

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -

Université Mohammed Seddik Ben Yafia - Jijel -

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Microbiologie Appliquée et
Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم : ميكروبيولوجيا تطبيقية و علوم التغذية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Biologie

Option : Contrôle de Qualité des produits Alimentaires

Thème

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 2527

***Impact du traitement thermique sur les
variations quantitatives et qualitatives des
composés phénoliques des grains d'haricot sec.***

Membres du Jury

Président : M^{elle} AYAD R.

Encadreur : M^{me} DJABALI S.

Examinatrice : Mme BENHAMADA N.

Présenté par

M^{elle} BOUDERAOUNE Nadjeh

M^{elle} BOUKENDIR Hanane

Année Universitaire 2016 – 2017

Numéro d'ordre (bibliothèque) : ...

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Allah, Le Tout Puissant et Le Miséricordieux, de m'avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme ma formation de Master.

C'est avec un grand honneur et un grand plaisir que je remercie mon enseignante et promotrice, Madame DJABALI Salîha, enseignante à l'université de Jijel pour m'avoir proposé ce sujet et pour m'avoir dirigé tout au long de la réalisation de ce travail, pour son esprit scientifique, ses précieux conseils et ses encouragements. Soyez assuré de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

J'adresse mes sincères remerciements à M^{me} ayade pour l'honneur qu'elle me fait de présider le jury.

J'exprime également mes remerciements à madame BENHAMADAN me fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements les plus respectueuses vont aussi à toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de mon mémoire, à tous les enseignants, magisters, collègues et amis, ainsi qu'au personnel administratif et tous les techniciens de laboratoires d'université de Jijel, pour la dimension humaine inestimable qu'ils ont manifesté à mon égard.

Enfin, je remercie du fond de mon cœur, ma famille qui m'a soutenu, encouragé et motivé tout au long de mes études. Merci à tous...

Dédicace

*A l'aide de dieu tout puissant, que m'a tracé le chemin de ma
vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A mes chers parents de m'avoir laissé libre dans mes choix
d'avoir prié pour moi Je leurs exprime ma profonde
reconnaissance pour leur amour, leur Confiance, leur soutien
moral ainsi que pour leurs efforts, sacrifices et encouragements
durant tout mon parcours*

*A mes sœurs ; Houda , Nadjet et Ghanaï pour leur soutien
moral et ses encouragements*

*A mon frère Ibrahim n'ont cessé de m'encourager tout au long
du projet*

*A mes nièces adam djawad, houyam, charaf addin, israa,
djihan et zin addin*

A toute ma famille

*A mes chers amis Amina, Hadjiba, Imane, Rabiaa, Fatiha ,
Souad, Chahra , Sara, Ibtissem*

Et Maroua

A toute personne qui me connaît

hanane

Dédicaces

A ma très chère mère : Djohar

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer
Le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu n'as cessé de
me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes
Études. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce
travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime.
Puisse le puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je
puisse te combler à mon tour.*

A mon très cher père : Saïd

*Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour,
pour leur amour, leur encouragement. Que ce travail soit pour vous
un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse. Que Dieu
le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de
L'esprit et te protège de tout mal.*

A mes chères frères choaïb, samir et hichem.

A mes sœurs, siham, souhila samiha et soumia

*A mes adorables amies ; wissem, rabiaa, amel, sara, mounira, nadjet,
asma et noura*

A mon chère binome hananne

A toute la promotion de 2^{me} année contrôle de qualité 2017

Nadjeh

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----------|
| Liste des tableaux | |
| Liste des figures | |
| Liste des abréviations | |
| Introduction | 1 |
| Synthèse Bibliographique | |
| Chapitre 01. Légumes secs | |
| 1. Aperçu sur les légumineuses alimentaires | 3 |
| 2. Place des légumineuses dans l'alimentation humaine | 3 |
| 3. Intérêt des légumineuses | 4 |
| 3.1. Intérêts agronomique et nutritionnel | 4 |
| 3.2. Légumineuses et la santé..... | 4 |
| 4. Classification botanique d'haricot | 5 |
| 5. Distribution et habitat d'haricot sec..... | 5 |
| 6. Composition biochimique d'haricot sec..... | 5 |
| 7. Production des haricots secs..... | 6 |
| 8. Grandes classes commerciales des haricots secs..... | 6 |
| Chapitre 02. Composés polyphénoliques | |
| 1. Généralité sur les polyphénols | 7 |
| 2. principales classes des composés phénoliques..... | 7 |
| 2. 1. Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)..... | 8 |
| 2.2. Flavonoïde (C6-C3 C6)..... | 9 |
| 2. 3. Stilbènes (C6-C2-C6)..... | 10 |
| 2. 4. Lignanes (C6-C3)2..... | 10 |
| 3. Biosynthèse des composés phénoliques..... | 10 |
| 4. Composés polyphénoliques du grain d'haricot sec..... | 11 |

| | |
|---|----|
| 5. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols..... | 11 |
| 5.1. Facteurs physiologiques | 12 |
| 5.2. Facteurs génétiques..... | 12 |
| 5.3. Facteurs de l'environnement | 13 |
| 5.4. Techniques culturales..... | 13 |
| 5.5. Transformation et conservation..... | 13 |
| 6. Localisation des composés phénoliques | 14 |
| 7. Effet de traitement thermique sur les polyphénols | 14 |
| 8. Activités biologiques des composés phénoliques..... | 15 |
| 8.1. Activité antioxydante des composés phénolique..... | 15 |
| 8.2. Activité antimicrobienne des composés phénoliques..... | 16 |
| 8.2.1. Activité antibactérienne des composés phénoliques..... | 16 |
| 8.2.2. Activité antifongique des composés phénoliques | 17 |
| 8.2.3. Activité antivirale des composés phénoliques..... | 17 |
| 8.3. Activité anticancérogène des composés phénoliques | 18 |

MATERIEL ET METHODES

| | |
|--|----|
| 1. Matériel végétal..... | 18 |
| 1.1. Présentation des variétés d'haricots secs | 18 |
| 1.2. Triage des grains et cuisson..... | 18 |
| 2. Matériel biologique..... | 19 |
| 2.1. Origine et choix des souches bactériennes..... | 19 |
| 2.2. Origine et choix des souches fongiques..... | 19 |
| 2.3. Choix des milieux de culture..... | 19 |
| 3. Méthodes..... | 19 |
| 3.1. Mesure du taux d'humidité des grains d'haricots secs..... | 20 |
| 3.2. Préparation des extraits bruts méthanoliques.... | 21 |
| 3.3. Mesure du rendement d'extraction..... | 21 |
| 3.4. Dosage des polyphénols totaux | 21 |

| | |
|--|----|
| 3.5. Dosage des flavonoïdes | 22 |
| 3.6. Dosage des anthocyanines..... | 22 |
| 3.7. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanolique..... | 23 |
| 3.8. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques | 23 |
| 3.8.1. Test de pouvoir antibactérien des extraits méthanoliques..... | 23 |
| 3.8.2. Test du pouvoir antifongique des extraits polyphénoliques..... | 25 |
| 3.9. Traitement statistique..... | 27 |

RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|----|
| 1. Taux d'humidité des échantillons d'haricots secs..... | 28 |
| 2. Rendement en extrait sec..... | 29 |
| 3. Teneurs en polyphénols totaux d'haricot secs..... | 30 |
| 4. Teneurs en flavonoïdes d'haricots secs..... | 32 |
| 5. Teneurs en anthocyanines des haricots secs..... | 34 |
| 6. l'activité antioxydante des extraits bruts méthanoliques..... | 35 |
| 7. Test du pouvoir antibactérienne..... | 36 |
| 7.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMIs..... | 39 |
| 7.2. Détermination de l'activité bactéricide et bactériostatique..... | 39 |
| 8. Test du pouvoir antifongique..... | 41 |
| 8.1. Détermination des index antifongiques (IA ₁₀₀)..... | 42 |
| 8.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMIs)..... | 42 |
| Conclusion et perspectives..... | 43 |
| Références bibliographiques..... | 45 |
| Annexes | |
| Résumé | |

LISE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau I. Composition biochimique des graines d'haricot sec | 6 |
| Tableau II. La production d'haricot dans l'Amérique latine..... | 6 |
| Tableau III. Les principales classes des composés phénoliques..... | 8 |
| Tableau IV. Caractéristiques des variétés d'haricots secs testés..... | 18 |
| Tableau V. les conditions de cuisson des haricots secs..... | 19 |
| Tableau VI. Analyse des différences par le test de Tukey entre les variétés d'haricot sec pour le taux d'humidité ($p \leq 0,05$)..... | 28 |
| Tableau VII. Rendement moyen en extrait sec exprimé en g/2g des échantillons analysés..... | 29 |
| Tableau VIII. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les variétés analysées pour le rendement en extrait sec ($p \leq 0.05$)..... | 29 |
| Tableau IX. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les échantillons cru et cuit des variétés analysées pour le rendement en extrait sec ($p \leq 0.05$)..... | 30 |
| Tableau X. Teneur en polyphénols totaux des extraits (mg EAG/g)..... | 30 |
| Tableau XI. Analyse des différences par le test de Tukey entre les échantillons d'haricot sec pour la teneur en polyphénols totaux ($p \leq 0,05$)..... | 31 |
| Tableau XII. Teneur en flavonoïdes des extraits d'haricots secs (mg EQ/g)..... | 33 |
| Tableau XIII. Teneur en anthocyanines des extraits d'haricot (g ECy-3-Glu/g de poudre)..... | 34 |
| Tableau XIV. Activité antioxydante des extraits des deux variétés d'haricots secs crus et cuits dans l'eau..... | 35 |
| Tableau XV. Activité antibactérienne des extraits polyphénoliques sur milieu Mueller-Hinton des quatre souches bactériennes..... | 37 |
| Tableau XVI. Résultats de CMI de l'activité antibactérienne des bactéries à Gram positif (en mg/ml) | 39 |
| Tableau XVII. Résultats de l'activité bactéricide et bactériostatique des quatre souches bactériennes | 40 |
| Tableau XVIII. Concentrations fongistatique (CFS) et fongicide (CF) en mg/ml des extraits polyphénoliques d'haricots secs sur la souche <i>Penicillium</i> s..... | 42 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 01. (A) Quelques exemples des acides hydroxybenzoïques.(B), Quelques exemples des acides hydroxycinnamiques | 9 |
| Figure 02. Structure générale des flavonoïdes | 9 |
| Figure 03. Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes..... | 10 |
| Figure 04. Structure chimique d'un lignane..... | 10 |
| Figure05. Structure chimique de quelques composés polyphénoliques présents dans les haricots communs..... | 12 |
| Figure 06. Photographie des variétés d'haricots étudiés respectivement (A),l'haricot à l'œil noir et (B),l'haricot blanc | 18 |
| Figure 07. Représentation schématique des étapes réalisées..... | 20 |
| Figure 08. Taux d'humidité des échantillons d'haricots sec..... | 28 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|--|--|
| A | absorbance |
| CF | Concentration fongicide |
| CFS | Concentration fongistatique |
| Ci | Concentration initiale |
| CMI | Concentration minimale inhibitrice |
| DMSO | Diméthyle sulfoxyde |
| FD | facteur de dilution |
| GN | gélose nutritive |
| H B | Haricot Blanc |
| H ON | Haricot l'Oeil Noir |
| H₃PMo₁₂O₄₀ | Acide phosphomolybdique |
| H₃PW₁₂O₄₀ | Acide phosphotungstique |
| IA | index antifongique |
| mg EAG/g d'extrait | mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait |
| mg EAA/ g MS | mg équivalents acide ascorbique par gramme de la matière sèche |
| Mo₈O₂ | Molybdène |
| MoO₄²⁻ | Molybdate |
| Na₂CO₃ | Carbonate de sodium |
| PDA | Potato Dextrose Agar |
| PDB | Potato Dextrose broth |
| PH | Potentiel hydrique |
| TAC | Capacité antioxydant totale |
| UV | Ultra violet |
| W₈O₂₃ | Tungstène |

Introduction

Les légumineuses à grains constituent une source de l'alimentation humaine et animale et jouent un rôle dans la rotation des cultures dans la plupart des régions du monde (Amini et al., 2013). Ce sont des aliments fonctionnels reconnus et leur utilisation comme ingrédients pour les formulations alimentaires devient de plus en plus intéressante (Sparvoli et al., 2016).

Haricot sec est l'un des principales légumineuses, (Amini et al., 2013) est une source essentielle de nutriments et de protéines diététiques pour plus d'un demi-milliard de personnes dans le monde (Corte et al., 2013).

Les graines des haricots secs sont la bonne source d'énergie, hydrates de carbone complexes (fibres alimentaires, amidon, et oligosaccharides), protéines, minéraux et vitamines ainsi d'antioxydants et de polyphénols nécessaires à la santé humaine (Sparvoli et al., 2016). Les haricots secs contiennent des niveaux élevés de composants chimiquement divers (phénols, amidon résistant, vitamines, fructooligosaccharides) qui se sont révélés protéger contre des conditions de stress oxydatif, les maladies cardiovasculaires, le diabète, le syndrome métabolique et de nombreux types de cancer, ce qui permet de positionner cette légumineuse comme un excellent aliment fonctionnel (Câmara et al., 2013).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires végétaux qui sont présents dans une gamme variée d'aliments tels que les légumes secs. Ces composés ont montré de nombreuses activités biologiques et des avantages pour la santé pour la prévention et le traitement des maladies liées à l'âge, les cancers, les maladies cardiaques. Les activités antioxydantes ont été largement étudié, activité anticancéreuse, activité anti-inflammation, et l'effet antimicrobien (le potentiel antibactérien, antifongique et activités antivirales) (Li et al., 2014).

Les profils de polyphénols dans les aliments individuels varient également en fonction de la variété, de la zone géographique, de l'état de maturité à la récolte, de la transformation des aliments et de la cuisson. Les polyphénols présents dans une variété d'un aliment végétal peuvent également être absents d'un autre en raison de la variation de l'expression de certaines enzymes biosynthétiques. En outre, les teneurs en polyphénols changent avec le traitement, comme après la cuisson, le stockage, la confiture, la mise en conserve et la congélation. Par exemple, les pertes en flavonoïde de 30-75% ont été rapportées après différents traitements culinaires (ZAMORA-ROS et al., 2014).

Plusieurs légumes secs, parmi lesquels figurent l'haricot sec, les lentilles, ne sont pas consommés crus, ils doivent subir la cuisson afin d'être consommés. L'effet de la cuisson sur la capacité antioxydante et la teneur polyphénolique sur ces aliments n'ont pas été largement étudiés (Barkat et Kadri, 2011).

Dans ce contexte les principaux objectifs de ce travail consistent à évaluer la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et l'anthocyanine extraits à partir de deux variétés d'haricot. Pour chaque variété deux états (cru et cuit) ont été étudiés, à évaluer le pouvoir antioxydant et antimicrobien de ces extraits, à mettre en évidence l'impact de cuisson dans l'eau sur ces teneurs pour atteindre ces objectifs, nous avons jugé utile de structurer le manuscrit comme suite : outre l'introduction et la conclusion générale, il est structuré en trois parties. La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle sont abordés trois chapitres; dans le premier chapitre nous apportons, principalement, des définitions, la classification et la composition biochimique d'haricot sec; le deuxième chapitre traite les composés phénoliques, leur classification et leur biosynthèse, les facteurs de variabilités et l'impact de traitement thermique sur ces derniers; le troisième chapitre élucide les activités biologiques des composés phénoliques et la deuxième partie décrit l'échantillonnage, le matériel et les méthodes utilisés pour l'extraction et l'évaluation de la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et les anthocyanes ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante, antibactérienne et antifongique. La troisième partie de ce travail expose les résultats obtenus et la discussion.

Synthèse
bibliographique

Chapitre 01. Légumes secs

1. Aperçu sur les légumineuses alimentaires

Les Légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille botanique des *Fabacées* (*Léguminosae*), qui représente la troisième famille des plantes par le nombre d'espèce (Anne et Christian, 2015) et compte environ 20.000 espèces (Gepts *et al.*, 2005). La plupart des légumineuses cultivées appartiennent à une des sous-familles, les *Faboideae* ou *Papilionoideae* et plus précisément aux tribus des *Fabeae*, des *Phaseoleae* et *Trifolieae* (Anne et Christian, 2015).

La sous famille des *Papilionoideae* regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement: le soja (*Glycine max*, $2n = 4x = 40$), le haricot (*Phaseolus vulgaris*, $2n = 2x = 22$), le pois (*Pisum sativum*, $2n = 2x = 14$), la luzerne (*Medica gossypifolia*, $2n = 4x = 32$), l'arachide (*Arachis hypogaea*, $2n = 4x = 40$), le pois chiche (*Cicer arietinum*, $2n = 2x = 16$), et la fève (*Vicia faba*, $2n = 2x = 16$). Ces légumineuses cultivées forment deux groupes appelés *Galegoïdes* et *Phaseoloïdes* à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des *Aeschynomeneae* (Broughton *et al.*, 2003).

Les légumineuses sont souvent préconisées dans les régimes occidentaux en raison de leur effets nutritionnels et parce qu'ils sont la source peu coûteuse de protéine (Mercedes *et al.*, 1999), dont le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) est considéré comme une source importante de nutriments pour plus de 300 millions de personnes dans l'Afrique de l'est et de l'Amérique latine, représentant 65% de la consommation totale de protéines, 32% de l'énergie, et une source majeure de micronutriments, par exemple le fer, le zinc, la thiamine et l'acide folique (Nicolai *et al.*, 2015).

2. Place des légumineuses dans l'alimentation humaine

Les légumineuses secs ont été appelés « la viande du pauvre », appellation qui a son intérêt et son importance à divers titres, historiques et d'autres. En premier lieu, elle implique l'idée de succédané de la viande, le fait que les légumineuses étaient précieuses, ce titre était perçu avant que leur teneur élevée en protéines ait été mise en évidence par analyse chimique. En seconde lieu, l'expression fait mention de la pauvreté, il existe au niveau social national une relation inverse entre la consommation des graines de légumineuses et celle de produits d'origine animale, y compris la viande, en effet les pays pauvres consomment plus de graines de légumineuses et moins de produits d'origines animales que les pays riches. En fin l'appellation « viande du pauvre » est déplorable, car elle implique aussi l'idée d'aliment de « deuxième classe » (Aykroyd et Doughty, 1982).

