hydrogène (Cherrak,2016).

Parmi les flavonoïdes on particule la sous classe des anthocyanes. (voir chap 03).

1.3Les antioxydants synthétiques

sont généralement des composés phénoliques d'origine pétrochimiques comme le butylhydroxytolène , le butylhydroxyanisole ou encore le gallate.

2-Le stress oxydant

Le stress oxydant ou le stress oxydatif , appelé aussi la pression oxydatif se définit par un déséquilibre entre l'antioxydant et pro-oxydant (les espèces radicalaires ou les réactives).(Cherrak,2016)

A l'état normale la balance rédox est en équilibrée ,mais l'organisme peut être confronté à des surexposition des composés oxydants à cause d'un production excessive des espèces réactives d'oxygène(comme dans la vieillissement ou l'athérosclérose) ou la diminution des capacités antioxydantes(personnes souffrant d'obésités et les fumeurs). (Bennamara,2017)



Figure 10 : Déséquilibre de la balance des espèces prooxydants et des systèmes de défense antioxydants.

2.1-Les espèces réactives de l’oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être produites dans n'importe quel type cellulaire, et ce même en conditions normales . Trois de ces espèces réactives de l'oxygène seront décrites ici, soit l'anion superoxyde (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radicalhydroxyle (OH[·]). (Boudalia,2016)

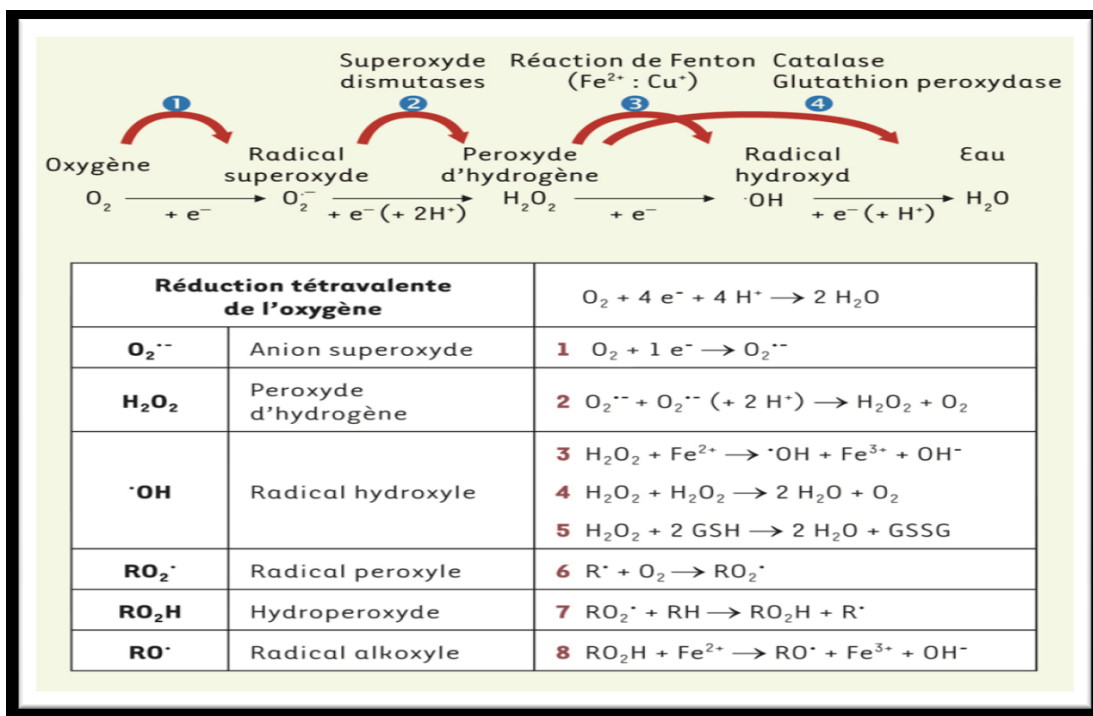


Figure 11: Origine des espèces réactives de l’oxygène(Camille. M et Mireille. S,2011)

2.2-L'origine de stress oxydatif

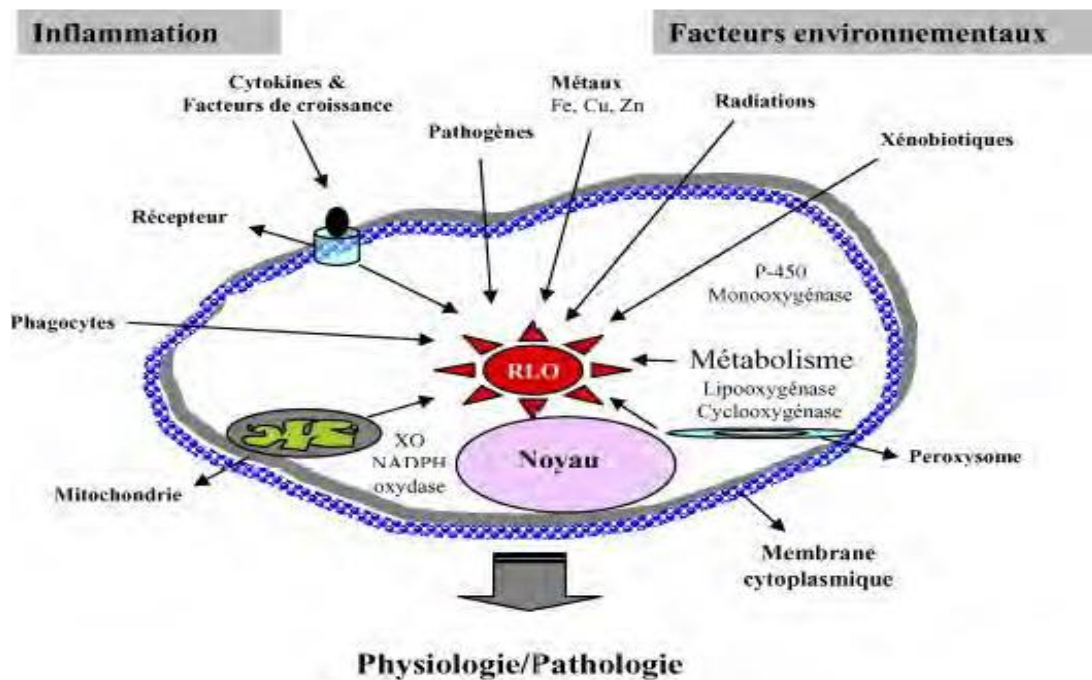


figure 12 : Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l’oxygène (guillouty,2016).

2.2 1-Endogène

a-la respiration mitochondriale

Les mitochondries sont des organites intracellulaires dont la fonction principale est la production d’ATP pour munir l’énergie aux cellules.

Elles convertissent l’énergie issue des oxydations en molécules d’ATP qui est les cellules utilisé pour assurer différentes fonctions.

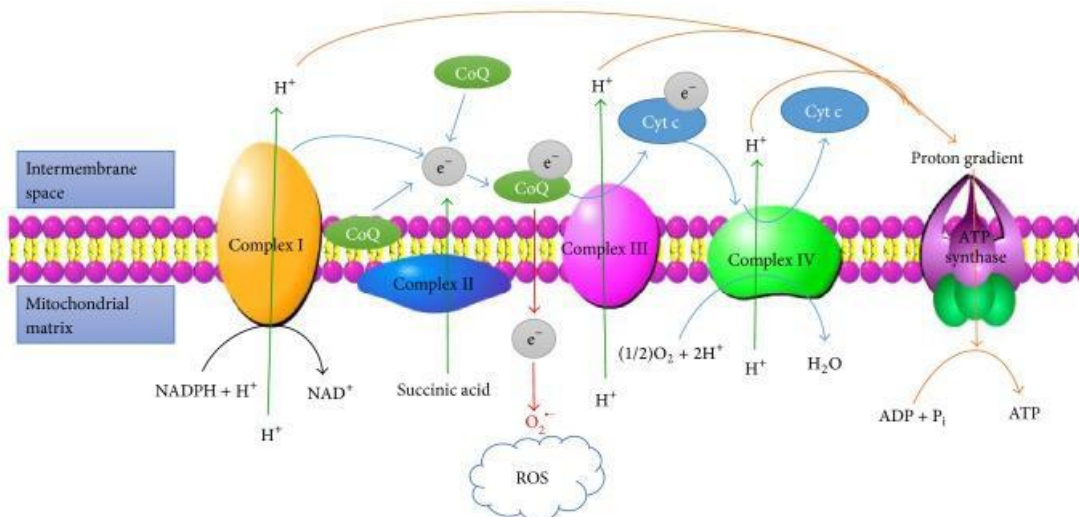


Figure13 : la chaine respératoire mitochondrial.

La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de cinq complexes (I : NADH-ubiquinone réductase, II : succinate-ubiquinone réductase, III : UQH₂-cytochrome c réductase, IV : cytochrome oxydase, V : ATP synthase) comprenant chacun des sous-unités protéiques .(Guillouty,2016)

Dans la chaîne respiratoire la processus de transport d'électron basé sur la réduction des glucides lipides et protéines et l'oxydation des coenzymes NADH ,H⁺ et FADH₂.(Benammara,2017).

La majorité de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente, ce qui conduit à la production d'eau, cette réaction est catalysée par l'enzyme cytochrome oxydase : $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$

Cette réaction peut cependant laisser fuir des électrons qui vont produire des espèces radicalaires de l'oxygène. Ces électrons réagissent avec les molécules d'oxygène, créant ainsi des radicaux superoxydes. Des ERO sont produites en continu par les complexes mitochondriaux I et III, notamment des anions superoxydes (0,4 à 4% de l'oxygène consommé).

