

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



كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES

Département Des Sciences De La Matière

Mémoire de MASTER

Domaine : Sciences de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie organique appliquée

Par :

DELASSI Lamia

THEME

**Optimisation de l'extraction des polyphénols de
deux variétés de graines locales du sorgho et
évaluation de leurs activités antioxydantes**

Soutenu publiquement devant le jury composé de:

M ^r . YOUSFI Mohamed	Professeur	President
M ^r . BENALIA Mohamed	M.A.A	Examineur
M ^r SAIDAT Aboubakar	M.C.A	Examineur
M ^{me} HADBAOUI Zineb	M.C.B	Promoteur

Année Universitaire 2015/2016



Dédicace

Je dédie cet humble travail avec grand amour,

Sincérité & fierté :

*A mes chers parents ma mère et mon père, source
de tendresse, de noblesse & d'affectation.*

*A mes très chers frères, en témoignage de la
fraternité, avec mes souhaits de bonheur de santé
et de succès.*

A tous les membres de ma famille.

*A mes amies et mes camarades surtout Amel et
Hakima*

*A tous mes professeurs que ce soit du primaire, du
moyen, du secondaire ou de l'enseignement
supérieur.*

*Enfin à tous ceux qui m'ont soutenu et qui me
soutient encore.*

Lamia



Remerciement

ELHAMDOULELLAH, le Miséricordieux de m'avoir donné Foi, volonté, et courage pour atteindre mon objectif.

Ce travail a été entrepris aux seins du laboratoire de recherche des sciences fondamentales à l'université de *Amar Telidji* de Laghouat grâce au Pr *Mohamed Yousfi* directeur de ce laboratoire pour avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire et disponible pour mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadrante Madame *HADBAOUI Zineb* pour son encouragement continu et aussi d'être toujours là pour m'aider et me guider à trouver le bon chemin par sa sagesse et ses précieux conseils pour accomplir ce projet.

Mes vifs remerciements vont à l'adresse de tous les membres du jury Monsieur *Mohamed Yousfi* comme président Monsieur *Aboubakar Saidat* et Monsieur *Mohamed Benalia* comme examinateurs pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur *Amar Djeridane*, pour les conseils et le soutien moral.

Liste Des Abréviations

A_{ech}	Absorbance de l'échantillon
A_t	Absorbance de témoin
DPPH	1,1-Diphényl-2-Picryl –Hydrazyl
EAG	Equivalente en acide gallique
EQ	Equivalente en quercetine
g/l	Gramme/litre
EC_{50}	(Efficient concentration) Concentration de l'extrait nécessaire pour inhiber 50% de l'oxydation
pH	Potentiel hydrogène
PPM	Phosphate molybdate
v/v	volume/volume
m/v	Masse/volume
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
VEEAC	vitamine E Equivalent Antioxydant Capacity
S.R	Sorgho rouge
S.B	Sorgho blanc

Liste Des Figures

Figure.1	: Les deux variétés des grains du sorgho (blanc et rouge)	4
Figure.2	: Répartition de la production de sorgho dans le monde (2010)	5
Figure.3	: Carte géographique de station de récolte	6
Figure.4	: Courbes représentant la variation de la densité optique en fonction du temps dans le test du DPPH	10
Figure.5	: Structure chimique du radical 1,1-Diphényl-2-Picryl -Hydrazyl et sa forme réduite	10
Figure.6	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	14
Figure.7	: Courbe d'étalonnage de la quercetine.	17
Figure.8	: Comparaison du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des extraits des deux variétés du sorgho	18
Figure.9	: Variation de la teneur des polyphénols en fonction de la teneur en flavonoïdes	19
Figure.10	: Courbes de la variation de PI% en fonction de la concentration phénoliques du S.R dans le test DPPH	19
Figure.11	: Courbes de la variation de PI% en fonction de la concentration phénoliques du S.B dans le test DPPH.	20
Figure.12	: Corrélation entre les EC ₅₀ du test DPPH des tourteaux et les teneurs en flavonoïdes	23
Figure.13	: Courbe d'étalonnage de la vitamine E du test Phosphate molybdate	24
Figure.14	: Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits phénoliques par le test de Phosphate molybdate (influence de la fraction du solvant).	26
Figure.15	: Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits phénoliques par le test de Phosphate molybdate (influence du temps).	27
Figure.16	: Corrélation entre La capacité réductrice et Les teneurs en polyphénols du sorgho blanc et sorgho rouge	28