3. Intérêt des légumineuses

3.1. Intérêts agronomique et nutritionnel

Les légumineuses représentent les composants majeurs du système agricole par leurs particularités de s'associer aux *rhizobia* qui fixent l'azote atmosphérique (Morgante et al., 2007) et qui contribuent à l'amélioration de la productivité de la plante et par leur source précieuse de protéines et des huiles utilisées dans la nutrition humaine et animale.

Les légumineuses présentent d'autres spécificités biologiques telles que leurs interactions avec des pathogènes et des ravageurs (insectes, nématodes), la production de métabolites spécifiques (iso flavonoïdes du soja ; suggérés pour réduire les risques du cancer et pour abaisser le cholestérol dans le sérum), impliquées dans la signalisation symbiotique, dans la réaction de défense et présentant aussi un grand intérêt pharmaceutique. L'intérêt agronomique des légumineuses réside dans leur exploitation dans le cadre d'une agriculture « durable » ; réduction des intrants, préservation et enrichissement des sols en azote (Journet et al., 2001).

Les légumineuses présentent un intérêt nutritionnel original: elles sont riches en protéines et apportent en même temps des sucres à digestion lente et des fibres (Combe et al., 1991). Les protéines des légumes secs sont des sucres protéiques sans gluten, donc intéressantes dans les maladies coeliaques (Besançon, 1976). L'absence de cholestérol et présence d'acide gras insaturés dans les légumineuses, fait de leur consommation un effet bénéfique sur les risques cardiovasculaire (Cayot et osson, 1997).

Les graines renferment une quantité important de matières azotées (20-40%), sur le plan nutritif, leurs protéines présentent une teneur élevée en lysine (5 à 8 g pour 16 g d'azote), et à ce point de vue elles constituent un bon complément aux céréales, toutes fois, leur valeur biologiques est limitée par un déficit important en acides aminés soufrés (1.2 à 3 g pour 16 g d'azote) (Ladividich, 1973).

L'utilisation des légumineuses en alimentation humaine et animal a cependant été freinée par la présence de facteurs glucidiques ou anti nutritionnels identifiés en quantité variable selon la partie anatomiques et l'état de maturation de la graine (Combe et al., 1991).

3.2. Légumineuses et santé

D'après des études récentes, les bénéfiques « santé » liés à la consommation de légumes secs sont importants, si on les compare à d'autre aliments de natures protéiques. Les légumes secs présentent un index glycémique très bas et sont donc particulièrement recommandés aux individus diabétiques, mais aussi aux sujets sains dont ils améliorent certains paramètres métaboliques

comme la lipémie (cholestérolémie et triglycéridémie). Les effets hypocholestérolémiants et les composés cardioprotecteurs des légumes secs (fibres, protéines, micronutriments [isoflavone, saponines...]), sont également des facteurs d'intérêt dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Malgré ce potentiel « santé », la consommation de légumineuses reste faible car ces effets positifs sont peu connus chez le grand public (Jacques et al., 2008).

4. Classification botanique d'haricot

Le genre *Phaseolus* se classe dans le sous-tribu des *Phaseolinae*, tribu des *Phaseoleae*, famille des *Fabaceae* et ordre des *Fabales*. Au sein des *Phaseolinae* (à stylet barbu sous le stigmate), les deux genres *Phaseolus* et *Vigna* sont les plus importants contiennent à eux seuls le plus grand nombre d'espèces cultivées comme légumineuses vivrières. La section *Phaseolus* du genre *Phaseolus* est la plus importante et regroupe notamment les cinq espèces cultivées : *P. acutifolius* A. Gray., *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. polyanthus* Greenm. et *P. vulgaris* L (Maréchal et al., 1978 ; Freytag et Debouck, 2002 ; Gepts et al., 2008).

5. Distribution et habitat d'haricot sec

Les haricots secs (*Phaseolus vulgaris* L.) sont cultivées dans le monde entier; cependant, il est reconnu que les haricots sont une «nouvelle culture mondiale» avec une distribution vers l'Afrique suite à des explorations / conquêtes espagnoles et portugaises (Stavely et al., 1994).

Hors les deux origines domestiques distinctes d'haricot sec qui sont situées en Amérique centrale et en Amérique du Sud. Leur diffusion semble avoir été très complexe, impliquant de nombreuses introductions sur différents continents le long d'une gamme d'agro-systèmes. Plusieurs régions géographiques ont été proposées comme des centres secondaires de diversification tel l'Afrique centrale-orientale et australe, le Brésil et la Chine. Ce n'est que vers le XV et XVI siècle, les haricots secs ont traversé l'océan Atlantique. Espagnol et les explorateurs portugais ont d'abord transporté les haricots secs vers l'Europe et l'Afrique, respectivement (De Ron et al., 2016).

6. Composition biochimique d'haricot sec

Le haricot commun est morphologiquement variable et adaptable à des environnements différents, créant un large éventail de variétés locales. En conséquence, la composition nutritionnelle du haricot commun est impactée par divers facteurs tels que le génotype, l'origine géographique, l'environnement et les conditions de croissance (OECD, 2015) (Tableau I).

Tableau I : composition biochimique des graines d'haricot sec (Carnovale et al., 1989).

| Composantes nutritives | Teneur en % MS |
|------------------------|----------------|
| Eau | 9,28 |
| Protéines | 24,72 |
| Lipides | 1,54 |
| Amidon | 46,99 |
| Sucres solubles | 7,99 |
| Cendres | 3,62 |
| Fibres alimentaires | 11,65 |
| Solubles | 0,99 |
| Insolubles | 10,65 |

7. Production des haricots secs

Le rapport annuel de la production d'haricots secs est d'environ 12 millions de tonnes, avec 5,5 et 2,5 millions de tonnes en Amérique latine Caraïbes (ALC) et en Afrique, respectivement. Les pays africains et de l'Amérique latine Caraïbes qui ont la plus forte production sont : Brésil, Mexique, la République démocratique du Congo (RDC), Kenya, Tanzanie et Ouganda (tableau II). La plus haute fréquence de consommation apparente par habitant se trouve au Burundi, au Kenya et au Rwanda (Nicolai et al., 2015).

Tableau II. Production d'haricot sec dans l'Amérique latine (Broughton et al., 2003).

| Payés /région | Surface (ha×10 ⁻³) | Production (MT×10) |
|---|-----------------------------------|-----------------------|
| Bazille | 5092 | 3055 |
| Mexique | 2259 | 1300 |
| Amérique centrale (Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panama) | 526 | 337 |
| Zone de sud (Chile, Argentine, Paraguay) | 357 | 398 |
| Zone andéen (Venezuela, Colombie, Pérou, Bolivie) | 299 | 265 |
| Caribéen (Cuba, Haïti, république de dominicain) | 157 | 141 |
| TOTALE | 8690 | 5496 |

8. Grandes classes commerciales des haricots secs

Il existe 10 grandes classes commerciales des haricots secs: les haricots noirs, les haricots pinto, les haricots rouges légers et foncés, les haricots roses, les haricots blancs, les haricots du nord, les alubias, les haricots de canneberge et de petits haricots rouges, également connus sous le nom de haricots rouges (Long-Ze et al., 2008).

Chapitre 02. Les composés phénoliques

1. Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires complexes, exclusivement synthétisés par le règne végétal (Collin *et al.*, 2011). Ils peuvent aller de molécules simples (acides phénoliques simples) à des molécules hautement polymérisées (tanins condensés) (Urquiaga et Leighton, 2000) de poids moléculaires compris entre 100 Da pour les composés phénoliques simples à 30 000 Da pour les polymères complexes (Cirillo et Lemma, 2012). Ce sont des substances possédant plus d'un cycle benzénique, portant un ou plusieurs fonctions hydroxyles(OH) qui peuvent être libres ou engagés. Plus de 8 000 composés phénoliques ont été isolés et identifiés (Tao et Lambert, 2014).

Ces composés sont présents dans les racines, les tiges, les fleurs et les feuilles des végétaux (Vautrin, 2005). Ils sont généralement plus divers et abondants dans les fruits, les légumes, les feuilles et les graines (Câmara *et al.*, 2013). Ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement (Urquiaga et Leighton, 2000) et peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel. D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (Macheix *et al.*, 2005).

2. Principales classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en une dizaine de sous classes qui se différencient par leurs structures de base et les substituants qu'ils portent (Neve et Pincemail, 2008). On distingue les phénols simples, les flavonoïdes, les lignanes et les stilbènes (Boros, 2010) (tableau III).

Tableau III. Principales classes des composés phénoliques (Crozier et al., 2006).

| Squelette carboné | Classe | Exemple | Origine(exemples) |
|--|---|---|--|
| C ₆ | Phénols simple | Catéchol | Nombreuses espèces |
| C ₆ -C ₁ | Acides hydroxybenzoïques | P-Hydroxybenzoïque | Epices, fraise |
| C ₆ -C ₃ | Acide hydroxycinnamiques Cumarines | Acide caféique, Acide férulique Scopoltétine | Pomme, pomme de terre Citrus |
| C ₆ -C ₄ | Naphotoquinones | Juglone | Noix |
| C ₆ -C ₂ -C ₆ | Stilbénes | Resvératrol | Vigne |
| C ₆ -C ₃ -C ₆ | Flavonoïde • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes | Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Daidzéine | Fruit, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois |
| (C ₆ -C ₂) ₂ | Lignanes | Pinorésinol | Pin |
| (C ₆ -C ₃) _n | Lignines | | Bois, noyan des fruits |
| C ₁₅ | Tannis | | Raisin rouge, kaki |

2.1. Acides phénoliques (C₆-C₁ ou C₆-C₃)

Les acides phénoliques sont les composés phénoliques qui contiennent au moins un cycle aromatique et un groupe hydroxyle (Câmara et al., 2013). On distingue les dérivés de l'acide benzoïque et ceux de l'acide cinnamique (Collin et al., 2011); Leur toxicité est très faible (Macheix et al., 2005).

- **Acides hydroxybenzoïques** ont une formule de base de type (C₆-C₁) comme l'acide *p*-hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, acide vanillique, acide gallique, acide syringique,

acide salicyclique et acide gentisique, ...etc. Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides (Gresele et al, 2001) (Figure 01).

- **Acides hydroxycinnamique** : leur structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique (figure 02) (Macheix et al., 2005), et on a l'acide *p*-coumarique et les acides caféique, férulique et sinapique. Ces acides sont rarement présents à l'état libre et ils sont en général combinés à d'autres molécules organiques, ils existent sous forme d'ester ou de glycosides (Lafay et Gil-Izquierdo, 2008).

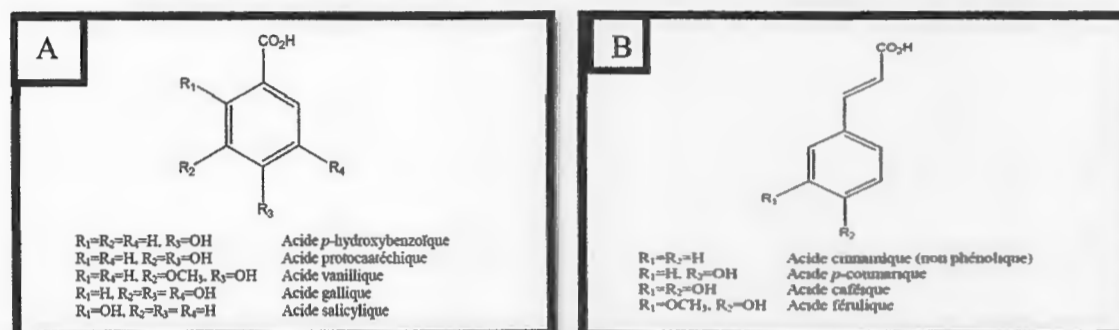


Figure 01. (A) Quelques exemples des acides hydroxybenzoïques (Chanforan, 2010).

(B) Quelques exemples des acides hydroxycinnamiques (Macheix et al., 2005).

2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont la plus grande classe de polyphénols dans l'alimentation humaine et sont caractérisés par deux cycles aromatiques ou plus contenant au moins un groupe hydroxyle dans chacun d'eux et reliés à un groupe pyrane hétérocyclique (Câmara et al., 2013)(figure 03). les flavonoïdes peuvent être subdivisés en deux groupes principaux : les anthocyanines (dérivés glycosylés d'anthocyanidine) et les anthoxanthines. Les anthoxanthines sont composés de plusieurs catégories, telles que les flavones, les flavanones, les flavonols, les flavanols, les isoflavones et leurs glycosides (Câmara et al., 2013).

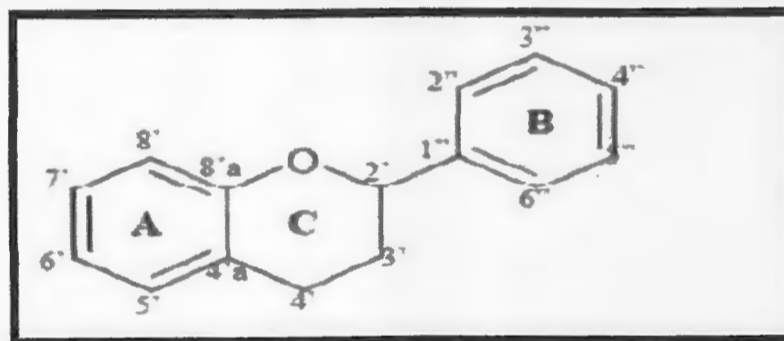


Figure 02. Structure générale des flavonoïdes (Collin et Crouzet, 2011).

2.3. Stilbènes

Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine, parmi ces composés, on trouve le resvératrol à action anticancéreuse, présent dans certaines plantes. Ils contiennent au minimum deux noyaux aromatiques reliés par un double liaison, dont la structure est C6- C2-C6 (figure 04), comme les flavonoïdes, formant ainsi un système conjugué (Crozier *et al.*, 2006). Ils ont été isolés et identifiés dans 25 familles de plantes différentes (Mérillon et Ramawat, 2012).

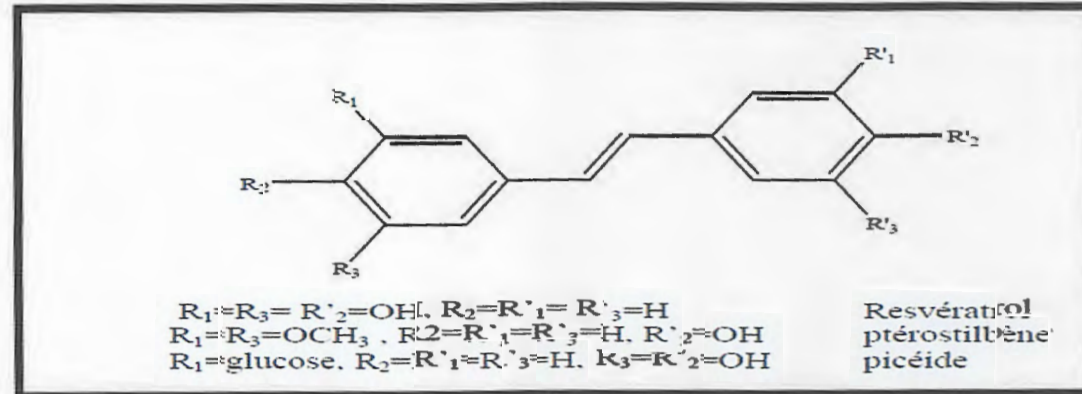


Figure 03. Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes (Crozier *et al.*, 2006).

2.4. Lignanes (C6-C3)₂

Les lignanes constituent une classe importante de métabolites secondaire dans le règne végétal (figure 05) (Bahaz et Rachdi, 2010). Sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6- C3) (Benarous, 2009). Ils répondent à une représentation structurale de type (C6-C3)₂ (Kone, 2009).

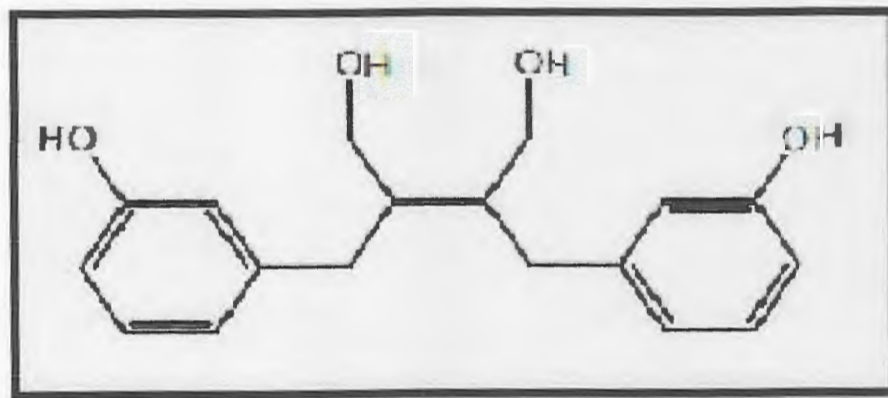


Figure 04. Structure chimique d'un lignane (Bahaz et Rachdi, 2010).

3. Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont synthétisés par les plantes au cours de leur développement normal, en réponse à des infections, des blessures, des rayons ultra-violet (UV) et des insectes (Pereira et al., 2012). Ils sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques :

- La voie la plus courante est celle qui, *via* le shikimate (l'acide shikimique), conduit des oses aux amino-acides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés.
- L'autre voie est la voie d'acétate et conduit à des poly-B-cétoesters de longueurs variables, les polyacétates engendrent, par cyclisation des composés polycycliques : chromones, isocoumarines, orcinols, depsides, depsidones, xanthones, quinones, etc. (Bruneton, 2009).

4. Composés polyphénoliques du grain d'haricot sec

Les principaux composés phénoliques d'haricot sec sont : les acides phénoliques et les flavonoïdes. La plus haute teneur en composés phénolique se trouve dans les variétés fortement pigmentées, en particulier dans leurs semences ou coques qui sont riches en flavonoïdes, anthocyanes et tanins. Cette teneur est variable selon la génétique et les facteurs environnementaux.

Les composés phénoliques simples les plus abondants dans les haricots communs sont l'acide férulique, l'acide sinapique, l'acide vanillique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique et l'acide p-hydroxy benzoïque, les teneurs rapportés variant selon la méthodologie utilisée pour l'analyse. L'acidesyringique, l'acide chlorogénique, l'acide gallique et de la vanilline ont également été signalé à être présent (OECD, 2015).