Lors d'une hypoxie, on a une diminution de l'oxygène au niveau du complexe IV donc une diminution de l'activité de ce complexe, ce qui entraîne une surproduction d'ERO au niveau du complexe III. De plus, la mitochondrie perçoit les variations de concentration en oxygène dans la cellule. Elle permet alors de réguler la réponse à l'hypoxie en libérant une quantité plus importante d'ERO. (. GUILLOUTY,2016).

b-la phagocytoses

Est un processus cellulaire mise en œuvre par des cellules immunitaires spécialisé (polynucléaires, neutrophiles , macrophage....ect)

Permettant de dégager les microorganismes.

la plupart des cellules sont capables de produire des radicaux superoxydes O₂•- via une activité NAD(P)H oxydase membranaire(NOX).

La NOX est une enzyme qui catalyse la réduction monoélectronique de l'O₂ en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons :



La NOX a été initialement étudiée dans les cellules phagocytaires où elle joue un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes.

2.2.2-Exogène

Les sources exogènes sont majoritairement des pro-oxydants environnementaux tels que les pesticides, les métaux lourds, la fumée de cigarettes, les polluants, la poussière (d'amiante, de silice), et les composés induits par la prise de certains médicaments, par le rayonnement électromagnétique (radiation ionisante, lumière ultraviolette), ou lors d'un coup de chaleur .(Benammara,2017)

3-les radicaux libres

Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /où un pouvoir oxydant fort. Contient un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe.

3.1-Les types des radicaux libres

Les ERO peuvent être radicalaires (radicaux libres de l'oxygène à proprement dit) ou non-radicalaires (certains dérivés oxygénés réactifs ne possédant pas d'électron célibataire).

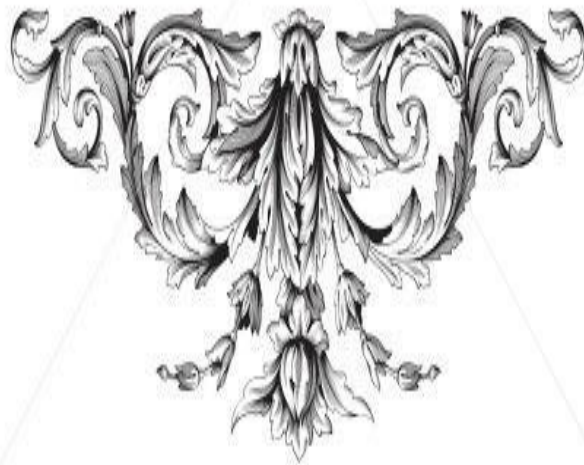
D'autre part, Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les **radicaux primaires** à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), le radical peroxyde (ROO^{\cdot}) et le radical alkoxyde (RO^{\cdot}). Les autres radicaux libres, dits **radicaux secondaires** telles que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule(benhammou,2011)

Tableau 10: Les principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote(benyahia,2017)

	Réaction de formation	propriétés
L'anion superoxyde (O ₂ ^{•-})	Il résulte de la réduction monoélectronique de l'oxygène O ₂ +1é O ₂ ^{•-}	C'est le radical le moins réactif, mais il joue un rôle très important dans la génération d'autre radicaux libres .
Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).	Produit à partir de l'O ₂ ^{•-} , cette réaction est catalysée par le superoxyde dismutase (SOD) 2O ₂ ^{•-} +2H ⁺ H ₂ O ₂ +O ₂	La majeure partie de la toxicité de H ₂ O ₂ provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle (OH [•])
Le radical hydroxyle (OH [•])	Le H ₂ O ₂ se transforme en OH [•] par la réaction de Fenton : H ₂ O ₂ +Fe ²⁺ OH [•] + OH ⁻ +Fe ³⁺ Ou celle ou cycle de Haber-Weiss : H ₂ O ₂ +O ₂ ^{•-} OH [•] + OH ⁻ +O ₂	C'est l'espèce radicalaire le plus dangereux dans l'organisme, il est très puissant, il attaque toutes les cibles cellulaires (acide nucléique, acides gras et protéines) et crée des dégâts très importants .
Le monoxyde d'azote (NO)	Il est synthétisé par voie enzymatique à partir d'un atome d'azote de l'acide aminé L-arginine, d'une molécule d'oxygène et de cofacteur (NADPH) L-arginine + O ₂ + NADPH →L-citrulline + NO + NADP ⁺ + e ⁻	Le NO est un radical libre qui est surtout réputée pour ses propriétés physiologiques mais sa surproduction capable de provoquer la déplétion des principaux antioxydants au niveau du plasma et d'entamer la peroxydation lipidique
Le peroxydinitrite (ONOO ⁻)	L'O ₂ ^{•-} peut réagir avec le NO pour former l'ONOO ⁻ O ₂ ^{•-} + NO [•] OONO ⁻	L'ONOO ⁻ très réactif et responsable des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL, il est capable d'oxyder les protéines et les bases azotées des brins d'ADN .



Partie II : partie expérimental

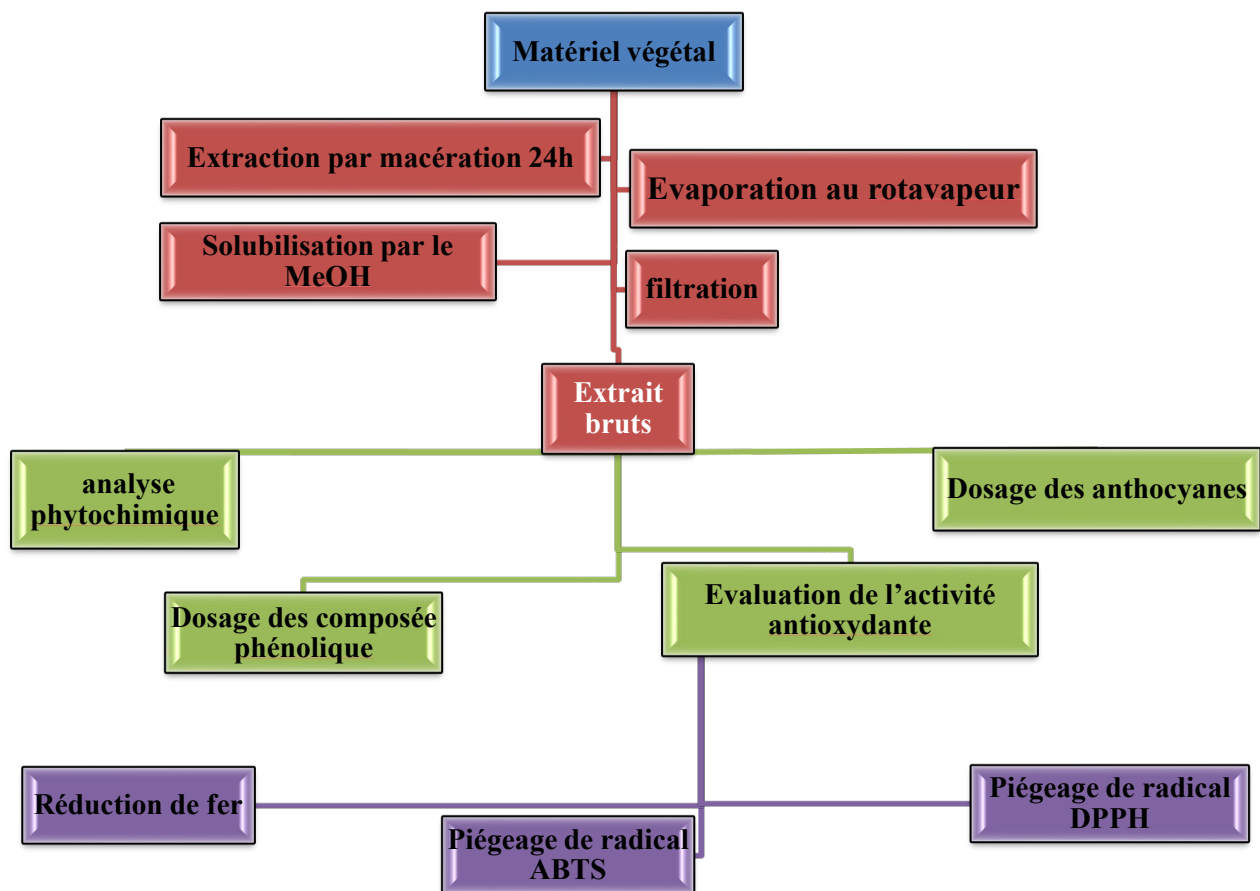


Notre étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de la biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de l'agronomie, Université Ammar Thlédji – Laghouat.

Elle comporte deux parties :

Partie 1 : Extraction du matériel végétal à partir des grains de *vigna mungo*, analyse phytochimique qualitative et dosages quantitatifs des polyphénols totaux et des anthocyanes.

Partie 2 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenus par trois méthodes



:

- ✚ Réduction du fer : Ferric reducing antioxidant power (FRAP)
- ✚ Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)
- ✚ Piégeage du radical preforme 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou ABTS .

Figure14 : récapitulatif du protocole expérimental

1. Matériel

1.1. Matériel biologiques

Nous avons effectué des expérimentations sur la plante de «*Vigna mungo*». Le matériel végétal a été constitué des grains de *vigna mungo* récolté en décembre 2016 au niveau du jardin botanique de notre région Augroute, un village situé à la wilaya d'Adrar.

Les graines récoltées séchées à l'abri de la lumière et à température ambiante sont broyées à l'aide d'un mortier en poudre qui sera stockée dans un flacon en verre.



Figure15 :(A) Les graines de *vigna mungo*. (B) La poudre obtenue après le broyage des graines (original,24/02/2020).

1.2. Produits et matériel chimiques

Méthanol, acétone, chloroforme, DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$, chlorure de fer ($FeCl_3$), Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , acide trichloracétique, acide hydrochlorique, iodate de potassium(KI), $HgCl_3$, I_2 , Nh_4OH , acide acétique, acide sulfurique(H_2SO_4), $NaOH$, NH_4OH , acide gallique, carbonate de sodium, folin Ciocalteu, $HgCl_2$, liquide de Fehling, ninhidridine, nitrite de sodium, $AlCl_3$.

