

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université ABDERRAHMANE MIRA – Bejaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-Chimique

# Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention de diplôme Master en biologie  
Option : Biochimie Appliquée

## Thème

**Métabolites secondaires de graines de légumineuses entières ou décortiquées : activité antioxydante d'extraits phénoliques bruts et activité hémolytique des saponines**

Présenté par :

M<sup>elle</sup> ABDI Amal

Membre de jury

Président : M<sup>r</sup> Ouchemoukh S.

Promoteur : M<sup>r</sup> Zaidi F.

Co-promotrice : M<sup>elle</sup> Boudjou S.

Examinatrice : M<sup>me</sup> Hassissene N.

Examinatrice : M<sup>me</sup> Bakdi H.

Année : 2012/2013.

# REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier le bon Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la volonté pour accomplir ce travail.*

*J'exprime mes remerciements à mon promoteur, M<sup>r</sup> ZAIDI F pour son encadrement, ses précieux conseils et son entière disponibilité.*

*Mes remerciements et mon profond respect à ma Co-promotrice M<sup>lle</sup> BOUDJOU S.*

*Je remercie également Mr OUCHEMOUKH S. d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance ainsi que M<sup>me</sup> HASSISSENE N et M<sup>me</sup> BAKDI H qui mon fait l'honneur de juger mon travail.*

*Mes remerciements vont plus particulièrement à ma famille et à mes amis qui ont su me soutenir et m'encourager tout au long de mes études.*

*Merci également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères reconnaissances.*



# *Dédicaces*

*Ce modeste travail*

*Est dédié à toutes les personnes que j'aime :*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie a mes  
parents qui m'ont apporté leur appui durant toutes mes années  
d'étude, pour son sacrifice et soutien qu'ils m'ont donnés  
confiance, courage et sécurité.*

*A ma très chère sœur Nawel*

*A mon très chère oncle ( Zizi Idir )*

*A nana Rachida et Karima*

*A toute la famille ABDI et BEKAOUI*

*A mes amis*



# *Sommaire*

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

## **Partie bibliographique**

### **Chapitre I : Les composés phénoliques**

I.1. Définition.....	02
I.2. Biosynthèse des composés phénoliques.....	02
I.2.1. Voie de l'acide shikimique.....	02
I.2.2. Voie acétate-malonate.....	02
I.3. Classification des composés phénoliques.....	05
I.3.1. les composés phénoliques simples.....	06
I.3.2. Les acides phénoliques.....	06
I.3.2.1. Les acides hydroxybenzoïques.....	06
I.3.2.2. Les acides hydroxycinnamiques.....	06
I.3.3. Les flavonoïdes.....	07
I.3.4. Les tannins.....	08
I.3.4.1. Tannins hydrolysables.....	08
I.3.4.2. Tannins condensés.....	08
I.4. Propriété antioxydante des composés phénoliques.....	09
I.5. Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène.....	10
I.5.1. Les radicaux libres.....	10
I.5.2. Les espèces réactives de l'oxygène.....	10
I.6. Mécanismes d'action des composés phénoliques.....	11
I.6.1. Transfert d'hydrogène.....	11
I.6.2. Effet scavenger.....	11
I.6.3. Chélation des métaux.....	12
I.7. Activités biologiques des polyphénols.....	13

## Chapitre II : les saponines

II.1. Définition.....	14
II.2. Distribution de saponines.....	14
II.3. Classification et Structure des saponines.....	15
II.3.1. Structure de la partie aglycone (sapogénine).....	15
II.3.1.1.Saponines triterpéniques.....	15
II.3.1.2. Saponines stéroïdiques.....	16
II.3.2. Structure de la partie osidique.....	17
II.4. Mode de liaison (osidique-sapogénine).....	18
II.5. Activités biologiques des saponines.....	18
II.5.1. L'activité hémolytique (sur la membrane cellulaire).....	18
II.5.2. Autre activité biologique.....	19

### Partie expérimentale

## Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal.....	20
I.1.1. Classification de <i>Vicia faba</i> et de <i>Lens culinaris</i> .....	21
I.1.2. Origine et provenance des échantillons.....	21
I.1.3. Préparation des échantillons.....	21
I.2. Le matériel sanguin.....	22
I.3. Les composés phénoliques.....	22
I.3.1. Extraction des composés phénoliques.....	22
I.3.1.1. Extraction par macération.....	22
I.3.1.2. Extraction par micro-onde.....	23
I.3.2. Dosage des composés phénoliques.....	23
I.3.2.1. Dosage des composés phénoliques totaux solubles.....	23
I.3.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	24
I.3.2.3. Dosage des tannins condensés.....	25
I.3.3. Détermination de l'activité antioxydante et anti-radicalaire.....	26
I.3.3.1. L'inhibition de NO (l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote).....	26

I.3.3.2. Réduction de la ferrozine.....	27
I.4. Les saponines.....	28
I.4.1. Mise en évidence des saponines.....	28
I.4.2. Extraction des saponines.....	28
I.4.3. Activité hémolytique.....	29
I.4.3.1. Evaluation de la concentration minimale hémolytique.....	29
I.4.3.2. Evaluation de la concentration hémolytique.....	30
I.5. Analyse statistique.....	30

## Chapitre II. Résultats et discussion

II.1. Résultats.....	31
II.1.1. Teneurs en composés phénoliques.....	31
II.1.1.1. Les phénols totaux solubles.....	31
II.1.1.2. Les flavonoïdes.....	32
II.1.1.3. Les tannins condensés.....	33
II.1.2. Activité antioxydante.....	34
II.1.2.1. Activité anti-radicalaire (% inhibition du NO).....	34
II.1.2.2. Réduction de la ferrozine.....	35
II.1.3. Les saponines.....	36
II.1.3.1. Mise en évidence des saponines.....	36
II.1.3.2. Evaluation de la concentration minimale hémolytique.....	37
II.1.3.3. Activité hémolytique.....	40
II.1.3.4. Concentration hémolytique.....	40
II.2. Discussion générale.....	41
Conclusion et perspectives.....	45
Référence bibliographique	
Annexe	

## Liste des abréviations

**ADN:** Acide Désoxyribonucléique

**AlCl<sub>3</sub>:** Trichlorure d'aluminium

**BHA:** Butyl-Hydroxy-Anisol

**BHT :** Butyl-Hydroxy-toluène

**Abs :** absorbance

**C :** atome de carbone

**g :** Gramme

**mg :** milligramme

**ml :** Millilitre

**EPSP:** 6-EnolPyruvylvShikimate 3 P

**ERO :** Espèces réactives de l'oxygène

**O :** oxygène

**Fe<sup>+3</sup>:** Ions ferriques

**Fe<sup>2+</sup>:** Ions ferreux

**FeCl<sub>2</sub>:** Chlorure ferreux

**HO Cl :** Acide hypochlorique

**HC 50 :** Concentration Hémostatique à 50%

**HPLC:** High performance liquid chromatography

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Carbone de Sodium

**Na NO<sub>2</sub>:** nitrite de sodium

**Na OH :** Hydroxyle de sodium

**PI :** Pourcentage d'inhibition

- **toco :** - tocophérol

**UV:** Ultra violet

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : La voie de l'acide shikimique .....	3
<b>Figure 02</b> : La synthèse des flavonoïdes par la voie des polyacétates.....	4
<b>Figure 03</b> : Les principales structures des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques.....	6
<b>Figure 04</b> : Squelette de base des flavonoïdes .....	7
<b>Figure 05</b> : Structure chimique des principaux flavonoïdes.....	7
<b>Figure 06</b> : Structure des tannins .....	9
<b>Figure 07</b> : Réaction des composés phénoliques avec les agents oxydants .....	11
<b>Figure 08</b> : Mécanisme de l'activité scavenger des flavonoïdes via la fonction catéchol .....	12
<b>Figure 09</b> : Chélation des ions métalliques par des acides phénoliques .....	12
<b>Figure 10</b> : Exemple de chélation de fer par les flavonoïdes .....	13
<b>Figure 11</b> : Structure de base des saponines .....	15
<b>Figure 12</b> : Les principaux squelettes triterpéniques.....	16
<b>Figure 13</b> : Les principaux squelettes stéroïdiques .....	17
<b>Figure 14</b> : Photographies des échantillons utilisés.....	20
<b>Figure 15</b> : Extraction des composés phénoliques par macération.....	22
<b>Figure 16</b> : Extraction des composés phénoliques par micro-onde.....	23
<b>Figure 17</b> : Protocole de dosage des composés phénoliques totaux solubles .....	24
<b>Figure 18</b> : Protocole de dosage des flavonoïdes.....	25
<b>Figure 19</b> : Protocole de dosage des composés phénoliques.....	26

<b>Figure 20</b> : Teneurs en phénols totaux Solubles (mg Equiv d'acide gallique/g matière sèche).....	31
<b>Figure 21</b> : Teneurs en flavonoides (mg équivalent de quercétine /g de matière sèche).....	32
<b>Figure 22</b> : Teneurs en tannins condensés (mg équivalent de cathéchine/g de matière sèche).....	33
<b>Figure 23</b> : Activité anti-radicalaire (% inhibition du NO).....	34
<b>Figure 24</b> : La chélation des ions .....	35
<b>Figure 25</b> : Concentration minimale hémolytique (mg/ml).....	37
<b>Figure 26</b> : Activité hémolytique de différents extraits.....	39
<b>Figure 27</b> : Concentration hémolytique des extraits saponines HC50 (µg/ml).....	40

# Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Les principales classes de composés phénoliques .....	05
<b>Tableau II</b> : Structure chimique des principaux flavonoïdes .....	07
<b>Tableau III</b> : Les principales espèces réactives de l'oxygène générées dans les systèmes biologiques .....	10
<b>Tableau IV</b> : Les différentes activités biologiques des polyphénols.....	13
<b>Tableau V</b> : Les différentes activités biologiques des saponines .....	19
<b>Tableau VI</b> : Classification de <i>Vicia faba</i> et de <i>Lens culinaris</i> .....	21
<b>Tableau VII</b> : Rendement du décorticage de <i>Vicia faba</i> , <i>lens culinaris</i> .....	22
<b>Tableau VIII</b> : La mise en évidence des saponines.....	36

### Introduction

Les graines de légumineuses font partie des aliments de l'Homme depuis les premiers âges de l'agriculture (**Duc et al., 2010**). Elles occupent une place importante dans le régime alimentaire humain partout dans le monde car elles contiennent une forte proportion des protéines, des glucides et des fibres alimentaires.

Sont souvent riches en facteurs antinutritionnels, comme les composés phénolique, l'acide oxalique, les acides phytiques, les saponines...etc.

A l'heure actuelle, la capacité antioxydante des produits naturels riches en polyphénols constitue un sujet de recherche largement étudié.

Les saponines, avec leur structure complexe sont hautement tensio-actives ; elles ont la capacité de lyser les érythrocytes, et d'interférer avec les cellules de l'intestin grêle perturbant l'absorption des nutriments.

Tels sont les deux aspects que se propose de traiter notre modeste travail. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aussi bien à l'évaluation des teneurs en composés phénoliques de trois légumineuses (décortiquées ou non) que de l'activité antioxydante de ces métabolites secondaire. La deuxième partie de traite des saponines par une approche qualitative et quantitative.

## I.1. Définition

Les polyphénols sont des métabolites dits "secondaires" présents dans tous les compartiments des plantes. Ils représentent une part importante dans le régime alimentaire humain et animal (**Balasundram et al., 2005 ; Madhan et al., 2006**). Le terme « polyphénol » désigne des corps dont la molécule contient plusieurs fonctions phénol. Ce sont des substances qui possèdent un ou plusieurs cycles aromatiques avec au moins un groupe hydroxyle (**Urquiaga and Leighton., 2000; Bennick et al., 2002** ). C'est une classe constituée d'environ 8 000 composés (**Middleton., 2000**).

## I.2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont synthétisés à partir des métabolites primaires par plusieurs voies telles que, la voie de l'acide shikimique (**Pitchaon et al, 2008**) et la voie des phénylpropanoïdes (**Proestos et al, 2006**).

### I.2.1. Voie de l'acide shikimique

La biosynthèse de nombreux composés phénoliques débute au niveau des acides aminés aromatiques, phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Les précurseurs initiaux sont l'érythrose 4-phosphate produit par la voie des pentoses phosphates et phosphoenolpyruvate, un produit de la glycolyse. L'EPSP qui catalyse la seconde réaction convertit le shikimate en 3-énolpyruvylshikimate-5 phosphate (**Macheix et al., 2006**), la désamination de ses acides aminés conduit aux acides cinnamiques, précurseurs de la majorité des acides phénols (**William et al., 2003**) (figure 01).

### I.2.2. Voie acétate-malonate

La voie acétate - malonate, rappelle que c'est la malonyl - CoA qui fournit par décarboxylation, les unités C<sub>2</sub> pour allonger le complexe acyl CoA. L'acide polycétonique formé se referme en un cycle portant une chaîne latérale. Ce sont des composés mixtes dont les représentants les plus importants sont les flavonoïdes (**Guignard, 2000**). La synthèse des flavonoïdes par cette voie est représentée dans la (figure 02).

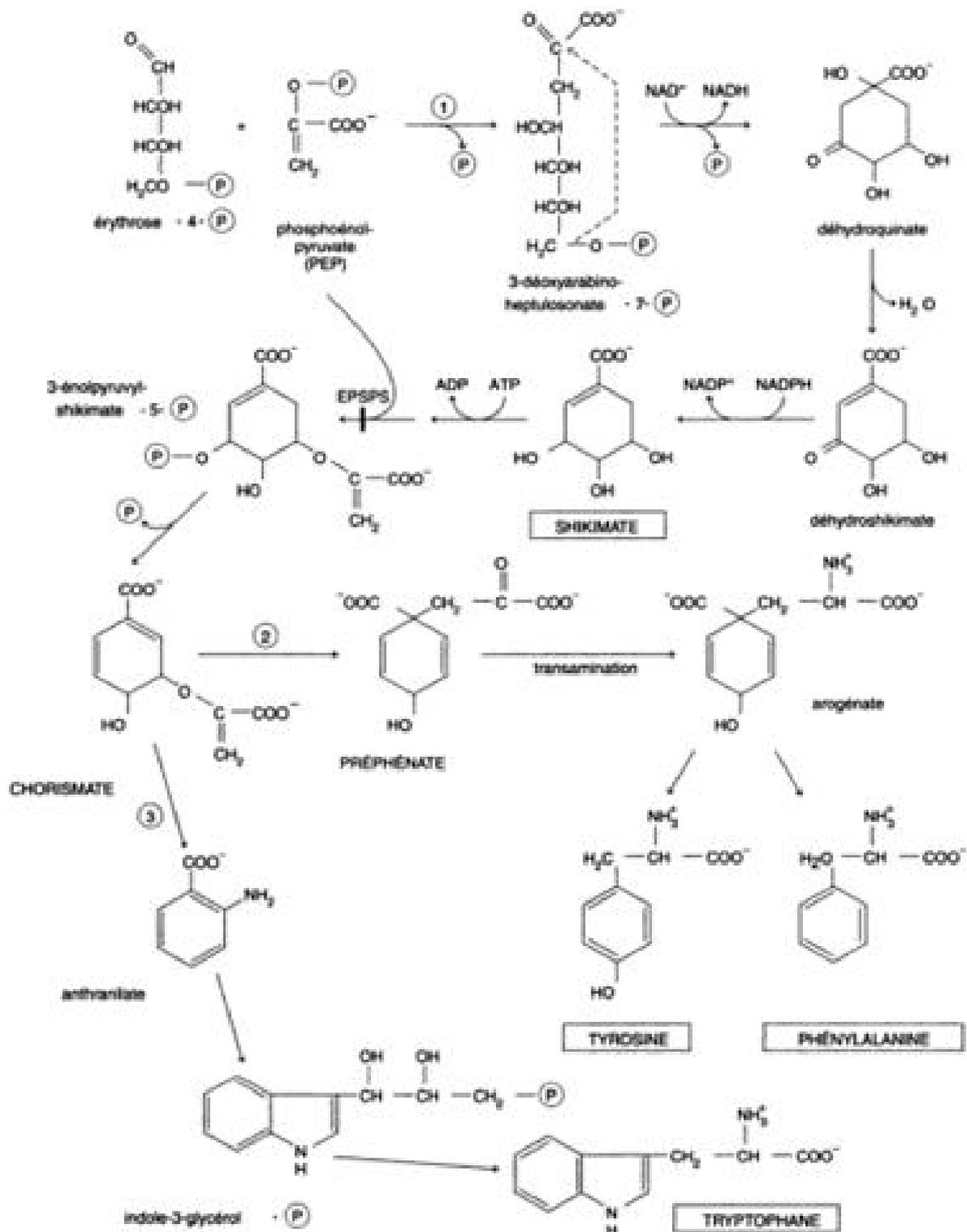


Figure 01 : La voie de l'acide shikimique (Macheix et al., 2006).