Figure.17	: Corrélation entre La capacité réductrice et Les teneurs en flavonoïdes du sorgho blanc et sorgho rouge	28
Figure.18	: Les doubles liaisons et nombre et la position des groupements OH influençant sur l'activité antiradicalaire	29
Figure.19	: Corrélation entre le EC ₅₀ du test DPPH et EC ₅₀ du test PPM	29

Liste Des Tableaux

Tableau.1	: Réactifs chimiques utilisés	6
Tableau.2	: Etat physique, couleur et le rendement d'extraction des extraits phénoliques.	13
Tableau.3	: L'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux et les flavonoïdes	16
Tableau.4	: La teneur en phénols totaux et flavonoïdes des graines extraite par le solvant MeOH/eau (80/20) v/v	16
Tableau.5	: Le pouvoir d'inhibition EC ₅₀ des différents extraits phénoliques pour le test DPPH	22
Tableau.6	: La capacité réductrice des différents extraits phénoliques	25

Résumé

Dans ce travail les graines de deux variétés de sorgho (blanc et rouge), ont fait l'objet d'une étude comparative de leurs teneurs en polyphénols en flavonoïdes et de leur activité antioxydante *in vitro* en changeant le temps et la fraction du solvant v/v de l'extraction. L'analyse quantitative des composés phénoliques a été déterminée par une méthode adaptée de Singleton et Ross (en 1965) avec le réactif de Folin –Ciocalteu, tandis que les teneurs en flavonoïdes ont été déterminées par une méthode colorimétrique adaptée par Lamaison et Carnat (1991), les résultats obtenus ont montré que le sorgho rouge est riche en polyphénols et en flavonoïdes par rapport au sorgho blanc et que la macération pendant 24heure 80/20 (V/V) donne les teneur les plus élevées en phénols totaux et en flavonoïdes.

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes courantes, simples et disponibles (test DPPH et Phosphate molybdate).

Les résultats obtenus montrent que la macération pendant de 24 heure (80/20) a donné une activité antiradicalaire intéressante et une capacité réductrice puissante par rapport aux autres extraits pour le sorgho rouge, concernant le sorgho blanc, l'activité antiradicalaire a été marqué dans la macération 6h (80/20) et capacité réductrice a été marqué dans la macération 4h (80/20).

Mots clés : Sorgho, composés phénoliques, flavonoïdes, Test DPPH, Test Phosphate molybdate.

في هذا بتقييم النشاط المضاد للأكسدة فينولات لنوعين من الرفيعة (لبيضاء) و ذلك عن طريق النقع و بتأثير عاملين هما مدة الاستخلاص و نسبة المذيب في الاستخلاص تم تحديد هذا بين بسيطين و غير مكلفين هما اختبار DPPH PPM .

تم تحديد التحليل الكمي للمركبات الفينولية بواسطة كاشف Folin-Ciocalteu و الفلافونويدات بواسطة محلول كلوريد الالمنيوم (2% $AlCl_3$) ذ اظهرت النتائج ان الذرة الرفيعة فينولات الفلافونويدات مقارنة بالذرة الرفيعة 24 (20/80) المذيب يعطي أعلى نسبة من إجمالي الفينولات و الفلافونيدات.