2.-Méthodes

2.1préparation de l'extrait méthanolique (Selon Mr Gouzi)

20 g de la poudre est ajoutée dans un flacon contenant 100 de méthanol. Après macération sous agitation pendant 24 heures à température ambiante, le macérat est filtré à l'aide du papier filtre puis le filtrat obtenu est évaporé à sec à $45^\circ C$ à l'aide d'un rota vapeur. Le résidu sec obtenuest solubilisé dans du méthanol pour une concentration de 200g/l et sera conservé à $4^\circ C$.

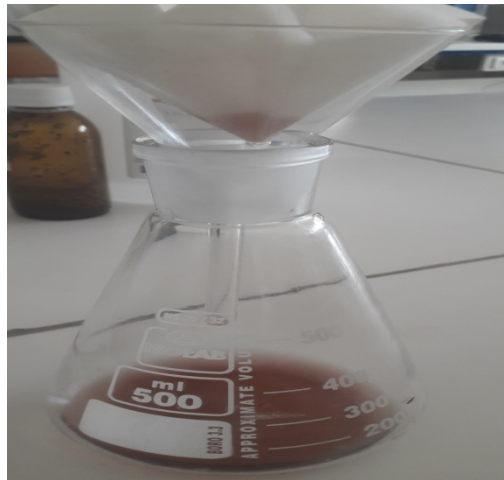


Figure16 : l'extrait obtenu après filtration(original.,25/02/2020)

2.2.-Calcul de rendement

Le taux d'extraction (%) est calculé en appliquant la formule suivante :

$$R(\%) = \{(P1 - P0) / E\} \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

P1 : poids de ballon rempli en (g).

P0 : poids du ballon vide .

E : poids de la poudre végétale (g).

3.Test phytochimiques

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents familles chimiques

contenus dans un organe végétal.est réalisée sur les différents solvants de l'extrait aqueux brut

Les tests sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation ainsi que des examens en lumière ultraviolette.

a-Les tannins

présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml d'eau distillé avec (0,1 ml extrait+ 0,9 ml MeOH) quelques gouttes (0,2 ml) de solution de $Fe Cl_3$ (1%). Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue ou vert-noire pour les tanins cathéchique et un couleur brun verdâtre pour les tannins galliques. (Benhamama ,2015)

b-Les terpénoïdes

Les terpénoïdes, ou également appelés isoprénoïdes .0.2 ml d'extrait repris dans 2,3 ml d'eau distillé, nous avons ajouté 1.5ml d'acide sulfurique et quelques goutte (1ml) de chloroforme. La couleur vert-bleu révèle la présence des hétérosides stéroïdiens et la couleur vert-violet révèle la présence des hétérosides terpéniques.

c-Les flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 0.5 ml d'extrait avec 0.95 ml d'eau distillé et on ajout 0.1ml de $ALCL_3$.la couleur vire au jaune en présence des flavonoïdes.

d-Les stérols

0.1ml d'extrait dissout dans 0.9 ml MeOH après ajouter 1 ml d'acide sulfurique concentré puis l'addition de quelques gouttes d'acide acétique glaciale (0.5ml). l'apparition à l'interphase, d'un anneau violet ,virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positif.

e-Les coumarines

0.1ml d'extrait introduit dans 1.9 ml d'eau distillé additionné à 3ml de NaOH.l'apparition d'un couleur jaune indique la présence des coumarines.

f-Les leucoanthocyanes

Leurs détection consiste à traité 1ml d'extrait (0.1ml d'extrait +0.9 ml méthanol) avec 0.2 ml HCL.l'apparition d'un couleur rouge confirme la présence des leucoanthocyane.

g-Les acides aminés

Ce test est basé sur la réaction des acides aminés avec la ninhydrine. Dans 0.9 ml d'eau distillé on ajout 0.1 ml d'extrait avec quelques gouttes de solution de ninhydrine, dont la concentration est de 1%. Chauffer dans le bain marie et observer le changement de couleur. La présence des aminoacides est confirmée par l'apparition d'une couleur violette.

k-Les sucres réducteurs

0.1ml d'extrait a été traité par 1 ml de liqueur de Fehling (réactif A+réactif B) ,après chauffage , la formation d'un précipité rouge brique indique la présence des sucres réducteurs.

4.Dosage des composés phénoliques et anthocyanes

4.1Dosage des polyphénols totaux

a. Principe

La teneur en polyphénols totaux des extraits bruts a été déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu suivant la méthode décrite par Lister et Wilson

Ce dernier est constitue d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Les deux acides sont réduits, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃). L'intensité de cette couleur renseigne sur le contenu en polyphénols totaux dans le mélange.(ABUDUNIA,2018).

b. Protocol expérimentale

Une prise de 40 µl d'extrait convenablement dilue est mise dans un tube en Présence de 3.16 ml d'eau distillé et 40 µl d'extrait, on ajoute ensuite 0.2 ml du réactif de Folin-Ciocalteu. Apres agitation vigoureuse, d'une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) a concentration de 200g/l (200µl) sont ajoutées. L'absorbance,

Après une incubation de 30 min à 40° C, l'absorbance par référence a une gamme étalon obtenue avec l'acide gallique, est mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, contre un blanc (le même mélange excepté l'échantillon qui est remplacé par le MéOH). Les résultats sont exprimés en termes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait.

Une courbe d'étalonnage ($y=ax+b$) a été réalisée en parallèle par l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. (Figure 11).

Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme du poids sec de la plante en poudre en appliquant la formule suivante :

$$C = (c \times V) / m$$

C : La teneur en phénols totaux (mg d'ac. gallique/ g de matière sèche).

c : La concentration de l'ac. gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : Volume de l'extrait.

m : Le poids de la matière sèche (g).

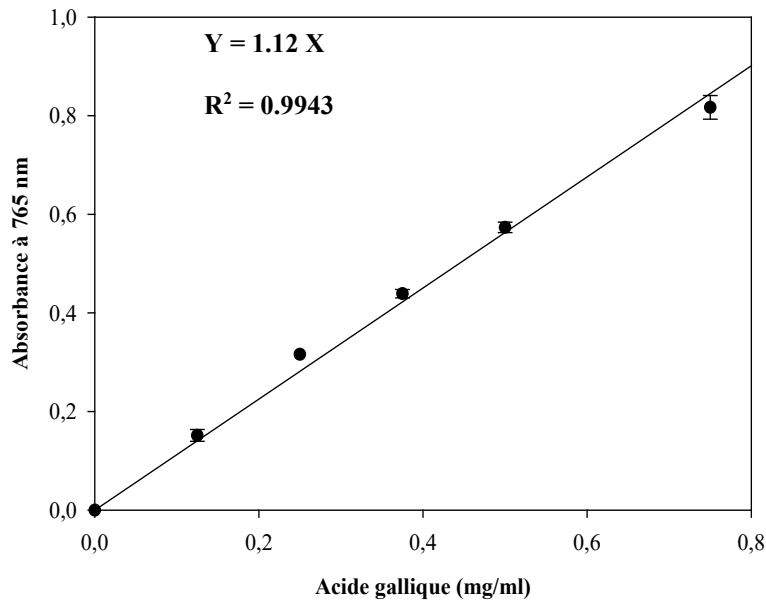


Figure 17 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

4.2. Dosage des anthocyanes

a. Principe

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

La méthode du pH-différentielle est basé sur le changement de la structure du chromophore d'anthocyane entre pH 1,0 et 4,5. Les anthocyanes monomériques subissent une transformation structurale réversible en fonction du pH (forme colorée d'oxonium à pH 1,0 et forme hémiacétale incolore à pH 4,5). La différence dans l'absorbance de ces pigments à 520 nm est proportionnelle à la concentration du colorant

(Saoudi et Bey, 2018).

b. Protocole expérimentale

La teneur en anthocyanes totales est mesurée en utilisant deux tampons : le

tampon de chlorure de potassium, pH 1,0 (0,025 M) et le tampon d'acétate de sodium, pH 4,5 (0,4 M). on prépare les deux tampon comme de suite :

On mesure un quantité de 1.86 g de kcl ajouté à 1l d'eau distillé, mélangé bien jusqu'à l'homogénéité puis ajouté graduellement le HCL jusqu'à atteint PH= 1.

Pour la deuxième tampon introduire 13.6 g d'acétate de sodium (NaCO_3) dans 250 ml d'ED puis ajouté le HCL jusqu'à le PH=4.5.

La Préparation de deux dilutions de l'échantillon d'essai, l'une avec un tampon pH 1,0 et l'autre avec un tampon pH 4,5 :

une prise de 3 ml de KCL introduite dans 100 μl d'eau distillé avec un volume de 25 μl d'extrait. et l'autre essai contient initialement 100 μl d'ED et 25 μl d'extrait puis on ajout 3 ml d'acétate .

La mesure d'absorbance de la prise d'essai dilué avec un tampon pH 1,0, et un tampon

pH 4,5, à la fois 520 et 700 nm .

Calculer l'absorbance de l'échantillon dilué (A) comme suit :

$$\text{Abs} = (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH}1} - (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH}4.5}$$

Calculer la concentration de pigment d'anthocyane monomère dans l'échantillon initial

en utilisant la formule suivante:

$$\text{Pigment d'anthocyane monomère (mg / litre)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

Où

A : l'absorbance de l'échantillon ;

MW : (masse moléculaire de la cyanidine 3-glucoside) = 449,2 g/mol ;

DF : facteur de dilution de l'échantillon ;

ϵ : coefficient d'extinction molaire = 26900 L.mol⁻¹ ;

5.Evaluation de l'activité antioxydante

Les antioxydants présentent une grande diversité moléculaire agissant contre les processus d'oxydation de différentes manières. Ainsi, afin de mesurer l'activité antioxydante d'une molécule, on peut coupler plusieurs tests. Par exemple, on retrouve le test au radical libre DPPH• (2,2-Diphényle-1-PicrylHydrazyle) ainsi que le test au radical libre ABTS• qui est obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylBenzoThiazoline-6-Sulfonique)). Ces deux tests sont les plus utilisés mais on peut également retrouver d'autres méthodes d'évaluation du

pouvoir antioxydant : ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Radical-Trapping Antioxydant Parameter) et FRAP (Ferric ion Reducing Antioxydant Parameter). (GUILLOUTY,2016)

5-1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH

a. Principe

L'effet anti-radicalaire des différents extraits vis-à-vis du radical DPPH° est basé sur une méthode colorimétrique décrite par Huang, en y apportant quelques modifications. Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH° (2,2-diphényle-1-picrylhydrazil).