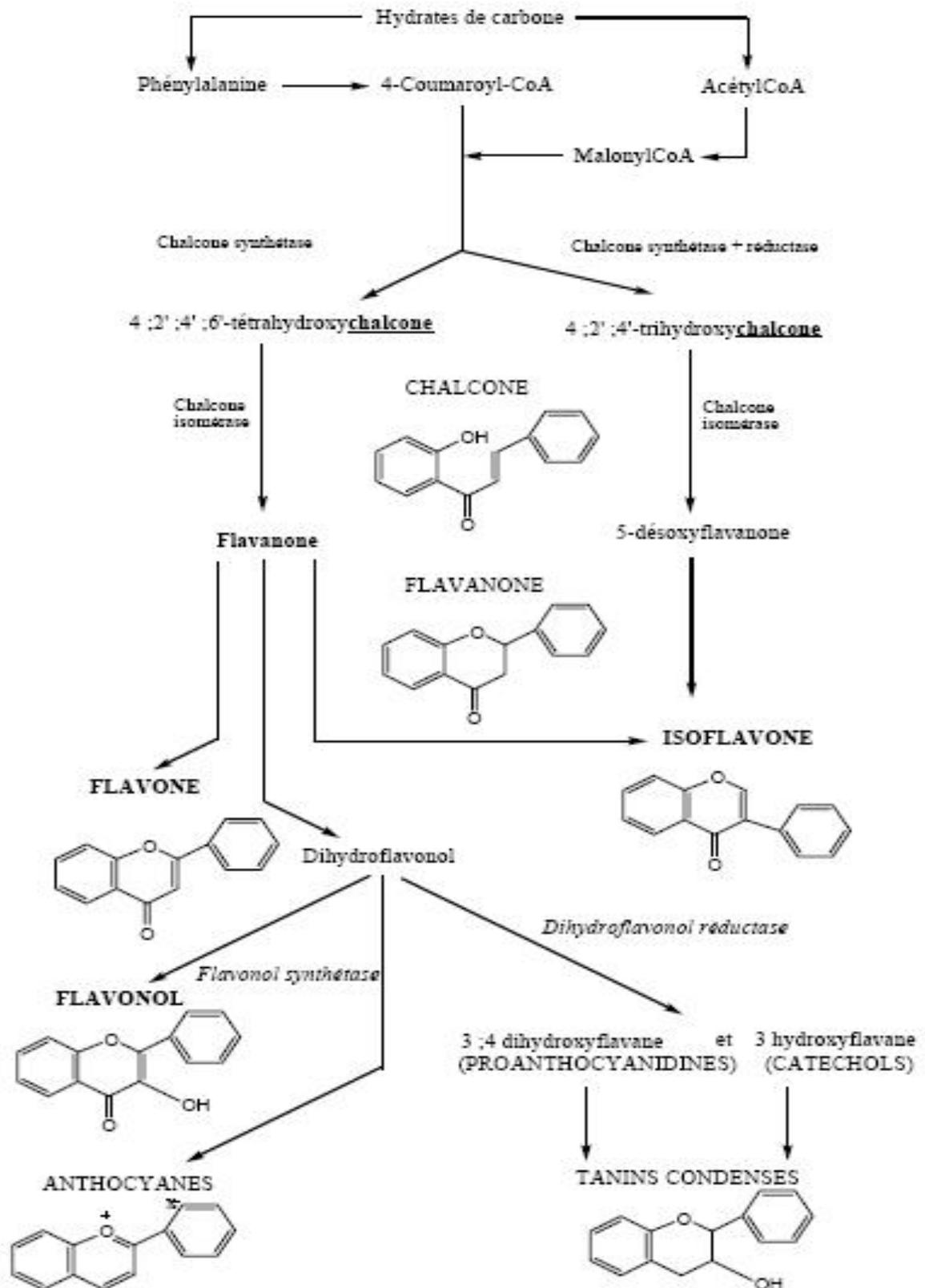


Figure 02: La synthèse des flavonoïdes par la voie des polyacétates (Milane, 2004)

### I.3. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (tableau I) qui se différencient par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C 6 à des formes très polymérisées), par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.) et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) (**Macheix et al., 2005; Beta et al., 2005**).

**Tableau I:** Les principales classes de composés phénoliques **Harbon (1989)**

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C 6	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C 6 - C 1	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C 6 - C 3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique Scopolétine, esculétine	Citrus Citrus
C 6 - C 4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C 6 - C 2 - C 6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C 6 - C 3 - C 6	Flavonoïdes • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Déidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleure, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C 6 - C 3 ) 2	Lingnanes	Pinorésinol	Pin
(C 6 - C 3 ) n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C 15 ) n	Tannins		Raisin rouge, Kaki

### I.3.1. Les composés phénoliques simples

Ce sont des dérivés en **C6** du noyau benzénique, rares à l'état naturel et issus de la décarboxylation de l'acide shikimique (**Chira et al., 2008**) parmi les phénols simples, citons l'hydroquinol, le pyrocatechol et le phloroglucinol.

### I.3.2. Les acides phénoliques

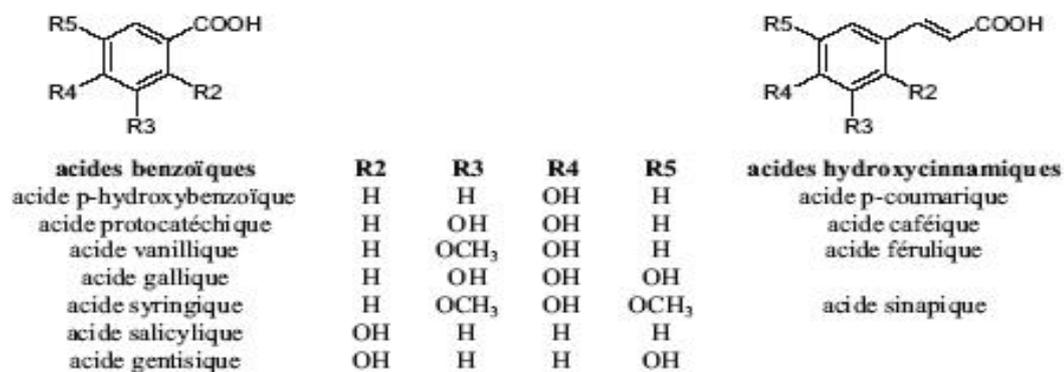
Ils regroupent deux classes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (**Macheix et al., 2006**).

#### I.3.2.1. Les acides hydroxybenzoïques

Ils sont représentés par sept formules, ayant en commun la structure C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (**Balasundram et al., 2005**), ils peuvent être à l'état libre, estérifiés ou glycosylés (figure 03). Le contenu des végétaux en ces acides est généralement faible à l'exception des fruits rouges et des oignons (**Chira et al., 2008**). Les principaux acides benzoïques sont les acides vanillique, protocatéchique, gallique, ellagique et p-hydroxybenzoïque (**Richter, 1993**).

#### I.3.2.2. Les acides hydroxycinnamiques

Ce sont des composés aromatiques à neuf carbones (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) (figure 03). Quatre acides ont une distribution très large (acide p-coumarique, acide caféique, acide férulique, acide sinapique), les autres (acide 2-coumarique) sont peu fréquents (**Bruneton, 1999**). Ces acides se trouvent rarement à l'état libre, ils sont souvent estérifiés (**Skerget et al., 2005**).



**Figure 03 :** Les principales structures des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (**Chira et al., 2008**).

## I.3.3. Les flavonoïdes

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés et représentent la plus grande partie des composés phénoliques. Ces composés partagent une structure commune possédant deux noyaux aromatiques A et B qui sont reliés par 3 atomes de carbone avec un hétérocycle oxygéné (cycle C) (Figure 04). En fonction du type de l'hétérocycle impliqué, les flavonoïdes sont subdivisés en 06 classes (**Manach et al, 2004**) (Tableau II).

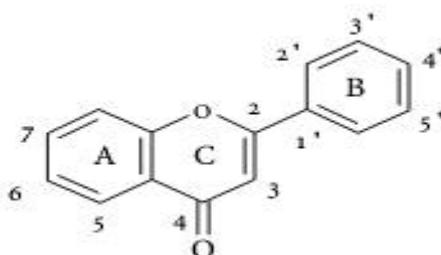


Figure 04 : Squelette de base des flavonoïdes (**Ghedira, 2005**).

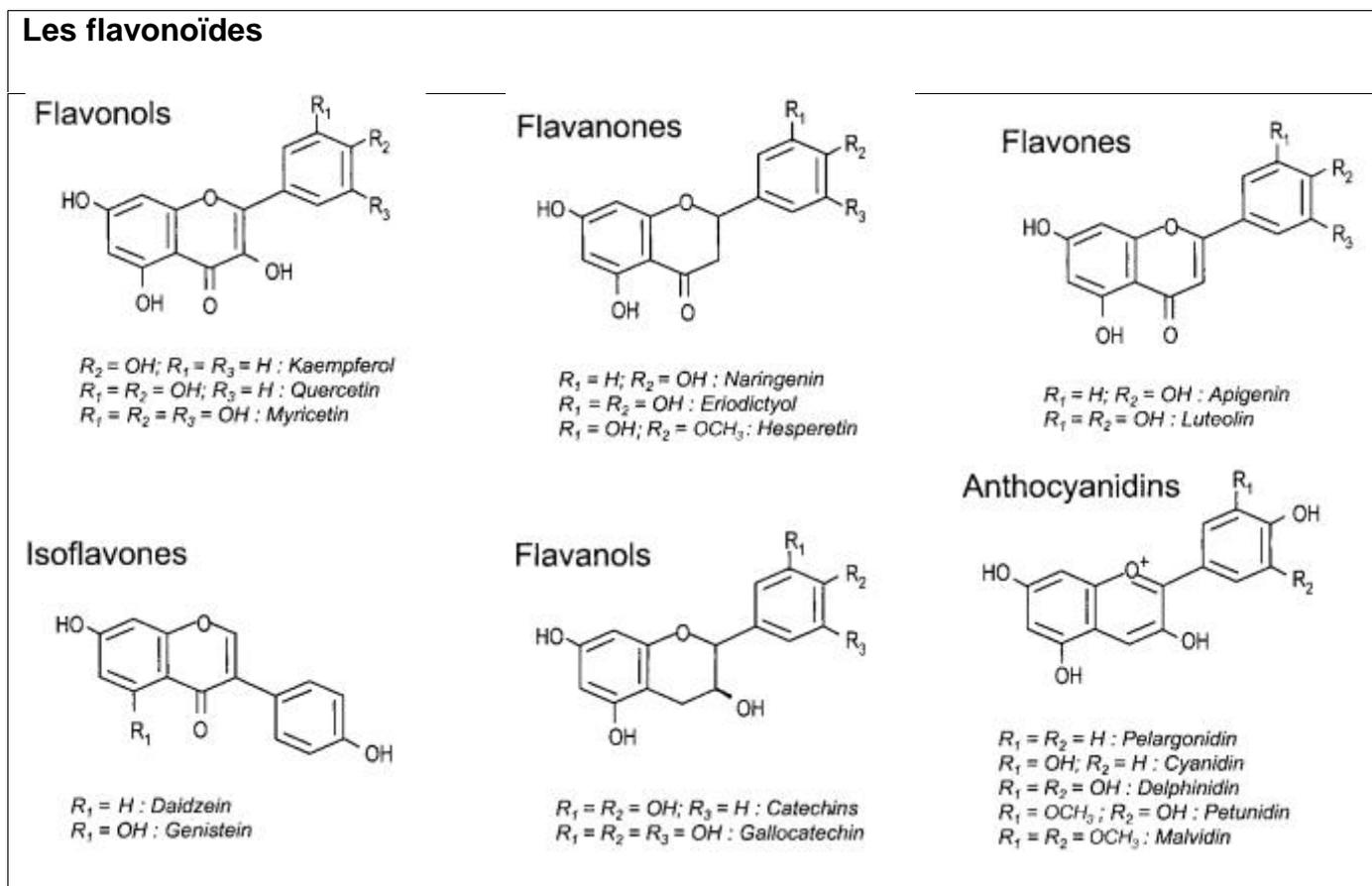


Figure 05: Structure chimique des principaux flavonoïdes (**Manach et al, 2004**).

### I.3.4. Les tannins

Les tannins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun l'aptitude à s'associer aux protéines d'où surgit la propriété tannante de ces composés (**Scharenberg et al., 2007**). Leur poids moléculaire est compris entre 500 à 3000 Da. Ils sont solubles dans l'eau, l'alcool et l'acétone mais insolubles dans l'éther (**Deysson, 1981**). Les auteurs distinguent deux grands groupes de tanins, différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Macheix et al., 2006**).

#### I.3.4.1. Tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont formés par estérification d'une molécule glucidique (souvent du glucose) avec un nombre variable de molécules d'acide phénol. Ces molécules sont soit de l'acide gallique dans le cas des tannins galliques soit de l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés dans le cas des tannins ellagiques (Figure 06). Ils sont facilement dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique (**Guignard, 2000**).

#### I.3.4.2. Tannins condensés

Les tannins condensés résultent de la polymérisation de molécule de flavanes-3-ols (catéchols ou catéchines) ou de flavanes-3,4- diols (leucoanthocyane ou proanthocyanidols) (figure 06). Ils peuvent aussi résulter de l'union de ces deux types de molécules. Ils diffèrent fondamentalement des tannins galliques et ellagiques par leur structure qui est voisine de celle des flavonoïdes. Ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules, sont non hydrolysables et ont au contraire, tendance à se polymériser (spécialement en solution acide concentré ou par action d'agents oxydants) (**Khanbabaee et Van-Ree., 2001**).

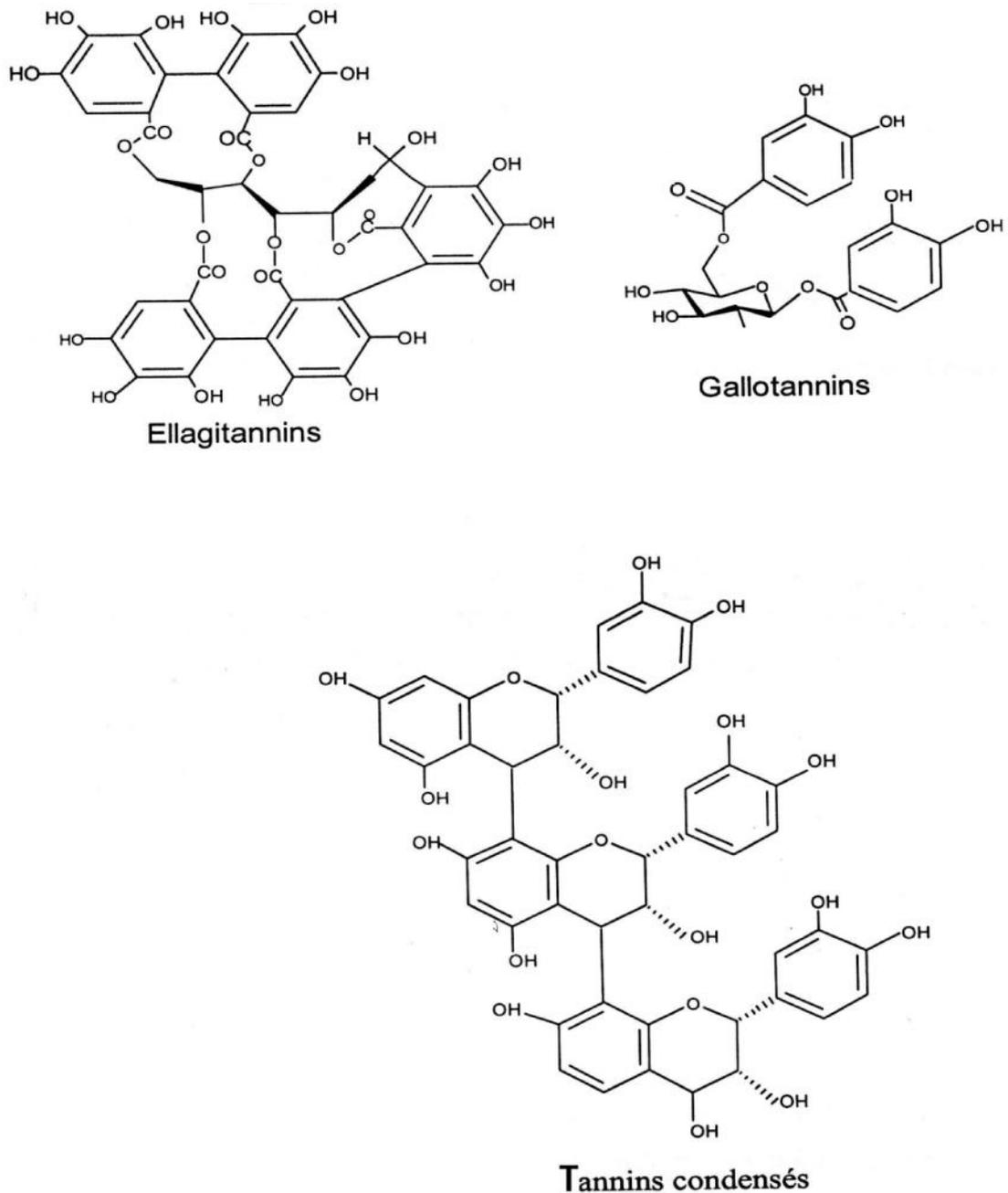


Figure 06 : Structure des tannins (Bruneton, 1999).

#### I.4. Propriété antioxydante des composés phénoliques

Un grand nombre de propriétés thérapeutiques des polyphénols est expliqué, surtout, par leur activité antioxydante, dont le mécanisme d'action est basé sur le phénomène scavenger des radicaux libres (Khady, 2010).

## I.5. Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène

### I.5.1. Les radicaux libres

Un radical libre est une molécule possédant un ou plusieurs électrons libres dit aussi électron célibataire, ce qui explique sa grande réactivité, et qui lui confère des propriétés physicochimiques particulières (**Noguchi et Niki, 1998**). Ces molécules sont très instables, leur durée de vie est courte, par conséquent les réactions radicalaires sont très rapides (**Clarkson et Thompson., 2000**).

### I.5.2. Les espèces réactives de l'oxygène

Les principaux radicaux libres, dérivent de la molécule de l'oxygène sous l'action de plusieurs facteurs, notamment par les métaux de transitions, les rayons UV ou au cours de réactions enzymatiques (**Hippeli et al., 1999**).

Ces produits sont appelés espèces réactives de l'oxygène : ERO (**Noguchi et Niki, 1998**). Les ERO sont facilement interconvertibles, formant ainsi un réseau complexe qui exerce une action néfaste sur les lipides, les protéines, les glucides et l'ADN (**Gulçin et al., 2005**). Parmi ces molécules on cite dans le tableau III :

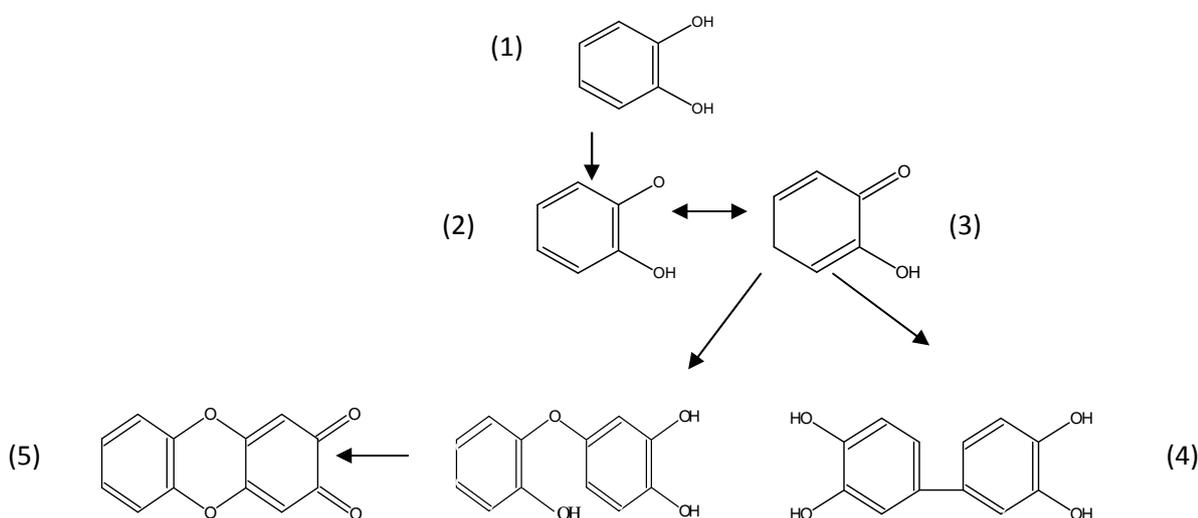
**Tableau III** : Les principales espèces réactives de l'oxygène (**Antwerpen, 2006**).