Le Kaempférol, survenant souvent par des liaisons O-glycosidiques c'est le plus abondant flavonol dans les haricots rouges et les haricots pinto avec des quantités de 209 et 148 mg /kg, respectivement. Les haricots noirs ou gris contient 20 mg / kg. La Quercétine est un autre flavonol présent dans la variété noire (9,7 à 23,5 mg / kg) (OECD, 2015).

Les anthocyanes qui se produisent dans les haricots sont les anthocyanidines simples, non-acylés, contenant habituellement le glucose comme seul sucre. Cependant, malvidine 3-galactoside a été détecté dans les haricots noirs (Xu et Chang, 2009). Six différents anthocyanidines ont été détectés dans le haricot commun, mais leur pourcentage relatif peut varier selon les écotypes et les classes de marché commerciales des haricots (OECD, 2015) (figure 06).

Plusieurs chercheurs ont rapporté que le delphinidine (49-81%) à prédominer, avec petunidine (4-32%). Cyanidine (1-23%) et de malvidine (4-14%) se produisant au niveau intermédiaire, et pélargonidine (0,4 à 6,5%) et péonidine (0,5 à 3,7%) moins fréquemment. Cependant, López et al.,

(2013) ont rapporté cyanidine et pélagonidine comme les principaux anthocyanidines dans les haricots noirs, où ils ont été complétés avec de petites quantités d'acylateddelphinidin et pélagonidine 3-glucosides(OECD, 2015).

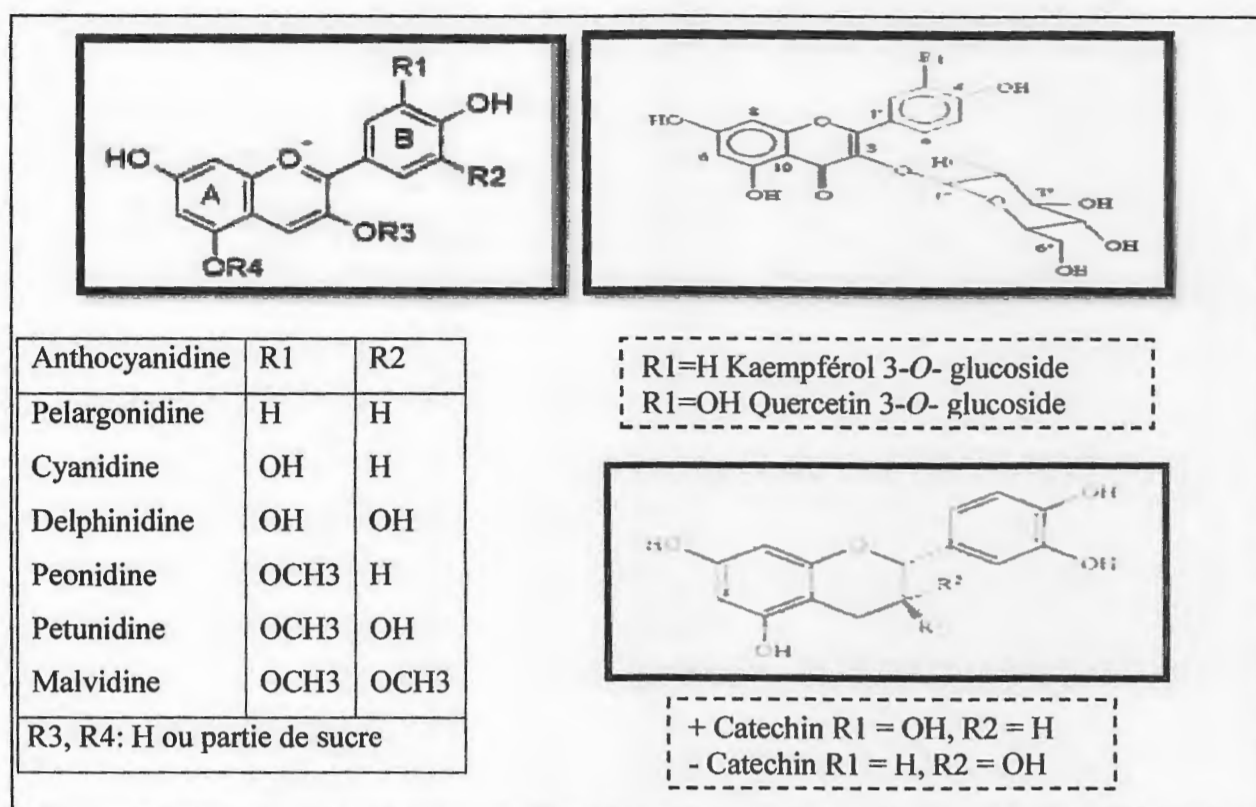


Figure 05. Structure chimique de quelques composés polyphénoliques présents dans les haricots communs (Reynoso *et al.*, 2006).

5. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols

Les végétaux présentent une grande diversité de composition et de teneur en phytonutriments. Les principales sources de variations sont inhérentes aux produits, d'ordre physiologique (liées au développement ou à la localisation dans le fruit ou le légume) ou génétique (lié au grand nombre de variétés disponibles), ou au contraire dépendantes des techniques culturales, des conditions environnementales, et enfin des conditions de conservation et de transformation après récolte.

5.1. Facteurs physiologiques

La teneur de la plupart des composés évolue au cours du développement des organes. Certains s'accumulent précocement puis ont tendance à disparaître à la maturation, tandis que d'autres vont s'accumuler au cours du développement. De même, suivant les organes, les compositions peuvent varier fortement. On les trouve donc souvent en plus grande concentration dans la peau des fruits ou dans les feuilles externes des légumes feuilles (Gorinstein *et al.*, 2002).

5.2. Facteurs génétiques

Des variations du simple au double sont fréquemment observées lors de comparaisons de plusieurs variétés de fruits et légumes cultivées dans des conditions identiques; mais on note également des variations beaucoup plus importantes dans certains cas. Les variations sont encore plus marquées lorsqu'on s'intéresse précisément aux molécules et non aux familles de molécules (Watzl et Rechkemmer, 2001).

5.3. Facteurs de l'environnement

Chez certains légumes, le rayonnement et la température jouent un rôle plus marqué que l'eau ou les apports de fertilisants (Schreiner, 2005). L'intensité du rayonnement a une influence prouvée sur le métabolisme des flavonoïdes. Par exemple, des légumes exposés à la lumière solaire contiennent davantage de flavonoïdes que des légumes cultivés sous ombrage (Watzl et Rechkemmer, 2001). Les effets de la température ont pu être interprétés au travers de son action sur l'activité de certaines enzymes.

5.4. Techniques culturales

Les techniques culturales ou les modes de production entraînent des variations dans le contenu en composés bioactifs mais les résultats sont souvent contradictoires et n'autorisent pas à tirer des lois générales. En l'état actuel des connaissances, aucun mode de production, biologique, intégré ou conventionnel, ne présente d'avantage ou de désavantage particulier en matière d'accumulation des composés bioactifs (Schreiner, 2005).

5.5. Transformation et conservation

Deux étapes qui sont souvent négligées alors qu'elles ont un impact majeur sont l'épluchage et le stockage car nombre des constituants ont des répartitions spécifiques, avec des concentrations accrues dans les parties externes en lien avec leurs fonctions de protection (contre les UV, les ravageurs, etc.). Les teneurs en nutriments d'intérêt à la récolte et leur évolution en cours de stockage et transformation vont différer selon les molécules concernées. Les polyphénols quant à eux sont susceptibles d'être oxydés notamment lors de la déstructuration tissulaire et avant inactivation enzymatique par des voies technologiques ou plus lentement par auto-oxydation à des pH neutres. Ils semblent cependant globalement assez stables, à l'exception des anthocyanes (Mou, 2005).

6. Localisation des composés phénoliques

La distribution des composés phénoliques chez les plantes au niveau tissulaire, cellulaire et subcellulaire n'est pas uniforme (Beckman, 2000). Les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : Les vacuoles et la paroi dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule (Bénard, 2009). Certains flavonoïdes ont même été localisés au niveau du noyau des cellules où ils pourraient directement moduler l'expression des gènes (Macheix et al., 2005). Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales (Bénard, 2009).

La localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au niveau de la plante entière, certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Les couches externes de plantes contiennent des niveaux plus élevés de composés phénoliques que ceux situés à l'intérieur (Bengoechea et al., 1997).

7. Effet de traitement thermique sur les polyphénols

La cuisson a un impact sur la teneur en polyphénols totaux des légumes secs. Cet impact s'avère positif dans la cuisson à la vapeur et négatif dans la cuisson par immersion dans l'eau bouillante. Les variations dans les pourcentages d'augmentation ou de diminution varient d'un légume à un autre et peuvent s'expliquer par la nature et la teneur des différents composés phénoliques propres à chaque légume. La diminution des teneurs en composés phénoliques totaux dans les légumes, cuits par ébullition dans l'eau, varie entre 8,07 % et 42 %. Cette diminution pourrait s'expliquer par la grande facilité avec laquelle les polyphénols solubles sont extraits des échantillons bouillis, suite à une forte fragilisation des parois cellulaires de tissus végétaux par la chaleur. La perte par éclatement cellulaire facilite la libération des polyphénols totaux et autres substances dans l'eau de cuisson (Barkat et Kadri, 2011).

En outre, Srisuma et al. (1989) (mentionner dans le texte de la référence) ont rapporté que le stockage induit « dur à cuire » haricots qui contenait des niveaux plus élevés d'acides hydroxycinnamiques que les grains de contrôle. Celles-ci les acides phénoliques fournissent des sites de réticulation de la pectine à lamelle moyenne et protéines les interactions qui peuvent entraîner des défauts de texture de soja. Il a été rapporté que le stockage à sec des haricots à des températures élevées et des résultats d'humidité dans la qualité des protéines inférieure, peut-être en raison de l'interaction des protéines avec des tanins. Sievwright et Shipe (1986) (mentionner dans le texte de la référence) ont suggéré que l'effet négatif des tanins sur la qualité de protéines de soja dépend de l'âge des haricots et leurs conditions de stockage. Ils ont trouvé que l'oxydase de phénol

poly améliore interaction protéine-tanin et que l'incidence de phénomène dur à cuire des haricots peut être réduite en trempant les fèves dans des solutions salines. Il a été émis l'hypothèse que le sel est impliqué à décomposer les liaisons hydrogène entre tanins condensés et des protéines. Le traitement thermique et la cuisson des haricots à améliorer leur texture et l'acceptabilité suite de la destruction de leurs facteurs antinutritionnels. Tremper les haricots avant la cuisson est une commune entraîne tel. Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer l'effet de la cuisson sur ces facteurs antinutritionnels de haricots. Il a été rapporté que la cuisson réduit la teneur des tanins de 30 à 40%. Par conséquent, il a été suggéré que les changements la teneur en polyphénols peuvent résulter de la liaison de composés phénoliques avec d'autres matériaux organique, ou la modification de la structure chimique des polyphénols, ce qui leur permet de donner une réaction colorée avec le réactif de Folin-Denis. Ce postulat était plus tard confirmé par les résultats des études de Bressani et al. (1982) (mentionner dans le texte de la référence) sur la partition de polyphénols pendant la cuisson des haricots (Shahidi et Naczak, 2006).

8. Activités biologiques des composés phénoliques

Les polyphénols naturels ont montré de nombreuses activités biologiques et des avantages pour la santé pour la prévention et le traitement des maladies liées à l'âge, les cancers, les maladies cardiaques...etc. et on peut citer :

8.1. Activité antioxydante des composés phénoliques

Parmi les bioactivités remarquables des composés phénoliques, les activités antioxydantes ont été largement étudiées, y compris le balayage des radicaux libres, l'inhibition de l'oxydation des lipides et la réduction de formation de l'hydroperoxyde. Le stress oxydatif imposé par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) joue un rôle important dans de nombreuses maladies chroniques et dégénératives. En tant que catégorie importante des composés phytochimiques, les composés phénoliques existent universellement dans les plantes, et ont été considérés avoir une capacité antioxydante élevée et une capacité de balayage des radicaux libres, avec le mécanisme qui inhibent les enzymes responsables de la production de ROS et réduisant les ROS hautement oxydés. Il y avait beaucoup d'expériences *in vitro* qui ont prouvé que les composés phénoliques sont généralement majeurs contributeurs des capacités antioxydantes des plantes. Les polyphénols peuvent également fonctionner comme antioxydants grâce à leurs effets sur le plasma, les membranes, des facteurs de transcription et des activités enzymatiques *in vivo*. L'activité antioxydante des extraits de romarin est principalement due aux diterpènes phénoliques et aux acides phénoliques tels que l'acide carboxylique, le camosol, le rosmadial, le genkwanin et l'acide rosmarinique. En outre, les anthocyanines sont considérées comme des composants fonctionnels

majeurs de riz pigmenté pour fournir les bioactivités, y compris les antioxydants, les anti-tumoraux, Anti-athérosclérose, hypoglycémie et antiallergiques (Li et al., 2014).

Les phénols sont généralement moins puissants que les médicaments, mais ils exercent le plus souvent leurs effets physiologiques, car ils sont largement distribués dans les aliments (Câmara et al., 2013).

Le mécanisme de travail des antioxydants polyphénoliques naturels a été résumé dans deux manières, c'est-à-dire le transfert d'atomes d'hydrogène et des électrons et l'action de chélation des ions métalliques. Beaucoup de polyphénols éliminent les radicaux libres à travers le mécanisme de transfert d'atomes d'hydrogène. Les polyphénols pourraient chélater les métaux de transition à travers leurs groupements OH et la fraction carbonyle, lorsqu'elle est présente. Les polyphénols peuvent être utilisés non seulement comme antioxydants pour préserver la santé, mais aussi comme conservateurs d'aliments dans les aliments industriels. Les extraits d'éthanol des graines de raisin et de framboises noires ont été évalués pour leur capacité pour supprimer l'oxydation des lipides, préserver les acides gras et inhiber la croissance microbienne (Li et al., 2014).

8.2. Activité antimicrobienne des composés phénoliques

De nombreux conservateurs sont ajoutés aux aliments comme des antioxydants ou des agents antimicrobiens. Les composés phénoliques sont connus pour posséder ces deux propriétés. Cependant, la nature lipophile des phénols peut réduire leurs propriétés antimicrobiennes. L'action antimicrobienne des composés phénoliques a été liée à l'inactivation des enzymes cellulaires qui dépendent de la vitesse de pénétration de la substance dans la cellule, plus tard, Judis (1963) (mentionner dans le texte de la référence) a suggéré que l'inhibition de la croissance microbienne est due à l'affaiblissement ou la destruction de la perméabilité membranaire. Par la suite, Juven et al. (1972) (mentionner dans le texte de la référence) ont démontré que les composés phénoliques provoquent des changements de perméabilité de la membrane. Ils ont montré qu'oleuropéine, un glucoside phénolique trouvé dans les olives, provoque une fuite du glutamate radiomarqué, de potassium et du phosphore à partir de *Lactobacillus plantarum* (Li et al., 2014).

8.2.1. Activité antibactérienne des composés phénoliques

La déstabilisation de la membrane externe des micro-organismes Gram-négatifs, ainsi que les interactions avec la membrane cellulaire peut être l'un des mécanismes spécifiques derrière l'action antibactérienne. *Listeria monocytogenes* est particulièrement sensible à pinosylvine. De plus, des extraits polyphénoliques de cerises aigres industrielles étaient caractérisés par la composition de polyphénol et l'activité antimicrobienne (Câmara et al., 2013).

Selon Raj et al. (2001), parmi 182 études sur les flavonoïdes, vingt-cinq ont trouvé une activité contre de nombreuses bactéries. De nombreuses préparations phytochimiques en teneur élevée en flavonoïdes ont également présenté une activité antibactérienne : exemples de ces flavonoïdes sont l'apigénine, la quercétine, 3-O -methylquercetin, différents glycosides, le kaempférol et de ses dérivés. Autres flavones (les flavones glycosides, les isoflavones, les flavanones, les isoflavanones, les isoflavans, les flavonols, les flavonols glycosides) ont démontré une activité antibactérienne (Cushnie et Lamb, 2005). L'une des actions moléculaires des tanins est la complexité avec des protéines par les forces dites non-spécifiques telles que les liaisons hydrogènes et les effets hydrophobes, ainsi que par la formation de liaisons covalentes (Stern et al., 1996).

8.2.2. Activité antifongique des composés phénoliques

Différents types de composés phénoliques, tels que l'acide férulique, l'acide gallique ou les flavonoïdes ont été prouvés soit pour stimuler ou inhiber la germination des spores et la croissance des hyphes des champignons saprotrophes. Les champignons mycorhizes peuvent être encore plus sensibles aux composés phénoliques, mais encore une fois les différents types de polyphénols peuvent avoir des effets opposés. Par exemple, la biomasse d'un mycélium des mycorhizes éricoïdes a été réduite par un mélange des acides phénoliques communs (Hättenschwiler et Vitousek, 2000). Les flavonoïdes (chrysin, isorhamnétine, kaempférol et lutéoline) ont un effet sur la croissance des champignons pré-symbiotiques (champignons mycorhizien sarbusculaires) notamment sur la germination des spores, la longueur des hyphes, la ramification des hyphes, la formation de cellules secondaires auxiliaires et les spores (*Gigasporarosea*, *G. margarita*, *Glomus mosseae* et *G. intraradices*) (Scervino et al., 2005).

Les flavonoïdes et les esters d'acides phénoliques ont été étudiés pour leur activité antifongique (Raj et al., 2001), ils ont démontré une activité inhibitrice contre *Aspergillus tamaris*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* (Cushnie et Lamb, 2005).

8.2.3. Activité antivirale des composés phénoliques

Un certain nombre de flavonoïdes présents dans les aliments d'origine végétale possèdent une activité antivirale. Quercétine, taxifolin et flavonoïdes de vin rouge peuvent inactiver un large éventail des virus et empêcher leur infectiosité. Tanins de fraises peuvent inactiver la polioentériques et virus de l'herpès. Quercétine, un aglycone flavonol trouvé dans un certain nombre de fruits comme la pomme, abricot, figue, prune, fraise et tomate, montre une activité antiviral

contre le virus de l'herpès simplex 1, le virus parainfluenza de type 3 et le virus de la poliomyélite (Shahidi et Naczk, 2006).