En effet, à température ambiante et en solution, ce dernier présente une coloration violette après saturation de ses couches électroniques se réduit en forme non radicalaire 2,2-diphényl -1- picryl hydrazine s'accompagne d'une disparition de la coloration violette et prend une couleur jaune. (ABUDUNIA,2018)

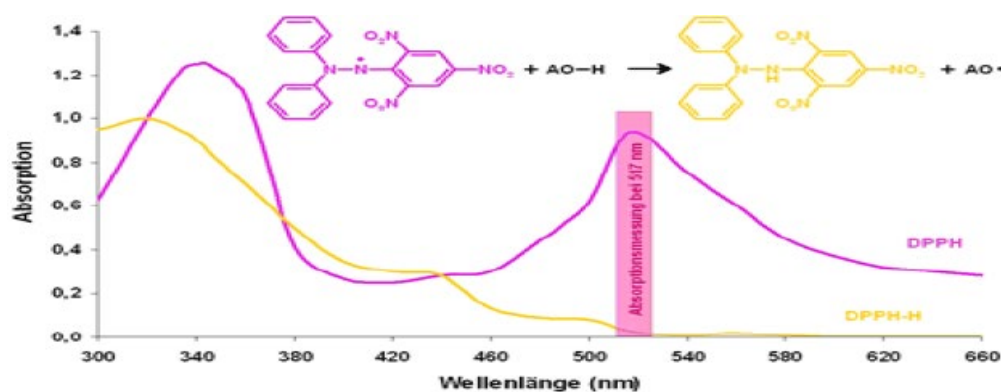


Figure 18: principe de test du DPPH. (Manallah,2012)

b-Protocole expérimentale

La préparation de la solution mère par le mélange de 0.8 ml méthanol et 0.2 ml d'extrait.

On fait la manipulation avec deux dilutions d'échantillon d'essai avec des concentrations croissantes différentes, pour chaque essai introduit dans 0.8ml méthanol une prise de 0.2 ml de solution mère puis l'ajout d'un 1.45 ml de DPPH. Les mélanges sont vigoureusement agités au vortex et mis en obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Après agitation au vortex, la lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre calibré par le méthanol à 517 nm. Le contrôle négatif est composé de la solution de DPPH dans le méthanol seul, et le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard

l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

L'activité antioxydant de nos extraits est exprimée en CI50, Ce paramètre est défini comme étant la concentration de l'antioxydant qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

Les valeurs des CI50 moyennes ont été calculées par les régressions linéaires, où l'abscisse est représentée par la concentration de l'extrait testé et l'ordonnée par le pourcentage de réduction (PR) du radical DPPH, ce dernier est calculé par la formule suivante :

$$I\% = \frac{\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs Echantillon}}{\text{Abs contrôle négatif}} \times 100$$

I% : pourcentage de l'activité antiradicalaire (AAR%)

Abs contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif

Abs de l'échantillon : Absorbance de l'échantillon

5-2.Méthode de piégeage du radical libre ABTS

a. Principe

Une deuxième méthode colorimétrique est le test TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) ou test de décoloration de l'ABTS^{•+} est effectuée selon la méthode décrite par Tuberoso, qui se base sur un essai de décoloration est rapportée afin de détecter le pouvoir antiradicalaire d'un composé donné. Le radical préforme 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou ABTS^{•+} est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium. La formation de radical ABTS^{•+} se traduit par l'apparition d'une coloration vert bleu intense. En présence d'un donneur de H•, le passage du radical ABTS^{•+} à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 734 nm. Cette décoloration résulte d'une réaction entre le radical ABTS^{•+} et un donneur de H•. (Hadj Salem, 2009).

Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer ABTS^{•+}. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre.

La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond donc à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester.

Le radical ABTS^{•+} se forme par arrachement d'un électron e⁻ à un atome d'azote

de l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de H⁺), le radical d'azote concerne piège un H⁺, conduisant à l'ABT⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution. (Abudonia, 2018).

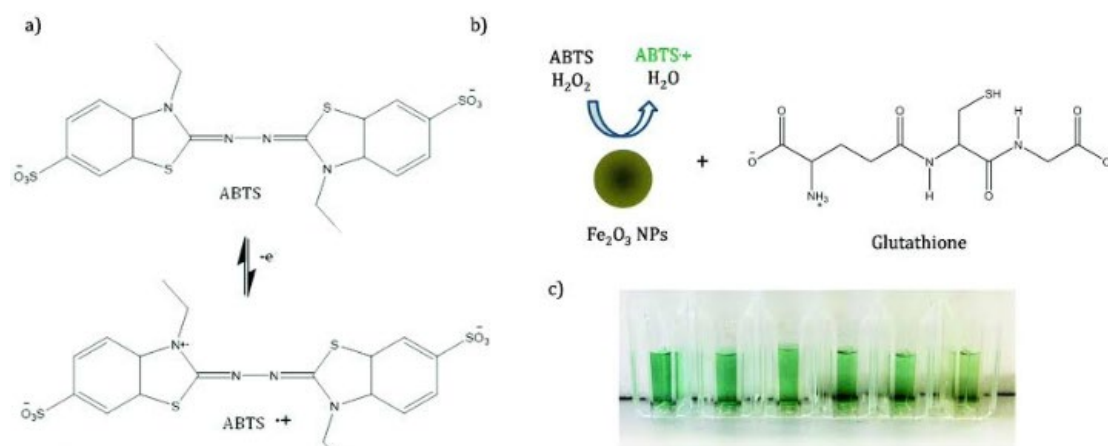


Figure 19 : principe de test d'ABTS.

b-protocole expérimentale

Le radical cationique ABTS^{•+} a été produit par la réaction entre ABTS (7 mM) dans H₂O et de persulfate de potassium. Le mélange a été mis en incubation à l'obscurité pendant 12 h à température ambiante.

La préparation du solution mère par le mélange de 0.950 ml méthanol et le 50 µl d'extrait. Un volume de 3 ml de solution mère avec 0.7 ml de MeOH. Après 20 min d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'absorbance des échantillons est lue à 734 nm.

Les pourcentages d'inhibition du radical d'ABTS ont été calculées par l'équation suivante :

$$\text{Inhibition de l'ABTS (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_E}{A_0} \right) \times 100$$

Avec

A₀ : Absorbance de la réaction de commande (en absence d'extrait).

A_E : Absorbance en présence de l'extrait.

5-3. Réduction du fer par la méthode FRAP

a-principe

Le test de la réduction du fer est considéré comme un test direct et rapide est

utilise pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques. Le test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est effectuée selon la méthode décrite par Oyaizu . Cette méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe^{2+} , la réaction est révélée par le virage de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}),

l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés .(Abudunia, 2018)

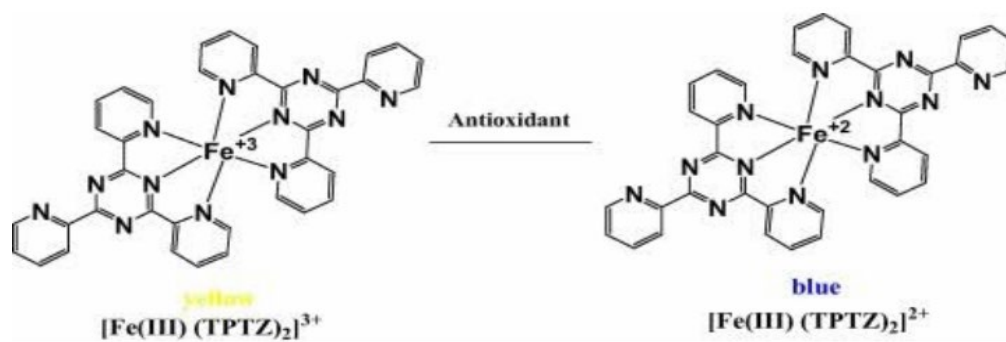


Figure 20 : principe de test (FRAP).

b-Le protocole expérimental

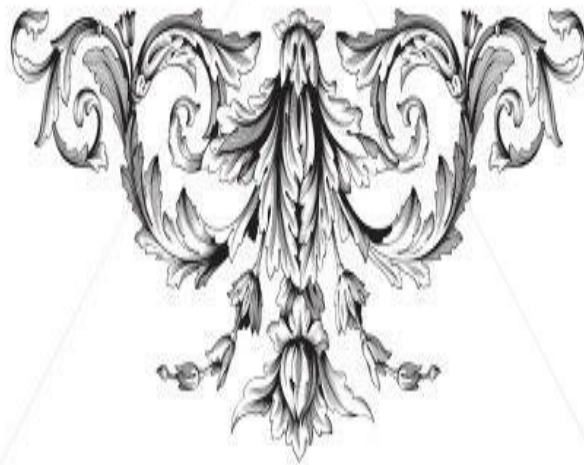
On prépare une solution de 50 μl d'extrait diluée (0.8 ml MeOH + 0.2 ml extrait) de différentes concentrations on ajoute 1 ml d'une solution tampon phosphate (0.1M ; pH 6.6) et 125 μl d'eau distillé , puis l'addition d'un 1 ml de solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% .le mélange est incubé à 50°C pendant 20 minutes.

1 ml de l'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction.

1 ml de cette solution sont ajoutés à 1 ml d'eau distillé et 125 μl d'une solution de trichlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 0.1%. la lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre .



Partie III : résultats et discussion



1. Rendement d'extraction

Beaucoup d'études ont montré l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements d'extraction des composés phénoliques d'origine végétale, tels que le temps et la température d'extraction, le pH, la composition chimique des échantillons et la polarité du solvant. Un rendement d'extraction d'environ 6,68% a été obtenu. Le méthanol a permis d'obtenir un extrait de couleur mauve foncée qui est riche en composés polaires comme les composés phénoliques. Le rendement d'extraction obtenu dans notre travail est plus ou moins similaire à celui trouvé par Ashok et *al* (2011) (9,5 %).

2. Criblage phytochimique

Les tests phytochimiques nous ont permis de mettre en évidence différents métabolites secondaires présents dans les grains de *vigna mungo* par des réactions de coloration et de précipitation. Les résultats obtenus (Tableau 11) ont révélée la présence des composés réducteurs,des acides aminés, des terpénoïdes,des flavonoïdes,des tannins, des coumarines, des stérols et des leucoanthocyanes.

Ces résultats sont en accord avec ceux qui ont rapportés par les travaux de Arockianathan et *al*(2019) sur l'extrait éthanolique de tégument de *Vigna mungo* qui ont montré la présence des composé réducteurs, des tannins,des terpénoïdes et des flavonoïdes

Tableau 11 : Résultats des testes phytochimiques

Groupes chimiques	Résultat du test
Composés réducteurs	+
Acides aminés	+
Terpénoïdes	+
Flavonoïdes	+
Tannins	+
Coumarines	+
Stérols	+
Leucoanthocyanes	+

3. Dosage de composés phénoliques et des anthocyanes

Les résultats d'analyse quantitative polyphénols totaux et en anthocyanes ont été exprimés dans le tableau 2

Les résultats montrent que notre extrait contient de $49,95 \pm 0,31$ mg EAG/g_{RS} polyphénols totaux et de $42,56 \pm 1,57$ (mg/100 g_{MS}) d'anthocyanes.

Tableau 12: Les teneurs en polyphénols totaux et en antocyanes de l'extrait méthanolique des graines de *Vigna mungo* L.

Constituants phytochimiques	Teneur
Polyphénols totaux (mg EAG/g _{RS})	49,95±0,31
Anthocyanines (mg/L)	1273,29±47,23 42,56±1,57 (mg/100 g_{MS})

Le dosage quantitatif d'extrait méthanolique de *vigna mungo*L de polyphénols totaux et d'anthocyanes, donne les teneurs suivants $49,95 \pm 0,31$ mg EAG/g_{RS} et $42,56 \pm 1,57$ (mg/100 g_{MS}) respectivement.

Notre teneur en polyphénols totaux restent nettement supérieurs à celles rapportées par Khyade et sharad (2016) sur l'extrait méthanolique, qui atteignent une valeur de 27.283 ± 3.48 mg/100 g .

D'après, Luthria et al (2014) qui ont fait une étude sur les grains et les bourgeons de *vigna mungo* la teneur trouvée est 25.03 ± 3.00 . et $40,69 \pm 1,23$ mg EAG/gE respectivement.

Par ailleurs, les résultats trouvés par Bhumi (2018) sur l'extrait méthanolique des graines de *Vigna mungo* et par Arockianathan et al.(2019) sur l'extrait éthanolique des téguments des graines de *Vigna mungo* donnent les valeurs suivantes, respectivement : 162.9 ± 3.4 mg EAG/gE et 57.78 ± 3.1 mg EAG/gE.

Ce qui concernant les anthocyanes nos résultats restent nettement inférieur à celle reporté par Ashok et al (2011) qui donne une teneur de $47,5$ (mg/100 g_{MS}) pour un extrait méthanolique des grains des *vigna mungo*

La variabilité des teneurs en polyphénols est du probablement à la composition phénoliques des extraits, aux facteurs génotypiques, les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques, la nature du sol et le type du microclimat) et aussi des étages bioclimatiques où poussent ces plantes. Elle dépend aussi de la méthode d'extraction et par la polarité des solvants d'extraction. (Benhamou ,2012).

4. Evaluation de l'activité antioxydant

A fin de caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon. Il faut combiner les réponses obtenues a l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est base sur l'utilisation de trois tests chimiques. Le principe de ceux-ci repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance a des longueurs d'ondes spécifiques. Dans ce qui suit, on présente les résultats du potentiel antioxydant d'extrait brut pour cette étude.

4.1 Piégeage du radical libre DPPH•

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydant en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. La méthode de DPPH présente plusieurs avantages du fait qu'elle soit indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydantes » à fin de mesurer leur capacité à réduire ce radical .La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde .

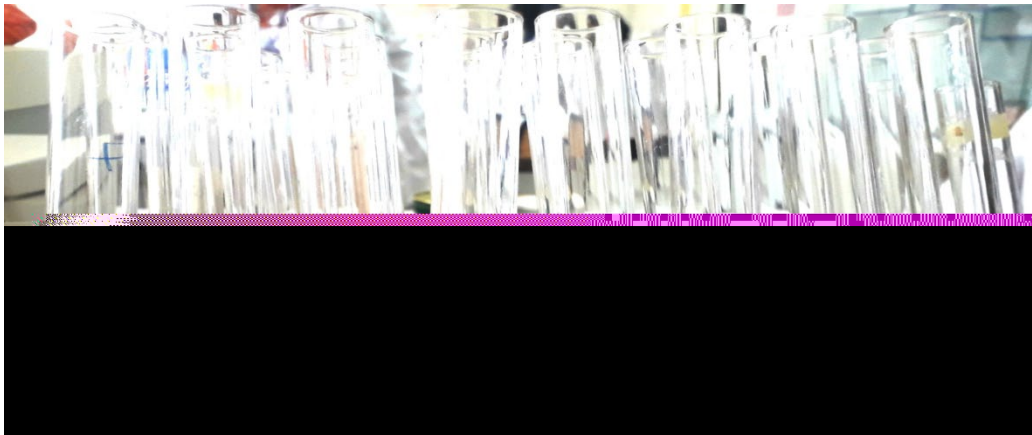


Figure 21 : Les résultats après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière du radical DPPH en présence de l'extrait méthanolique de *vigna mungo* à différentes concentrations.

Les résultats de l'activité antioxydant d'extrait à des concentrations différentes est exprimées en pourcentage d'inhibition ou l'acide ascorbique utilisé comme molécule de référence

La figure montre que à toutes les concentrations testés notre extrait méthanolique a été inhibé le radicale DPPH de manière dose dépendante au long de l'intervalle <0,2 mg/ml où il donne une activité d'inhibition maximale de 92% .A partir de concentration précédent le pourcentage d'inhibition est à l'état stationnaire .Ce qui explique que la totalité de radicale DPPH est sous forme réduite.

D'autre part, l'acide ascorbique a une pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de concentration jusque atteint une pourcentage d'inhibition maximal de 75 % à une concentration finale de 0,16 mg/ml Cependant, ces donnés restent inférieur de notre extrait méthanolique .Qui représente une PI plus grand que notre référence dans des concentrations faible.

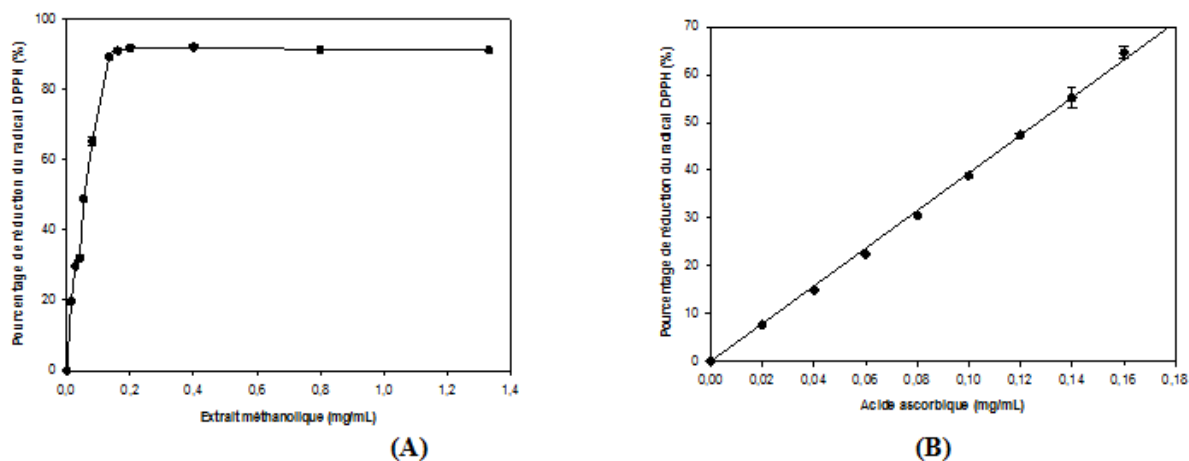


Figure 22: courbe de Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH' en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique des graines de *Vigna mungo L.* (A) et d'acide ascorbique (B).

Pour mieux comparer les activités antioxydant, les EC_{50} ont été déterminées. On voit que l'extrait méthanolique a une EC_{50} de $57,35 \pm 2,40 \mu\text{g/ml}$ qui est supérieur à celle de l'acide ascorbique qui est $120 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$. ce qui veut dire que notre extrait méthanolique de grains de *Vigna mungo L* posséd une forte activité de piégeage des radicaux DPPH• par rapport de l'acide ascorbique.

Nos résultats sont plus ou moins inférieurs à ceux qui sont obtenus dans l'étude réalisée par Luthria et al (2014) (EC_{50} de $23,13 \pm 0,82 \mu\text{g/ml}$) et Khyade et sharad (2016) ($26,214 \pm 0,88 \mu\text{g/ml}$). Par contre, nos résultats sont similaire à ceux trouvés par Arockianathan et al (2019) ($49,75 \mu\text{g/ml}$).