ولقد أظهرت نتائج تقييم خصائص الأكسدة عن طريق اختبار DPPH PPM فينولات الذرة الرفيعة البيضاء 24 (20/80) هي الأعلى بالنسبة للذرة الرفيعة 6 (20/80) اما فيما يخص PPM فينولات 4 (20/80).

المفاتيح: DPPH ، المركبات الفينولية ، الفلافونويدات ، (الحمراء و البيضاء) ، DPPH

.PPM

Abstract

In this work two varieties of sorghum seeds (white and red), were the subject of a comparative study of their polyphenol contents of flavonoids and their antioxidant activity in vitro by changing the time and the fraction of solvent v / v maceration. The quantitative analysis of phenolic compounds was determined by a suitable method of Singleton and Ross (1965) with the Folin -Ciocalteu, while flavonoid contents were determined by a colorimetric method adapted Lamaison and Carnat (1991), the results have mounted that red sorghum is rich in polyphenols and flavonoids compared to white sorghum and maceration 24hours 80/20 V / V gives the highest content of total phenols and flavonoids.

Finally the antioxidant activity was evaluated by two common methods, simple and available (DPPH and phosphomolybdate assays)

The results show that the maceration 24 hours (80/20) gave an interesting and powerful antiradical activity reducing capacity compared to other extracts for red sorghum, for white sorghum, the antiradical activity was marked in the maceration 6h (80/20) and reducing capacity was scored in maceration 4 hours (80/20).

Keywords: Sorghum bicolor, phenolic compounds, flavonoids, DPPH assay, PPM assay.

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
I. Introduction générale	1
II. Matériel et méthodes	3
II.1. Matériel	3
II.1.1. Matériel végétal	3
II.1.1.1. Taxonomie de l'espèce	3
II.1.1.2. Description botanique du sorgho	3
II.1.2. Critère de sélection des espèces	4
II.1.2.1. Echantillonnage et description des graines de cultivars de sorgho	5
II.1.3. Réactifs chimiques	6
II.2. Méthodes	7
II.2.1. Préparation des extraits phénoliques	7
II.2.2. Dosage des phénols totaux	8
II.2.3. Dosage des flavonoïdes	8
II.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante	9
II.2.4.1. Test chimique DPPH	9
II.2.4.2. Test chimique Phosphate molybdate	11
III. Résultats et discussion	13
III.1. Quantification des extraits phénoliques	13
III.1.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible).....	14
III.1.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques.....	14

III.1.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux	17
III.1.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante	19
IV. Conclusion générale	30
V. Référence Bibliographique	32
VI. Annexe	35

I. Introduction générale

La nature et sa biodiversité offre aux chercheurs une multitude de sujets de recherche, en particulier pour trouver des molécules aux propriétés biologiques intéressantes: thérapeutiques, phytosanitaires,...etc. Par son impressionnante richesse et sa complexité, en plus de sa beauté bien souvent, la nature est source d'inspiration pour les chimistes. **(Guéritte F., 2009).**

Ces dernières années, des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification des principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de matière végétale, notamment le cas des composés phénoliques végétaux et les flavonoïdes, ces derniers ils suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison de leurs effets bénéfiques auprès de nombreuses affections, ainsi ils sont considérés en thérapeutique comme des agents préventifs de plusieurs maladies parmi lesquels celles associés au stress oxydant, tel que le cancer et les maladies cardio-vasculaires et qui ont fait l'objet de nombreuses recherches comme antioxydants naturels très puissant pouvant remplacer des antioxydants synthétiques. **(Bonnaillie et al., 2012 ; Popovici et al., 2009).** En effet, de nombreux tests antioxydants tels que le test DPPH, ORAC, FRAP, PPM....etc, ont été développés *in vitro* pour mesurer et évaluer l'activité antioxydante afin de pouvoir comparer et classer les antioxydants des différents aliments. **(Naznin et Hasan., 2009, Schaich et al., 2015).**