Espèces réactives oxygénées (ROS)			
Radicalaires		Non radicalaires	
OH <sup>·</sup>	Radical hydroxyle	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
RO <sup>·</sup>	Radical alkoxyl	ROOH	Peroxyde organique
ROO <sup>·</sup>	Radical peroxy	HOCl	Acide hypichloreux
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Anion superoxyde	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxygène singulet
NO <sup>·</sup>	Radical oxynitrique	ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrite

## I.6. Mécanismes d'action des composés phénoliques

### I.6.1. Transfert d'hydrogène

La figure 07 illustre la réaction de réduction des agents oxydants par les composés phénoliques. En première étape, le phénol (1) cède un atome d'hydrogène et se transforme en radical libre (2). Étant donné que le radical formé est instable, il se transforme rapidement après isomérisation en un dimère (3). La combinaison de 2 dimères soit par une liaison C-C ou par liaison C-O donne les produits tétrahydroxybiphényles (4), quinone (5) respectivement (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

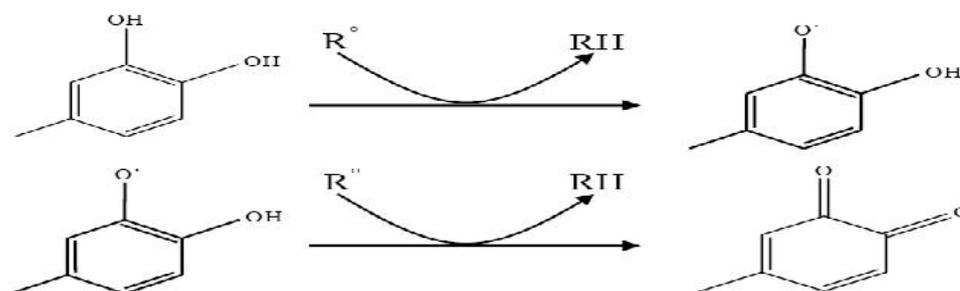


**Figure 07** : Réaction des composés phénoliques avec les agents oxydants (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

### I.6.2. Effet scavenger

L'effet scavenger des composés phénoliques consiste à piéger et à neutraliser les formes toxiques de l'oxygène en les réduisant par transfert direct d'un électron sur leur dernière couche électronique (**Ghedira, 2005**).

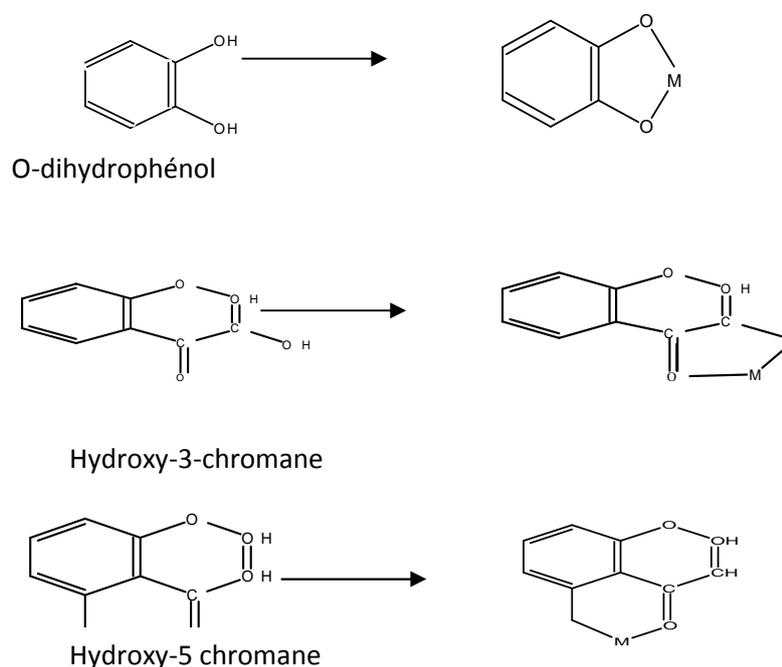
La capacité scavenger des radicaux libres est attribuée en premier lieu à la réactivité élevée des groupements substitués OH des flavonoïdes selon la figure suivante :



**Figure 08 :** Mécanisme de l'activité scavenger des flavonoïdes via la fonction catéchol (Pietta, 2000).

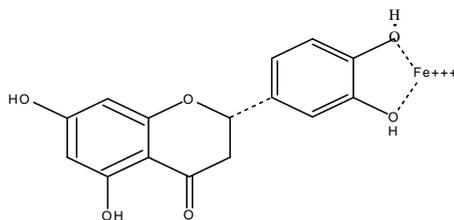
### I.6.3. Chélation des métaux

De nombreux composés phénoliques contiennent certains groupes structuraux susceptibles de former des complexes avec les ions métalliques comme le  $\text{Fe}^{2+}$  (figure 09) (Ribéreau-Gayon, 1968).



**Figure 09 :** Chélation des ions métalliques par des acides phénoliques (Ribéreau-Gayon, 1968).

Les flavonoïdes inhibent la formation des radicaux libres par la chélation des métaux de transition,  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$  et  $Cu^{+}$  (figure 10 ) qui amplifie la formation des ROS (**Prior et al., 2003**).



**Figure 10** : Exemple de chélation de fer par les flavonoïdes (**Marfak, 2003**).

## I.7. Activités biologiques des polyphénols

Les différentes activités biologiques des polyphénols sont regroupées dans le tableau IV.

**Tableau IV** : Les différentes activités biologiques des polyphénols

Activité	Exemple	Référence
anti-inflammatoire	Lutéoline	(Skerget <i>et al.</i> , 2005 ; Boudjou <i>et al.</i> , 2013)
anti-cancérogène	Catéchine	(Han <i>et al.</i> , 2007) (Oueslati <i>et al.</i> , 2012)
anti-microbienne	Naringénine	(Bouzid <i>et al.</i> , 2011)
anti-allergique	Quercétine	(Ghedira, 2005)
hypoglycémiant	Tanin gallique	(Kwon <i>et al.</i> , 2008)
anti-ulcérogène	Hespéridine	(Marfak, 2003)
Anti-bactériennes	Acide cafeique	(Carson <i>et al.</i> , 2002)

## II.1. Définition

Les saponines ou saponosides sont une classe spécifique de métabolites secondaires, produits naturels retrouvés abondamment dans le règne végétal (**Sparg et al., 2004**). Ce sont des substances tensio-actives, glycosides. Ils sont principalement produits par les plantes supérieures, mais aussi par des animaux marins inférieurs et quelques bactéries (**Francis et al., 2002; Das et al., 2012**) qui sont souvent utilisés pour consommation humaine et animale (**Kren and Martínková 2001**).

Leurs nom provient du latin « soap » signifiant "savon" en raison de leurs propriétés à former des solutions moussantes stables dans des solutions aqueuses. (**Gauthier, 2008**). Les saponines isolées de différentes sources possèdent un goût amer (**Abid et al., 2012**) elles ont été utilisées en tant que détergents, pesticides et molluscicides en plus de leurs applications industrielles en tant qu'agents moussants et tensioactifs.

## II.2. Distribution de saponines

Les saponines sont distribuées (**Dini et al., 2001**) dans une large variété de produits alimentaires et dans plusieurs familles de plantes différentes qui incluant l'asperge, luzerne, lentilles, haricots, mûres sauvages, pois, pommes de terre, fenugrec, ginseng, betterave sucrière et le thé .

Selon **Oakenfull (1981) et Vincken et al (2007)** les sources les plus importantes de saponines dans l'alimentation de l'homme sont les légumineuses: soja, pois chiches, haricots mungo, les arachides, les fèves, les haricots et les lentilles, même aux niveau des différentes parties des plantes, qui comprennent les racines, les tiges, écorce, feuilles, graines et les fruits.

Outre leur origine végétale, les saponines peuvent être obtenues chez certains animaux marins, exemple étoiles de mer qui appartenant à Asteroidea, famille de saponines triterpéniques.

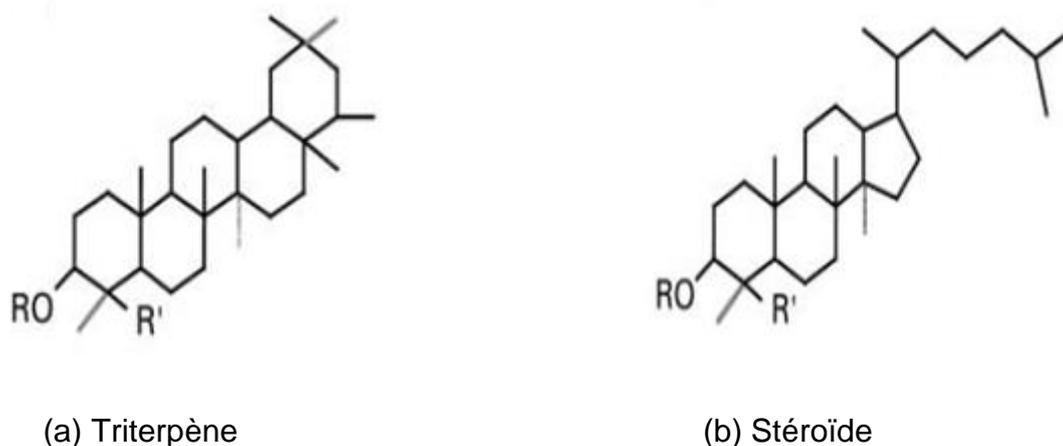
## II.3. Classification et Structure des saponines

La biosynthèse des saponines se produit à partir de 3 unités isoprènes, (molécules contenant 5 atomes de carbone) reliés les une aux autres de façon tête-à-queue (Belloum., 2007), entraînant la formation d'une molécule de farnésyl pyrophosphate (FPP) à (15 atome de carbonnes). Deux molécule de FPP sont ensuite liée de manière queue-à-queue pour obtenir un composé de 30 atomes de carbone, appelés squalène (Yu *et al.*, 2001). Ce dernier est oxydé en oxydosqualène.

### II.3.1. Structure de la partie aglycone (sapogénine)

Les saponines sont des molécules composées de deux entités : une génine (aussi appelée aglycone) et une fraction glycoside. La partie aglycone (sapogénine) est constituée d'un noyau stéroïdique (b) ou triterpénique (a) (figure 11) (Oakenfull., 1981; Krief., 2003 ; Thakur *et al.*, 2011)

Certains auteurs distinguent un troisième groupe appelé amines stéroïdiens, (Glycoalcaloïdes stéroïdiennes) (Sparg *et al.*, 2004).



**Figure 11:** Structure de base des saponines (Fransic *et al.*, 2002)

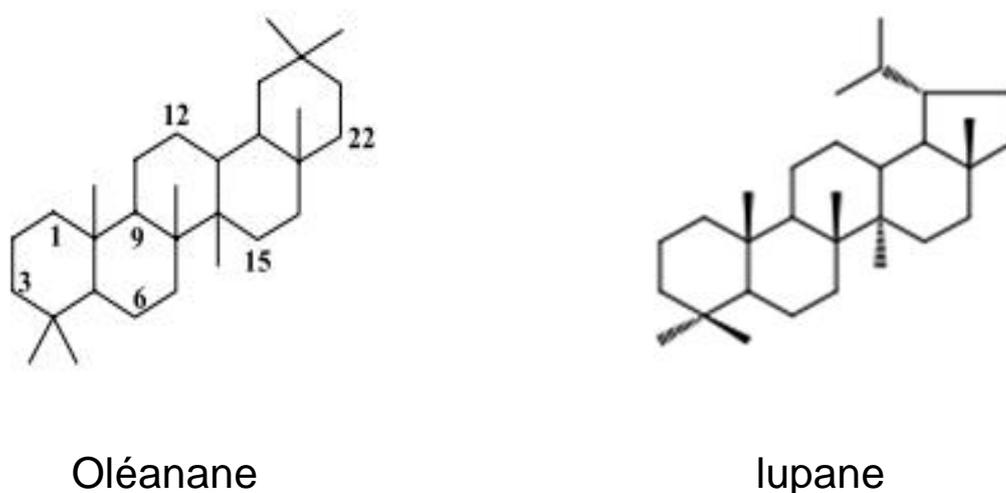
#### II.3.1.1. Saponines triterpéniques

Les saponines triterpenoides consistent en un aglycone triterpenoïde, formé d'une squelette C30, de structure pentacyclique (Yücektü et Bildacı., 2008). La majorité des saponines triterpéniques se trouve principalement dans les plantes

dicotylédones mais aussi dans certaines monocotylédones (**Mert., 2006**), qu'elles soient sauvages ou cultivées.

Les Saponines triterpénoïdes ont été détectées dans beaucoup de légumineuses telles que le soja, les haricots, les pois, luzerne, et les lentilles (*Lens culinaris*) et le thé, les épinards, la betterave à sucre, le quinoa, de réglisse, tournesol, marronnier d'Inde, et le ginseng.

Les squelettes le plus connu de sapogénine triterpénique est celui de l'oléanane et lupane (figure 12) (**Lautrette., 2004**)



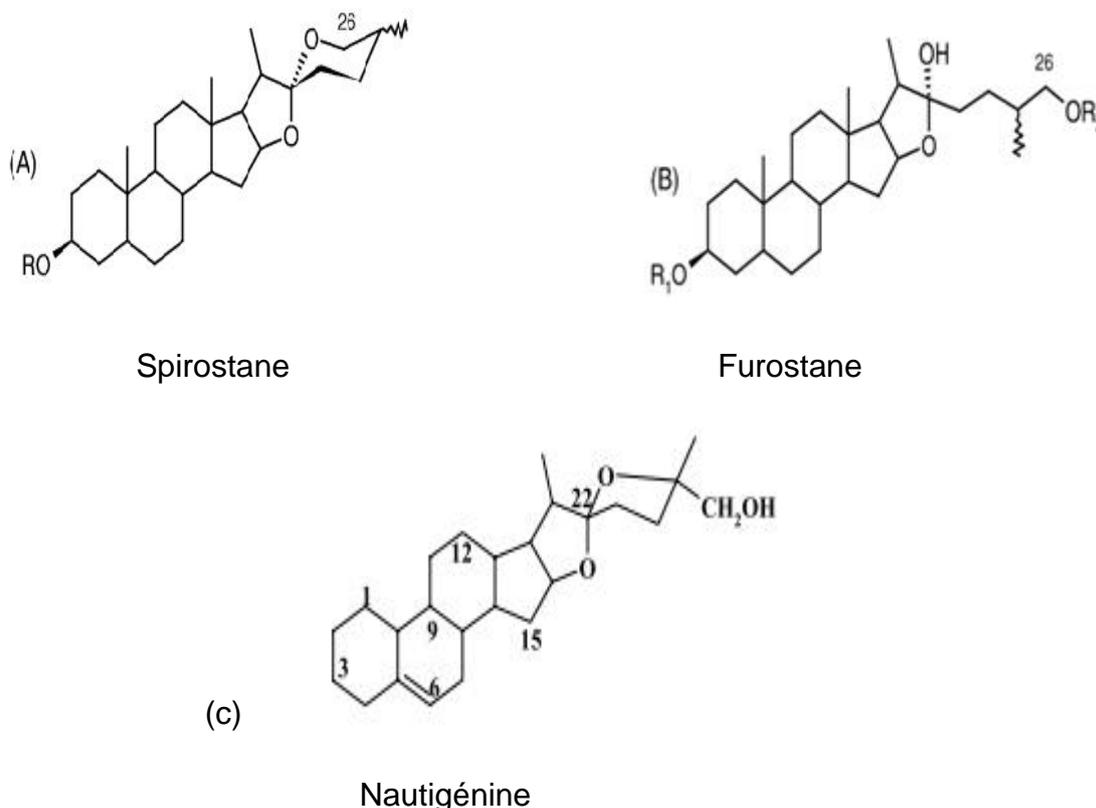
**Figure 12:** Les principaux squelettes triterpéniques. (**Belloum., 2007**)

### II.3.1.2. Saponines stéroïdiques

Les Saponines stéroïdiens sont constituées d'un stéroïde aglycone, d'une squelette C27, comprenant généralement une structure de six torique « spirostane » (Fig. 13 A). Dans certains cas, le groupe hydroxyle dans la position 26 est engagé dans une liaison glycosidique, et si la structure aglycone reste pentacyclique. Ceci est considéré comme un furostane (Fig.13 B). La troisième famille des sapogénines stéroïdiques est la nautigénine (Fig. 13 C) (**Bouhadjera., 2005**).

Les saponines stéroïdiennes se trouvent principalement dans les monocotylédones, telles que la Lilliaceae, Droscoraceae et Agavaceae et dans l'avoine, les poivrons, aubergine, graine de tomate, alliums, les asperges, l'igname,

le fenugrec, le yucca et le ginseng. (Yücekutlu et Bildacı 2008) comme en les trouve dans certaines dicotylédones, tels que la digitale, fabaceae (Yu *et al.*, 2001; Sparg *et al.*, 2004 )



**Figure 13** : Les principaux squelettes stéroïdiques. (Sparg *et al.*, 2004 ; Lautrette, 2004 )

### II.3.2. Structure de la partie osidique

La fraction glycoside contiennent généralement du glucose, galactose, l'acide glucuronique, xylose, le rhamnose, (Thibeault *et al.*, 2007; Abid *et al.*, 2012). Les saponines appartenant à un même groupe peuvent avoir un squelette énorme variation dans le nombre et le type de résidus de monosaccharides attaché (Vincken *et al.*, 2007).

La plupart des saponines sont monodesmosides ou bidesmosides, ce qui signifie qu'ils contiennent soit 1 ou 2 chaînes de saccharide, respectivement, à des

positions différentes (**Oleszek et al., 1992**). Les chaînes Oligosaccharides sont généralement fixés au C3 et / ou C17. Il ya quelques cas dans lesquels les chaînes sacharideiques sont fixés à l'C4, C16, C20, C21 et, et ce sont des courtes chaînes de 1 ou 2 résidus (**Vincken et al., 2007**).

#### **II.4. Mode de liaison (osidique-sapogénine)**

La partie aglycon (sucre) de la molécule peut compter jusqu'à 11 oses liés à la génine par une liaison de type acétal au niveau de carbone C3 (monodesmoside), toute fois, deux parties glucidiques (bidesmoside) attachées a la positions C 3 et C 22, C 3 et C 28 ou C3 et C17 par une liaison ester ou éther. (**Krief., 2003; Lautrette., 2004; Vincken et al., 2007; Yücekutlu et Bildacı., 2008**)

#### **II.5. Activité biologiques des saponines**

La présence de deux polaire (sucre) et non-polaires (stéroïde ou triterpène) fournir des groupes saponines ayant de fortes propriétés tensio-actives qui sont responsables de bon nombre de ses effets indésirables et effets biologiques bénéfiques (**Yücekutlu et Bildacı., 2008**).