4.2 piégeage du radical libre ABTS+

Cette méthode introduite par Miller et Rice-Evans (1993) est basée sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). La solution ABTS est obtenue en mélangeant l'ABTS avec un oxydant (généralement le persulfate de potassium) qui donne une solution d'une couleur bleu intense. La CA est mesurée comme la capacité des composés tests à diminuer l'intensité de la coloration obtenue à partir de l'ABTS en la comparant avec un antioxydant de référence, le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E sans la chaîne aliphatique. La réduction de l'ABTS conduit à une décoloration du bleu de la solution ABTS mesurée à 645 - 734 nm de la solution. Plus l'absorbance finale est faible, plus la valeur TEAC est

élevée, c.-à-d. plus l'antioxydant est efficace. Cette méthode a pour avantages sa simplicité à mettre en œuvre et sa rapidité.

De plus, la solution d'ABTS est soluble dans l'eau et dans les solvants organiques et n'est pas affectée par la force ionique, elle peut donc déterminer la CA lipophile et hydrophile (Tolba, 2016).

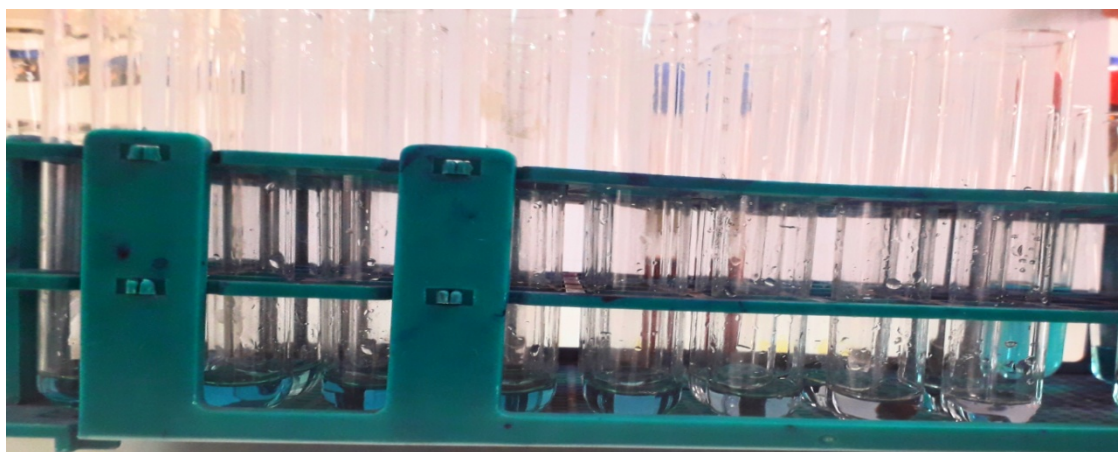


Figure 23: Les résultats après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière du radical ABTS en présence de l'extrait méthanolique de *vigna mungo* à différentes concentrations.

La capacité de notre extrait méthanolique à inhiber le radical ABTS^{•+}, obtenu à partir de l'ABTS est exprimée en pourcentage d'inhibition dont l'acide ascorbique utilisé comme molécule de référence.

La Figure montre que le radical cation ABTS^{•+} a été inhibé de façon significative à toutes les concentrations testées, et de manière dose dépendante de l'extrait méthanolique. On remarque que l'augmentation de concentration méthanolique de notre extrait provoque l'augmentation de PI jusqu'à atteindre sa valeur maximale 84 % à la concentration 0,075 mg/ml.

Cependant ces résultats restent très inférieurs à celle de notre référence l'acide ascorbique qui représente un pouvoir d'inhibition très élevé pour le cation ABT^{•+} dans des concentrations très faibles de celui-ci.

Concernant les EC₅₀ l'acide ascorbique et de notre extrait méthanolique sont 1.60±0.00 µg/mL et 37,33±1,06 µg/ml respectivement. Comme un résultat, l'acide ascorbique a un pouvoir de réduction de cation ABTS^{•+} très fort que notre extrait méthanolique.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Bhumi (2018) (EC₅₀ égale à 29,4±0,7 µg/ml) mais en désaccord avec les résultats trouvés par Ashok et al (2011) (EC₅₀ de 6 µg/ml).

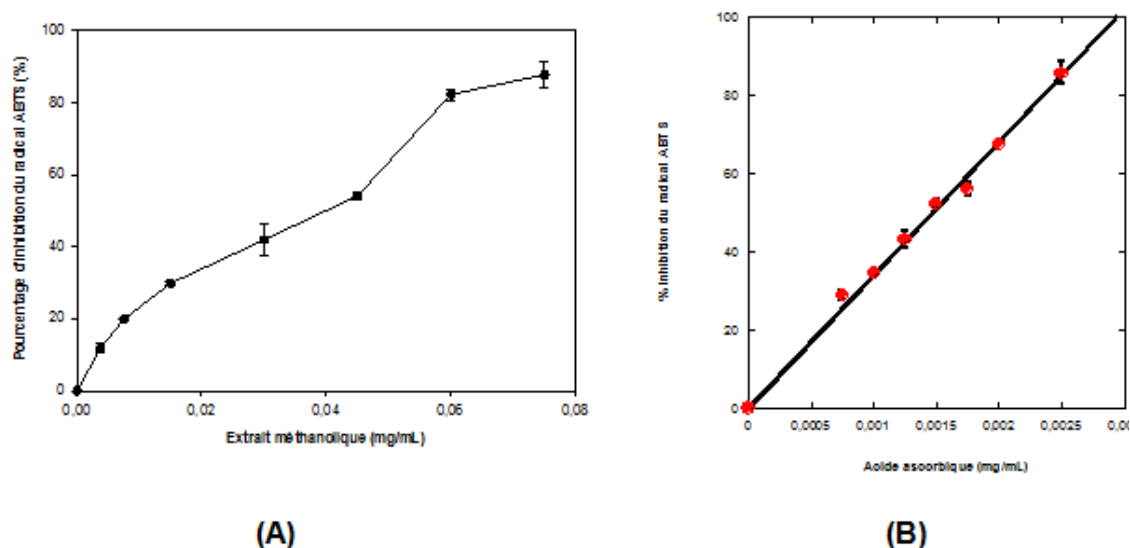


Figure 24: Courbes représentant la variation du pourcentage de réduction du radical ABTS en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique des graines de *Vigna mungo* L. (A) et de l'acide ascorbique (B).

4.3 Réduction de fer FRAP (Ferric Reducing antioxidant Power)

Le pouvoir réducteur est l'aptitude de l'extrait à réduire le fer ferrique du Complexe ferricyanure en fer ferreux, cette réduction donne une couleur verte dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait a étudié (Aberkane et Adnane, 2013).

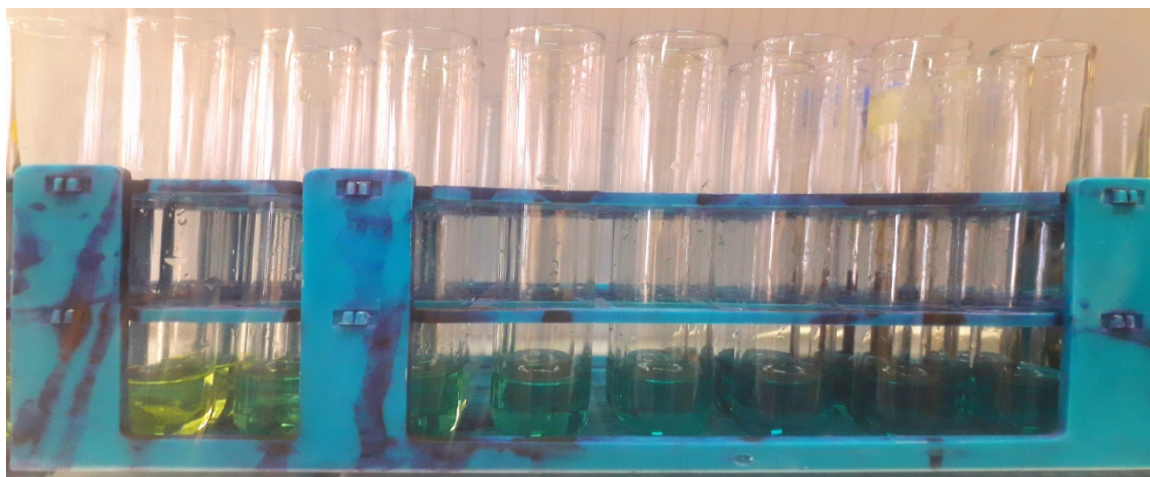


Figure 25 : Les résultats après 20 min d'incubation au bain marie du complexe ferricyanure en présence de l'extrait méthanolique de *vigna mungo* à différentes concentrations.

Les résultats obtenus pour cette méthode sont présentés sous forme de graphes de l'absorbance en fonction des concentrations des extraits ou de l'acide ascorbique utilisé comme molécule de référence (Fig. 18)

D'après la figure, nous remarquons que l'absorbance augmente au fur et à mesure que la concentration en extrait s'élève ce qui correspond à un effet dose dépendant. A une concentration de 0,25 mg/ml, l'extrait méthanolique présente une absorbance de 0,1 nm. Lorsque l'on augmente la concentration, les absorbances augmentent. À une concentration finale de 2 mg/mL, l'extrait présente une densité optique maximale 0,95 nm. Alors que l'acide ascorbique présente une DO élevée dans des concentrations très faibles par rapport de notre extrait dont cette DO augmente avec l'augmentation des concentrations de référence.