Dans un pays regorgeant d'une richesse très importante en flore comme l'Algérie, la valorisation de la filière des plantes aromatiques et médicinales est devenue indispensable. Le Sahara, le plus vaste et le plus chaud des déserts du monde, possède une végétation diffuse et clairsemée. L'état de la flore dans cette zone ainsi que les relations entre l'homme et les espèces, méritent une attention particulière.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à étudier l'activité antioxydante du sorgho blanc et sorgho rouge (*Sorghum bicolor L*), dans le but de valoriser de nouveaux agents antioxydants d'origine végétale. Cette espèce est intéressante comme sources d'antioxydants. En effet les dizaines de variétés du sorgho poussent dans les régions les plus chaudes en Algérie (région Ain Salah). Ce sont des céréales secondaires, qui ont été peu investiguées par rapport aux autres céréales. L'existence des données ethnopharmacologiques indiquant leur utilisation contre certaines maladies et également pour la nutrition humaine et la nutrition animale **(Mami Z., 2015).**

Introduction générale

L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence du temps et la fraction du solvant sur les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et l'activité antioxydante.

Dans une première partie, nous présentons les techniques d'extractions des composés phénoliques, des dosages spectrophotométriques et des tests d'activité antioxydante à savoir le test DPPH et le test Phosphate molybdate. La seconde partie consiste en une analyse des résultats obtenus et une discussion qui mettra l'accent sur leur signification par rapport aux données de la littérature. Enfin, le manuscrit se terminera par une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongement à ce travail.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

II.1.1.1. Taxonomie de l'espèce

Selon (**House, 1987**), la classification de l'espèce est la suivante :

- Règne : Plantae
- Sous-règne: Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Liliopsida
- Sous-classe : Commelinidae
- Ordre : Cyperales
- Famille : Poaceae
- Sous-famille : Panicoideae
- Tribu : Andropogoneae
- Genre Sorghum
- Nom vernaculaire

Arabe : Durra.

Français : Sorgho, gros mil.

Anglais: Sorghum, Sorgo, Great millet.

II.1.1.2. Description botanique du sorgho

Le sorgho est une plante herbacée . Il est formé de grandes plantes à chaumes dressés, robustes, dont les fleurs, disposées en panicules rameuses plus ou moins denses.**Figure.1. (Mami, 2015)**

Graminée annuelle atteignant **5 m** de haut. Elle comporte une tige (chaume) principale pleine habituellement érigée, elle peut présenter un certain nombre de tiges secondaire partant de sa base, appelées taille basales. Feuilles alternes simples; gaine de **15-35 cm** de long. La graine de sorgho est un caryopse ou fruit sec à un seul germe, habituellement partiellement couvert par les glumes de **4-8 mm** de diamètre arrondi et à pointe obtuse. (**Brink et Belay, 2006 ; Chantereau et al, 2013**).



Figure.1: Les deux variétés des graines de sorgho (rouge et blanc).

II.1.2. Critère de sélection des espèces

Afin d'isoler des substances nouvelles des espèces et de trouver de ce fait de nouvelles voies d'applications tant dans les domaines de la nutrition que de la pharmacie et du cosmétique et afin de rendre la stratégie d'isolement la plus efficace, il convient de sélectionner avec soin les espèces à étudier. Dans cette optique, un certain nombre de critères ont été pris en compte pour la sélection de nos espèces :

- **Une origine géographique commune : Le Sahara**

Le Sahara qui occupe 84% de la surface de l'Algérie, il n'a fait l'objet que de très peu de travaux relatifs à la mise en valeur de la flore qu'il renferme. Cela contribue à faire de cette partie une zone de choix pour la mise en lumière de nouvelles molécules élargissant ainsi la croissance de la biodiversité de notre pays.