##### **II.5.1. L'activité hémolytique (sur la membrane cellulaire)**

Depuis longtemps, les saponines sont connues pour leur capacité d'induire la formation des pores dans les membranes cellulaires et ainsi entraîner l'hémolyse des globules rouges (érythrocytes). Cette propriété a amené la mise en place des tests hémolytiques qui permettant la détection des saponines dans les extraits des plantes (**Sparg et al., 2004**). Cette activité hémolytique est généralement expliquée par l'interaction des saponines avec les stérols de la membrane cellulaire des érythrocytes en particulier le cholestérol, avec lesquelles elles forment des complexes insolubles (**Das et al., 2012**).

Les monodesmosides ont une activité hémolytique supérieure aux bidesmosides, et cette activité diminue lorsque la chaîne osidique s'allonge (**Lautrette., 2004 ;**). La plupart des saponines ont des propriétés hémolytiques et sont toxiques à la plupart des animaux à sang froid (**Sparg et al., 2004**).

Néanmoins, les saponines sont rapportés à affecter la perméabilité des cellules de la muqueuse de l'intestin grêle et donc avoir un effet sur le transport des

nutriments actif. Les saponines ont également été montré pour inhiber les enzymes digestives diverses, notamment la trypsine et la chymotrypsine, et sont aussi connus pour inhiber la dégradation des protéines en formant le complexes saponine-protéine (Makkar *et al.*, 2007).

### II.5.2. Autre activité biologique

Les différentes activités biologiques des saponines sont regroupées dans le tableau V.

**Tableau V** : Les différentes activités biologiques des saponines

<b>Activité</b>	<b>Référence</b>
Antivirale, Antifongique	(Chaieb., 2010 ; Abid <i>et al.</i> , 2012)
Antitumoral et cytotoxique	(Lee <i>et al.</i> , 2005; Tapondjou <i>et al.</i> , 2006; Chwalek <i>et al.</i> , 2006)
Hypoglycémique, Edulcorant	(Yoshikawa <i>et al.</i> , 2001)
Anti-inflammatoire	(Das <i>et al.</i> , 2012)
Insecticide	(Chaieb., 2010)
Antimicrobien	(Sparg <i>et al.</i> , 2004)

## Objectif du travail

Notre travail porte la quantification des composés phénoliques de quelques légumineuses produites localement, la mesure de leur activité antioxydante et l'évaluation qualitative des saponines et leur activité hémolytique.

### I.1. Matériel végétal

Nous nous sommes intéressés à trois légumineuses largement consommées en Algérie ; les lentilles (figure a 14), la fêverole (figure b 14) et la fève (figure c14) ; une partie de ces légumineuses à subi un décorticage séparant ainsi les cotylédons des téguments.

a) *Lens culinaris*



(b) *vicia faba minor*

(c) *vicia faba major*

**Figure 14:** Photographies des échantillons utilisés.

### I.1.1. Classification de *Vicia faba* et de *Lens culinaris*

Nous rapportons ci-dessous la classification de *Vicia faba* et de *Lens culinaris* donnée par **Gallais et Bannerot (1992)**. Les trois légumineuses appartiennent à la même famille et se distinguent uniquement par le genre et l'espèce.

**Tableau VI** : Classification de *Vicia faba* et de *Lens culinaris*

Règne	Plantea	Plantea
Sous règne	Tracheobionta	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsidia	Magnoliopsidia
Sous classe	Rosidae	Rosidae
Ordre	Fabales	Fabales
Famille	Fabacae	Fabacae
Genre	<i>Vicia</i>	<i>Lens</i>
Nom binomial	<i>Vicia faba</i>	<i>Lens culinaris</i>

### I.1.2. Origine et provenance des échantillons

Les lentilles utilisées proviennent de l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de Sétif.

Les fèves utilisées proviennent du village Remila de la commune de Sidi aich de la wilaya de Bejaïa.

Les fêveroles ont été récoltées dans la région de Merdj Ouamane, wilaya de Béjaïa.

### I.1.3. Préparation des échantillons

Les graines ont été triées, et les graines saines ont été nettoyées et séchées à l'air libre. Elles ont été ensuite concassées à l'aide d'un moulin traditionnel en pierre, puis broyées (broyeur de type « IKA A 11 basic »), la poudre obtenue (0.5mm de diamètre des particules) est conservée au sec dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière.

Une partie des graines de *Vicia faba* (major et minor) et *lens culinaris* a subi un décorticage séparant les cotylédons des téguments (tableau VII).

**Tableau VII** : Rendement du décorticage de *Vicia faba*, *lens culinaris*

	Cotylédons (%)	Téguments (%)
<i>Vicia faba major</i>	85,9%	13,7%
<i>Vicia faba minor</i>	84,9%	14,7%
<i>lens culinaris</i>	89,8%	8,3%

## I.2. Le matériel sanguin

Les échantillons de sang proviennent du centre de transfusion sanguine (CTS) de Béjaia. Ils appartiennent aux groupes A, B, O et AB et sont de rhésus positif.

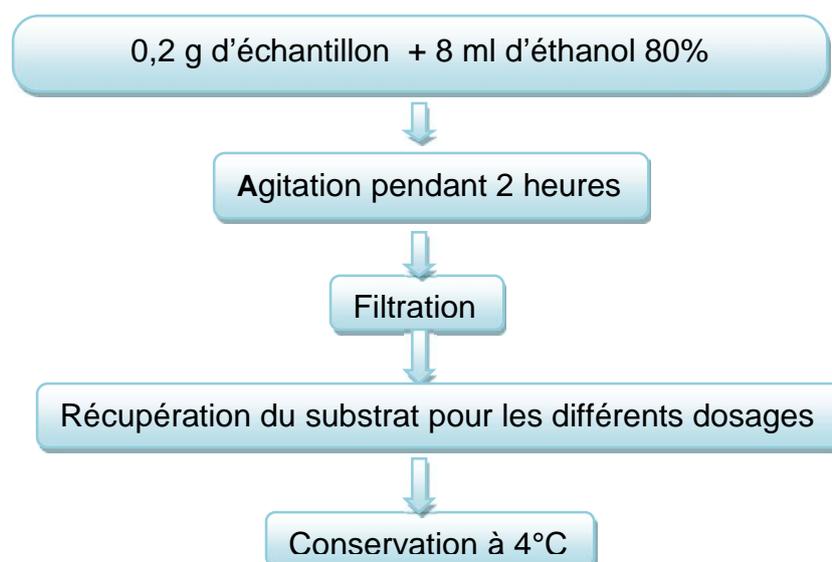
## I.3. Les composés phénoliques

### I.3.1. Extraction des composés phénoliques :

Les polyphénols contenus dans les différentes parties de graines de légumineuses, ont été extraites par deux méthode différentes

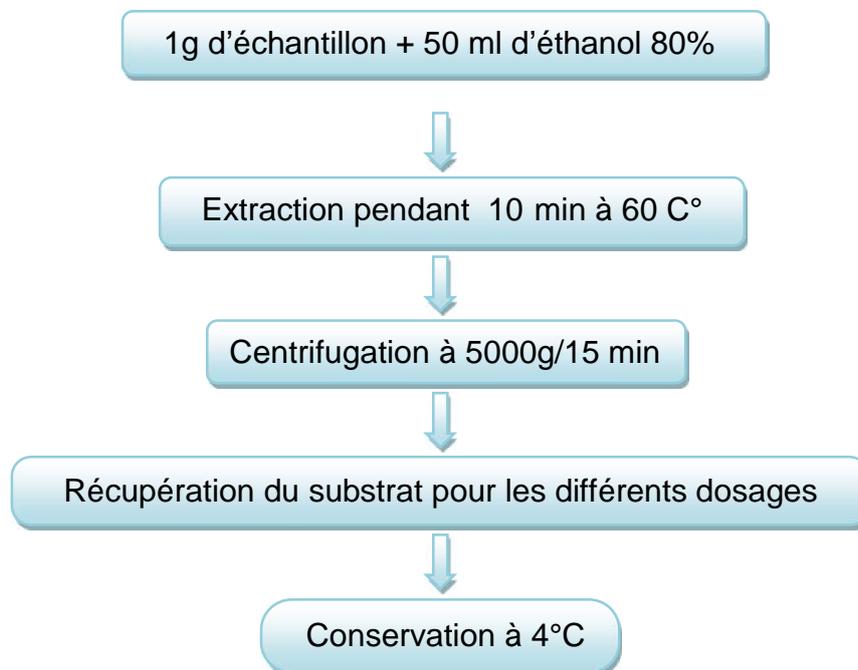
#### I.3.1.1. Extraction par macération

L'extraction des composés phénoliques est réalisée suivent la procédure décrite par **Oomah et al., (2010)** et schématisée dans la figure 15

**Figure 15** : Extraction des composés phénoliques par macération (**Oomah et al., 2010**)

### I.3.1.2. Extraction par micro-onde

L'extraction des composés selon la procédure décrite par **Jun *et al.*, (2009)** est schématisé dans la figure 16 :



**Figure 16 :** Extraction des composés phénoliques par macération (**Jun *et al.*, 2009**)

## I.3.2. Dosage des composés phénoliques

### I.3.2.1. Dosage des composés phénoliques totaux solubles

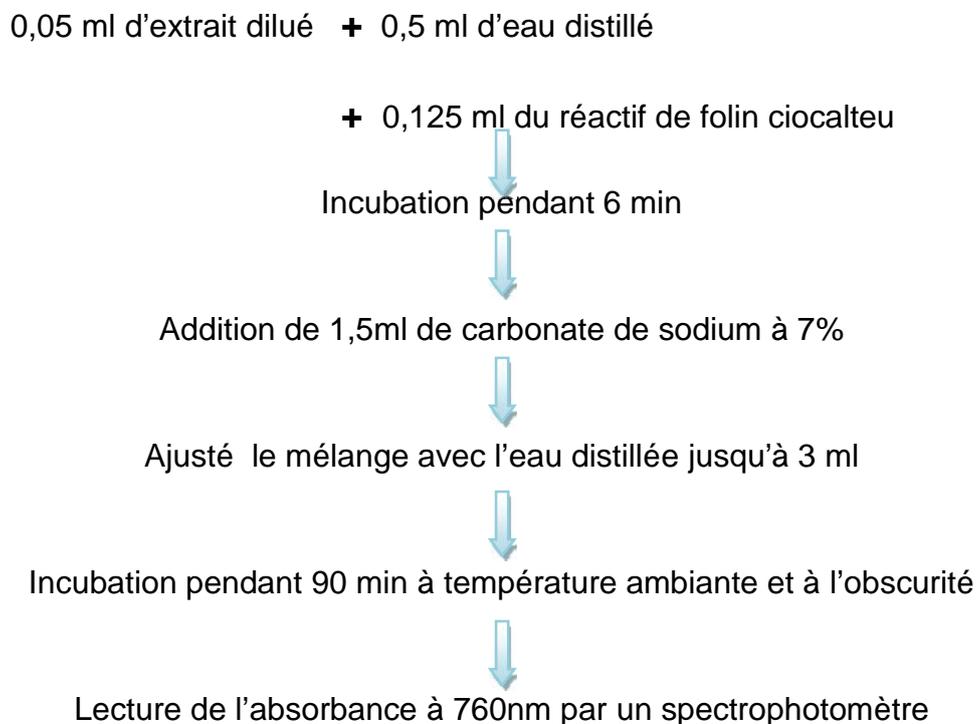
La quantification colorimétrique des composés phénoliques totaux a été déterminée selon la méthode décrite par **Dewanto *et al.*, (2002)**

- **Principe**

La méthode utilise le réactif de Folin ciocalteu, qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H 3 PW 12 O 40 ) et d'acide phosphomolybdique (H 3 PMo 12 O 40 ). Ces derniers, lors de l'oxydation des phénols, sont réduits en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

- **Mode opératoire**

Le protocole utilisé par **Dewanto et al., (2002)**, pour le dosage des composés phénoliques totaux solubles est schématisé dans la figure 17



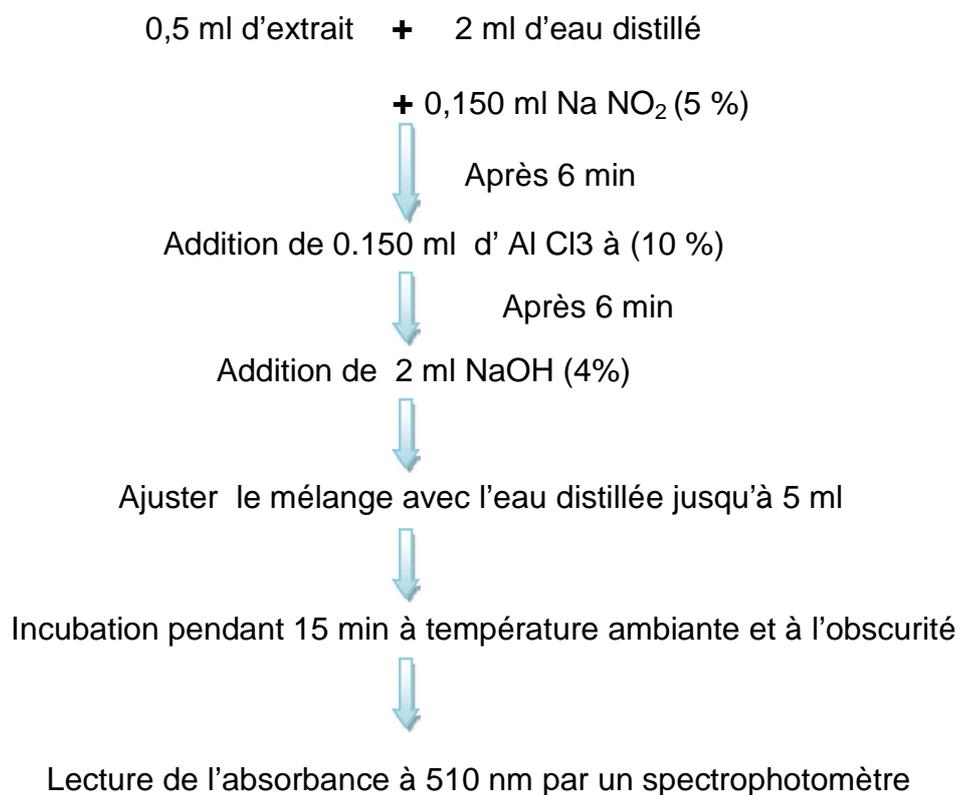
**Figure 17** : Protocole de dosage des composés phénoliques totaux solubles  
(**Dewanto et al., 2002**)

La concentration en composés phénoliques de l'extrait, exprimée en mg équivalent d'acide gallique (E.A.G)/100g d'échantillon, est déterminée en nous référant à une courbe d'étalonnage obtenue dans les mêmes conditions en utilisant de l'acide gallique comme standard (**Annexe n° 02**).

### **I.3.2.2. Dosage des flavonoïdes**

La quantification colorimétrique des composés flavonoïdes a été déterminée selon la méthode décrite par **Pereira et al., (2012)**

- **Mode opératoire**



**Figure 18** : Protocole de dosage des flavonoïdes (**Pereira et al., 2012**)

La concentration en composés phénoliques de l'extrait, exprimée en mg équivalent d'acide gallique d'échantillon, est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue dans les mêmes conditions en utilisant la quercétine comme standard (**Annexe n° 03**).

### **I.3.2.3. Dosage des tannins condensés**

Le protocole utilisé par **Dewanto et al., (2002)**, pour le dosage des tannins est schématisé dans la figure 19



**Figure 19** : Protocole de dosage des composés phénoliques

**(Dewanto *et al.*, 2002)**

Les résultats sont rapportés à une courbe d'étalonnage et exprimés en équivalent de la catéchine (**Annexe n° 04**).

### **I.3.3. Détermination de l'activité antioxydante et anti-radicalaire**

L'activité antioxydante de l'extrait a été déterminée selon deux méthodes. La première évalue le pouvoir antiradicalaire en mesurant le pourcentage de neutralisation d'un radical (NO). La deuxième est l'estimation du pouvoir réducteur qui mesure la capacité des extraits à réduire les ions métalliques (fer ferrique en fer ferreux) par les antioxydants présents dans notre échantillon.

#### **I.3.3.1. L'inhibition de NO (l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote)**

- **Principe**

cette méthode est basée sur le principe selon lequel, le nitroprussiate de sodium en solution aqueuse à pH physiologique génère spontanément l'oxyde nitrique, qui interagit avec l'oxygène pour produire des ions nitrites qui peut être estimée en utilisant le réactif de Griess (**Ebrahimzadeh *et al.*, 2010**). Les charognards de l'oxyde nitrique sont en concurrence avec de l'oxygène, ce qui conduit à réduction de la production d'ions nitrite.

- **Mode opératoire**

L'inhibition de NO par les extraits a été déterminée selon la méthode développée par **Sousa et al., (2008)**

Dans des tubes à essai, un volume de 1 ml du réactif sodium nitroprosside (10m M) préparée dans un tampon phosphate (pH7.4) est ajouté à 1 ml d'extrait est incubé pendant 60 minutes, à température ambiante sous une lumière. Après incubation, 1 ml de réactif de Griess (1% sulphanilamide et 0,1% naphthylethyldiamine dans l'acide phosphorique à 2%) a été ajouté à chaque tubes. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 min et l'absorbance a été mesurée à 562 nm. Deux essais ont été réalisés, chacun en trois exemplaires. Trois standards ont été utilisés, la BHA, la BHT, -tocophérol.

L'inhibition de l'oxydation de NO par les antioxydants des légumineuses est exprimée en pourcentage selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition de NO} = [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{Extrait}}) / Abs_{\text{control}}] \times 100$$

D'où :

**Abs Blanc** : Absorbance de control à 562 nm.

**Abs Extrait** : Absorbance des extraits à 562 nm.

L'évaluation du pourcentage d'inhibition de NO par rapport aux concentrations des standards (la BHA, la BHT, -tocophérol) est réalisée dans les mêmes conditions.

### **I.3.3.2. Réduction de la ferrozine**

Le pouvoir réducteur, par la réduction de la ferrozine, de l'extrait étudié est évalué selon la méthode décrite par **Bourgou et al. (2008)**.

Pour 0,1 ml d'extrait sont ajoutées respectivement 2,75 ml d'eau distillée, 0,1ml de la ferrozine (5mM) et 0.05 ml de FeCl<sub>2</sub> (2mM). Après une incubation, à l'abri de la lumière, pendant 10 minutes, l'absorbance est mesurée à 562 nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$PI \% = [(Abs_{Control} - Abs_{Extrait}) / Abs_{Control}] \times 100$$

D'où :

**Abs<sub>Control</sub>** : Absorbance de Control après 10 minutes à 562 nm.

**Abs<sub>Extrait</sub>** : Absorbance des extraits après 10 minutes à 562 nm.

L'évaluation du pourcentage de réduction de la ferrozine par rapport aux concentrations des standards (la BHA, la BHT, -tocophérol) est réalisée dans les mêmes conditions.