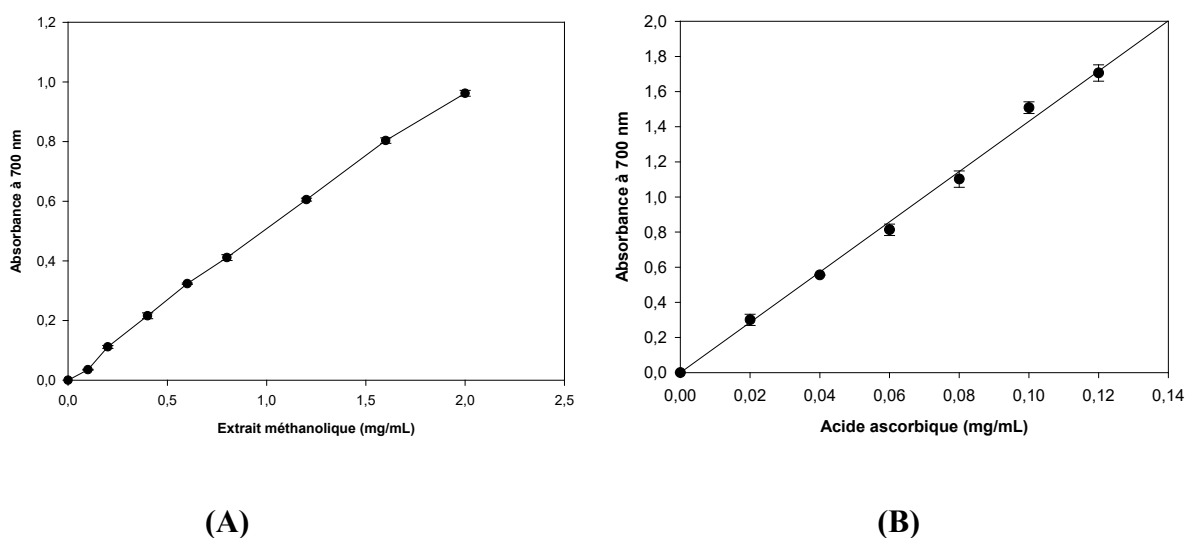


Figure 26: courbe du pouvoir réducteur du fer par l'extrait méthanolique des graines de *Vigna mungo* L. (A) et de l'acide ascorbique (B).

Concernant les EC_{50} de référence et de notre extrait méthanolique sont $80 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$ et $988 \pm 15,55 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

Nous pouvons noter que l'extrait méthanolique de grains de *Vigna mungo* L possède une activité de réduction de fer mais nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique, reflétée par les densités optiques élevées obtenues à différentes concentrations de celui-ci.

Calcul des EC_{50}

L' EC_{50} est un paramètre qui définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical. Plus la valeur de EC_{50} est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

Les EC_{50} calculées à partir des équations des régressions logarithmiques données précédemment sont données dans le (tableau 13).

Tableau 13 : Les valeurs d'EC₅₀ des activités antioxydantes de l'extrait méthanolique des graines de *Vigna mungo* L. et de l'acide ascorbique obtenues par les tests DPPH, ABTS et FRAP

Test du pouvoir antioxydant	Acide ascorbique	Graine de <i>Vigna mungo</i> L
DPPH (EC ₅₀ ; µg/ml)	120±0.00	57,35±2,40
ABTS (EC ₅₀ ; µg/mL)	1.60±0.00	37,33±1,06
FRAP (EC ₅₀ ; µg/mL)	80±0.00	988±15,55

D'après les résultats indiqués par Bhumi (2018) une valeur d'EC₅₀ 448,5 ± 7,9 µg/ml du pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique est obtenue avec le test FRAP.

D'après les résultats précédemment décrits, les activités antioxydante et antiradicalaire de l'extrait méthanolique des graines de *Vigna mungo* peuvent être expliquées par la présence surtout des anthocyanes et des polyphénols qui peuvent piéger et neutraliser les radicaux libres, inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux libres et être des chélateurs de certains ions métalliques(Benyahia, 2017).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante des grains de *vigna mungo* L.

1. Rendement d'extraction

- ✓ Le rendement d'extraction de *vigna mungo* obtenu après utilisation de méthanol dans notre étude est 6,68 %.
- ✓ L'étude réalisée par Ashok et al (2011) donne un rendement de 9,5 %.

2.test phytochimiques

Les tests phytochimiques que nous avons réalisés sur l'extrait méthanolique des grains *vigna mungo* L a révélé la présence des composés réducteurs, Acides aminés, Terpénoïdes, Flavonoïdes, Tannins, Coumarines, Stérols et Leucoanthocyanes.

Ces résultats sont en accord avec ceux qui ont rapportés par les travaux de Arockianathan et al(2019) sur l'extrait éthanolique de tégument de *vigna mungo* qui ont montré la présence des composé réducteurs, des tannins ,des terpénoïdes et des flavonoïdes .

3. dosage des polyphénols totaux et d'anthocyanes

Le dosage quantitatif d'extrait méthanolique de *vigna mungo* L de polyphénols totaux et d'anthocyanes, donne les teneurs suivants $49,95 \pm 0,31$ mg EAG/g_{RS} et $42,56 \pm 1,57$ (mg/100 g_{MS}) respectivement.

Notre teneur en polyphénols totaux restent nettement supérieurs à celles rapportées par Khyade et sharad (2016) sur l'extraits méthanolique, qui atteignent une valeur de 27.283 ± 3.48 mg/100 g .

D'après, Luthria et al (2014) qui ont fait une étude sur les grains et les bourgeons de *vigna mungo* la teneur trouvée est 25.03 ± 3.00 . et $40,69 \pm 1,23$ mg EAG/gE respectivement.

Par ailleur, l'étude réalisée par Bhumi (2018) sur l'extrait méthanolique des grains de *vigna mungo* et Arockianathan et al (2019) sur l'extrait éthanolique de tégument de *vigna mungo* donnent les valeurs suivantes 162.9 ± 3.4 mg EAG/gE et 57.78 ± 3.1 mg EAG/gE par orde .

Ce qui concernant les anthocyanes nos résultats restent nettement inférieur à celle reporté par Ashok et al (2011) qui donne une teneur de 47,5 (mg/100 g_{MS}) pour un extrait méthanolique des grains des *vigna mungo*

La variabilité des teneurs en polyphénols est du probablement à la composition phénoliques des extraits, aux facteurs génotypiques, les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques, la nature du sol et le type du microclimat) et aussi des étages bioclimatiques où poussent ces plantes. Elle dépend aussi de la méthode d'extraction et par la polarité des solvants d'extraction. (Benhamou ,2012).

4.1'activité antioxydantes

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante par piégeage de radicaux libres

1. Pour la méthode de DPPH•, nous avons le EC₅₀ d'extrait méthanolique égale à 57,35±2,40 µg/ml qui est supérieur à celle de l'acide ascorbique qui est 120±0.00 µg/ml.

Nos résultats sont inférieurs à ceux qui sont obtenus dans l'étude réalisée par Luthria et al (2014) qui ont trouvés un EC₅₀ de 23.13±0.82 µg/ml.

De plus, les travaux réalisés par Khyade et sharad (2016) sur l'extrait méthanolique et par Arockianathan et al (2019) indiquent les valeurs suivantes 26.214±0.88 µg/ml et 49,75 µg/ml par ordre.

2. pour la méthode l'ABTS notre extrait méthanolique représente une EC₅₀ de 37,33±1,06 µg/ml qui est très faible à celle de l'acide ascorbique qui est 1.60±0.00 µg/ml.

Bhumi (2018) trouve que la valeur d' EC₅₀ égale à 29,4±0,7 µg/ml.

De plus, Ashok et al (2011) ont trouvé une EC₅₀ de 6 µg/ml l.

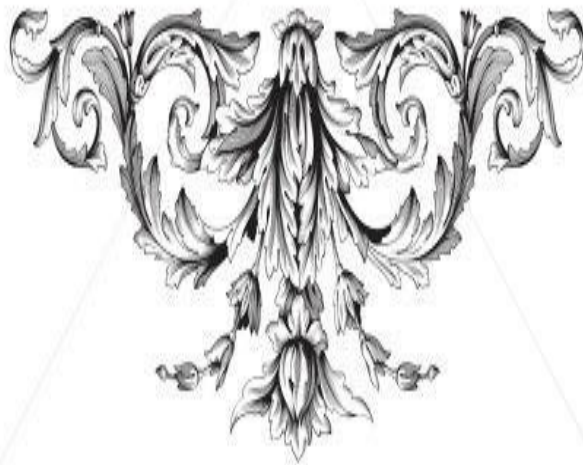
3. pour la méthode de FRAP notre extrait méthanolique représente une EC₅₀ de 988±15,55 µg/ml qui est très faible à celle de l'acide ascorbique 80±0.00 µg/ml.

D'après les resultats indiqués par Bhumi (2018) le pouvoir réducteur suivit par l'extrait méthanolique avec (EC₅₀ égale á 448,5 ± 7,9).

L'activité antioxydante de polyphénols dépend généralement de leurs structures chimiques, du nombre et de la distribution des groupements hydroxyles .Ils peuvent piéger et neutraliser les radicaux libres, inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux libres et être des chélateurs de certains ions métalliques). Les polyphénols qui contiennent le noyau catéchol dans leur structure présentent un pouvoir réducteur du fer élevé, cela est due à la participation des groupements OH liée au noyau catéchol (Benyahia, 2017).



Conclusion



La connaissance et l'usage des plantes constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimiques contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicaux tels que les antioxydants.

Vigna mungo L. (Black gram) est largement utilisé comme produit alimentaire à raison de sa valeur nutritionnelle plus élevée, de plus leurs sous-produits principalement le tégument sont utilisés comme aliments pour animaux.

Le présent travail a pour objectif l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante des grains de *vigna mungo*.L

L'analyse phytochimique de ces extraits nous a révélé la présence de nombreuses familles chimiques représentées par des composés réducteurs, Acides aminés, Terpénoïdes, Flavonoïdes, Tannins, Coumarines, Stérols et Leucoanthocyanes. Le dosage de polyphénols totaux, des anthocyanes, a quantifié le taux de ces composés dans l'extrait méthanolique des grains.

L'étude d'activité antioxydante déterminée par le radical libre DPPH \cdot , ABTS et par le pouvoir réducteur du fer (FRAP), a révélé que notre extrait possède une activité antioxydante intéressante. Cette effet a été très fort dans les test DPPH mais faible dans les autres teste.