8.3. Activité anticancérogène des composés phénoliques

L'activité anti-cancéreuse des haricots a été principalement attribuée à leurs composés polyphénoliques. Comme indiqué précédemment, les polyphénols sont capables de protéger les lipides, les protéines et les acides nucléiques à partir de ROS que, si rien ne peut prédisposer un individu au cancer. L'apport en polyphénols a été associé à l'immobilisation des leucocytes inférieure, l'induction d'apoptose et inhibition de l'angiogenèse. Ont également discuté précédemment, les haricots pinto contiennent des niveaux élevés de RS qui agissent comme des substrats pour la fermentation bactérienne qui se traduit également par la génération AGCC. C'est la production de ces AGCC qui offrent la protection contre le cancer. Cet AGCC a été associée à un arrêt de croissance, l'apoptose et la différenciation dans plusieurs lignées cellulaires du cancer du côlon (Câmara *et al.*, 2013).



MATERIES
ET METHODES

1. Matériel végétal

1.1. Présentation des variétés d'haricot sec

Cette étude a porté sur deux variétés d'haricot sec. La première variété de couleur blanche, de taille moyenne et réniforme. La deuxième variété de couleur blanche avec une couleur noir sous forme d'une œil et de taille petite (figure 07). La variété blanche a été importée de l'Argentine et la variété blanche à l'œil noir a été importée de Madagascar. Les deux variétés ont été achetées d'un point de vente des produits alimentaires, wilaya de Jijel et stockées dans des sachets en plastique perforé de 25kg à température ambiante (tableau IV).

Le choix de ces deux variétés est fondé sur la fréquence de consommation (une grande consommation), la génétique et la différence de couleur des grains.

Tableau IV : caractéristiques des variétés d'haricots secs testés.

| produit | Origine | Poids net (kg) | emballage | Date de récolte | Date de péremption | Numéro de lot |
|----------------------|------------|----------------|---------------------|-----------------|--------------------|---------------|
| Haricot blanc | Argentine | 25kg | Sachet en plastique | 07/2014 | 07/2017 | 101-03 |
| Haricot à l'œil noir | Madagascar | 25kg | Sachet en plastique | 03/2016 | 03/2018 | 72168 |

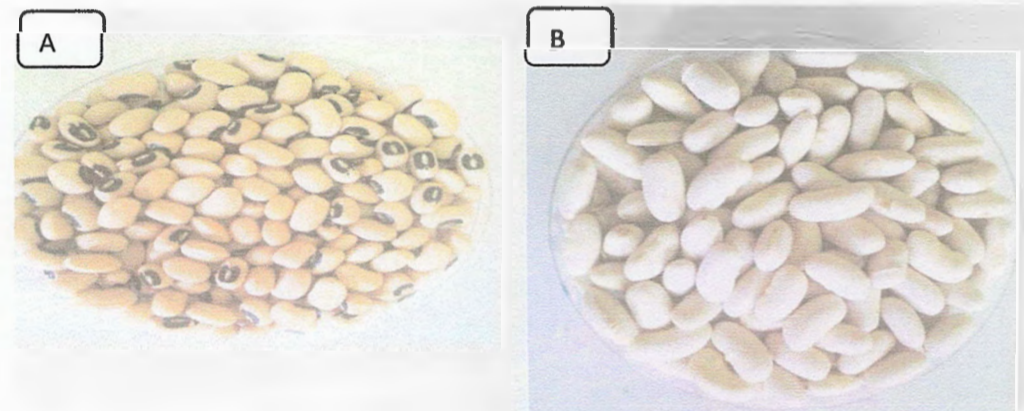


Figure 06 : Photographie des variétés d'haricots étudiés respectivement (A), l'haricot à l'œil noir et (B), l'haricot blanc.

1.2. Triage des grains

Pour chaque variété d'haricot sec, une séparation préalable à deux échantillons

- Le premier échantillon est resté à l'état cru;
- Le deuxième échantillon est cuit dans l'eau bouillante pendant 30 min (tableau V);

Tableau V : les conditions de cuisson des haricots secs.

| variété | Poids des graines (g) | Volume d'eau de cuisson (ml) | Température de cuisson (°C) | Durée de cuisson (min) |
|----------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Haricot blanc | 100 | 600 | 100 | 30 |
| Haricot à l'œil noir | 100 | 600 | 100 | 30 |

2. Matériel biologique

2.1. Origine et choix des souches bactériennes

Les trois souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa* et *Staphylococcus aureus*) choisies au cours de cette étude sont à l'origine de plusieurs infections (urinaire, intestinale, respiratoire, etc). Ces souches bactériennes ont été fournies par le laboratoire d'analyse médicale « BAKIEWA ». Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24h à 37°C. La quatrième souche *Lactobacillus subtilis*, est fournie par 'Mm BOUCHEFRA enseignante à l'université de Jijel.

2.2. Origine et choix des souches fongiques

L'activité antifongique a été évaluée sur un champignon (*Penicillium sp*), il est choisi pour son capacité à contaminer les denrées alimentaires et son pathogénicité. Le champignon utilisé dans le test est fourni par Madame « BOURZAMA » enseignante à l'université de Jijel. Il est cultivé sur le milieu nutritif PDA (*Potato Dextrose Agar*) pendant 7 jours, à 25 °C.

2.3. Choix des milieux de culture

Pour évaluer l'activité antifongique, nous avons utilisé le PDA (*Potato Dextrose Agar*) pour déterminer les taux d'inhibition, en comparant leur action à diverses concentrations sur la croissance mycélienne (Hussin et al., 2009) et pour estimer l'IA 100 (l'index antifongique 100), et sur milieu liquide, *Potato Dextrose Broth* « PDB » pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration fongicide (CF) et la concentration fongistatique (CFS) (Derwich et al., 2010).

3. Méthodes

Le plan suivi dans la méthodologie est récapitulé dans la (figure 08). Toutes les analyses ont été effectuées aux laboratoires pédagogiques de l'université Mohammed Seddik Ben Yahia- Jijel- Faculté des sciences de la nature et de la vie.

La détermination du taux d'humidité des grains d'haricots secs, l'extraction et le dosage des polyphénols totaux ont été réalisés au niveau du laboratoire pédagogique de biochimie.

Les activités antioxydante, antibactérienne et antifongique ont été réalisées au niveau du laboratoire de microbiologie pour éviter les résultats biaisés, tous les essais ont été répétés trois fois.

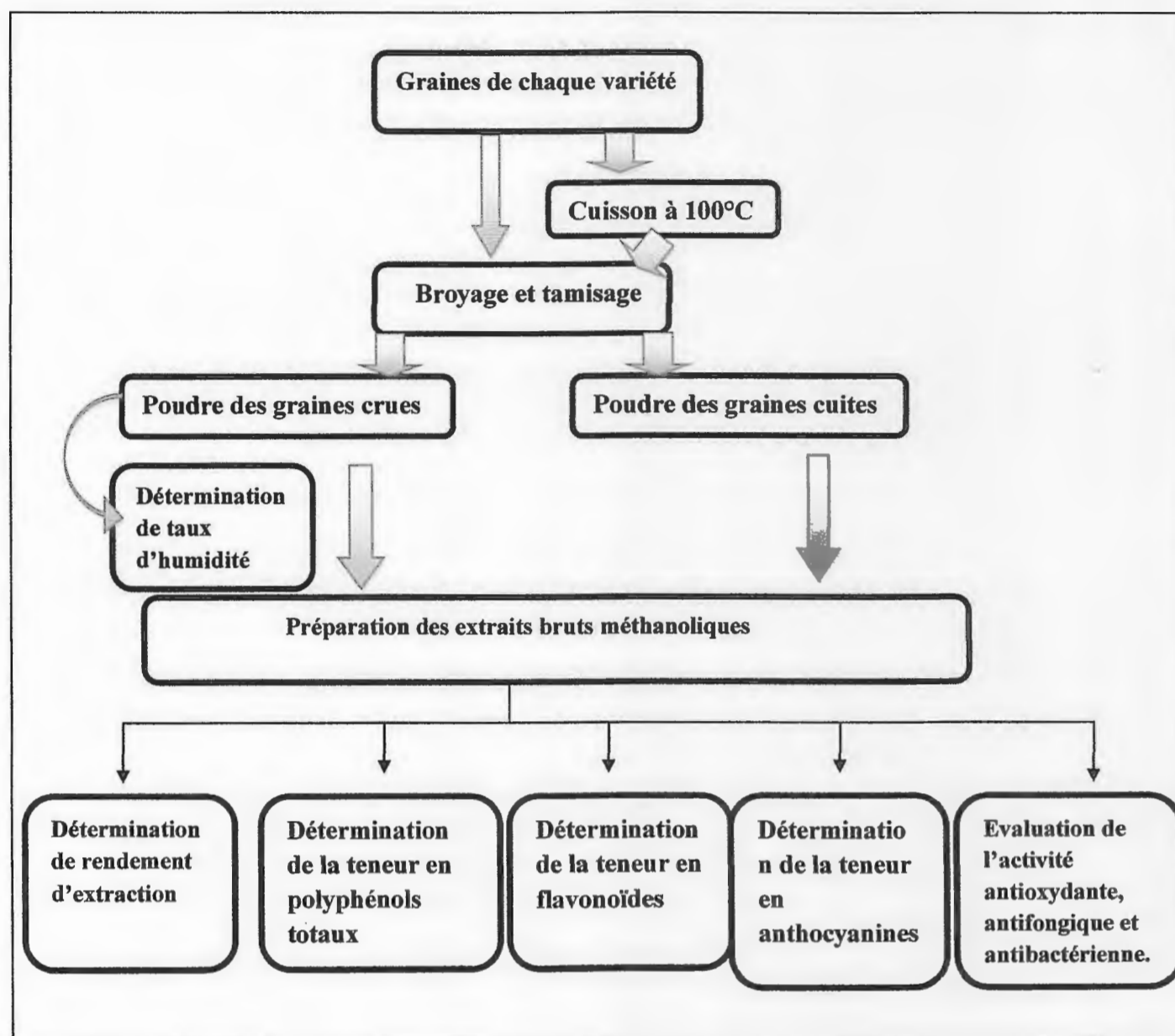


Figure 07. Représentation schématique des étapes réalisées.

3.1. Mesure du taux d'humidité des grains d'haricots secs

Le taux d'humidité de la farine issue des grains entiers d'haricots secs est déterminé par séchage à l'étuve à une température de 110°C d'une prise d'essai de 05g jusqu'à un poids constant et il est exprimé en pourcentage (François, 2004):

$$H (\%) = (M1 - M2) / M1 \times 100$$

Avec :

H (%) : Taux d'humidité exprimé en pourcentage ;

M1 : Poids de l'échantillon en gramme avant séchage ;

M2 : Poids de l'échantillon en gramme après le séchage ;

3.2. Préparation des extraits bruts méthanoliques

Les grains entiers des deux variétés d'haricot sec sont broyés à l'aide d'un broyeur Automatique Retsch GM.200 et tamisés à l'aide d'un tamis de 450 μ afin d'obtenir de la farine et d'extraire mieux les polyphénols.

L'extraction des polyphénols totaux des variétés crus et cuits d'haricot sec a été réalisée selon le protocole suggéré par **Luthria et Pastor-Corrales (2006) modifié par Mujica et al. (2009)**.

1g de la farine de chaque échantillon est solubilisé dans 25 ml Méthanol-eau 80:20 v / v acidifié avec 0,1% HCl 2N. Le mélange était laissé pendant 2 h à température ambiante, plus tard, le mélange a été centrifugé à 1800 g pendant 15 minutes, le méthanol a été décanté et le résidu a été ré-extrait avec 25 ml de méthanol frais et centrifugé une autre fois. A la fin, les surnageants sont combinés. L'extrait sec a été récupéré après une évaporation sèche (Figure 08) à l'aide d'un rota vapeur R .300 la marque BUCHI afin d'obtenir les extraits.

3.3. Mesure du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante (**Falleh et al., 2008**) :

$$R(\%) = M_{\text{extrait}} / M_{\text{échantillon}} \times 100$$

Avec :

R(%) : rendement d'extraction en pourcentage;

M_{extrait} : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg ;

M_{échantillon} : la masse sèche de l'échantillon végétal en mg ;

3.4. Dosage des polyphénols totaux (Dosage quantitative)

➤ Protocol

4 μ l de chaque extrait polyphénolique (1000ppm) mélangés avec 4 μ l de Folin ciocalteu et 12 μ l de carbonate de sodium (2%, p /v). L'absorbance du mélange a été mesurée à 760nm (à l'aide d'un spectrophotomètre de SPECORD 50) après 120 min d'incubation à température ambiante. Le blanc

est préparé pour chaque échantillon, en remplaçant nos extraits polyphénoliques par le méthanol pur 80%.

La concentration des polyphénols totaux, est calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (Annexe 01) en se basant sur des essais préalables, est exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

3.5. Dosage des flavonoïdes

La méthode au trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ a été employée pour la détermination de la teneur des extraits en flavonoïdes (Huang *et al.*, 2004).

Un millilitre et demi (1,5ml) de l'extrait phénolique 1mg/ml a été ajouté à un volume égale d'une solution de 2% $AlCl_3$. le mélange a été vigoureusement agité, et l'absorbance a été lue à 430nm, après 30minutes d'incubation à température ambiante.

Une courbe d'étalonnage ($Y = a X + b$) réalisée par la Quercétine (Annex 02) à différentes concentrations pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons a servi pour la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg équivalent Quercétine par gramme d'échantillon (Huang *et al.*, 2004).

3.6. Dosage des anthocyanes

La teneur des anthocyanes a été estimée par spectrophotomètre selon la méthode du pH différentiel, en utilisant deux solutions tampons : le chlorure de potassium (pH 1,0 ; 0,2 M) et l'acétate de sodium (pH 4,5 ; 0,4 M) (Lee *et al.*, 2005).

1g de chaque échantillon est dissout dans 10 ml de solvant (méthanol) acidifié (0,01%), la solution obtenue est incubée pendant 16 heures au réfrigérateur, puis filtrée (Reyes-Carmones *et al.*, 2005). 1 ml de chaque extrait a été ajouté à 2,4 ml de solution tampon.

L'absorbance de l'extrait a été mesurée à 510 puis à 710 nm puis déduite par l'équation :

$$A = ([A510-A710] \text{ pH } 1,0 - [A510-A710] \text{ pH } 4,5)$$

La teneur en anthocyanine a été déterminée selon l'équation :

$$C = A \cdot MW \cdot FD \cdot 4000 / \epsilon$$

C : teneur en anthocyanines (g ECy-3-Glu/g de poudre) ;

A : absorbance

MW : poids moléculaire de la cyanidine-3-glucose (449,2g/mol) ;

FD : facteur de dilution ;

ϵ : Coefficient d'extinction molaire (26900) de la cyanidine-3-glucose ;

3.7. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide (Prieto et al., 1999).

➤ Dosage

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait méthanolique (1000ppm) est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS). (Prieto et al., 1999). Le méthanol (0,3 ml) à la place de l'extrait a été utilisé comme un blanc. La courbe d'étalonnage (annex 03) a été préparée en mélangeant de l'acide ascorbique avec du méthanol.

3.8. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques

✓ Choix du solvant de récupération des extraits polyphénolique

Si les extraits phénoliques doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant de récupération peut être critiquable car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique (Yrjonen, 2004) Pour cela nous avons choisi le diméthyle « DMSO » qui est le solvant préférable par la majorité des auteurs (Toty et al., 2013). Qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir inhibiteur puissant.

3.8.1. Test de pouvoir antibactérien des extraits méthanoliques

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusions en milieu gélosé.

Le principe de cette méthode est d'utiliser des disques de papier Whatman n°1 de 6mm de diamètre. Les disques ont été imprégnés dans différentes solutions (10 mg/ml) des extraits dissous dans le DMSO (diméthylsulfoxyde). Un disque imbibé par le DMSO a été employé en tant que contrôle négatif. Ces disques sont ensuite déposés à la surface d'un milieu écouvillonné par une suspension microbienne. Nous avons utilisé pour les souches bactériennes le milieu gélose nutritive. A la fin de la durée d'incubation (18-24h) pour les souches bactériennes les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (Choi et al., 2009).

➤ **Préparation des suspensions bactériennes**

Les bactéries à tester sontensemencées sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées. A partir de ces boîtes et à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 5ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, et la densité optique lue à 625 nm est justifiée à (0.08 - 0.10). On admet que cette densité mesurée à 625 nm est équivalente à 10^8 CFU/ml (Mohammedi, 2006). L'inoculum est ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

➤ **Préparation des concentrations des extraits méthanoliques**

En se basant sur des essais préalables, une gramme de solution de concentration allant de 0,25mg /ml à 2mg/ml a été préparée dans le DMSO.

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman N°1, avec un diamètre de 6mm (0.28cm^2 de surface) par l'emporte-pièce. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

Vingt millilitres (20 ml) de la gélose nutritive en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, 100 μ l de la suspension bactérienne à tester (10^8 CFU.ml⁻¹) sont étalés en surface. Les disques imprégnés des différents extraits, sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose. Les boîtes de Pétri sont d'abord laissées pendant 1h à la température ambiante pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 (Mohammedi, 2006).

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré ;(y compris le diamètre de disque de 6mm). L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque.

❖ **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque tube. La CMI a été la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas eu de trouble observé à l'œil nu (Toty et al., 2013).

❖ Détermination de l'activité bactériostatique et bactéricide

Un prélèvement de la zone d'inhibition est transféré dans un tube contenu un bouillon cœur – cervelle qui par la suite incubé à 37 °c pendant 18 heures. Les tubes sont examinés à œil nu, un milieu trouble indique un pouvoir bactériostatique ; tandis que un milieu clair indique un pouvoir bactéricide de l'extrait (Laouer et *al.*, 2003).

3.8.2. Test du pouvoir antifongique des extraits polyphénoliques

3.8.2.1. Détermination du taux d'inhibition

Les extraits méthanoliques des grains de la variété d'haricot sec cru et cuit, la variété d'haricot sec à l'œil noir cru et cuit, solubilisés dans le DMSO, sont procédés à une dilution successive de façon à obtenir successivement les dilutions 0.25-0.5-1-2 mg/ml. Ces concentrations ont été choisies après des tests préliminaires.

Un ml de chaque extrait polyphénolique, pour chaque concentration, est ajouté dans des tubes contenant 19 ml du milieu PDA stérile encore liquide. Le mélange est homogénéisé et ramené à 45°C (Subrahmanyam et *al.* 2001). Ensuite, il est immédiatement coulé dans des boîtes de pétri de 90 mm (20ml/boite) (Satish et *al.* 2010). Après solidification de gélose, les boîtes de pétri sont partagées en deux parties (correspond au nombre de souches à tester) etensemencées par un disque mycélien, de 6 mm de diamètre pris de la culture jeune du mycète.