## I.4. Les saponines

### I.4.1. Mise en évidence des saponines

La détermination des saponines est réalisée selon la méthode décrite par **Ncube et al (2011)**.

Dix millilitres d'eau distillée ont été ajoutés à 0,1 g de poudre d'échantillons dans des tubes à essai. Les tubes à essai ont été agités pendant 2 min. 15 min après quelque goutte de huile d'olive sont ajoutées.

L'apparition d'une mousse stable et persistante sur la surface du liquide pendant 15 min indiqué la présence de saponines (**Tadhani et Subhash, 2006**).

### I.4.2. Extraction des saponines

L'extraction des saponines est réalisée selon la méthode décrite par **Goel et al., (2012)**.

A 5 g de poudre de légumineuses délipidée 50 ml de méthanol pure (absolue 99,9 %) sont ajoutés et l'ensemble est mis sous agitation à la température ambiante pendant 24 heure et centrifugé à 3500 tour / min pendant 20 min.

Le surnageant est filtré (papier de watman) et l'extrait méthanolique est évaporé à sec ; l'extrait sec de l'échantillon a été redissout dans 10 ml d'eau distillée puis extrait de nouveau avec le n-butanol (trois fois).

Le n-butanol est évaporé (sans dépasser la température de 45°C). Les extraits sont reconstitués dans 10 ml d'eau distillée et lyophilisés. La poudre obtenue est utilisée pour les différents tests.

### I.4.3. Activité hémolytique

#### I.4.3.1. Evaluation de la concentration minimale hémolytique

L'évaluation de l'activité hémolytique sur microplaques de titration est conduite selon la méthode de **Francis *et al.*, ( 2002)** par visualisation à l'œil nu.

Une solution de sang humain de différents groupes dans un tampon phosphate salin (3%) est préparée. Le sang est centrifugé à 3000g pendant 5 min, et les érythrocytes sont lavés trois fois avec le tampon phosphate salin (pH 7,2). Les érythrocytes sont ensuite dilués à 3% avec le même tampon.

20 mg de poudre de saponines lyophilisées sont dissouts dans 1 ml de tampon phosphate salin et une série de double dilutions est réalisée.

0,04 ml de chaque dilution sont déposés dans les puits d'une microplaque à titration et additionnés de 0,04 ml de la suspension d'érythrocytes. Les plaques sont incubées à température ambiante pendant deux heures.

- **Lecture des résultats**

Dans des puits ayant subi une hémolyse, le sang est dispersé dans le tampon phosphate contenant l'échantillon formant ainsi un mélange homogène uniformément réparti dans les puits.

Dans les puits n'ayant subi aucune hémolyse, le sang est condensé au centre du puits et entouré d'une zone claire.

A la fin de l'incubation, la concentration minimale ayant provoqué une hémolyse a été déterminée dans le puits précédent à celui où l'hémolyse n'a pas eu lieu.

### I.4.3.2. Evaluation de la concentration hémolytique

Nous avons utilisé la méthode rapportée par **Sun et al., (2011)**.

Pour la préparation des hématies :

Une solution de sang humain de différents groupes est préparée avec l'eau physiologique. Le sang est centrifugé à 3000g pendant 5 min, et les érythrocytes sont lavés trois fois avec l'eau physiologique. Les érythrocytes sont ensuite dilués à 0,5% avec l'eau physiologique.

1 ml des hématies préparées est ajouté à 1 ml de l'extrait des saponines à différentes concentrations (1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/ml). Le mélange a été incubé pendant 30 min à 37 ° C et centrifugé à 70 g pendant 10 min. L'hémoglobine libre dans le surnageant ont été mesurées par spectrophotométrie à 412 nm. L'eau physiologique et l'eau distillée ont été utilisées comme contrôles hémolytique minimale et maximale. La concentration induisant 50% d'hémolyse (HC50) a été calculée.

Le % d'hémolyse est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = [(Abs_{\text{Extrait}} - Abs_{\text{EP}}) / Abs_{\text{ED}}] \times 100$$

$Abs_{\text{Extrait}}$  : Absorbance d'extrait à 412 nm.

$Abs_{\text{EP}}$  : Absorbance de l'eau physiologique à 412 nm.

$Abs_{\text{ED}}$  : Absorbance de l'eau distillée 412 nm.

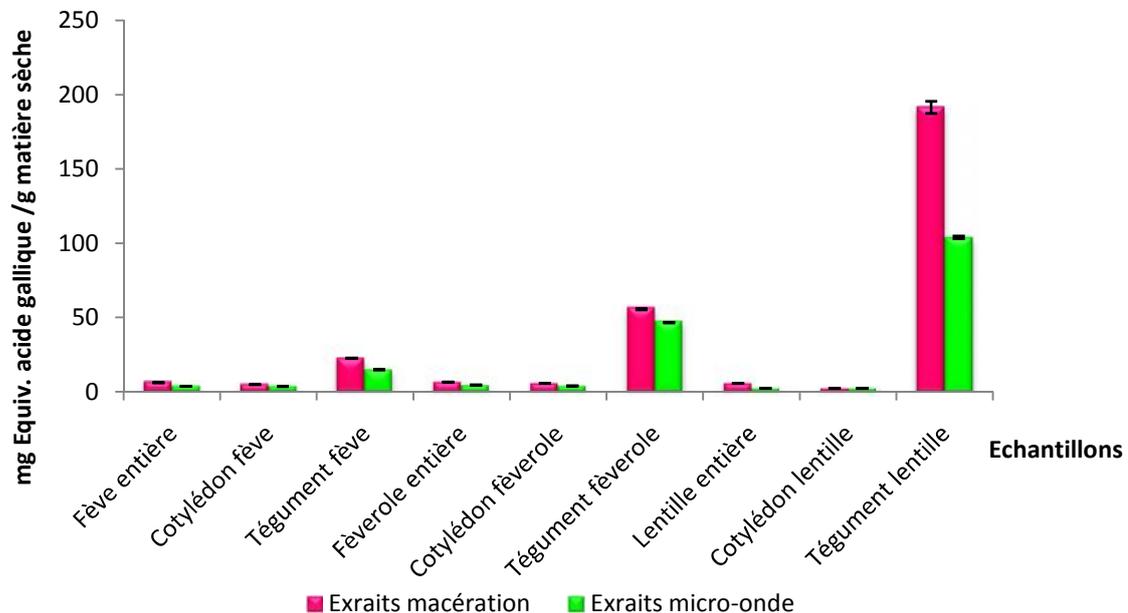
## I.5. Analyse statistique

Toutes les déterminations ont été réalisées en triple. Les données quantitatives ont fait l'objet d'une analyse statistique (ANOVA).

## II.1. Résultats

### II.1.1. Teneur en composés phénoliques

#### II.1.1.1. Les phénols totaux solubles



**Figure 20 :** Teneurs en phénols totaux Solubles (mg Equiv d'acide gallique/g matière sèche)

La figure (20) montre une très grande variabilité de teneur en composés phénoliques totaux solubles des différents échantillons testés. Cette teneur varie avec la graine considérée, la partie utilisée et le mode d'extraction.

L'analyse de la variance révèle (annexe 05) un effet hautement significatif ( $p < 0,05$ ) de chacun de ces facteurs qui ne manifestent pas d'interactions significatives entre eux ( $p > 0,05$ ).

La comparaison multiple des teneurs en composés phénoliques solubles des différents échantillons montre que ce sont les téguments des différentes graines qui sont plus riches ( $p < 0,05$ ); l'extraction par macération augmente significativement ( $p < 0,05$ ) les rendements d'extraction en phénols totaux solubles.

Pour un même mode d'extraction, seul les téguments manifestent de grande différence de teneur entre les graines ; ces teneurs varient de 22,7 à 191,5 pour une

extraction par macération contre 15,01 à 104,01 respectivement pour les extraits fève, lentille pour l'extraction par micro-onde.

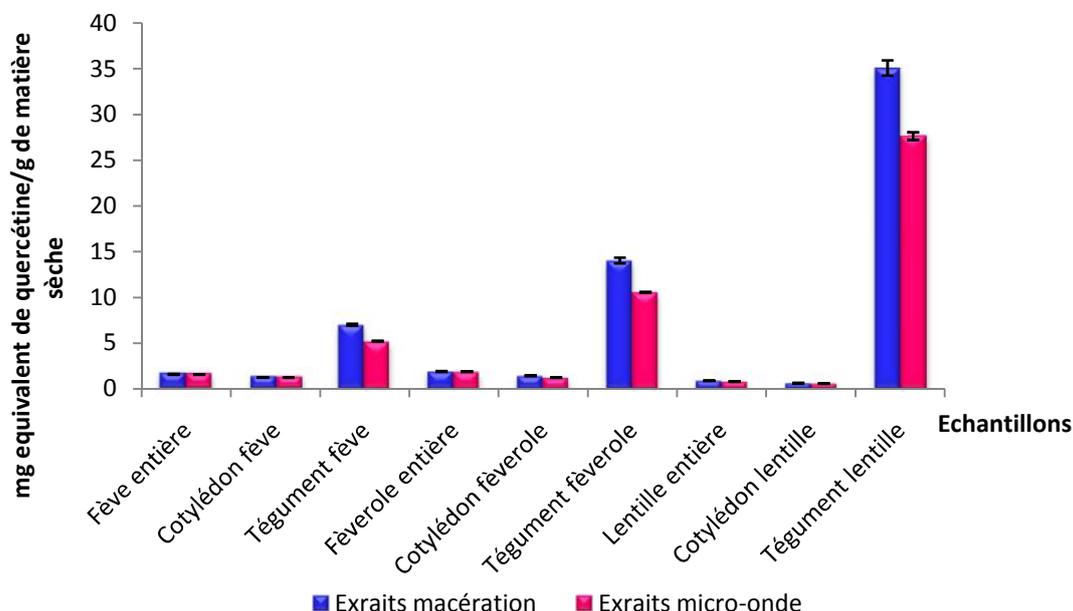
Les résultats obtenus montrent que la teneur en composés phénoliques présents dans les graines de fève (6,27) est très proche de celle des graines de fèverole (6,75) et lentille (5,96).

Les composés phénoliques de la fève, fèverole et lentille sont inégalement répartis au sein de la graine.

Les teneurs en phénols totaux solubles sont très élevés au niveau des téguments entre la graine entière et la graine décortiquée. Par contre, ces derniers présentent une légère différence entre eux.

Les composés phénoliques des trois légumineuses et leurs différentes parties extraits par macération montrent un taux élevé par rapport aux teneurs des composés phénoliques extraits par micro-onde.

### II.1.1.2. Les flavonoïdes



**Figure 21** : Teneurs en flavonoïdes (mg équivalent de quercétine /g de matière sèche)

Les résultats illustrés sur la (figure 21) montrent une grande variabilité de teneur en flavonoïdes. Cette teneur varie avec la graine considérée, la partie utilisée et le mode d'extraction.

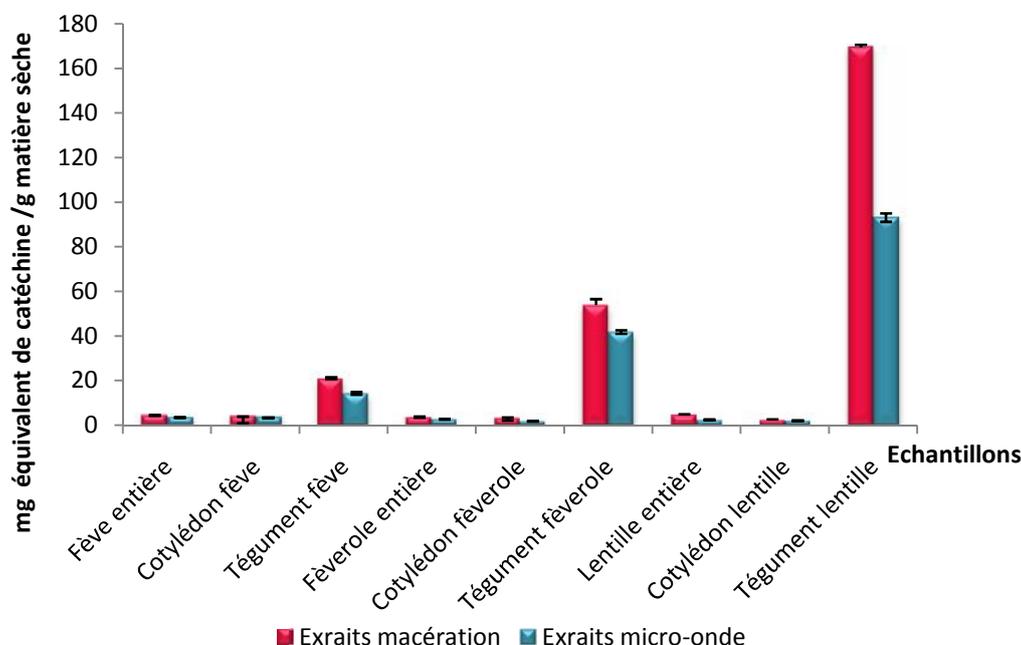
L'analyse de la variance révèle (Annexe 5) un effet hautement significatif de chacun de ces facteurs ( $p < 0,05$ ).

Les fèves se distinguent par une teneur en flavonoïdes deux fois plus élevés à celle correspondant aux fèves.

La comparaison multiple des teneurs en flavonoïdes des différents échantillons montre que ce sont les téguments de différentes graines qui sont plus riches ; l'extraction par macération augmente significativement les rendements d'extraction en flavonoïdes.

Pour un même mode d'extraction, seul les téguments manifestent une grande différence de teneur entre les graines ; ces teneurs varient de 7,01 à 35,08 pour une extraction par macération contre 5,20 à 27,63 respectivement pour les extraits fève et lentille pour l'extraction par micro-onde.

### II.1.1.3. Les tannins condensés



**Figure 22:** Teneurs en tannins condensés (mg Equiv de cathéchine/g de matière sèche)

La figure (22) montre une très grande variabilité de teneur en tannins condensés. Cette teneur varie avec la graine considérée, la partie utilisée et le mode d'extraction.

L'analyse de la variance révèle un effet significative de chacun de ces facteurs ( $p < 0,05$ ).

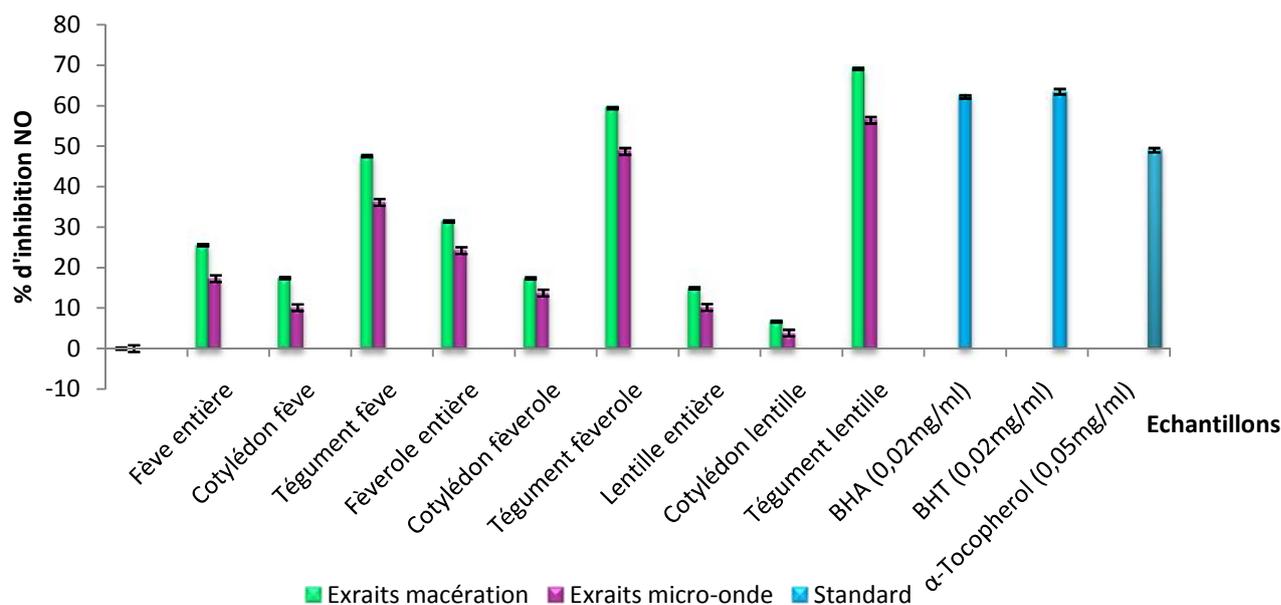
Les trois graines de légumineuses présentent des teneurs similaires en tannins avec des taux 4,72 ; 3,65; 4,36 respectivement pour la lentille, la fève et la fève.

La comparaison multiple des teneurs en tannins des différents échantillons montre que ce sont les téguments de différentes graines qui sont les plus riches; l'extraction par macération, augmente significativement les rendements d'extraction en tannins.

Pour un même mode d'extraction seul les téguments manifestent de grandes différences de teneur entre les graines ; ces teneurs varient de 20,96 à 169,37 pour une extraction par macération contre 14,31 à 93,10 respectivement pour les extraits de fève et de lentille pour l'extraction par micro-onde.

## II.1.2. Activité antioxydante

### II.1.2.1. Activité anti-radicalaire (% inhibition du NO)



**Figure 23 :** Activité anti-radicalaire (% inhibition du NO)

La figure 23 montre que les extraits de légumineuses, présentent un bon effet scavenger contre le radical monoxyde d'azote.