- **Utilisation des espèces en nutrition et contre certain maladie**

Le Sorgho a constitué une source d'alimentation vitale pour des Milliers d'hommes, notamment dans les zones tropicales (**Vasudeva G. Kamath, 2004**). Avec une production mondiale de 56 000 000 de tonnes en 2010 selon le FAOSTAT (**Chantereau et al, 2013**). Le Sorgho se classe au cinquième rang des céréales après le blé, le riz, le maïs et l'orge. Le Sorgho est généralement cultivés à la fois pour son grain, utilisé en alimentation humaine, et sa paille utilisée comme fourrage. **Figure.2.**

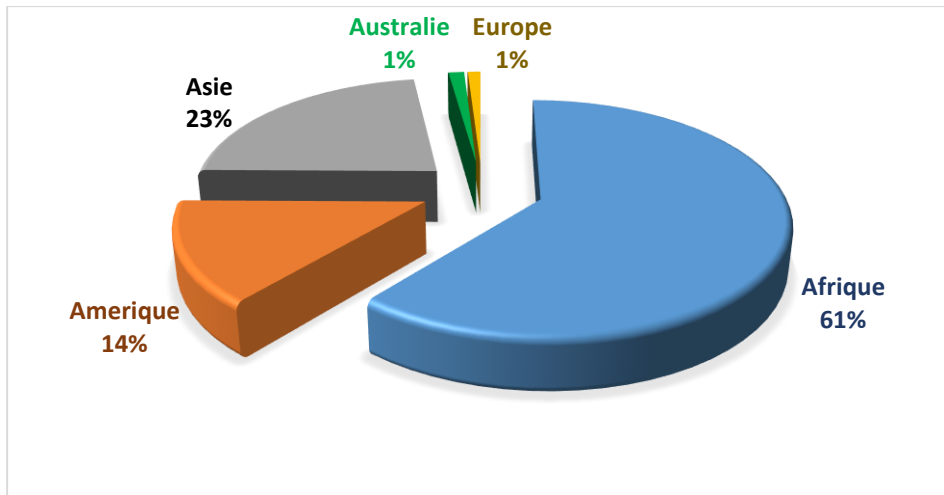


Figure.2: Répartition de la production de sorgho dans le monde (2010) (FAOSTAT, 2014)

- **Les polyphénols**

Le sorgho est une source riche en polyphénols. Les polyphénols se trouvent sous forme de tannins, d'acides phénoliques et d'anthocyanines. Beaucoup de polyphénols sont colorés et sont responsable de la pigmentation de la graine de sorgho. (Waniska, 2000).

Les polyphénols sont intimement liés à la protection des graines de sorgho contre les attaques des parasites et des oiseaux. Les polyphénol de sorgho possèdent une activité antioxydante élevée. Ils offrent des possibilités intéressantes de lutte contre les radicaux libres dans la santé humaine (Awika et Rooney, 2004). Les tannins du sorgho sont presque exclusivement du type condensé, ils sont principalement des produits polymérisés de flavan-ols et/ou flavan-3,4-diols.

Pour le présent travail, en tenant compte de tous ces critères, nous avons sélectionné deux variétés sahariennes ayant un fort potentiel d'activité.

II.1.2.1. Echantillonnage et description des graines de cultivars de sorgho

Les graines de deux échantillons de sorgho de couleurs différentes (rouge et blanc) ont été échantillonnées en 2014 du sud de l'Algérie dans une zone à climat très aride : Ain-Saleh. **Figure.3.**

Les graines de sorgho (blanc et rouge) sont réduits en poudre manuellement à l'aide d'un mortier, puis tamisée à la même granulométrie, après ils ont été conservés à l'abri de la lumière et de l'humidité. La poudre ainsi obtenue a été utilisée pour l'extraction.

Ain Saleh



Figure.3 : Carte géographique de station de récolte.

II.1.3. Réactifs chimiques

Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé **Tableau.1**.