Le PDA sans extrait a servi de témoin pour chaque souche (Mishra et Dubey, 1994; Khallil, 2009).

Les concentrations finales en extraits polyphénoliques utilisées ont été calculées à partir de l'équation suivante :

$$CF = Ci/20$$

Avec :

Cf : concentration finale de l'extrait poly phénolique dans 1ml du PDA;

Ci : concentration initiale de l'extrait poly phénolique solubilisé dans le DMSO (Mohammedi, 2006) ;

La souche est incubée pendant 7 jours à température de 30°C (Mohammedi, 2006). Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, par comparaison au témoin, a été calculé par la formule suivante :

$$PI (\%) = (A-B) / A \times 100$$

Où :

PI(%) : Taux d'inhibition exprimé en pourcentage;

A : Diamètre de colonies dans les boîtes « témoins positifs »;

B : Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait du grain (Bajpai *et al.*, 2010).

3.8.2.2. Détermination de l'index antifongique (IA100)

La concentration qui inhibe 100% la croissance mycélienne est exprimée par l'IA100. Les valeurs de l'IA100 ont été calculées graphiquement, où, l'abscisse est représentée par la concentration de l'extrait polyphénolique et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition de la croissance des moisissures (Chang *et al.*, 2008).

3.8.2.3. Méthode de dilution en milieu liquide

Cette technique comporte deux étapes, la première permettant de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMIs) et la seconde permettant de déterminer les concentrations fongicide (CF) et fongistatique (CFS).

➤ Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMIs)

Après sporulation de la souche fongique choisie (ensemencées sur 20 ml de PDA dans des boîtes de pétri), les spores de la culture jeune sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée stérile sous agitation (Solis-Pereira *et al.*, 1993). Après, on procède à une évaluation de l'absorbance (lecture à une longueur d'onde de 625 nm) de la suspension fongique; cette évaluation est effectuée dans le but de standardiser la suspension de spores à 10⁶ spores/ml (Hossain *et al.*, 2008). On estime qu'une absorbance comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de 10⁶ spores/ml (Braga *et al.*, 2007).

Les extraits polyphénoliques des grains de la variété blanche (cru et cuit), la variété à l'œil noir (cru et cuit), solubilisés dans le DMSO, sont ajoutés au PDB à raison de 1ml dans 9 ml. On procède ensuite à une dilution successive de PDB au préalable de façon à obtenir successivement les dilutions 0.25-0.5-1-2 mg/ml. Ces concentrations ont été choisies après des tests préliminaires.

Une suspension de spores de 10 µl de souche fongique à tester a été inoculée dans les tubes à essai contenant le milieu PDB à différentes concentrations; ces tubes sont incubés pendant 7 jours à 30°C. En parallèle, un tube contenant le milieu PDB a été inoculé seulement avec la suspension fongique de spore, il va servir de témoin. Les concentrations minimales pour lesquelles aucune croissance évidente n'a été observée, sont définies comme des concentrations minimales inhibitrices (Bajpai *et al.*, 2008).

➤ Détermination des concentrations fongicide (CF) et fongistatique (CFS)

Pour les tubes dans lesquels aucune croissance n'est constatée, on poursuit l'expérimentation dans des boîtes de pétri. Chaque boîte contenant 20ml de PDA stérile est inoculée avec 10µl de

chaque tube présentant une inhibition totale de la croissance fongique. Le suivi de la croissance est effectué pendant 1 à 4 jours à une température de 30°C. Lorsqu' il n'y a aucune reprise de croissance; les concentrations sont dites fongicides (CFs) (Zarrin *et al.*, 2010) et les concentrations pour lesquelles il y a croissance sont dites fongostatiques (CFSs) (Bajpai *et al.*, 2008).

3.9. Traitement statistique

Pour chaque test, les moyennes plus ou moins l'écart type des trois essais ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Excel 2007. Les résultats obtenus ont été traités par deux analyses indépendantes (avec un seuil de $p \leq 0,05$) à l'aide de logiciel (IBMSPPSS2016) fourni par Mr Khannouf enseignant à l'université de Jijel.

RESULTATS
ET DISCUSSION

1. Taux d'humidité des échantillons d'haricot sec

Les taux d'humidité révélés varient entre 11,20% et 11,30%. Ils sont équivalents à $11,20 \pm 0,28\%$, $11,30 \pm 0,42\%$, respectivement pour la variété blanche et à l'œil noire (Figure 08).

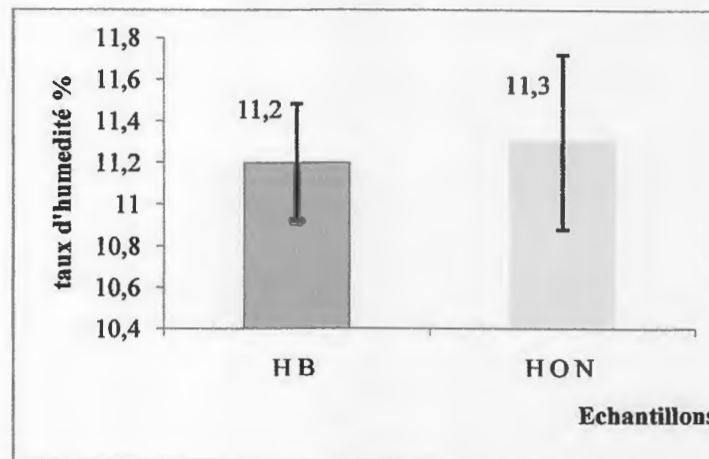


Figure 08. Taux d'humidité des échantillons d'haricot blanc (HB) et d'haricot à l'œil noir (HON).

La variété à l'œil noire présente le taux d'humidité le plus élevé ($11,30 \pm 0,42\%$) par rapport à celui de la variété blanche ($11,20 \pm 0,28\%$). L'analyse de la variance montre une absence de différence significative variétale ($\alpha=0,05\%$) (Tableau VI).

Tableau VI. Analyse des différences par le test de Tukey entre les variétés d'haricot sec pour le taux d'humidité ($p \leq 0,05$).

| Variétés | Moyenne estimée |
|-------------------------|--------------------|
| Le haricot à l'œil noir | 11,30 ^a |
| Le haricot blanc | 11,20 ^a |

La même lettre signifie absence de différence significative

Dans leur globalité, ces résultats indiquent que, les teneurs en eau des échantillons, comprises entre ($11,30 \pm 0,42\%$) et ($11,20 \pm 0,28\%$) correspondent à la norme requise pour le stockage des grains qui est de 10 à 15% (Borget, 1989). Aussi sont en parallèle à ceux signalés par Aykroyd et Doughty (1982) et Veriling (1999) qui ont cité des taux d'humidité des légumineuses compris entre 11% et 13%.

Dans les aliments, l'eau se présente sous deux formes: l'eau libre et l'eau liée. Lors de la maturation, les graines subissent une forte déshydratation au cours de laquelle l'eau libre s'évapore tandis que l'eau liée adhère dans les graines (Multon, 1982). C'est cette « eau liée » qui devrait rester après le séchage. Les teneurs faibles en eau présentent des avantages sur la durée de stockage

en permettant une longue conservation par l'inhibition de la prolifération des microorganismes susceptibles d'altérer le produit, sur la diminution de la vitesse d'oxydation et de l'activité enzymatique (Combe 1991).

2. Rendement d'extraction

Les extraits secs récupérés après évaporation, ont été pesés pour déterminer le rendement d'extraction (tableau VII).

Tableau VII. Rendement moyen en extrait sec exprimé en g.

| Variété Echantillon | haricot blanc | | haricot à l'œil noir | |
|----------------------------------|---------------|-------------|----------------------|------------|
| | cru | cuit | cru | cuit |
| Rendement moyen des Echantillons | 14,5 ±0,513 | 13,25 ±0,25 | 12,5 ±0,3 | 11,20 ±0,2 |

Le rendement d'extraction est plus élevé dans grains crus des deux variétés par rapport aux grains cuits ce qui correspond (14,5 ±0,5%), (13,25 ±0,25%), (12,5 ±0,3%), (11,20 ±0,2%) respectivement pour la variété haricot blanc cru (HB cru), haricot blanc cuit (HB cuit), haricot à l'œil noir cru (HON cru), haricot à l'œil noir cuit (HON cuit)

Par ailleurs, l'analyse de la variance montre qu'il y a différence significative ($p \leq 0.05$) entre les rendements en extrait sec des variétés analysées; celles-ci ont été rassemblées en deux groupes différents (Tableau VIII).

Tableau VIII. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les variétés analysées pour le rendement en extrait sec ($p \leq 0.05$).

| Variété | Moyenne estimée |
|----------------------|--------------------|
| Haricot blanc | 13,88 ^a |
| Haricot à l'œil noir | 11,85 ^b |

La même lettre signifie absence de différence significative

Sur le plan intra-variétal (échantillon cru et échantillon cuit de la même variété), l'analyse de la variance montre présence de différences significatives pour le rendement moyen en extrait sec.

Sur le plan inter-variétal, l'analyse de la variance ne montre aucune différence significative pour les différents échantillons crus entre eux et cuits entre eux et différence significatives ($p \leq 0.05$) entre l'échantillon cru de la variété blanche et l'échantillon cuit de la variété à l'œil noir, l'échantillon cuit de la variété blanche et l'échantillon cru de la variété à l'œil noir (Tableau IX).

Tableau IX. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les échantillons cru et cuit) des variétés analysées pour le rendement en extrait sec ($p \leq 0.05$).

| Variété | Moyenne estimée | |
|--------------------|-------------------|--------------------|
| | Echantillons cru | Echantillons cuit |
| Haricot blanche | 14,5 ^a | 13,25 ^b |
| Haricot l'œil noir | 12,5 ^c | 11,20 ^d |

La même lettre signifie absence de différence significative

3. Teneurs en polyphénols totaux d'haricots secs

La courbe d'étalonnage obtenue, en prenant l'acide gallique à différentes concentrations comme standard, (Annexe 01), montre la linéarité de la réponse du détecteur en fonction des différentes concentrations. Le choix de ce modèle de représentation est fondé sur la méthodologie de plusieurs auteurs, notamment Mujica *et al.* (2009).

En se basant sur les valeurs d'absorbance des extraits polyphénoliques, réagissant avec le réactif de Folin-Ciocalteu, et comparées à la solution standard d'acide gallique, les résultats de l'analyse quantitative des composés phénoliques totaux sont donnés dans le tableau X.

Tableau X. Teneur en polyphénols totaux des extraits (mg EAG/g).

| Echantillons | Quantité des phénols totaux (mg EAG/g) | Moyenne (mg EAG/g) |
|------------------------------------|--|--------------------|
| Haricot blanc cru (HB cru) | 1,43±0,23 | 1,42±0,17 |
| Haricot blanc cuit (HB cuit) | 1,42±0,12 | |
| Haricot l'œil noir cru (HON cru) | 1,40±0,13 | 1,44±0,17 |
| Haricot l'œil noir cuit (HON cuit) | 1,48±0,20 | |

Les résultats enregistrés ci-dessus montrent qu'il y'a un effet variétal, la variété à l'œil noire est plus riche en polyphénols totaux (1,44±0,17mg EAG/g) par rapport à la variété blanche (1,42±0,17mg EAG/g). L'analyse de la variance entre les deux variétés étudiées montre une absence de différence significative ($\alpha=0.05\%$).

En ce qui concerne l'état, la variété d'haricot blanc à l'état cru représente une teneur en polyphénols totaux plus importante (1,43±0,23mg EAG/g) par rapport à celle de l'état cuit (1,42±0,12 mg EAG/g), et la variété à l'œil noir à l'état cru représente une faible teneur moyenne en polyphénols (1,40±0,13 mg EAG/g) par rapport à celle de l'état cuit (1,48±0,20 mg EAG/g) avec absence de différence significative intra variétale ($\alpha=0.05\%$).

L'analyse de la variance (ANOVA) ne montre aucune différence intra-variétale significative ($p \leq 0,05\%$) sur le plan quantité de polyphénols entre le lot cru et le lot cuit de la variété à l'œil noir. A l'inverse, la variété blanche indique une absence de différence intra-variétale significative entre les deux lots ($p \leq 0,05\%$) (Tableau XI).

Tableau XI. Analyse des différences par le test de Tukey entre les échantillons d'haricot sec pour la teneur en polyphénols totaux ($p \leq 0,05$).

| Echantillons | Moyenne estimée | |
|--------------------|------------------------|------------------------|
| | Echantillons cru | Echantillons cuit |
| Haricot blanc | 1,43±0,23 ^a | 1,42±0,12 ^a |
| Haricot l'œil noir | 1,40±0,13 ^a | 1,48±0,20 ^a |

Les valeurs indiquent que 37,4 à 66,7% des polyphénols totaux de haricots crus est restée dans les haricots cuits et que les eaux de cuisson contenait moins de 20% de polyphénols totaux. Cependant, 17,8 à 50,9% des polyphénols totaux n'ont pas été pris en compte; ces polyphénols étaient probablement impliqués dans la formation de complexes insolubles avec des protéines ou d'autres composés. La teneur en tanins de haricots peut être réduite par l'enlèvement de coques ou de trempage (Shahidi et Naczk., 2006).

Quant à la différence variétale, la même constatation a été faite par Laparra *et al.* (2008); Ying Tan *et al.* (2008); Xu et Chang (2009), où les haricots secs colorés se sont avérés plus riches en polyphénols que les haricots secs blancs. La contribution des composés phénoliques à la pigmentation des aliments végétaux est également bien reconnue. Entre autres les glycosides flavonols, les tanins et les anthocyanes sont responsables pour la couleur de tégument de la graine dans les haricots secs (Shahidi et Naczk, 2006). Cette différence est due probablement aux anthocyanines, groupe de colorants hydrosolubles bien connus, qui contribue de manière significative à la coloration des grains (Horbowicz *et al.*, 2008).

Quel que soit la variété, les résultats variables ont été relevés, la cuisson dans l'eau semble avoir un impact négatif sur la teneur en polyphénols totaux pour le haricot blanc; tandis que un effet positif sur la teneur en polyphénols totaux de le haricot à l'œil noire.

La teneur en polyphénols peut résulter de la liaison de composés phénoliques avec d'autres matériaux organiques, ou la modification de la structure chimique des polyphénols. Ce postulat était plus tard confirmé par les résultats de Bressani *et al.* (1982) (mentionner dans le texte de la référence) sur la partition de polyphénols pendant la cuisson des haricots. Les valeurs indiquent que 37,4 à 66,7% des polyphénols totaux de haricots crus est restée dans les haricots cuits

et que les l'eau de cuisson contenait moins de 20% de polyphénols totaux. Le trempage des haricots ailés dans l'eau permet de réduire la teneur en tanins par 34 et 67,5% après 6 h et 24 h de traitement, respectivement. L'enlèvement additionnel de tégument eau après trempage en outre réduit la teneur en tanins dans les haricots ailés et les haricots secs (*Phaseolus vulgaris* L.). Réduction substantielle contenu tannin peut être obtenu par un traitement chimique des haricots: trempage des haricots ailés en une solution d'hydroxyde de sodium pendant 6 h réduit leur teneur en tanin de 63%, tandis que le traitement de 24 h de fèves avec 2% de KOH aqueux supprime environ 87,2% de leurs tanins (Shahidi et Naczki., 2006).

Cette diminution pourrait s'expliquer par la grande facilité avec laquelle les polyphénols solubles sont extraits des échantillons bouillis, suite à une forte fragilisation des parois cellulaires de tissus végétaux par la chaleur. La perte par éclatement cellulaire facilite la libération des polyphénols totaux et autres substances dans l'eau de cuisson ce qui contribuerait à la diminution des teneurs des polyphénols. Les variations dans les pourcentages d'augmentation ou de diminution varient d'un légume à un autre et peuvent s'expliquer par la nature et la teneur des différents composés phénoliques propres à chaque légume (Barkat et Kadri, 2011).

Selon Mittal et al., (2012), la réduction de la teneur en polyphénols pendant le traitement thermique est probablement en raison de leur nature thermolabile et leur complexation avec d'autres substances hydrosolubles. Cette perte pourrait être due aux liaisons hydrogène phénoliques existant entre le groupe hydroxyle des composés phénoliques et les groupes de récepteurs qui forment ensemble des complexes. Plusieurs auteurs ont supposé que la diminution apparente en polyphénols pendant la cuisson n'est pas due à une diminution réelle en polyphénols, mais à un changement de la solubilité ou de la réactivité avec des composés chimiques.

4. Teneurs en flavonoïdes des haricots secs

La courbe d'étalonnage obtenue, en prenant Quercétine à différentes concentrations comme standard, (Annexe 02), montre la linéarité de la réponse du détecteur en fonction des différentes concentrations.

La teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques en termes d'équivalent Quercétine (EQ) est de (0,45±0,009 mg EQ/g), (0,22±0,04 mg EQ/g), (0,49±0,03 mg EQ /g), (0,26±0,02 mg EQ /g) respectivement pour les extraits des variétés haricot blanc cru (HB cru) et cuit (HB cuit), haricot à l'œil noir cru (HON cru) et cuit (HON cuit) (Tableau XII).

Tableau XII. Teneur en flavonoïdes des extraits d'haricots secs (mg EQ/g).

| Echantillons | Quantité des flavonoïdes (mg EQ/g) | Moyenne (mg EQ/g) |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| Haricot blanc cru (HB cru) | 0,45±0,009 ^a | 0,34±0,02 ^g |
| Haricot blanc cuit (HB cuit) | 0,22±0,04 ^b | |
| Haricot l'œil noir cru (HON cru) | 0,49±0,03 ^c | 0,38±0,02 ^h |
| Haricot l'œil noir cuit (HON cuit) | 0,26±0,02 ^d | |

La même lettre signifie absence de différence significative.

D'après les résultats trouvés, nous constatons que la variété à l'œil noir contient une teneur en flavonoïdes plus élevée (0,38±0,02mg EQ/g) par rapport à celle de la variété blanche (0,34±0,02mg EQ/g). L'analyse de la variance entre les deux variétés étudiées montre une différence significative ($\alpha=0.05\%$).

De la même manière, la teneur en flavonoïdes de la variété blanche crue (0,45±0,009mg EQ/g) s'est révélée plus remarquable par rapport à celle de la variété blanche cuite (0,22±0,04mg EQ/g). L'analyse de la variance entre les deux variétés montre une différence significative ($\alpha=0,05$).