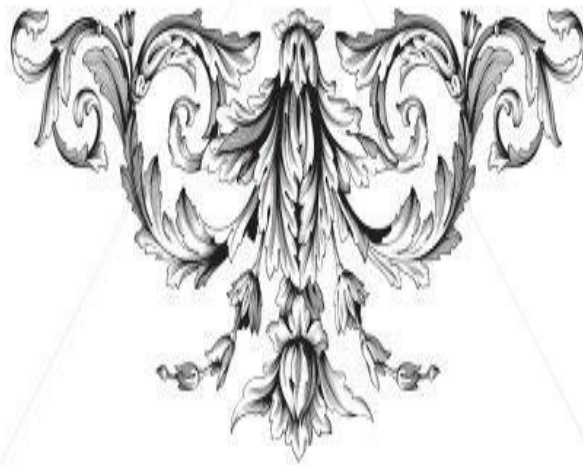
Ces résultats restent préliminaires et ne constituent bien évidemment qu'une première étape de recherche. Des études complémentaires, précises et approfondies, seraient nécessaires, qui se résument dans les points suivants :

- ✚ Réaliser autres méthodes d'extraction par changement du solvant et le temps d'extraction.
- ✚ Réaliser une étude phytochimique approfondie qui consiste à la purification, l'identification, et la caractérisation des principes actifs par des techniques chromatographiques et spectrales.comme HPLS.
- ✚ Tester *in vitro* l'activité antioxydante par d'autres méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) et le blanchiment de β -carotènes.

- ✚ Evaluation d'autres activités biologiques, dont l'activité antimicrobienne, antifongique, antidiabétique, antitumorale ... et autres.
- ✚ L'étude d'activité enzymatique de cette plante par l'utilisation des différentes méthodes d'extraction .



Références bibliographique



1. **Aberkane .L, Adnane . H. (2013).** Activité antioxydante de quelques légumineuses cuites (haricot blanc, pois chiche) à l'état sec et en conserve, et petit pois (sec, frais, congelé et conserve). Université ABDERRAHMANE MIRA-Bejaïa, mémoire de master.p21-28
2. **ABUDUNIA.A.(2018).** Etude phytochimique ,screening biologique et pharmacologique des fleurs de *Calendula Arvensis*. Université mohammed V-RABAT,thèse de doctorat.p 34- 39.
3. **Achat. S .(2014) .** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse doctorat,Université A. Mira –Bejaia.P5-30.
4. **Anonyme 1, (2018).** Urad Dal For Health: 8 Benefits Of Including Split Back Gram In Your Diet.Journal, <https://food.ndtv.com/food-drinks>.
5. **Anonyme 2, (2019).** Black Gram: Nutrition, Therapeutic Benefits, Uses For Skin And Hair.Journal, <https://www.netmeds.com/health-library>.
6. **Anonyme 3, (2019).**Black gram (urad) nutrition facts. Journal,<https://www.nutrition-and-you.com>.
7. **Arockianathan.M, Kumar. R et Nagappan.P.(2019).** Proximate composition, phytochemicals, minerals and antioxidant activities of *Vigna mungo L.* seed coat. www.bioinformation.net.vol15(8).p581-583
8. **Béliveau.R.(2009).**les caroténoïdes: des pigment essentiels à la santé, le journal de mentriale,53 ; p 1.
9. **Benhamama.L.(2015).** Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité Antioxydante de la plante médicinale *Crataegus monogyna*. Université des Frères Mentouri Constantine ,mémoire de master.p39.
10. **Benhammou. N. (2012) .** Activité antioxydant des extraits des composés Phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-ouest Algérien. Thèse doctorat, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen .P5-16
11. **Benlaldj . A. (2017).** Etude comparative physiologique et biochimique de trois espèce de vigna (*Vigna mungo L*, *Vigna unguiculata L*, *Vigna radiata*) stressés à la salinité. Thèse doctorat, Université de Ahmed Ben Bella 1 Oran.P.11-22.
12. **Beye. C ., Lat Souk .T ., Mamadou A ., Thonart . P et Patrick .F .(2015).** Opportunités pour la valorisation des végétaux riches en anthocyanes comme sources de colorants alimentaires .Article. **19(4)** P392-396.

13. **Bhumi.P.(2018)**. Total phenolic content and total antioxidant capacity of common Indian pulses and split pulses, Association of Food Scientists & Technologists,55(4);p1502
14. black-gram-urad-dal-benefits-and-sideeffects.Journal,<https://www.lybrate.com>
15. **Camille.M , Mireille.S.(2011)**. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant .médecine/sciences,vol 27 ;p405-407.
16. **Chekroune. C. (2018)**. Recherche des conditions optimales de régénération de Soja sous contraintes salines par la culture in vitro. Thèse doctorat, Université Ahmed Ben Bella 1 Oran.P.8.
17. **CHERRAK.S.A. (2016)**. Etude in vitro.de l'effet antioxydant des complexes Flavonoïdes –Métaux : Relation structure activité. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Thèse de doctorat .p15 et p 30-33
18. **Choon.S.Y., S. H. Ahmad., P. Ding., U. R. Sinniah et A. A. Hamid.(2010)**. Morphological and Chemical Characteristics of Black Gram (*Vigna mungo* L.) Sprouts. Journal,Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science. Vol. 33 (2).P186-189.
19. **D.P.Theertha., J.Alice.R.P.Sujeetha., C.V.Kavitha Abirami et K. Alagusundaram.(2014)**. Effet of moisture content on physical and gravenmetric propertiés of black gram (*vigna mungo* L).journal, International Journal of Advancements in Research & Technology. Volume 3, Issue 3, P.100.
20. **Dangles.O , Deluzarche .M.(1994)**. Flavonoides et anthocyanes.Journal, Bulletin de l'union des physiciens. B.U.P. n° 768.P1610.
21. **David.V.(2010)**. Étude des propriétés biologiques des constituants des vins de Champagne .thèse de doctorat. Université Montpellier.
22. **Desmier ,T.(2016)**.les anthocyanes de nos jours définition et application. Thèse doctorat, Université de Limoges. P36-47.
23. **Donatien. K. (2009)**. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales Maliennes-extraction, identification d'alcaloïdes –caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydant .Thèse doctorat, Université Paul Verlaine de Metz –UPV- M (France).P40.
24. **FAO.(2016)**.Légumineuses des grains nutritives pour un avenir durable. Livre ,189. p13.

25. **Gomez. C. (2009)** .Etude des mécanismes de stockage des anthocyanes des la baie de raisin caractérisation fonctionnelle de stockage des gènes impliqués dans ces mécanisme. Thèse doctorat, Université de Montpellier Supagro.P8
26. **Guilloty.A.(2016)**. Plantes médicinales et antioxydants .Université Toulouse III PAUL SABATIER, thèse de doctorat.p19-20.
27. **Hadj Salem.J.(2009)**. Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique. Université de LORRAINE, thèse de doctorat .p113.
28. **Heuzé V., Tran G et Boval M(2016)**. *Black gram (Vigna mungo)*. Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/236>
29. **Jansen.P.C.M.(2006)**.*Vigna mungo(L)*Hepper .Livre,plant resource of tropical Africa.
30. **Kimou. S.(2013)**.Variabilités morphologique et phénologique de dix variétés de *vigna unguiculata (L) Walp.*(Fabaceae),Niebé,cultivées en Cote d'Ivoire.Thésé doctorat,Université Nangui Abrogou.p.4.
31. **Luthria. A, Singh. K. et D'souza M. (2014)**. In vitro antioxidant activity of black gram, cowpea, desi chickpea and yellow mustard as affected by sprouting, *Journal of Global Biosciences*, vol 3(1);p389
32. **Macheix . JJ (1996)** . Les composés phénoliques des végétaux: quelles quelles perspectives à la fin du XXème siècle?,*Acta Botanica Gallica*. Article ,P475-476
33. **Manisha. R ., Dilip .V., Vishwas. N., Santosh. C et Animeshchandra .G. (2011)** . *In vitro*, Antioxidant effect of seed coats extracts of *Vigna mungo*.*Journal, Journal of Pharmacy Research 4 (3)* .P 656-657.
34. **Muanda. M N. (2018)**. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydant et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse doctorat, Université Paul Verlaine-Metz . P77.
35. **Nguyen, T. (2019)**. Éco-extraction et encapsulation de pigments caroténoïdes et anthocyanes à partir de plantes tropicales .Thèse doctorat, Université de Bourgogne - Franche-Comté. P13-19 .

36. **Rezaire. A. (2012).** Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse doctorat, Université des Antilles et de la Guyane.
37. **Sahraoui. W. (2015).** Les anthocyanes. Laboratoire de pharmacognosie. P1-5
38. **SAOUDI. H, Tayeb Bey. D. (2018).** Evaluation de l'activité antioxydante de quelques fruits secs. UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA . mémoire de master. p31.
39. **Sava. C., Sirbu. R et Dumitrescu. C. (2006).** Analyse qualitative et quantitative des anthocyanes dans des produits naturels. Article. p785-786.
40. **Shweta, Rajan Katoch et Meena Kumari. (2017).** . Proximate and anti-nutritional composition of underutilized and common *Vigna* species of Himachal Pradesh. Article, *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. Vol 6(5). P.27-29
41. **Tiwari, A. K., Swapna, M., Ayesha, S. B., Zehra, A., Agawane, S. B. et Madhusudana, K.. (2011).** Identification of proglycemic and antihyperglycemic activity in antioxidant rich fraction of some common food grains, *International Food Research Journal*, 18(3). p916-919
42. **TOLBA. I. (2016).** Détermination d'un méta-paramètre pour l'estimation de la capacité antioxydante globale des thés, tisane et jus. Université de Québec , mémoire. p31.
43. **Zagadou .A. (2016).** Optimisation de la production des anthocyanes par culture cellulaire de l'oseille de Guinée [*Illibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae)], isolement et étude de quelques activités biologiques. Thèse doctorat, Université de Nangui Abrogoa. P17-25.