Tableau.1 : Réactifs chimiques utilisés

Produit	Marque
Vitamine E (α -tocophérol)	Fluka
Méthanol, Carbonate de sodium Na_2CO_3 ; Acide sulfurique ; Hexane ; Acétate d'éthyle, Acide gallique ; réactif de Folin-Ciocalteu ; Quercitine; DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl).	Sigma-Aldrich
Sulfate de sodium anhydre(Na_2SO_4).	Biochem
Acide ascorbique vitamine C.	Prolabo

-Nous avons utilisé un spectrophotomètre **UV-1601** de type **SHIMADZU**, et les résultats sont traités par **Microsoft Office Excel 2013**

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des extraits phénoliques

Le matériel végétal est constitué des tourteaux des graines des deux variétés de sorgho blanc et rouge. Les tourteaux sont obtenus par délipidation et dépigmentation en utilisant l'hexane comme solvant. Ces résidus solides obtenus sont utilisés pour l'étude des composés phénoliques.

L'extraction des composés phénoliques des matières végétales est influencée par leur nature chimique, la méthode et le temps d'extraction. (Nacz et Shahidi, 2004). Cependant la qualité alimentaire ou thérapeutique d'un extrait naturel est liée à l'efficacité et à la sélectivité du procédé d'extraction utilisé. Les techniques conventionnelles d'extraction des polyphénols impliquent différents solvants et divers procédés : macération, infusion et décoction,...etc. (Nkhili, 2009).

Dans notre travail nous avons choisi l'extraction à température ambiante « macération ».

A partir d'une quantité bien déterminée 10g de matière végétale délipidés macérés dans 100ml d'un mélange hydro alcoolique (MeOH/eau) en changeant deux facteurs :

- Facteur de temps : la matière végétale est macéré dans 100ml du mélange (MeOH/ eau) (80/20 : V/V) pour une durée de 2:30h ; 4h ; 6h et 24h.
- Facteur de la fraction du solvant (polarité du solvant) : la matière végétale est macéré pendant 24h dans 100ml du mélange (MeOH/ eau) de différents rapports de solvant (80/20; 70/30 ; 30/70 ; 20/80 : V/V).

Après filtration sur papier filtre, le méthanol est évaporé sous pression réduite et on récupérée la phase aqueuse. Cette dernière est traitée par acétate d'éthyle pour la purification des composés phénoliques. Le séchage de la phase organique est effectué par l'ajout du sulfate de sodium anhydre ensuite elle est filtrée sur papier filtre, et évaporée sous pression réduite jusqu'à siccité.

Enfin, le résidu récupéré est pesé puis solubilisé dans 5ml de méthanol, sauf l'extrait du sorgho rouge (MeOH/ eau) (80/20 : V/V) 24h est solubilisé dans 13ml de méthanol jusqu'à solubilisation.

Les extraits ainsi obtenus sont conservés à 4°C jusqu'à leur analyse.

II.2.2. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Rossi (1965) avec le réactif Folin-Ciocalteu, ce dernier c'est un mélange d'acide phosphotungestique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$).

Le mécanisme repose essentiellement sur la réduction du mélange par le composé phénolique en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (Singleton et Rossi., 1965). Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu que dans des conditions basiques ajustées par une solution de carbonate de sodium . (Blainski *et al*, 2013 ; Jadhav *et al*, 2012)

L'extrait est dilué dans l'eau distillée pour obtenir une absorbance finale inférieure à 1. 100 μ l de chaque extrait dilué ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué).suivis de 2 ml de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 5% (m/v). Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm par un spectrophotomètre UV.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été exprimée en mg équivalent d'acide gallique par 100g de tourteaux. (Mahmoudi *et al*, 2013)

II.2.3. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par Lamaison et Carnat (1991). Lors de cette réaction les flavonoïdes réagissent avec le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). $AlCl_3$ a la capacité de se complexer avec les oxygènes des groupements hydroxyles des flavonoïdes, produisant ainsi un complexe de couleur jaune, dont l'absorbance est enregistrée à 412 nm.