Les valeurs obtenues dans la présente étude sont différents de celles rapportées par **Ombra et al., (2016)**, qui sont (58,731 ± 2,471 EQ/g), (50,992 ± 4,804 mg EQ/g) dans les haricots blancs analysés (*Dente de Morto*) respectivement, cru et cuit. Cette différence est due à la méthode d'extraction, les variétés étudiées et aussi le mode de cuisson.

On remarque aussi que la variété à l'œil noire crue contient une teneur en flavonoïdes plus élevée (0,49±0,03EQ/g) par rapport à celle de la variété à l'œil noir cuite (0,26±0,02mg EQ/g). L'analyse de la variance entre les deux variétés étudiées montre une différence significative ($\alpha=0.05\%$).

D'après Ombra et al., (2016) Il faut signaler que la teneur en flavonoïdes dans tous les échantillons crus est supérieure à celle des échantillons cuits. Ces composés étant particulièrement abondant dans les haricots colorés, avec une tendance très importante, Les extraits de haricots blancs ont montré une faible teneur en flavonoïdes.

En effet, en se référant à la littérature, les flavonoïdes peuvent exister sous forme d'hétérosides dans lesquels un ou plusieurs groupements hydroxyle sont combinés à des sucres, la

présence de cette fraction osidique rend les flavonoïdes très solubles dans l'eau ce qui explique les résultats relatifs aux flavonoïdes.

Selon Makris et Rossiter (2001) et Renard (2005), la cuisson dans l'eau bouillante est la moins efficace quant à l'augmentation des composés phénoliques cela est due à la solubilisation des polyphénols dans l'eau de cuisson lors de ce type de traitement thermique.

5. Teneurs en anthocyanines des haricots secs

Les valeurs moyennes de la teneur en anthocyanines des variétés d'haricots blanc et à l'œil noir dans les deux états cru et cuit sont récapitulées dans le (Tableau XIII).

Tableau XIII. Teneur en anthocyanines des extraits d'haricot (g ECy-3-Glu/g de poudre).

| Echantillons | Quantité des anthocyanines (g ECy-3-Glu/g de poudre). | Moyenne (g ECy-3-Glu/g de poudre). |
|--------------------------------------|---|------------------------------------|
| Haricot blanc cru (HB cru) | 0,94±0,25 ^a | 0,64±0,16 ^c |
| Haricot blanc cuit (HB cuit) | 0,34±0,06 ^b | |
| Haricot l'œil noir cru (HON cru) | 2,09±0,57 ^c | 1,24±0,33 ^f |
| Haricot à l'œil noir cuit (HON cuit) | 0,39±0,09 ^d | |

La même lettre signifie l'absence de différence significative ($\alpha=0.05\%$).

D'après le tableau, il ressort que la teneur en anthocyanines de la variété blanche crue (0,94±0,25g ECy-3-Glu/g de poudre) est plus élevée par rapport à celle de la variété blanche cuite (0,34±0,06g ECy-3-Glu/g de poudre). La comparaison entre les deux variétés révèle une différence significative ($\alpha=0.05\%$).

La teneur en anthocyanine d'haricot à l'œil noir cru (2,09±0,57gECy-3-Glu/g de poudre) est plus importante par rapport à l'haricot à l'œil cuit (0,39±0,09gECy-3-Glu/g de poudre). La comparaison entre les deux variétés révèle une différence significative ($\alpha=0.05\%$).

Les valeurs obtenues dans la présente étude sont différents de celles rapportées par Ombra et al., (2016) qui sont nulles dans les haricots blancs analysés (cru et cuit)(0 g ECy-3-Glu/g). Cette différence est due à la méthode d'extraction, les variétés étudiées et aussi la mode de cuisson.

Concernant les deux variétés étudiées, l'extrait d'haricot à l'œil noir a montré une haute teneur en anthocyanines ($1,86 \pm 1,74$ g ECy-3-Glu/g de poudre) suivi par le haricot blanc ($0,79 \pm 1,4$ g ECy-3-Glu/g de poudre). L'analyse de la variance entre les deux variétés étudiées montre une différence significative ($\alpha=0.05\%$).

Ces composés étant particulièrement abondant dans les haricots colorés, avec une tendance très importante, Les extraits des haricots blancs ont montré une faible teneur en anthocyanines (nulle) (Ombra et al., 2016). La teneur en anthocyanine varie de manière importante selon les variétés et selon le solvant d'extraction.

6. Activité antioxydante des extraits méthanoliques

La courbe d'étalonnage obtenue, en prenant l'acide ascorbique à différentes concentrations comme standard (Annexe 03), montre la linéarité de la réponse du détecteur en fonction des différentes concentrations. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/g MS) (Prieto et al., 1999).

Les valeurs de l'activité antioxydante varient entre $14,52 \pm 0,89$ et $6,59 \pm 1,26$ mg EAA/g MS. Elles sont équivalentes à $6,79 \pm 1,26$ mg EAA/g MS, $9,57 \pm 0,98$ mg EAA/g MS, $6,59 \pm 0,36$ mg EAA/g MS et $14,52 \pm 0,89$ mg EAA/g MS respectivement pour les haricots blanc cru (HB cru), et cuit (HB cuit), haricot à l'œil noire cru (HON cru) et cuit (HON cuit) (Tableau XIV).

Tableau XIV. Activité antioxydante des extraits des deux variétés d'haricots secs crus et cuits dans l'eau.

| Echantillons | Capacité antioxydante totale (mg EAA /g MS) | Moyenne (mg EAA/g MS) |
|--------------------------------------|---|-----------------------|
| Haricot blanc cru (HB cru) | $6,79 \pm 1,26^a$ | $8,18 \pm 1,12^c$ |
| Haricot blanc cuit (HB cuit) | $9,57 \pm 0,98^b$ | |
| Haricot l'œil noir cru (HON cru) | $6,59 \pm 0,36^c$ | $10,55 \pm 0,62^f$ |
| Haricot à l'œil noir cuit (HON cuit) | $14,52 \pm 0,89^d$ | |

La même lettre signifie l'absence de différence significative.

Les résultats obtenus indiquent que la capacité antioxydante d'haricot blanc cuit ($9,57 \pm 0,98$ mg EAA/g MS) est plus importante à celle d'haricot blanc cru ($6,79 \pm 1,26$ mg EAA/g MS). La comparaison entre les deux cas révèle une différence significative ($\alpha=0,05$).

Le haricot à l'œil noir cuit a révélée une capacité antioxydante ($14,52 \pm 0,89$ mg EAA/g MS) plus élevée à celle d'haricot à l'œil noire cru ($6,59 \pm 0,36$ mg EAA/g MS). La comparaison entre les deux cas révèle une différence significative ($\alpha=0,05$).

Concernant les deux variétés d'haricots étudiés, le haricot à l'œil noir a enregistré une capacité antioxydante ($10,55 \pm 0,62$ mg EAA/g MS) plus importante que la variété blanche ($8,18 \pm 1,12$ mg EAA/g MS). L'analyse de la variance montre une différence significative ($\alpha=0,05$) entre les deux variétés.

Les résultats obtenus indiquent que les valeurs d'activité antioxydante sont affectées d'une façon variable selon les variétés des haricots secs considérés et la cuisson.

En se référant à l'état cru, l'activité antioxydante a été augmentée lors de la cuisson dans l'eau des deux variétés d'haricot blanc et à l'œil noire. La comparaison entre les deux variétés révèle une différence significative ($\alpha=0,05$).

En effet, l'activité antioxydante des composés phénoliques des légumineuses est liée à la structure des composés phénoliques (Decker, 1997) et à la position et au du degré d'hydroxylation (Riz-Evans et al., 1997).

La cuisson conduit à des modifications de la quantité de polyphénols, mais elle peut également modifier la structure des polyphénols, ce qui pourrait affecter la capacité antioxydante (Makris et Rossiter, 2001).

7. Test du pouvoir antibactérienne

L'activité antibactérienne s'est manifestée par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques imprégnés de principes actifs. Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne des extraits polyphénoliques sont présentés dans le tableau XV.

Tableau XV: Activité antibactérienne des extraits polyphénoliques sur milieu Mueller-Hinton des quatre souches bactériennes.

| Souche bactérienne | C(mg/ml) | Les moyennes des zones d'inhibition en mm | | | | | |
|-------------------------------|----------|---|--------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|----------------------|
| | | Haricot blanc cru (HB cru) | Haricot blanc cuit | Haricot à l'œil noir cru | Haricot à l'œil noir cuit | haricot blanc | Haricot à l'œil noir |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 2 | 24±1,41 | 21,5 ±2,12 | 22 ±1,41 | 13,5 ±2,12 | 22,75± 1,76 | 17,75±1,76 |
| | 1 | 13,5 ±2,12 | 13,5 ±4,94 | 16 ±1,41 | 10,5 ±0,70 | 13,5± 3,53 | 13,25±1,05 |
| | 0,5 | 11,5 ±2,12 | 8,5 ±0,70 | 11,5 ±0,70 | 8,5 ±0,70 | 10 ± 1,41 | 10±0,7 |
| | 0,25 | 7,5 ±2,12 | 6 ±1,41 | 7 ±2,82 | 3,5 ±2,12 | 6,75±1,76 | 5,25±2,47 |
| <i>Lactobacillus Subtilis</i> | 2 | 28 ±1,41 | 24 ±1,41 | 16,5 ±2,12 | 22 ±2,82 | 26 ±1,41 | 19,25±2,47 |
| | 1 | 23 ±2,82 | 18,75±1,06 | 14,5 ±2,12 | 18,5 ±2,12 | 20,87 ±1,94 | 16,5± 2,12 |
| | 0,5 | 18 ±2,82 | 11 ,9±0,84 | 12 ±2,82 | 15 ±5,65 | 14,95 ±1,83 | 13,5±4,23 |
| | 0,25 | 12,5 ±3,53 | 8,5 ±2,12 | 7,5 ±3,53 | 0,95 ±0,21 | 10,5 ±2,82 | 4,22 ±1,87 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2 | 14±1,41 | 18±2,82 | 19±1,41 | 15±1,41 | 16 ±2,11 | 17±1,05 |
| | 1 | 10,5±0,70 | 13±1,41 | 15,5±0,70 | 12±1,41 | 11,75± 1,05 | 13,75±1,05 |
| | 0,5 | 7±1,41 | 11±1,41 | 11,5±2,12 | 8,5±2,12 | 9±1,41 | 10±2,12 |
| | 0,25 | 4±1,41 | 9±1,41 | 8±1,41 | 7±2,82 | 6,5± 1,41 | 7,5± 2,11 |
| <i>Escherichia coli</i> | 2 | 27±1,41 | 17±1,41 | 15±1,41 | 15,5±0,70 | 22± 1,41 | 15,25± 2,11 |
| | 1 | 18±2,82 | 14±1,41 | 11±1,41 | 10,5±2,12 | 16± 2,11 | 10,75± 1,76 |
| | 0,5 | 12,5±2,21 | 10,5±0,70 | 9,5±0,70 | 8,5±2,12 | 11,5 1,45 | 10± 1,41 |
| | 0,25 | 10,5±2,12 | 8±1,41 | 3±1,41 | 4±1,41 | 9,25± 1,76 | 3,5 ±1,41 |

Le tableau montre clairement qu'il y a une grande variabilité dans les résultats obtenus. Les souches bactériennes utilisées ont réagi plus ou moins bien selon la nature et la concentration du produit végétal, les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 3 et 28mm.

On constate que la concentration 2mg/ml à présenter les plus importants valeurs des zones d'inhibition à celles des autres concentrations comme suit : Les valeurs des zones d'inhibition à 2mg/ml>les valeurs des zones d'inhibition à 1mg/ml>les valeurs des zones d'inhibition à 0,5mg/ml>les valeurs des zones d'inhibition à 0,25mg/ml pour toutes les souches bactériennes et les deux variétés d'haricots à l'état cru et cuit.

Les résultats obtenus indiquent que les moyennes des zones d'inhibition des deux variétés (blanc et à l'œil noir) à l'état cru sont révélés plus importantes à celle de l'état cuit.

Concernant les deux variétés d'haricots étudiées, l'extrait d'haricot blanc a montré des hautes moyennes des zones d'inhibition à celle d'à l'œil noir. La comparaison entre les deux cas révèle une différence significative ($\alpha=0,05$).

Les tests montrent une grande hétérogénéité dans les résultats. Les quatre souches *Escherichia coli* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus*

ATCC29213 et *Lactobacillus subtilis* semblent être plus sensibles aux deux concentrations (2mg/ml et 1mg/ml). Les valeurs des zones d'inhibition sont comprises entre (9,25± 1,76 et 22± 1,41mm), (6,5± 1,41 et 16 ±2,11mm), (6,75± 1,76 et 22,75± 1,76mm) et (10,5 ±2,82 et 26 ±1,41mm) pour le haricot blanc et (3,5 ±1,41 et 15, 25± 2,11mm), (7,5± 2,11 et 17± 1,05), (5,25± 2,47 et 17,75± 1,76) et (4,22 ±1,87 et 19,25± 2,47) pour le haricot à l'œil noir respectivement pour *Escherichia coli* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 et *Lactobacillus subtilis*.

En appuyant sur les résultats précédents, il s'est avéré que les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC29213 et *Lactobacillus subtilis*.) étaient plus sensibles à différentes concentrations des extraits utilisés que celles à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853).

Les polyphénols ont été mis en évidence le potentiel antibactérien, antifongique et activités antivirales. Alvarez-Suarez *et al.* 1993 (mentionner dans le texte de la référence) ont analysé plusieurs miels cubains pour déterminer leur phénolique totale, flavonoïde, l'acide ascorbique, l'acide aminé, de la protéine et la teneur en caroténoïdes ainsi que leurs capacités antimicrobiens. L'activité antimicrobienne a été criblée par deux bactéries Gram-positives et Gram-négatives. *Staphylococcus aureus* est le micro-organisme le plus sensible tandis que *Pseudomonas aeruginosa* était le moins sensible micro-organisme. *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* ont tous deux été modérément sensible (Li *et al.*, 2014).

Le pouvoir antibactérien est plus ou moins important selon la nature de la souche, la variété et l'état de la variété soit cru ou cuit.

Du fait que la principale cible de ces composés naturels est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes (Rhayour, 2002). Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes (Ulanowska *et al.*, 2006). Les flavonoïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort (Rhayour, 2002).

Selon Bernheim (1972) (mentionner dans le texte de la référence), les changements dans la perméabilité de la membrane cellulaire peuvent être dus à l'interaction avec des phénols composants les phospholipides des membranes. Davidson et Branen (1980 a, b) (mentionner dans le texte de la référence) ont proposé que la rupture des membranes cytoplasmiques est partiellement

responsable de l'action inhibitrice de l'hydroxyanisolebutylé (BHA) sur *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas fragi*. De plus, ils ont émis l'hypothèse que le BHA peut également affecter l'activité liée à la cellule de systèmes enzymatiques (Shahidi et Nacz, 2006).

7.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) doivent être calculées dans le but de définir l'efficacité antibactérienne des extraits polyphénoliques. Les résultats sont configurés dans le la le tableau XVI.

Tableau XVI: Résultats de CMI des bactéries à Gram-négatif et Gram positif (mg/ml).

| Souche bactérienne | Haricot blanc cru | Haricot blanc cuit | Haricot à l'œil noir cru | Haricot à l'œil noir cuit |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 0,5 | 1 | 0,25 | 0,5 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0,25 | 1 | 0,5 | 0,25 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0,125 | 0,5 | 0,25 | 0,5 |
| <i>Lactobacillus Subtilus</i> | 0,125 | 0,25 | 0,25 | 0,5 |

La concentration minimale inhibitrice (CMI), définie comme la plus basse concentration de polyphénols qui a eu comme conséquence l'inhibition complète de la croissance des bactéries, est comprise entre 0,125 à 0,5 mg/ml pour les extraits polyphénoliques d'haricot blanc cru et entre 0,25 à 1 mg/ml pour les extraits polyphénoliques d'haricot blanc cuit et entre 0,25 à 0,5 mg/ml pour les extraits polyphénoliques d'haricot à l'œil noir cru et cuit. Les souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Lactobacillus Subtilus*) se sont les plus sensibles aux extraits polyphénoliques étudiés notamment à ceux d'haricot blanc cru (0,125mg/ml) suivi par le haricot à l'œil noir cru par rapport à celle des Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*).

En suivant la variété, les extraits d'haricot blanc présentent une grande sensibilité par rapport aux extraits de la variété à l'œil noir et pour l'état de la variété, les extraits des deux variétés à l'état cru présentent une grande sensibilité par rapport aux extraits des deux variétés cuits.

7.2. Détermination de l'activité bactéricide et bactériostatique

❖ Activité bactériostatique

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès

que la substance disparaît. L'effet bactériostatique est évalué par la concentration minimale inhibitrice.

❖ **Activité bactéricide**

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'extraits utilisées *in vivo* ou *in vitro*; s'il persiste moins de 0.01% de survivants après 18 h de culture en présence d'antibiotique.

Les résultats de l'activité bactéricide et bactériostatique des quatre souches bactériennes *Escherichia coli* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Lactobacillus subtilis* sont indiqués dans le tableau XVII.

Tableau XVII: Résultats de l'activité bactéricide et bactériostatique des quatre souches bactériennes.

(+) : présence de trouble bactériostatique, (-) : absence de trouble bactéricide.

| Souches bactériennes | Haricot blanc cru (HB cru) | Haricot blanc cuit (HB cuit) | Haricot à l'œil noir cru (HON cru) | Haricot à l'œil noir cuit (HON cuit) |
|-------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | + | - | + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | - | + | - | + |
| <i>Lactobacillus subtilis</i> | - | + | - | - |

Concernant la bactérie *Escherichia coli* le tableau indique la présence de trouble vis-à-vis l'extrait d'haricot blanc cru (HB cru), haricot blanc cuit (HB cuit) et haricot à l'œil noir cru (HON cru) donc elle est révélée bactériostatique pour ces trois derniers à l'exception de l'extrait d'haricot à l'œil noir cuit (HON cuit) qui est révélée négatif (pas de trouble) donc elle est bactéricide

Concernant la bactérie *Lactobacillus subtilis*, le tableau indique l'absence de trouble vis-à-vis l'extrait d'haricot blanc cru (HB cru), d'haricot à l'œil noir cru (HON cru) et d'haricot à l'œil noir cuit (HON cuit) donc elle est révélée bactériostatique pour ces trois derniers à l'exception de l'extrait de haricot blanc cuit (HB cuit) qui est révélée négatif (pas de trouble) donc elle est bactéricide.