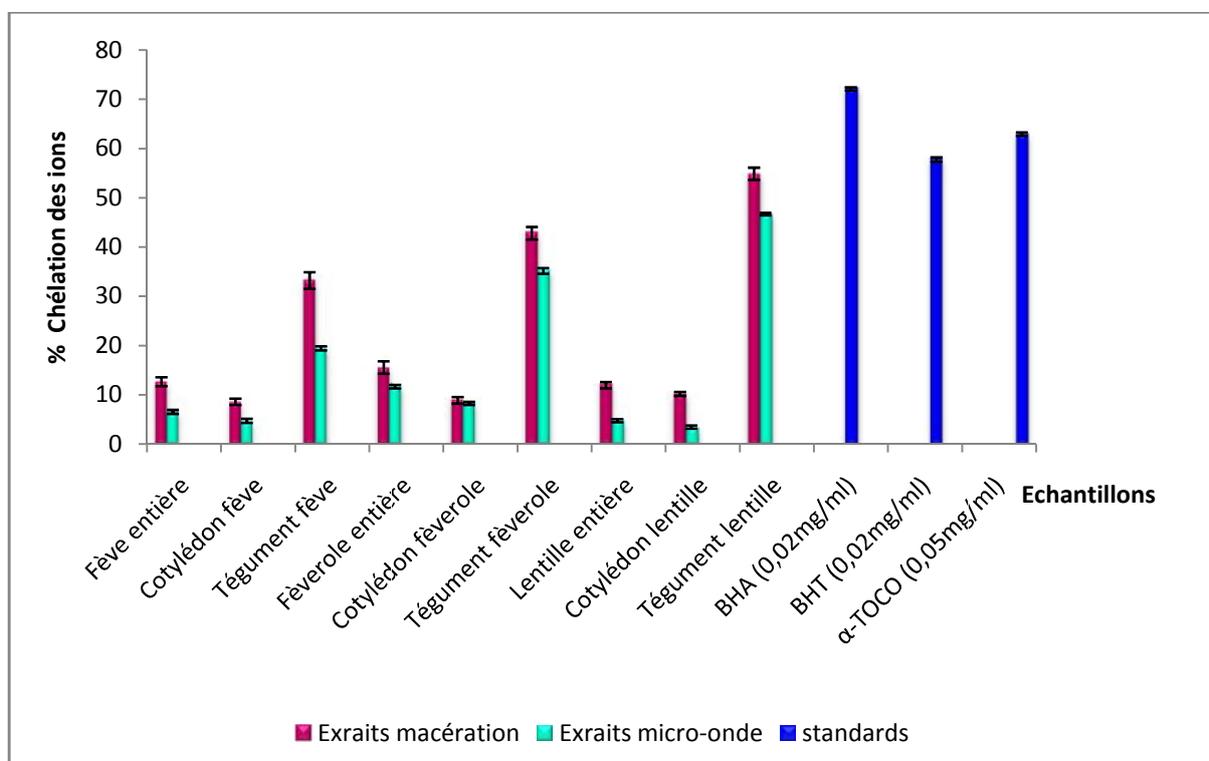
Les comparaisons multiples d'effet scavenger des différents échantillons montrent que ce sont les téguments des différentes graines qui manifestent un bon effet scavenger.

Pour les téguments de lentilles (69,08%), l'effet observé s'avère plus élevé que le BHA (62,15%), le BHT (63,45%) et l'  $\alpha$ -tocophérol (48,99%).

Pour un même mode d'extraction seul les téguments manifestent une grande différence de l'activité antioxydante des graines ; cette activité varie de 47,54 à 69,08 pour une extraction par macération contre 36,13 à 56,41 respectivement pour les extraits de fève, de lentille pour l'extraction par micro-onde.

Les résultats d'inhibition de NO par les graines, de légumineuses sont relatifs à la teneur des composés phénoliques.

### II.2.1.2. Réduction de la ferrozine



**Figure 24:** Activité anti-oxydante (% chélation des ions)

D'après les résultats obtenus dans la présente étude, la capacité de réduction des échantillons étudiés est présentée dans la figure 24.

Les graines de légumineuses présentent un pouvoir de réduction de la ferrozine le moins élevé par rapport à leurs téguments.

L'activité de réduction de la ferrozine par les téguments de lentille est très proche à celle de l'activité de la BHT à 0,02mg/ml.

Les extraits par macération présentent l'activité la plus élevée par rapport aux extraits par micro-onde.

Ces résultats sont relatifs à la teneur des composés phénoliques.

### II.1.3. Les saponines

#### II.1.3.1. Mise en évidence

Les neuf échantillons de notre étude sont soumis à un test de mousse qui permet de déterminer qualitativement les saponines qui confèrent la saveur, la couleur et d'autres caractéristiques à nos échantillons.

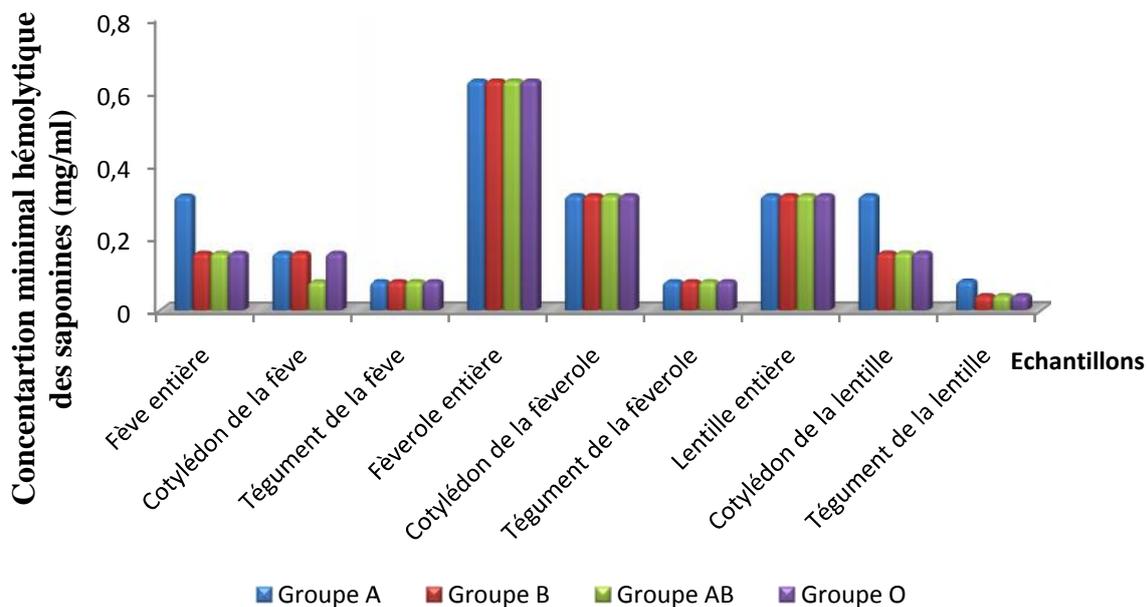
Nos données indiquent la présence de saponines dans tous nos échantillons.

**Tableau VIII** : La mise en évidence des saponines

Partie étudiée	fève entière	cotylédon fève	tégument fève	fèverole entière	cotylédon fèverole	tégument fèverole	lentille entière	cotylédon lentille	tégument lentille
Saponine	+	+	+	+	+	+	+	+	+

⊕ : Présence

### II.1.3.2. Evaluation de la concentration minimale hémolytique



**Figure 25:** Concentration minimale hémolytique (mg/ml)

Les tests réalisés sur microplaques montrent que les saponines extraites des fèves, fèveroles et lentilles (entières ou décortiquées) manifestent toutes un pouvoir hémolytique sur les différents groupes sanguins (figure 25)

Les résultats rapportés dans la figure 25 montrent une variabilité de la concentration minimale hémolytique des extraits de saponines.

Sur les différents groupes sanguins, les téguments affichent le plus fort pouvoir hémolytique suivis des téguments de la fèverole et de la fève.

La fèverole et leur partie affichent la même activité hémolytique vis à vis les différents groupes sanguin, les cotylédons et les téguments de la lentille présente une activité hémolytique sur les groupes B, AB, O plus élevée par rapport aux groupe A.

La fève (entière ou décortiquée) présente une activité hémolytique moins élevée sur le groupe A par rapport aux groupes B, AB, O. Et une activité hémolytique des cotylédons la plus élevée sur le groupe AB par rapport aux groupes A, B, O.

Quelque soit le groupe sanguin considéré, les plus faibles activités hémolytiques sont en faveur des extraits des graines entières ; La concentration minimal hémolytique de la fève entière (0,625 mg /ml) est nettement plus élevée que celles de la fève est lentille (0,3125). Ce sont les saponines des téguments qui ne distinguent pas une concentration minimale hémolytique la plus faible (0,039 à 0,078 mg/ml).

Une variabilité entre groupes sanguins est également relevée dans nos essais. Alors que la fève est ses différents partis affichent la même activité hémolytique vis à vis ces différents groupes sanguin, les cotylédons et les téguments de la lentille présentent une activité sur les groupes B, AB et O plus élevée par rapport au groupe A l'extrait de la fève (entière ou décortiquée) est moins actif sur le groupe A comparé aux autre groupes sanguin. Les cotylédons de cette graine fournissent une saponine aussi active que les téguments sur le groupe AB.

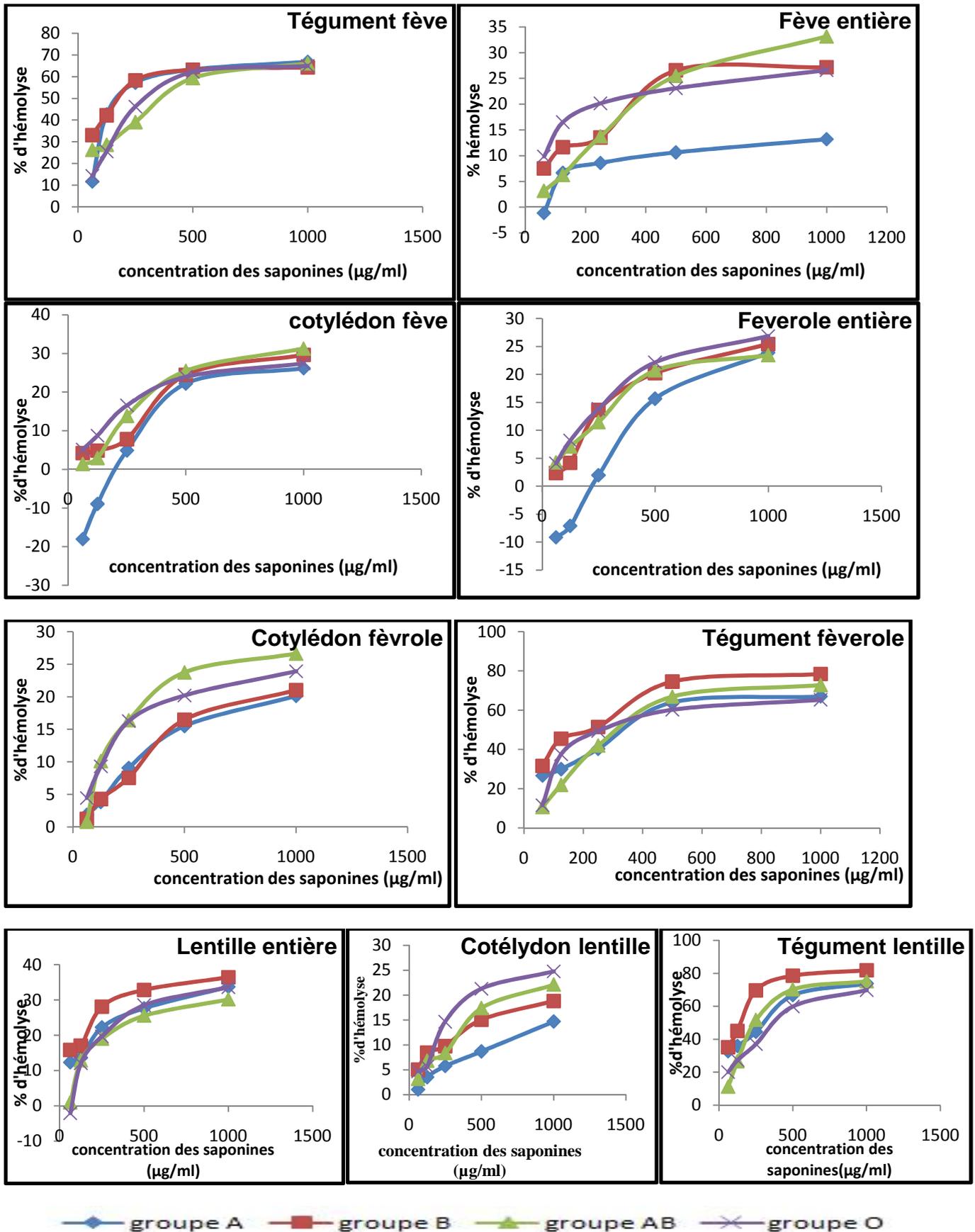


Figure 26: Activité hémolytique de différents extraits

### II.1.3.3. Activité hémolytique

Les résultats des extraits de saponines de nos trois légumineuses (figure 26) s'accompagnent d'une variation de l'activité hémolytique selon la concentration des extraits de saponine vis-à-vis le groupe sanguin utilisé.

L'activité hémolytique des extraits de saponines augmente avec l'élévation de la concentration de l'extrait de saponines.

Seuls les téguments de chacune des trois graines induisent une activité hémolytique supérieure à 50%.

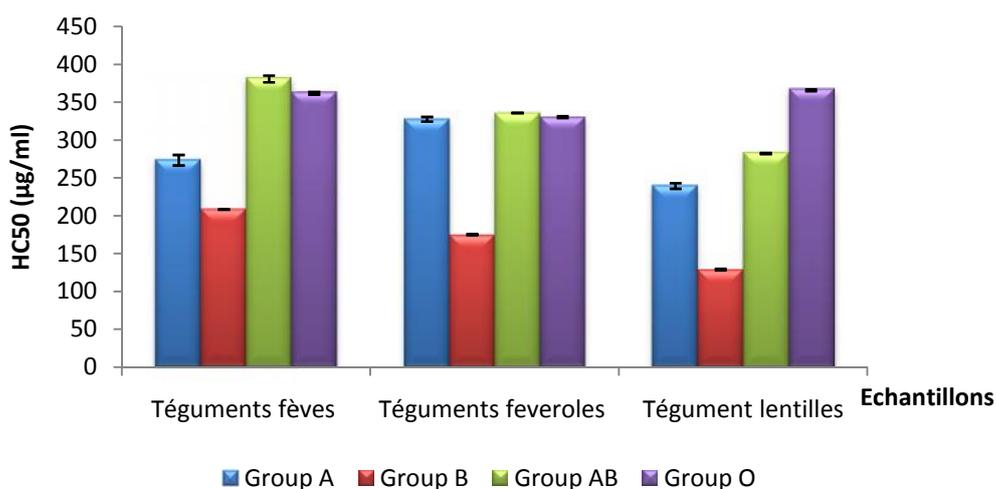
Les graines de la fève et fèverole montrent une même activité hémolytique (26,60; 26,84 respectivement) moins élevée que celle de la lentille (33,57%).

Les téguments des trois légumineuses montrent une activité hémolytique de 2,07 à 2,81 fois plus élevée par rapport aux graines entières et leur cotylédon.

### II.1.3.4. Concentration hémolytique

Nos résultats précédents ont montré que seuls les téguments de chacune des trois graines présentent une activité hémolytique supérieure à 50 %.

Les résultats de calcul de calcul de l' HC50 sont résumés dans la figure 27. Nous notons une densité d'HC50 en fonction du groupe sanguin et de la graine.



**Figure 27** : Concentration hémolytiques des extraits saponines HC50 (µg/ml)

L'HC50 varie de 129,22 à 208,42 mg /ml pour le groupe B. Il varie entre 239,47 et 327,5 mg/ml pour le groupe A et entre 282,3 et 380,7 mg/ml pour le groupe AB.

Les téguments de la fève et lentille présentent une activité hémolytique plus élevée sur les groupes sanguin AB et O par rapport aux groupes sanguin A et B; les téguments fèverole présentent une activité hémolytique plus élevée sur les groupes A, AB et O par rapport aux groupe B.

## II.2. Discussion générale

Le présent travail porte deux aspects des métabolites secondaires des trois graines de légumineuses testés : D'une part nous sommes intéressés à l'évaluation de leurs teneurs en composés phénoliques et de l'activité antioxydante des extraits bruts. D'autre part une approche qualitative et quantitative de l'activité hémolytique des saponines est abordée.

Nous avons noté que les composés phénoliques sont diversement présents les trois graines de légumineuses et leur différentes parties.

L'analyse de la variance révèle un effet hautement significatif ( $p < 0,05$ ) de chacun des facteurs mis en jeu (graine, partie et mode d'extraction).

Les teneurs en phénols totaux solubles s'intègrent pour *Vicia faba* dans l'intervalle des données rapportées par la littérature (**Alonso et al., (2000)**; **Nacer-Abbas et al., (2008)**; **Nacer- Abbas et al., (2009)**); pour les lentilles, elles diffèrent de celles enregistrées par **Khandelwal et al., (2010)** et **Boudjou et al., (2013)**.

Nos substrats expérimentaux s'avèrent moins riches en flavonoïdes comparés aux données de **Chaib et al., (2011)** et **Oomah et al., (2011)**. D'autre part elles sont supérieures à celles rapportées par **Boudjou et al., (2013)**.

Les teneurs en tannins condensés de *lens culinaris* sont similaires à celles observées par **khandelwal et al., (2010)**, mais inférieures à celles observées par **Ghavidel et Prakash (2007)** ; les valeurs observées pour *vicia faba L* sont inférieures à celles rapportées par **Ghavidel et Prakash (2007)** sur une autre légumineuse (*chickpea*).

Ces différences peuvent s'expliquer par divers facteurs liés au substrat tels que le cultivar (**Chaib et al., 2011**), la méthode de conservation des substrats et le

mode d'extraction de ces composés phénoliques. Le type de solvant, le temps d'extraction et le nombre d'étapes d'extraction représentent également des facteurs influençant les rendements d'extraction.

Les différents observés après décorticage des graines dépendent de la proportion des téguments dans la graine entière. Ces derniers sont connus pour leur teneurs élevées en tannins particulièrement et l'élimination des téguments laisse de cotylédons moins riches en ces composés **Nasar-Abbas et al., (2008)** et **Wang et al., (2008)** rapportent le même phénomène.

Dans nos conditions expérimentales, l'extraction aux micro-ondes s'accompagne d'une diminution des teneurs en composés phénoliques comparativement à la technique d'extraction par macération. Nous avons enregistré le phénomène inverse à celui observé par **Hong-yu et al., (2010)** ; **Rafiee et al., (2011)** ; **Dragovi-Uzelac et al., (2012)** sur les feuilles d'oliviers.

Des différences paramètres de traitement (temps, température et teneur en eau des échantillons) et de composition chimique seraient à l'origine des diminutions observées.

Le traitement aux micro-ondes consiste en un chauffage par radiation. Les micro-ondes sont transmises efficacement dans l'eau, c'est l'oscillation des molécules d'eau dans la nourriture qui entraîne un réchauffement (**Rossy et Rinot, 1994**) .

Selon **Gonzalo et al. (2003)** l'efficacité du traitement dépend du taux d'humidité des échantillons avec risque d'apparition de réaction de Mallard.

**Hafez et al., (1983)**, et **Yoshida et Kajimoto ,(1998)** ont démontré que l'efficacité du traitement aux micro-onde sur les facteurs antinutritionnels de graines de soja ; cette efficacité dépend de la teneur en eau des graines .

Les différents tests réalisés montrent une activité antioxydante des différents extraits utilisés. Nos données s'accordent avec ceux rapportés par **Chaib et al., (2011)**.

Nos résultats pour l'activité scavenger du radical monoxyde d'azote des polyphénols des téguments de *vicia faba* et de *lens culinaris* sont similaires à ceux

observés sur *ficus Carica* (Moracées) par **Oliveira et al., (2009)** et sur *Maranta arundinacea* .L par **Nishaa et al., (2012)**, elles sont inférieurs à celles observées sur la *Illicium verum* par Srinivasa **Rao et al., (2012)**.