Suivant les bactérie, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* les résultats indiquent l'absence de trouble vis à vis l'extrait d'haricot blanc cru (HB cru) et d'haricot à l'œil noir cuit (HON cuit) donc sont présentent une activité bactéricide, contrairement aux extraits d'haricot blanc cuit (HB cuit) et d'haricot à l'œil noir cru (HON cru) qui présentent de trouble donc sont révélés bactériostatique.

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI ont permis d'observer des activités variées des extraits polyphénoliques d'haricots secs sur les souches testées. Les extraits polyphénoliques d'haricot blanc cru et d'haricot à l'œil noir cru révèlent des activités bactéricides sur les souches bactériennes sauf *Escherichia coli* révélé bactériostatique.

Les extraits polyphénoliques d'haricot blanc cuit et d'haricot à l'œil noir cuit sont bactériostatiques seulement *Lactobacillus Subtilus* est révélée bactéricide.

L'activité bactéricide évaluée par les tests *in vitro*, il ressort que les polyphénols possèdent un pouvoir antibactérien important sur les germes multirésistants responsables des maladies infectieuses. L'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce bactérienne, de la nature et de la concentration du produit testé et aussi du milieu de culture.

8. Test du pouvoir antifongique

La souche *Penicillium* sp. a une croissance aléatoire ce qui nous a empêché de calculer leur taux d'inhibition.

$$PI (\%) = (A-B) / A \times 100$$

Où :

PI(%) : Taux d'inhibition exprimé en pourcentage;

A : Diamètre de colonies dans les boîtes « témoins positifs »;

B : Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait du grain (Bajpai et al., 2010).

L'extrait polyphénolique est dit:

- Très actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100%; la souche fongique est dite très sensible;
- Actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 74%; la souche fongique est dite sensible;
- Moyennement actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 49%; la souche est dite limitée
- Peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 24%; La souche est dite peu sensible ou résistante (Alcamo, 1984).

Les résultats indiquent que l'extrait d'haricot blanc cru exerce un effet d'inhibition plus important suivi par l'extrait d'haricot à l'œil noir cru. Sur le plan inter variétal les extraits d'haricot blanc sont plus efficaces à celle d'haricot à l'œil noir et sur le plan intra variétal les extraits d'haricots crus sont révélés plus importants à ceux des haricots cuits. Donc la cuisson exerce un effet négatif sur les extraits d'haricots secs étudiés.

8.1. Détermination des index antifongiques (IA₁₀₀)

IA₁₀₀ de *Penicillium* n'ont été pas déterminés à cause de la dispersion des spores, par conséquent, nous n'avons pas pu mesurer leurs diamètres. Malgré l'existence des taux d'inhibition relativement faibles, les résultats obtenus prouvent l'existence d'une activité antifongique contre la souche *Penicillium sp.* Donc, il est intéressant d'estimer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), les concentrations fongicide (CF) et fongistatique (CFS).

8.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les concentrations fongistatique (CFS) et fongicide (CF) exprimées en mg/ml sont présentées dans le tableau XVII.

Tableau XVIII. Concentrations fongistatique (CFS) et fongicide (CF) en mg/ml des extraits polyphénoliques d'haricots secs sur la souche *Penicillium sp.*

| La souche | CF | CFS | CF | CFS | CF | CFS | CF | CFS |
|------------------------|---------|------|----------|-----|-----------|-----|------------|-----|
| | H B cru | | H B cuit | | H O N cru | | H O N cuit | |
| <i>Penicillium sp.</i> | ND | 0,25 | ND | 0,5 | ND | 1 | 2 | 0,5 |

ND: Non Déterminée

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI ont permis d'observer des activités variées des extraits polyphénoliques d'haricots secs sur les souches testées. Les extraits polyphénoliques d'haricot blanc cru révèlent des activités fongistatiques sur la souche fongique à 0,25 mg/ml pour *Penicillium sp.* Les polyphénols d'haricot blanc cuit, d'haricot à l'œil noir cru et le haricot à l'œil noir cuit sont fongistatiques à 0,5mg/ml ; 1mg/ml et 0,5mg/ml .Ceci serait dû à la nature de la paroi des souches fongiques composée d'un réseau complexe de protéines et de polysaccharides et qui varie en composition selon les espèces fongiques (Yen et Chang, 2008). La perturbation de cette matrice par adsorption des composés phénoliques suit à la complexation polyphénols/polysaccharides membranaires, peut avoir comme conséquence une réduction de la fluidité des couches internes et externes de la paroi qui devienne défectueuse et sensible à la lyse osmotique des agents antifongiques (Domineco et al., 2005).

Nous concluons que les polyphénols sont des composés d'origine exclusivement végétale, dont la teneur est très influée par des facteurs internes et externes en particulier l'espèce végétale et certains traitements technologiques notamment le mode de cuisson. Nous concluons aussi que le principal objectif de cette étude est de voir l'impact de la cuisson dans l'eau sur les composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et anthocyanines) et sur l'activité antioxydante et antimicrobienne. Cette étude a porté sur deux variétés d'haricots secs : le haricot blanc et le haricot à l'œil noir.

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée selon la méthode de Mujica et al., (2009), utilisant le méthanol 80% et leur dosage a été réalisé selon la méthode proposée par Singleton et al., (1995) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats ont été exprimés mg équivalent acide gallique/g d'extrait. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode au trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ selon le protocole proposé par Huang et al., 2004; les résultats ont été exprimés en mg équivalent de Quercétine (QE)/g d'échantillon sec. La teneur des anthocyanes a été estimée par la méthode du pH différentiel selon Lee et al., (2005). Les résultats sont exprimés en équivalent cyanidine 3-glucoside /g de poudre.

Les résultats obtenus indiquent que la cuisson appliquée est variable, elle diminue ou augmente les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et anthocyanines selon les variétés étudiées. De même, un constat variable a été relevé par rapport à l'effet de la cuisson dans l'eau sur l'activité antioxydante, antifongique et antibactérienne.

Le test antifongique, réalisé par la méthode de contact direct a montré un effet antifongique considérable vis-à-vis la souche *Penicillium* sp. Ce pouvoir a été variable en fonction de la dose appliquée. Les extraits polyphénoliques d'haricot blanc cru révèlent des activités fongostatiques sur la souche fongique à 0,25 mg/ml. Les polyphénols d'haricot blanc cuit, d'haricot à l'œil noir cru et cuit, sont fongostatiques à 0,5mg/ml ; 1mg/ml et 0,5mg/ml.

L'activité antibactérienne, réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, des extraits polyphénoliques vis-à-vis les quatre souches testées ont montré un effet antibactérien. Ce pouvoir a été variable en fonction de la souche et de la dose appliquée et l'espèce végétale étudiée ainsi que leur traitement thermique (cuisson). Les résultats indiquent que les souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC29213 et *Lactobacillus subtilis*) semblent être les plus sensibles à celles Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) vis à vis les extraits polyphénoliques étudiés en particulier ceux de la variété blanc cru. Sur le plan inter variétal les extraits polyphénoliques d'haricot blanc exercent un effet d'inhibition plus

important à celles d'haricot à l'œil noir et sur le plan intra variétal, les extraits des deux variétés sont plus puissant à l'état cru et sont révélés bactéricide mais variables selon la souche et la concentration.

Il est souhaitable de poursuivre cette étude par : l'application des autres méthodes d'identification et quantification des polyphénols (HPLC, GC-MS....etc.), de tester d'autres méthode d'extraction (par fluide supercritique (SFE)....etc.), modes de cuisson (à la vapeur, micro onde.... etc.) et d'étudier autres espèces et variétés des légumes secs afin de tirer des conclusions plus fiables.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- **Alcamo E-I.(1984).** Fundamentals of Microbiology. *Addison Westy publishing company*, London: 310-341; 617-699.
- **Amini.R., Pezhgan.h. and Mohammadasab.A D.(2013).** Effect of weeds competition on some growth parameters of red, white and pinto bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)*. 3. 86-93.
- **Anne S et Christian H. (2015).** Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. édition Quae. RD 10, 78026 Versailles cedex paris :CiradLfremer, Inra, Irstea,. Rôle des légumineuses dans l'agriculture française. p11- 77.ISBN :978-2-7592-2334-3.
- **Aykroyd et Doughty.(1982).** Les graines de légumineuses humaines. Deuxième Edition n°20 FAO. Rome.
- **Bahaz M et Rachdi.H.(2010).**Quantification des principes actifs (Les composés phénoliques) de *Rhazinolepis Lonadoides Coss (Tichert)*; Mémoire de fin d'étude d'ingénieur (université de Ouargla).
- **Bajpai V-K., Shukla S. et Kang C-S.(2008).** Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria L.* *Bioresource Technology, Elsevier* (99): 8903–8908.
- **Barkat.M et Kadri.F. (2011).** Impact de deux modes de cuisson sur la teneur en polyphénols solubles de six légumes. *Revue de Génie Industriel*.6, 41-45. ISSN 1313-8871.
- **Beckman C-H.(2000).** *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 57: 101–110.
- **Bénard K. (2009).** Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de doctorat. Nancy Université-Inra.260p.
- **Benayad N.(2013).** Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse. Université Mohammed V – AGDAL. RABAT. Thèse de doctorat. P186.
- **Bengoechea M-L., Sancho A-I., Bartolome B., Estrella I., Gomez Cordoves C. et Hernandez T.(1997).** *J. Agric. Food Chem.* (45) : 4071–4075.
- **Besançon.(1976).** Besoins alimentaires et qualité nutritionnelle des aliments, in Cheftel.C., Chefter. H., Besançon. P., introduction a la biochimie et a la technologie des aliments.Volume 2.Lavoisier Tee et Doc. Paris. 1979. pages : 87-134.
- **Borget M. (1989).** Les légumineuses vivrières tropicales. Paris : Maisonneuve et Larose, 161p.

- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felinger, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in Thymus species. *Journal of Chromatography A*, 1217: 7972–7980.
- Braga F-G., Bouzada M-L-M., Fabri R-L., Matos M-O., Moreira F-O., Scio E. et Coimbra E-S. (2007). Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 396-402.
- Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J. (2003). Bean (*Phaseolus* spp.) . model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55–128.
- Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition, Edition TEC & DOC, Lavoisier, pp 261-262-444.
- Câmara.C.R.S., Urrea.C A. and Schlegel.(2013). Pinto Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a functional Food: Implications on Human Health. *Agriculture*.3.90-111.
- Carnovale E., Marletta L., Marconi E., Brosio E. (1989). Nutritional and Hydration Properties in Cowpea. *Cowpea Genetic Resources*. Ed, N. Q. Ng and L.M. Monti. 200p
- Cayot N, Osson A. (1997). Farines et protéine de pois chiche : données récentes sur la application en alimentation humaine. *Ind. Ali. Et Agri*, 114 ; n 29, pp20-28.
- Chang C-W., Chang W-L., Chang S-T. et Cheng S-S. (2008). Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. *Water Research* 42: 78-286.
- Charpentier J-P. et Boizot N. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Amélioration génétique et physiologie forestières. *INRA*: 79.
- Choi HJ, Song JH, Park KS. (2009) Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 37 (3-4): 329-33.
- Cirillo G. et Lemma F. (2012). Antioxidant Polymers Synthesis, Properties, and Applications. *Scrivener Publishing*. 484p.
- Collin S., Counet C., Callemien D. et Jercovic V. (2011). Nomenclature et voie de synthèse des principaux polyphénols. In : COLLIN S. et CROUZET J. Polyphénols et procédés. Edition TEC & DOC, Lavoisier, Paris, pp 6-11.
- Combe E., Achi T., Pion. (1991). Utilisation digestive et métabolique comparée de fève de la lentille et du pois chiche chez le rat. *Raportd Nutr Dere* 31(6), pp 631-646. Comelade E, 1990. Technologie et hygiène alimentaire : les nutriments. Paris : Editions JACQUES LANORE, 144p.

- **Come D. (1982).** Les semences, organe de vie. In : MULTON J. L. Conservation et stockage des grains, graine et produits dérivés. Paris : Technique et documentation LAVOISIER, vol 1 : 233-252.
- **Cominelli E and Bollini R. (2016).** Exploitation of Common Bean Flours with Low Antinutrient Content for Making Nutritionally Enhanced Biscuits. *Frontiers in Plant Science*. 7:928.
- **Corte's AJ, Monserrate FA, Ramí'ez-Villegas J, Madrin' a'n S, Blair MW. (2013).** Drought Tolerance in Wild Plant Populations: The Case of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *PLoS ONE* 8(4): e62898. doi:10.1371/journal.pone.0062898.
- **Cushnie T.P. et Lamb Andrew J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 26, pp 343–356.
- **Crozier A, Clifford M.N et Ashihara H.(2006).** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.
- **De Ron Antonio M., Ana P.Rodiño, Marta Santalla, Ana M.González, María J.Lema, Isaura Martín and Jaime Kigel . (2016).** Seedling Emergence and Phenotypic Response of Common Bean Germplasm to Different Temperatures under Controlled Conditions and in Open Field. *Frontiers in Plant Science*, 7, Article 1087.
- **Derwich E., Benziane Z. et Boukir A. (2010).** GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. Journal of Agricultural and Biology*. 6 (3):191-198.
- **Dewick PM., (1995).** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 12(6): 579-607.
- **Domenico T., Francesco C., Maria G-S., Vincenza V., Mariateresa C-D., Antonella S., Gabriela M. et Giuseppe B. (2005).** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*., 49 : 2474-2478.
- **François V. (2004).** Détermination d'indicateurs d'accélération et de stabilisation de détérioration des céréales, *thèse de doctorat*, Université de Limoges. 360 P.
- **Freytag GF, Debouck DG. (2002).** Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (*Leguminosae–Papilionoideae*) in North America, Mexico and Central America. Sida Bot Misc 23. Botanical Research Institute of Texas.
- **Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND. (2005)** .Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137:1228–1235.

- **Gepts P, Francisco JL, Aragão Everaldo de Barros, Matthew W. Blair, Rosana Brondani. (2008).** Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics, In: P.H. Moore, R. Ming (eds.), Genomics of Tropical Crop Plant. Springe, pp. 113- 143
- **Gresele, P., Cerletti, C., Guglielmini, G., Pignatelli, P., De Gaetano, G., Violi, F. (2001).** Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function : an update. *J. of Nutr. Biochem.*, 22, 201-211.
- **Hättenschwiler S. et Vitousek Peter M.(2000).** The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Elsevier Science*, vol. 15, pp 238-244.
- **Horbowicz M., Kosson R., Grzesiuk A. et Dębski H. (2008).** Anthocyanins of fruits and vegetables, their occurrence, analysis and role in human nutrition. *Vegetable Crops Res. Bull:* 5-22.
- **Hossain M-A., Zhari I., Atiqur R. et Chul Kang S. (2008).** Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth *Industrial crops and products* (27): 328–334.
- **Huang D.J ,Lin C ,Chen H .J,et Lin Y.H .(2004).**Antioxydant and prolifératives of sweet potato (*Ipomoea (L) Lam tainong57°*)constituents *Bot Bull.Acod Sin*,45 ,179-186).
- **Huang D., Ou B. et Prior R-L. (2005).** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays.*Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- **Hussin ,N.M., Muse R., Ahmad, S., Ramli, J., Mahmood ,M., Sulaiman ,M-R, Shukor M-A-Y., Rahman, M-F-A. et Aziz K-N-K. (2009).** Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia racemosa* L. (*Lecythidaceae*). *African Journal of Biotechnology* Vol. 8(12): 2835-2842.
- **Jacque G., Gerard D., Jean-pierre., Yves D. (2008).**la filière protéagineux : Quels défis ? Edition Quae, Paris. Page : 40.
- **Journet E. P., Carreau V., Gouzy J., Thoquet P., Rosenberg C., Barker D., Huguet T., Denarie J. and Gomas.P. (2001).**la légumineuse modèle médicago truncatula. *ecolthématique de biologie végétale* pp.1-9.
- **khalil A., dababneh B.F., Al-gabbiesh A.H.,. (2009).** Antimicrobial activity against pathogenic microorganisms by extracts from herbal jordanian plants. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 7 (2): 103-106.
- **Ladividich J.(1973).**valeur protéique des graines de *Vigna Sinensis* et de Féverole : comparaison chez le rat avec le tourteau de sojas.*ANN.Zootech*, 22(3).p267-277.

- **Lafay, S., Gil-Izquierdo, A. (2008).** Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev.*, 7, 301-311.
- **Laïb I.(2009).** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. *Thèse magistère*.INATAA, Constantine: 124 P.
- **Laparra, J-M., Glahn R-P. et Miller D-D. (2008).** Bioaccessibility of phenols in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and iron (Fe) availability to caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.*,56: 10999-11005.
- **Lee J, Durst RW et Wrolstad RE .(2005).** Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International* 88, 1269-1278.
- **Li.A.N., Li.S., Zhang.Y J., Xu.X R., Chen.YM and Li.HB.(2014).** Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*.6. 6020-6047.
- **Long-Ze L, James M. Harnly, Marcial S. Pastor-Corrales, and Devanand L. Luthria. (2008).**The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. *Food Chem*, 107(1) .399–410.
- **Macheix J., Fleuriet A., et Jay-Allemand C. (2005).** Les composées phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, presses polytechniques et universitaires romandes, ISBN 2-88074-625-6 p 1, p 67,p121-216 , p 162.
- **Makris D. P. et Rossiter J. T. (2001).** Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*).
- **Maréchal R, Mascherpa JM, Stainier F. (1978).** Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* sur la base de données morphologiques et polliniques traitées par l'analyse informatique. *Boisiera* 28: 273.
- **Mercedes Mu, Burbano.c., Ayet.G., Mercedes M. Pedrosa, Carmen Cuadrado. (1999).**The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and varietal differences. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*v3(4).p210-216
- **Mérillon J. M. et Ramawat K. G.(2012).** Plant Defence: Biological Control, *Springer Science+Business Media*, 412p.
- **Mishra A-K. et Dubey N-K.(1994).** Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *Applied and Microbiology*. 60 (4): 1101-1105.
- **Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Thèse magistère*. Université de Tlemcen: 104 P.