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits utilisés ainsi que les standards possèdent une activité chélatrice tout en capturant l'ion ferreux avant qu'il soit complexé avec la Ferrozine.

La ferrozine « monosodium salt hydrate of 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,p'-disulfonic acid » est un réactif qui réagit avec les Fer divalents pour former un complexe magenta(rouge violacé) stable (**Viollier et al., 2000**).

L'ionisation du  $\text{FeCl}_2$  libère des ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) qui se complexent avec la ferrozine pour former un complexe coloré. Les composés phénoliques entrent en compétition avec la ferrozine pour se lier avec les ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), leur puissance de chélation élevée, réduit la concentration ferreuse libre en ions, diminuant de ce fait l'intensité de la réaction entre les ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et la ferrozine ce qui limite la formation du complexe Fer-ferrozine (**Akkol et al., 2011**).

L'activité de la chélation des graines étudiées se révèlent inférieure à celle observée sur les graines de *Nigella sativa* L **Meziti, (2009)**. Par contre elle est similaire à celles observées sur *Fructus lycii* par **Le et al., (2007)**.

Nos différentes données de l'activité antioxydante s'accordent avec les conclusions de **Boudjou et al., (2013)** et traduisent comme le soulignent ces mêmes auteurs, une forte corrélation entre l'activité antioxydante et teneurs en composés phénoliques.

Au moyen de tests simples, nous avons noté la présence de saponines dans les différents échantillons étudiés. Les saponines sont des métabolites secondaires de structure complexe. Elles sont dotées d'un haut potentiel tensioactif et sont connues pour leur propriétés cytotoxiques **Sparg et al., (2004)**.

Nous avons révélé un pouvoir hémolytique de tous nos extraits sur les différents groupes sanguin et nos données confirment les résultats de **Zatouche (2011)**. Cette propriété est attribuée par **Sparg et al., (2004)** à l'interaction des saponines avec les stérols de la membrane des globules rouges.

Nous avons noté que le pouvoir hémolytique varie en fonction du substrat végétale utilisé. Cette variation de l'activité des saponines est rapportée **Sparg et al., (2004)** qui notent que l'intensité de l'activité hémolytique est attribuée au type d'aglycone et au type de sucre lié à l'aglycon.

La valeur d'HC 50 (208,42 µg/ml) de l'extrait de tégument de la fève sur les hématies des globules rouge de groupe B est similaire à celle de saponine glycoside (208,28 µg /ml) rapporté par **Waheed et al., (2012)**.

Les téguments des trois légumineuses présentent un pouvoir hémolytique le plus élevé toutes les valeurs d'HC50 des extraits des téguments de différentes graines de légumineuses sur tous les groupes sanguins sont inférieurs à celles de *Anemone raddeana* saponine (873 µg/ml) révélés par **Sun et al., (2008)**

Les graines de légumineuses renferment diverses classes de composés phénoliques avec des teneurs globalement plus élevées dans les téguments particulièrement dans les téguments de lentille.

L'extraction par macération des composés phénoliques s'avère la plus efficace que celle de micro-onde.

Lors des différents essais destinés à déterminer l'activité antioxydante des différents substrats, nous avons noté une plus forte activité sur les téguments par rapport à la graine entière et leur cotylédon. Cette activité est relative à la teneur en composés phénoliques et en tannins.

Tous les substrats végétaux utilisés présentent des saponines. Ces derniers manifestent un pouvoir hémolytique qui diffère d'un extrait à un autre, nous notons que les téguments montre une activité hémolytique plus élevée qui dépasse 50% d'où l'intérêt de calculé HC50.

Une identification par HPLC, permettant la séparation des différent constituant de l'extrait brut de composés phénoliques serait intéressant de déterminer les molécules responsables de l'activité antioxydante.

Il serait intéressant d'approfondir cette étude pour une quantification des saponines et une meilleure caractérisation par HPLC pour identifier les différentes types de saponines responsables de l'activité hémolytique.

### *A*

**Abid A., Naqvi T.S., Naqvi M.S.(2012).** Identification of Phytosaponins as Novel Biodynamic Agents: An Updated Overview. *ASIAN J.EXP.BIOL.SCI* . 3 459-467

**Alonso R., Aguirre A., Marzo F. (2000).** Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*. 68. 159–165

**Antwerpen P.V. (2006).** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système myeloperoxydase /peroxyde d'hydrogène /chlorure. Thèse de Doctorat .Université libre de Bruxelles. 122

### *B*

**Balasundram N., Sunddram K., et Samman S. (2005).** Phenolic compounds in plants and agro-industrial by- products: Antioxidant activity, occurrence, n and potential uses. *Food Chemistry*.99. 191-203.

**Belloum Z., (2007).** Etude phytochimique des plantes médicinales . Inula crithmoides L Algériennes, cas de l'espèce. Mémoire de magister.

**Bennick A., (2002).** Interaction of Plant Polyphenols with Salivary proteins. *Department of Biochemistry and Faculty of Dentistry*. 13.184-196.

**Beta, T., Nam, s., Dexter, J.E., et Sapirstein, H.D., (2005).** Phenolic content and antioxydants. Activity of Pearled wheat and Roller-Milled. Fractions. *Cereal chem*.82. 390-393.

**Boudjou S., Oomah B. D., Zaidi F., Hosseinian F. (2013).** Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food Chemistry* 138. 1543–1550.

**Bouhadjera K (2008).** Contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. *Université Abou Bekr Belkaid*. 140.

**Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, Skandrani I, Falleh H, Marzouk B. (2008).** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Pharmacology, toxicology / Pharmacologie, toxicologie. C. R. Biologies* 331. 48–55

**Bouزيد W, Yahia M, Abdeddaim M, Aberkane M C, Ayachi A. (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'*Aubepine monogène*. *Lebanese Science Journal*, 12.1.

**Bruneton J., (1999).** Composés phénoliques, Shikimates, acétate. In : « Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales ». Ed. *Technique et Documentation – Lavoisier*. 233-447

### C

**Carson C.F., Rilley T.V., Bosque F., 2002.** Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*. 78. 264-269.

**Chaieb I. (2010).** Saponins as insecticides: a review. *Tunisian Journal of Plant Protection* 5. 39-50.

**Chaieb N., González J., López-Mesas M., Bouslama M., Valiente M. (2011).** Polyphenols content and antioxidant capacity of thirteen faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes cultivated in Tunisia. *Food Research International* 44. 970–977

**Chira, K.; Suh, J.H.; Teissédre, P.L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6. 75-82.

**Chwalek M., Lalun N., Bobichon H., Ple K., Voutquenne-Nazabadiokoet L. (2006).** Structure–activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760 (2006) 1418–1427. plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94. 219–243.

**Clarkson P. M. et Thompson H. S. (2000).** Antioxidants : whate role do they play in physical activity and health ? *American Journal Clinical Nutritional*. 72. 637-646.

### D

**Das T K., Banerjee D., Chakraborty D., Pakhira M C, Shrivastava B, Kuhad R C. (2012).** Saponin: Role in Animal system. *Vet. World.* 5(4): 248-254

**Deysson, G. (1981).** Formation, distribution et utilisation des composés ternaires divers, acycliques et cycliques. **In** Physiologie et biologie des plantes vasculaires. Nutrition et métabolisme. 5<sup>ème</sup> édition, Tome III: 212.

**Dewanto V., Wu, X., Adom K. K., Liu, R. H. (2002).** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3010–3014.

**Dini, I., Tenore G. C., Schettino O., Dini A. (2001).** New oleanane saponins in *Chenopodium quinoa*. *J Agric Food Chem* 49. 3976-3981.

**Dragovi-Uzelac V., Garofuli I. E., Juki M., Peni M., Dent M. (2012).** The Influence of Microwave-Assisted Extraction on the Isolation of Sage (*Salvia officinalis L.*) Polyphenols. *Food Technol. Biotechnol.* 50. 377–383

### E

**Ebrahimzadeh M. A., Nabavi S. F., Nabavi S. M. (2010).** Pourmorad F. Nitric oxide radical scavenging potential of some Elburz medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* . 9. 5212-521.

### F

**Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., and Becker, K. (2002).** The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* 88. 587–605

### G

**Gauthier C, (2008).** Amélioration du comportement biopharmaceutique de triterpènes naturels anticancéreux par synthèse de saponines mono- et bidesmosidiques.

**Gallais A, Bannerot H. (1992).** Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection. Paris : *INRA*.

**Goel N., Sirohi S., Dwivedi J., (2012).** Estimation of Total Saponins and Evaluate Their Effect on in vitro Methanogenesis and Rumen Fermentation Pattern in Wheat Straw Based Diet. *Journal of Advanced Veterinary Research.* 2. 120-126

**Ghavidel R. A., Prakash J. (2007).** The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT* 40. 1292–1299

**Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4. 162-169.

**Gonzalo G, Mateos, Latorre M et Lázaro R(2003).** Traitement de la graine de soja. *American soybean association.* 11.

**Guignard, J.L. (2000).** Les composés phénoliques. Biochimie végétale. 2<sup>ème</sup> Edition Dunod, Paris. 160-164.

**Gulçin I., Alici H. A. et Cesur M. (2005).** Determination in vivo antioxidant and radical scavenging activity of Propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 53. 281-285

## H

**Hafez, Y.S., Singh, G., Mc Lellan, M.E. y Monroe-Lord, L. (1983).** In Hamza M. Abu-Tarboush (1988). Irradiation .Inactivation of Some Antinutritional Factors in Plant.Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 46. 2698-2702

**Han X., Shen T., Lou H. (2007).** Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences.* 8. 950-988.

**Hippeli S., Heiser I. et Eistner E. F. (1999).** Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology : new insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* 37. 167-178.

**Hong-yu L., Bin W., Chun-guang Y., Yin-fen X. (2010).** Optimization of Microwave-assisted Extraction of Polyphenols from *Enteromorpha prolifera* by Orthogonal Test. *Luo HY et al. Chinese Herbal Medicines.* 2. 321-325.

### J

**Jun X., Deji S., Shou Z., Bingbing L., Ye L., RuiZ. (2009).** Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *International Journal of Pharmaceutics*. 382. 139–143

### K

**Khady B , Emmanuel T , Jacqueline D, Ndiaga C, Philippe T. (2010).** Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14. 131-139

**Khandelwal S., Udipi S A., Ghugre P. (2010).** Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Research International* 43. 526–530

**Khanbabaee K. et Van-Ree T. (2001).** Tannins: classification and definition. *Journal of Royal Society of Chemistry* 18. 641-649.

**Kren V and Martíňková L (2001).** Glycosides in Medicine: "The Role of Glycosidic Residue in Biological Activity". *Current Medicinal Chemistry*, 8. 1303-1328.

**Krief S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en ouganda.

**Kwon Y., Apostolidis E., Shetty K (2008).** In vitro studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology* 99. 2981–2988.

### L

**Lautrette S., (2004).** Utilisation des Fibres de carbone activé comme catalyseurs de O- et N-glycosylation Application à la synthèse d'analogues de saponines et de nucleosides. *Université de LIMOGES, PAST*. 139.

**Le K., Chiu F., Ng K. (2007).** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*. 105. 353–363

**Lee M., Yuet-Wa J., Kong S., Yu B., Eng-Choon V., Nai-Ching H., Chung-Wai T., Fung K., (2005).** Effects of Polyphyllin D, a Steroidal Saponin in *Paris polyphylla*, in Growth Inhibition of Human Breast Cancer Cells and in Xenograft. *Cancer Biology & Therapy*. 4. 1248-1254.

### M

**Macheix, J.J., Fleriet, A et Christian, A. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Ptur Lausanne.

**Macheix, J.J.; Fleuriet, A et Sarni-Manchado, P. (2006).** Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : Les polyphénols en agroalimentaire. Edition *Technologie et document*. Paris. 380-398.

**Manach C; Scalbert A ; Morand C.; Remesy C., Lilliana J. ( 2004).** Polyphenols: Food sources bioavailability. *American Society for clinical Nutrition*. 79. 727-747.

**Madhan B., Krishnamoorthy G., Raghava Rao J., Unni Nair B. (2006).** Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *Journal of Biologic Macromolecules*. 41 .16-22.

**Makkar H.P.S., Siddhuraju P., Becker K (2007).** Plant Secondary Metabolites Humana. 17-26

**Marfak A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools : formation of depsides. Thèse doctorale. Université de Limoges. Ecole doctorale Science Biologie Santé. *Faculté Pharmacie*. 1-110.

**Mert F. ( 2006).** Saponins versus plant fungal pathogens. 13 *Journal of Cell and Molecular Biology* .University, Printed in Turkey 5. 13-17

**Meziti A (2009).** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa L*  
Étude in vitro et in vivo. Memoire magister . Universite EL-HAJ LAKHDAR  
BATNA

**Middleton E., (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells:  
implications for inflammation, heart, disease, and cancer. *Pharmacological. Review.*  
52. 673-751.

**Milane, H. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant  
ou capteurs de radicaux libres : étude et application thérapeutiques .*Thèse de  
Doctorat. Université Louis Pasteur.* 47- 49.

### N

**Nasar-Abbas S., Plummer J., Siddique K., White P., Harris D., Dods K. (2008).**  
Cooking quality of faba bean after storage at high temperature and therole of lignins  
and other phenolics in bean hardening. *LWT* 41. 1260–1267.

**Nasar-Abbas S.M., Siddique K.H.M., Plummer J.A. White P.F., Harris D., Dods  
K., D’Antuono M. (2009).**Faba bean (*Vicia faba L.*) seeds darken rapidly and  
phenolic content falls when stored at higher temperature, moisture and light intensity.  
*LWT- Food science and Technology.* 42. 1703-1711.

**Ncube B., Finnie J.F., Van Staden J., (2011).** Seasonal variation in antimicrobial  
and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South  
Africa. *South African Journal of Botany.* 77. 387-396.

**Nishaa S., Vishnupriya M., Sasikumar J.M., Hephzibah P., CHRISTABEL.,  
Gopalakrishnan.V.K. (2012).** Antioxidant activity of ethanolic extract of *Maranta  
arundinacea. L .Tuberous rhizomes.* V5, 4.

**Noguchi N. et Niki E. (1998).** Chemistry of active oxygen species and antioxidants.  
In : « Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health ». *Ed. CRC Press. Papas et  
Quillen.* 03-20.

O

**Oakenfull D. (1981).** Saponins in food--a review. *Food Chemist O*, 6 .19-40.

**Oleszek, W., Jurzysta, M., Ploszynski, M., Colquhoun, I.J., Price, K.R., Fenwick, G.R., (1992).** Zanic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* 40. 191–196 [Fabales – *Medicago sativa*].

**Oliveira A., Valentão P.,Pereira J., Silva B., Tavares F., Andrade P. (2009).** *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology* 47. 2841–2846

**Oueslati S., Ksouri R., Falleh H., Pichette A., Abdelly C., Legault J.(2012).** Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda fruticosa* Forssk. *Food Chemistry* 132. 943–947

**Oomah, B. D., Corbé, A., & Balasubramanian, P. (2010).** Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56. 8225–8230.

**Oomah B. D., Caspar F., Linda J. Malcolmson., Bellido A.S. (2011).** Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International.* 44. 436–441.

P

**Pereira E, Barrosa L, Martinsa A, Ferreira, I. (2012).** Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry* 130394–403

**Pietta P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants, Reviews. *Journal of Natural Products.* 63. 1035-1042.

**Pitchaon M; Sirikarn P. and Pitiporn,R. (2008).**Relationship between antioxydant properties and chemical composition of some thai plants .*Journal of Food Composition and Analysis.* 21. 229-240.

**Proestos, C; Sereli, D. and Komaitis, M. (2006).** Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MC. *Food Chemistry*. 95. 44-52.

**Prior R. L., Wu X. et Schaich K. (2003).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 53. 4290-4302.

**Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Meier C., Ka'hko'nen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldentey K.-M. (2001).** Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*. 90. 494–507

### R

**Rafiee Z., Jafari S. M., Alami M., Khomeiri M. (2011).** Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; A comparison with maceration. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 21. 738-745

**Richter G. (1993).** Les composés phénoliques des végétaux. Métabolismes des végétaux : *Physiologie et biochimie*. Ed : DUNOD. 317-339

**Ribereau-Gayon P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Ed : DUNOD, Paris. 12. 14-24.

**Roussy G, Rinot P-A, (1994)** La cuisson des aliments aux micro-ondes. 32. 4

### S

**Scharenberg, A et Hess, H.D. (2007).** Les plantes contenant des tanins dans l'alimentation des ruminants. *Revue, UFA* 2. 44-45

**Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A.R.; Simonic, M and Knez, Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Journal of Food Chemistry*. 89. 191-198

**Sousa, C., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2008.** Tronchuda cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *costata* DC): scavenger of reactive nitrogen species. *Journal. Agric. Food Chem.* 56. 4205–4211

**Sparg G.S., Light M.E. Van staden J. (2004).** Biological activities and distribution of plant saponin. *Journal of Ethnopharmacology*. 94. 219-243

**Srinivasa Rao K., Keshar N. K., Kumar R., (2012).** A Comparative Study of Polyphenolic Composition and In-vitro Antioxidant Activity of *Illicium verum* Extracted by Microwave and Soxhlet Extraction Techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 46. 3

**Sun H, Chen L, Wang J, Wangb K, Zhoua J.(2011).** Structure–function relationship of the saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* for hemolytic and adjuvant activity. *International Immunopharmacology* 11. 2047–2056

**Sun Y., LI M., Liu J., (2008).** Haemolytic activities and adjuvant effect of *Anemone raddeana* saponin (ARS) on the immune responses to ovalbumin in mice. *International immunopharmacology*. 8. 1095-1102

### *T*

**Tadhani, M., Subhash, R., (2006).** Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *Journal of Medical Science*. 6. 321 – 326

**Tapondjou L., Mitaine-Offer A., MiyamotoT., Lerche H., Mirjolet J., Guilbaud N. (2006).** Triterpene saponins from *Schefflera abyssinica*, *Marie-Aleth Lacaille-Dubois*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 34. 887 - 889

**Thakur M , Melzig M, Fuchs H, Weng A. (2011).** Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. 1. 19–29

**Thibeault D, Gauthier C, Legault J, Bouchard J, DufourP , Pichette A. (2007).** Synthesis and structure–activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3b-O-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15. 6144–6157

### U

**Urquiaga I. and Leighton F., (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological. Research.* 33. 2

### V

**Vincken, J.-P., Heng, L., De Groot, A. and Gruppen, H. (2007).** Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochem.* 68. 275-297

**Viollier E., Inglett 1 .P.W., Hunter K., Roychoudhury A.N. et Van Cappellen P. (2000).** The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry.* 15. 785-790.

### W

**Wang N., Hatcher D.W., Toews R., Gawalko E.J. (2009).** Influence of cooking and dehulling on nutritional composition of several varieties of lentils (*Lens culinaris*). *LWT - Food Science and Technology.* 42. 842–848

**Waheed A., Barker J., Barton S J., Owen C P., Ahmed S., Mark A. Carew. (2012).** A novel steroidal saponin glycoside from *Fagonia indica* induces cell-selective apoptosis or necrosis in cancer cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 47. 464–473

**William G., Hopkins., C.M., Evrard, M. (2003).** Physiologie végétale. Molécules et métabolisme. 532-539.

### Y

**Yoshida, H. et Kajimoto, G. (1988)** .Effects of microwave treatment on the trypsin inhibitor and molecular species of tryglycerides in soybeans. *Journal of Food Science.* 53. 1756-1761.

**Yu B, Liao J, Zhang J, Hui Y. (2001).** The first synthetic route to furostan saponins. *Tetrahedron Letters*. 42. 77–79

**Yücekutlu N A et Bildacı I. (2008).** Determination of Plant Saponins and Some of Gypsophila Species:A review of the literature. *Hacettepe J. Biol. & Chem.* 36. 129-135

**Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, Kageura T & Matsuda H (2001).** Medicinal flowers. III. Marigold : hypoglycaemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 49. 863–870.

### Z

**Zatouche A. (2011).** *Vicia faba* (minor, major), *Lens culinaris* Approche de quelques métabolites secondaires. Mémoire master II. Université A.Mira de béjaia. 36.

## Annexe N° 01

Préparation des solutions et des réactifs

- Solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7%) :

Dissoudre 7 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (carbonate de sodium) dans 100 ml d'eau distillée.

- Solution de Na OH à 4%

Dissoudre 4g dans 100 ml eau distillée

- Solution de  $\text{Al Cl}_3$  à 10%

Dissoudre 10 g  $\text{Al Cl}_3$  (Trichlorure d'aluminium) dans 100 ml eau distillée

- Solution de  $\text{Na NO}_2$  (nitrite de sodium) (5%)

Dissoudre 5 g dans 100 ml eau distillée

- Solution de Na OH (4%)

Dissoudre 4g dans 100 ml eau distillée

- Solution de l'acide dinitrosalicylique :

Dissoudre 1g de l'acide dinitrosalicylique est dissout dans 500 mL d'eau distillé.

- Solution de tampon phosphate 10 Mm, Ph 7.4

Dissoudre 0,35g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,272g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dans 200ml d'eau distillé, ajuster le pH à 7,4

- Le réactif sodium nitroprusside :

Dissoudre 0,15g de sodium nitroprusside de 10 mM dans 50 ml de tampon phosphate pH7,4

- Solution d'acide phosphorique :

Prendre 2,35 ml de l'acide phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) et ajusté le volume à 100 ml avec l'eau distillée.

- Le réactif griess :

Dissoudre 0,5 g de sulfanilamide et 0,05 g de naphthyle éthylène diamine dans 50 ml de l'acide phosphorique.

- Solution de  $\text{FeCl}_2$  (chlorure ferreux) à 2 mM :

Dissoudre 0,022 g de  $\text{FeCl}_2$  dans 100ml d'eau distillée.

- Solution de ferrosine à 5 Mm :

Dissoudre 0,123 g de la ferrosine dans 50ml d'eau distillée.

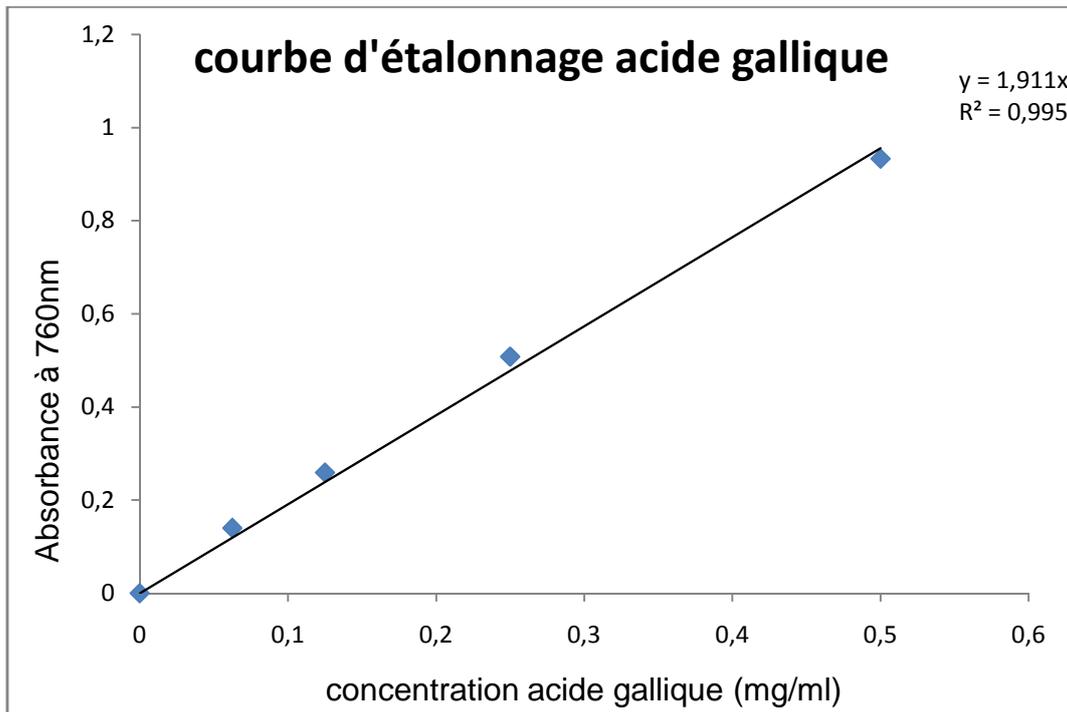
- Tampon de phosphate salin pH 7.2 :

Dissoudre 8,2 g de Na Cl, 0,136  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,224g KCl, 1,14 g  $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ , ajuster le pH à 7,2.

- Solution d'érythrocyte 3% :

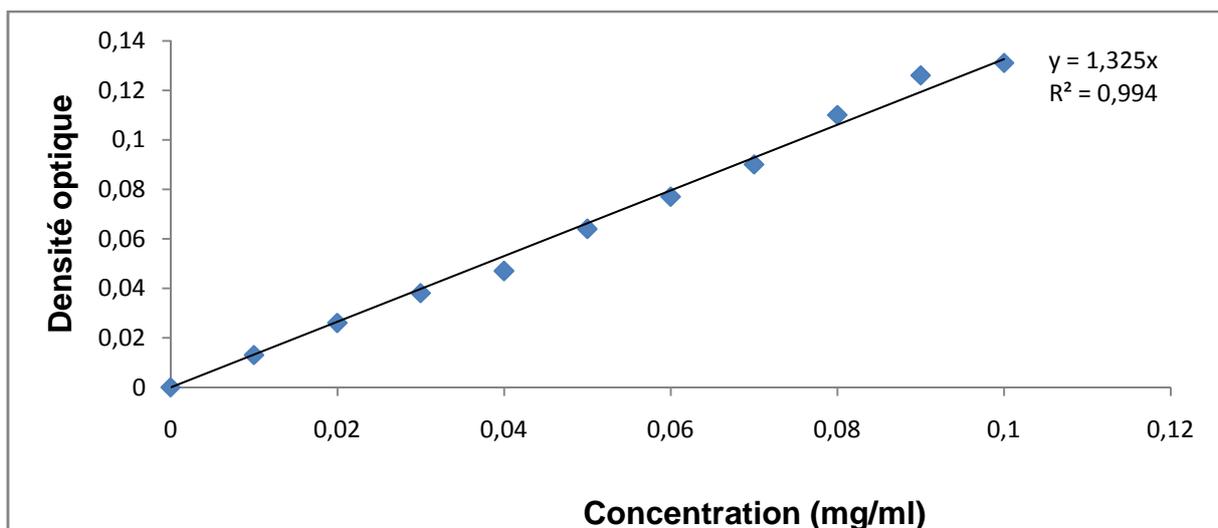
Centrifuger les tubes de sang imprégnés d'anticoagulant à 1500g pendant 5 min, et laver le culot 3 fois avec le tampon phosphate salin, diluer les érythrocytes lavés à 3 % avec le tampon.

## Annexe N° 02



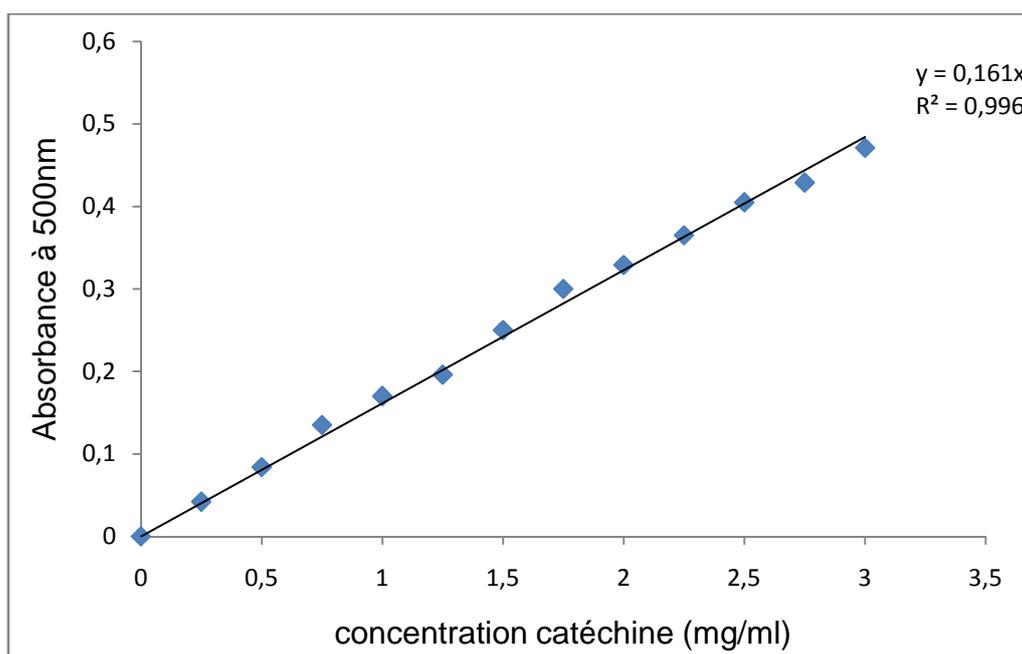
## Courbe d'étalonnage acide gallique

## Annexe N° 03



## Courbe d'étalonnage de la quercétine (1mg/ml)

## Annexe N° 04



## Courbe d'étalonnage catéchine

## Annexe N° 05

Univariate Tests of Significance for FLAVONOI (adstudy.sta)

Sigma-restricted parameterization

Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of Freedo m	MS	F	p
Intercept	174777	9	174777	152471	
GRAINE	9	1	9	8	0
PARTIE_P	27068	2	13534	11807	0
MODE_EXT	2617	2	1308	1141	0
GRAINE*PARTIE_P	284	1	284	247	0
GRAINE*MODE_EXT	38	4	10	8	0,00001
PARTIE_P*MODE_EXT	0	2	0	0	0,707512
GRAINE*PARTIE_P*MODE_EX	49	2	24	21	0
T	7	4	2	2	0,192124
Error	103	90	1		

## Univariate Tests of Significance for PTS (adstudy.sta)

Sigma-restricted parameterization

Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2276213	1	2276213	959527,9	0
GRAINE	67043	2	33521	14130,8	0
PARTIE_P	7204	2	3602	1518,3	0
MODE_EXT	721	1	721	303,8	0
GRAINE*PARTIE_P	16	4	4	1,7	0,167465
GRAINE*MODE_EXT	0	2	0	0	0,965494
PARTIE_P*MODE_EXT	5	2	2	1	0,377943
GRAINE*PARTIE_P*MODE_EXT	2	4	0	0,2	0,911449
Error	214	90	2		

## Univariate Tests of Significance for TANNINS (adstudy.sta)

Sigma-restricted parameterization

Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1941928,93	1	1941928,93	1327394,46	0
GRAINE	40614,3519	2	20307,1759	13880,8544	0
PARTIE_P	4022,35185	2	2011,17593	1374,72785	0
MODE_EXT	424,037037	1	424,037037	289,848101	0
GRAINE*PARTIE_P	20,7037037	4	5,17592593	3,53797468	0,00995481
GRAINE*MODE_EXT	0,57407407	2	0,28703704	0,19620253	0,82219635
PARTIE_P*MODE_EXT	18,0185185	2	9,00925926	6,15822785	0,00311434
GRAINE*PARTIE_P*MODE_EXT	5,37037037	4	1,34259259	0,91772152	0,45726319
Error	131,666667	90	1,46296296		

# *Introduction*

*Partie  
expérimentale*

*Matériels et  
méthodes*

# *Résultats et discussion*

*Conclusion  
et perspectives*

# *Annexes*

# *Sommaire*

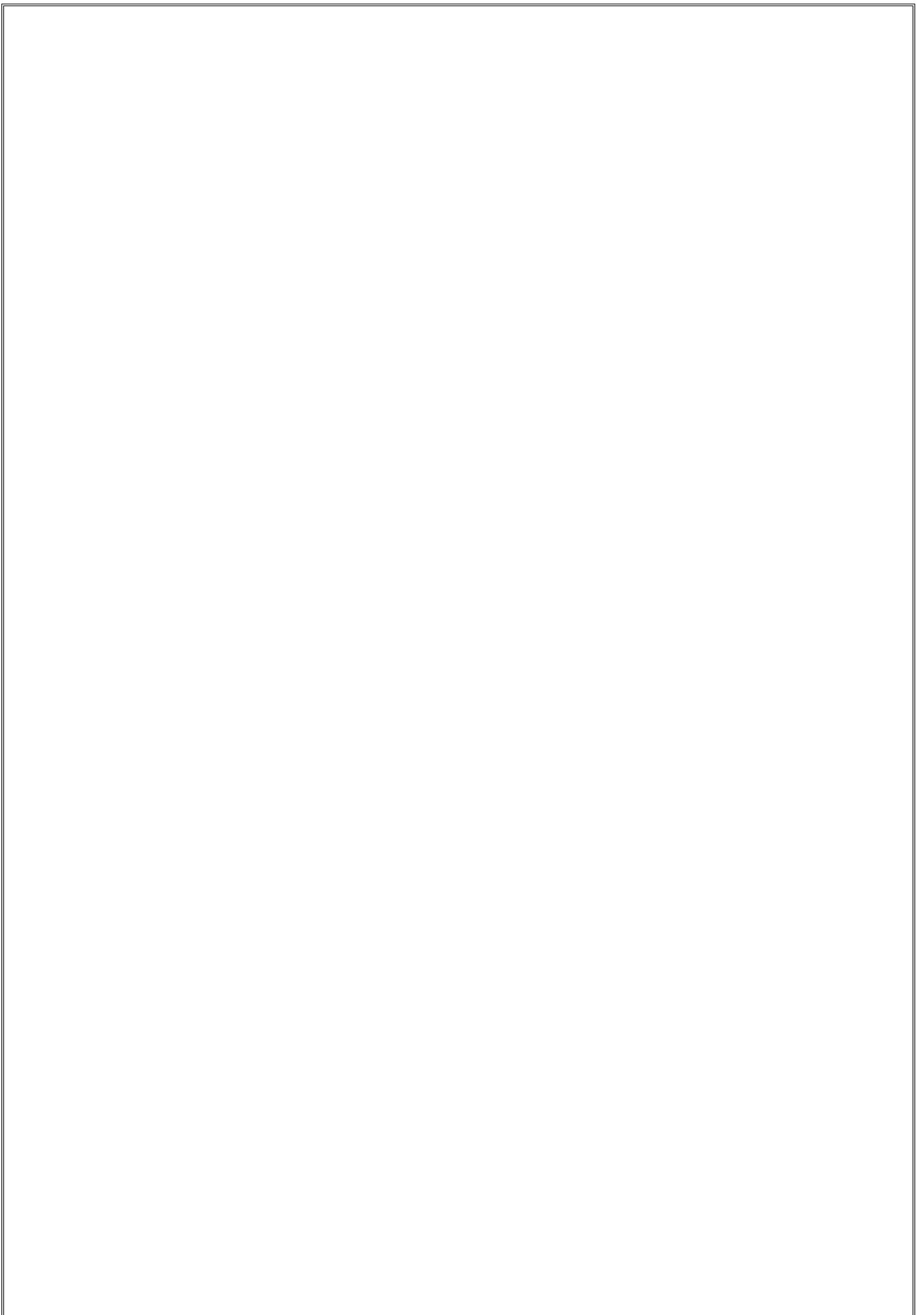
# *Bibliographie*

*Références  
bibliographiques*

*Chapitre I :*

*Composés  
phénolique*

*Chapitre II :*  
*Les saponines*



## Résumé

Les fèves, fêveroles et lentilles appartiennent à la famille des légumineuses à graines. Les espèces appartenant à cette famille se caractérisent par leur richesse en protéines végétales et en fibres alimentaires. Cependant, elles contiennent de nombreux facteurs antinutritionnels qui réduisent leur digestion et diminuent considérablement la biodisponibilité des nutriments. Ces composés peuvent être des inhibiteurs de protéases, des lectines, des composés phénoliques, des saponines...etc.

Le présent travail a été entrepris dans le but de déterminer les teneurs en composés phénoliques et leur activité antioxydante des trois légumineuses (fèves, fêveroles et lentilles) entières, décortiquées et leurs téguments d'une part, d'autre part, on a contribué à l'évaluation qualitative et activité hémolytique des saponines.

Les résultats obtenus indiquent que les teneurs maximales en composés phénoliques se situent au niveau des téguments particulièrement ceux de la lentille. Ces téguments manifestent le plus fort pouvoir d'inhibition de NO et la chélation des ions ainsi que l'activité hémolytique des saponines

**Mots clés :** *Vicia faba*, *Vicia faba L*, *Lens culinaris*, polyphénols, activité antioxydante, saponines, activité hémolytique.

## Abstract

Faba bean (major et minor) and lentils belonging to the family of legumes. The species belonging to this family are characterized by their high vegetable protein and dietary fiber. However, they contain many anti-nutritional factors that reduce their digestion and significantly decrease the bioavailability of nutrients. These compounds may be protease inhibitors, lectins, phenolic compounds, saponins ... etc..

This work was undertaken in order to determine the levels of phenolic compounds and antioxidant activity of three legumes (faba bean major and minor and lentils), whole, dehulling seeds and hulls in the first step. In a second step, we have contributed to the qualitative and hemolytic activity of saponins.

The results indicate that the maximum levels of different classes of phenolic compounds are in hulls, particular those of lens. These hulls manifest the strongest inhibition of NO and the chelation of ions and the hemolytic activity of saponins.