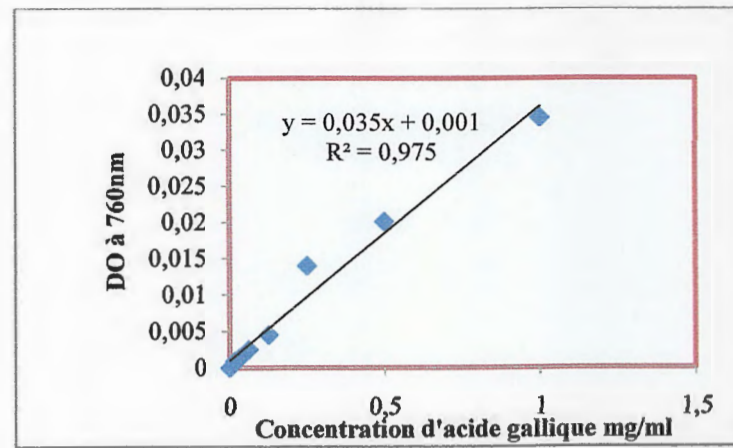
- **Morgante C, Castro S. Fabra A.(2007).** Role of rhizobial Eps in the evasion of bean defense response during the crack-entry infection process soil Biology and Biochemistry. Vol.39.Pp.1222-1225.
- **Mujica M-V., Granito M. et Soto N.(2009).** Importance of the extraction method in the Quantification of total phenolic compounds in *Phaseolus vulgaris* L.Venezuela. Interciencia, Vol. 34, N° 9: 650-654.
- **Multon J-L., (1982).** Conservation et stockage des grains et des graines et produits dérivés (Céréales, Oléagineux, Protéagineux, aliments pour animaux), *Lavoisier*, Paris: 576.
- **Neve J. et Pincemail J. (2008).** Antioxydants alimentaires : vitamines, oligoéléments et non-nutriments. *IN : ROBERFROID M.B., COXAM V. et DELZENNE N.* Aliments fonctionnels. 2ème édition, TEC & DOC, Lavoisier, Paris, pp 211.
- **Nicolai P, Erick B., James P. Wirth and Richard F, Hurrell. (2015).** Review: The Potential of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) as a Vehicle for Iron Biofortification.*nutrients*,7,1144-1173.
- **Ombra M.N, Antonio.A., Filomena .N., Riccardi.R., Spigno.P., Zaccardelli.M., Pane.C., Maione.M., and Florinda Fratianni.f.(2016).** Phenolic Composition and Antioxidant and Antiproliferative Activities of the Extracts of Twelve Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Endemic Ecotypes of Southern Italy before and after Cooking. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.Volume 2016, 12 pages, Article ID 1398298.
- **Organisation for Economic Co-operation and Development. (2015).** Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of COMMON BEAN [*Phaseolus vulgaris* L.]: Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Other Constituents. OECD Environment, Health and Safety Publications.paris. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds. No. 27.
- **Ownagh A., Hasani A., Mardani K. et Ebrahimzadeh S. (2010).** Antifungal effects of thyme, agastache and satreja essential oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. *Veterinary Research Forum*. 2: 99-105.
- **Pereira Nunes X, Souza Silva F., Alneida J.R.G. et al. (2012).** Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. Chapter1. In “phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health”. 1ère édition Venketeshwer Rao. Pp 1-20.

- Prieto ,p.,pineda,M .,Aguilar ,M.(1999) .Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E.*Anal biochem*;269:337-41.
- Raj N.K., Reddy Sripal M., Chaluvadi M. R. et Krishna D.R. (2001). bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 33, pp 2-16.
- Renard C. M. G. C., (2005). Effects of conventional boiling on the polyphenols and cell walls of pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 310-318. Research 5, 384-387.
- Reyes-Carmona, J., G.G. Yousef, R.A. Martínez-Peniche, et M.A. Lila. (2005). Antioxidant capacity of fruits extracts of blackberry (*Rubus sp.*) produced in different climatic regions. *Journal of Food Science* 70(7): S497-S503.
- Reynoso C., Ramos G. et Loarca P.(2006). Bioactive components in common beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Research Signpost* (2). India: 37-661.
- Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès. Maroc.158 p.
- Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Dunod*, Paris: 254 P.
- Rice-Evans C. A., Miller N. (1997). Free Radical. *Biol. Med.* 20. 931-935.
- Rozman ,T., and Jersek, B.(2009). Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis L.*) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, Vol. 93 ; N° 1, pp.51-58.
- Satish S., Raghavendra M-P., Mohana D-C. et Raveesha K-A.(2010). In vitro evaluation of the antifungal potentiality of *Polyalthia longifolia* against some sorghum grain moulds. *Journal of Agricultural Technology*. Vol.6(1): 135-150.
- Scervino Jose M., Ponce Maria A., Erra-bassells R., Vierheilig H., Ocampo Juan A. and Godeas A.(2005). Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research*, vol. 109, pp 1-6.
- Schreiner M. (2005).Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European Journal of Nutrition*, 44 (2): 85-94.
- Shahidi. F et Naczk.M. (2006). Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC PRESS Boca Raton London New York Washington, D.C. International Standard Book Number 1-58716-138-9 (Print Edition). ISBN 0-203-59485-1 (Adobe e-Reader Format).

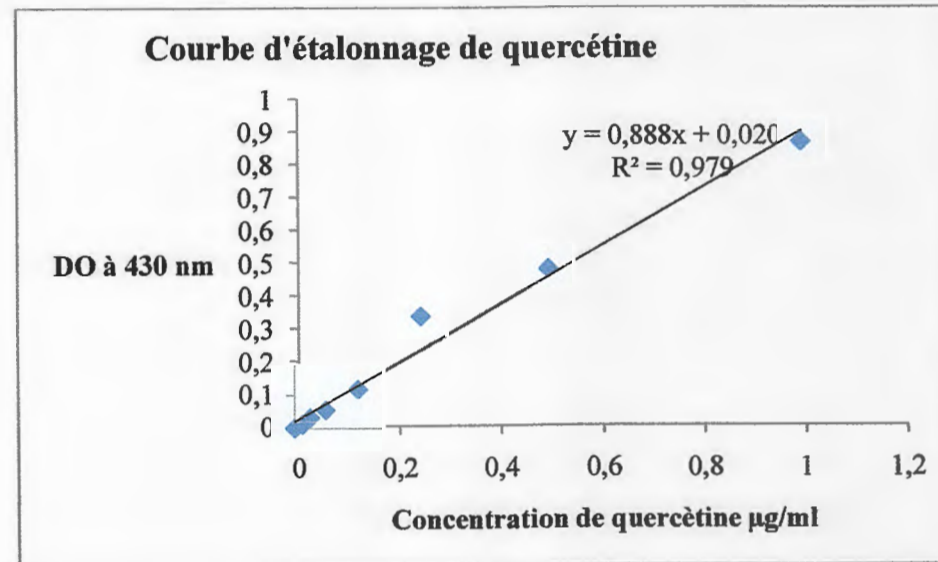
- Solis-Pereira S., Ernesto F-T., Gustero V-G. et Mariano-Gutierrez R. (1993). Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39: 36-41.
- Sparvoli F, Laureati M, Pilu R, Pagliarini E, Toschi I, Giuberti G, Fortunati P, Daminati MG, Cominelli E and Bollini R.(2016). Exploitation of Common Bean Flours with Low Antinutrient Content for Making Nutritionally Enhanced Biscuits. *Front. Plant Sci.* 7:928.
- Stavelly J.R. , Kelly, J.D., Grafton, K.F.(1994). BelMiDak-Rust-Resistant Navy Dry Bean Germplasm Lines. *HORTSCIENCE.* 29(6).709–711.
- Subrahmanyam M., Hemmady A. et Pawar S-G.(2001).Antibacterial Activity Of Honey On Bacteria Isolated From Wounds. *Annals of Burns and Fire Disasters.* XIV (I).
- Tao, L., Lambert, J.D. (2014). Polyphenols in the prevention and Treatment of Vascular and Cardiac Disease, and Cancer. *Polyphenols in Human Health & Disease*, 2,1191 -1198.
- Ulanowska K, Traczyk A, Konopa G, Wegrzym G. (2006).Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.*, 184 (5): 271-8.
- Urquiaga I. N. E. S. and Leighton F. E. D. E. (2000). Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res.*; 33: 55-64.
- Vautrin D. (2005). Une peau Zéro défaut. Editions Alpen s.a.m., pp 52.
- Vierling ,(1999). Aliment et boisson, filière et produit, Dions, Bordeaux.France.pp 151-156.
- Watzl B et Rechkemmer G. (2001). Flavonoïde. *Ernährungsumschau* 48: 161–164.
- Xu B. et Chang S.(2009). Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 57: 4754-4764.
- Yen T-B. et Chang S-T. (2008). Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 99: 232-236.
- Ying Tan S., Chi Kong Y., Elad T., Raymond P-G., Ross M-W., Xingen L. et Dennis D-M. (2008). Iron bioavailability to piglets from red and white common beans (*phaseolus vulgaris*). *J.Agric. Food Chem*: 5008–5014.
- Yrjönen T. (2004). Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. *Conference Room 513 at Viikki Infocentre (Viikinkaari 11), Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki*: 64.

- Zamora-Ros.R., Touillaud.M., Rothwell.H., Romieu.I, and Scalbert.A.(2014). Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: current tools and applications and their limits. *American Society for Nutrition*.100. 11-26
PMCID: PMC4144095.
- Zarrin M., Amirrajab N. et Nejad B-S.(2010). *In vitro* antifungal activity of satureja khuzestanica jamzad against *Cryptococcus neoformans*. *Pak. J. Med. Sci*; 26 (4): 880-882.

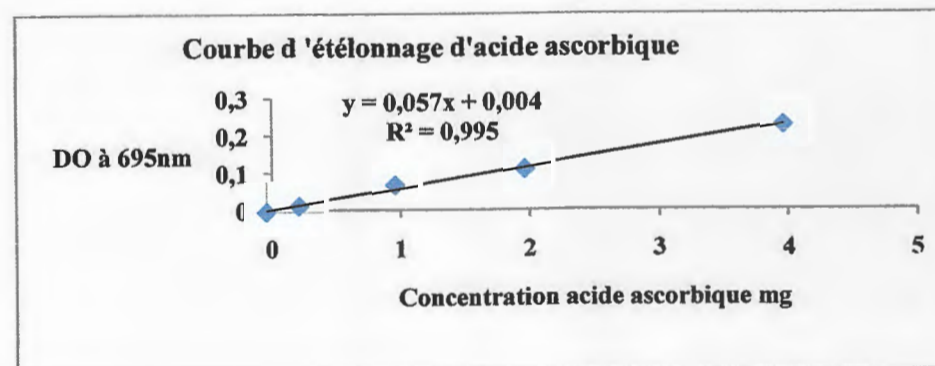
Annex 01 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique



Annexe 02 : courbe d'étalonnage de la Quercétine.



Annex 03 : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.



Cette étude a pour objectifs d'évaluer la teneur en composés phénoliques, en flavonoïdes et en anthocyanines; d'estimer les activités antioxydante et antimicrobienne (antibactérienne, antifongique) des polyphénols extraits à partir de la farine des grains entiers de deux variétés d'haricot sec, l'un d'haricot blanc et l'autre d'haricot à l'œil noir et à mettre en évidence l'influence de la cuisson dans l'eau sur la quantité et la qualité des composés phénoliques.

La détermination du taux d'humidité des deux variétés d'haricot sec ; elle a révélé des taux moyens convenables pour une bonne conservation.

L'extraction des polyphénols totaux a été réalisée à l'aide d'un solvant polaire, et leur quantification a été basée sur la réaction de Folin Ciocalteu. Pour les extraits d'haricot blanc et d'haricot à l'œil noir respectivement ; la teneur totale en polyphénols a été de 1,42 ± 0,17 mg EAG/g, 1,44 ± 0,17 mg EAG/g. La teneur en flavonoïdes a été 0,34 ± 0,02 mg EQ/g, 0,38 ± 0,02 mg EQ/g et la teneur en anthocyanines a été 0,64 ± 0,16 g ECy-3-Glu/g de poudre et 1,24 ± 0,33 g ECy-3-Glu/g de poudre. L'estimation de l'activité antioxydante a été réalisée par la méthode de phosphomolybdène. Le pourcentage de l'activité antioxydante d'haricots secs a été 8,18 ± 1,12% pour l'extrait d'haricot blanc, 10,55 ± 0,63% pour l'extrait d'haricot à l'œil noir. Le test antifongique réalisé a permis de prouver le pouvoir antifongique des polyphénols sur *penicillium* sp. Les résultats de la méthode de diffusions en milieu gélosé, des extraits polyphénoliques vis-à-vis les quatre souches testées ont montré un effet antibactérien où les souches les plus sensibles sont les souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC29213 et *Lactobacillus subtilis*) par rapport aux souches Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC25923 et *Pseudomonas aerogenosa* ATCC27853).

Les résultats obtenus concernant l'effet de la cuisson sont variables, ils indiquent que la cuisson dans l'eau a un impact négatif sur la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en anthocyanines d'haricot blanc et d'haricot à l'œil noir. De même pour l'activité antioxydante, la cuisson semble avoir un effet positif pour les deux variétés d'haricots par contre la cuisson semble avoir un effet négatif sur l'activité antimicrobienne.

Mots clés : Polyphénols, haricot sec, activité biologique.

Abstract

The objectives of this study are to evaluate the content of phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins; To estimate antioxidant and antimicrobial (antibacterial, antifungal) activities of polyphenols extracted from whole-grain flour of two dry bean varieties, one white bean and one black bean, and make in evidence the influence of cooking in water on two varieties of dry bean.

Determination of the moisture content of the two dry bean varieties; It revealed suitable average rates for good conservation. Extraction of the total polyphenols was carried out using a polar solvent, and their quantification was based on the reaction of Folin Ciocalteu. For white bean extracts; The black eye respectively; The total polyphenols content was 1.42 ± 0.17 mg EAG / g, 1.44 ± 0.17 mg EAG / g the flavonoids content was 0.34 ± 0.02 mg EQ / g, 0.38 ± 0.02 mg EQ / g and for the anthocyanins content was 0.64 ± 0.16 G ECy-3-Glu / g powder, 1.24 ± 0.33 G ECy-3-Glu / g powder. Estimation of antioxidant activity was carried out by the phosphomolybdenum method. The percentage of the dry bean antioxidant activity was 8.18 ± 1.12% for the white bean extract, 10.55 ± 0.63% for bean extract with the black eye. The antifungal test performed helped prove antifungal power of polyphenols on *Penicillium* sp. The antibacterial activity, carried out by the method of diffusions in agar medium, of the polyphenolic extracts with respect to the four strains tested showed an antibacterial effect. Or the most sensitive strains are Gram-positive strains (*Staphylococcus aureus* ATCC29213 and *Lactobacillus subtilis*) payment to those Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC25923 and *Pseudomonas aerogenosa* ATCC27853).

The results obtained with respect to the effect of cooking are variable; indicating that cooking in water has a negative impact on the content of total polyphenols, flavonoids and anthocyanins of white bean and the eye black beans. Similarly for antioxidant activity, cooking seems to have a positive effect for both varieties of beans by contrast the antibacterial and antifungal activity that are noticed a negative effect follows on cooking for both varieties.

Key words: Polyphenols, dry beans, biological activity.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم محتوى المركبات الفينولية، الفلافونويد والانتوسيانين، وتقدير النشاطات المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات (مضادة للبكتيريا و مضادة للفطريات) لمستخلصات متحدة الفينول المستخرج من طحين الحبوب الكاملة لصنلين من الفاصولياء الجافة الأولى الفاصولياء البيضاء والأخرى الفاصولياء ذات العين السوداء. تمعد الفينول المستخلص من دقيق الحبوب الكاملة من نوعين من الفاصولياء الجافة والفاصولياء البيضاء وظهور تأثير طهي هذين الصنلين من الفاصولياء الجافة في الماء. تحديد مستوى الرطوبة لهذين الصنلين من الفاصولياء الجافة بينت متوسط معدلات ملائمة للتخزين الجيد للحبوب. وتمت عملية استخراج الفينول الكلي بواسطة مذيب قطبي وتقديره اعتمد على رد فعل الكاثف فواين سيوكالتيو (Folin Ciocalteu) لمستخلصات من الفاصولياء البيضاء والفاصولياء العين السوداء على التوالي بلغ إجمالي محتوى الفينول الكلي 1,42±0,17 ملغ مكافئ لحمض الفاليك، 1,44±0,17 ملغ مكافئ لحمض الفاليك، ومحتوى الفلافونويد 0,34±0,02 ملغ مكافئ للكارسينين إغ، 0,38±0,02 ملغ مكافئ للكارسينين إغ ومحتوى الانتوسيانين 0,64±0,16 غ مكافئ حمض الفلورتاميد إغ، 1,24±0,33 غ مكافئ ECy-3 إغ. تم إجراء تقدير نشاطات مضادات الأكسدة من خلال طريقة Phosphomolybdène حيث كانت نسبة النشاط المضادة للأكسدة للفاصولياء الجافة 8.18 ± 1.12% لمستخلص الفاصولياء البيضاء، 10.55 ± 0.63% لمستخلص فاصولياء العين السوداء. يسمح اختبار النشاط المضاد للفطريات وبإثبات الترة المضادة للفطريات للفينول الكلي على البستيريوم. تم الكشف عن النشاط المضاد للبكتيريا بطريقة الانتشار على الوسط الجوزي لمستخلصات الفينول الكلي تجاه أربع سلالات للبكتيريا، التي أثبتت الفعل المضاد للبكتيريا أن السلالات الأكثر حساسية وأكثرها هي تلك ذات الغرام الإيجابي (*Staphylococcus aureus* ATCC29213 et *Lactobacillus subtilis*) مقارنة بسلالات الغرام السطبي (*Escherichia coli* ATCC25923 et *Pseudomonas aerogenosa* ATCC27853).

النتائج المتحصلة عليها على أثر الطهي في متغيرة وتبين أن الطهي في الماء له تأثير سلبي على نسبة متحد الفينول والفلافونويد والانتوسيانين للفاصولياء البيضاء والفاصولياء ذات العين السوداء في نفس السياق فالطهي له فعل إيجابي على النشاط المضاد للأكسدة لكلا صنلي الفاصولياء وهو عكس النشاط المضاد للبكتيريا والمضاد للفطريات الذي سجل فعل سلبي تماما للطهي في الماء لصنلي الفاصولياء المدروسة.

الكلمات المفتاح:متعدد الفينول ، الفاصولياء الجافة، النشاط البيولوجي.