1ml de chaque extrait dilué dans le méthanol est ajouté à 1ml de trichlorure d'aluminium à 2% (m/v) après incubation de 15min à température ambiante l'absorbance du mélange a été mesurée à 412 nm.

Dans cette méthode, la quercétine a été utilisée comme étalon (flavonoïde de référence).

II.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante

Même si les antioxydants de synthèse sont efficaces et bon marché et que leurs doses autorisées sont largement limitées pour éviter tout problème de toxicité, on a assisté depuis des années à un engouement pour les produits naturels, et au développement d'extraits végétaux à usage antioxydants, qui auraient des propriétés biologiques pouvant contribuer à réduire le risque de certaines pathologies bien que le sujet soit en évolution permanente. Il nous a paru nécessaire de faire le point sur cette question, d'autant que l'intérêt pour les antioxydants naturels, particulièrement les polyphénols s'expliquent aussi par leur rôle potentiel *in vivo* vis-à-vis des radicaux libres, via l'alimentation ou la pharmacologie.

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que les radicaux libres ou les complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capable d'inhiber la génération de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs : soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron.

Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, alors que les méthodes basées sur le transfert d'électron mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer d'électron qui réduira n'importe quel composé, incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux.

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits des composés phénoliques a été réalisée par deux tests chimiques à savoir : le piégeage du radical libre DPPH et test phosphate molybdate.

II.2.4.1. Test chimique DPPH

Le 2,2'-di (4-tert-octylphényl)-1-picrylhydrazyl (DPPH.) est un radical stable qui absorbe dans l'UV-visible à la longueur d'onde de 517 nm (Cotelle *et al.*, 1996). La réduction du radical libre DPPH· par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-Vis, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits

Figure.4

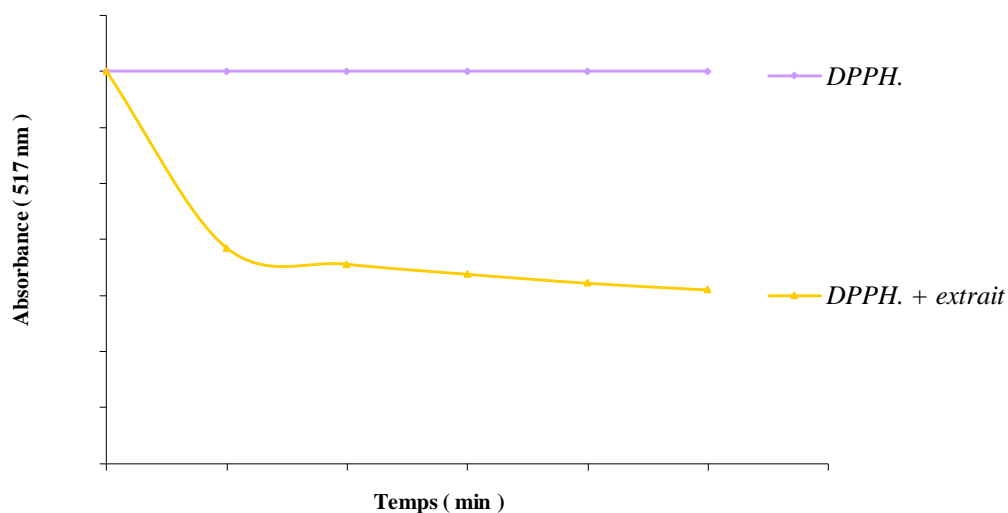


Figure.4 : Courbes représentant la variation de la densité optique en fonction du temps dans le test du DPPH .

Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie **Figure.4**. Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques (**Djeridane, 2008**).

Dans ce test, le substrat d'oxydation est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule d'antioxydante, se transforme en DPPH-H avec perte de son absorbance caractéristique à 517 nm (**Schaich et al, 2015**). Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu méthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants. Le système est très utilisé car il est rapide, facile et non coûteux (**Figure.5**).

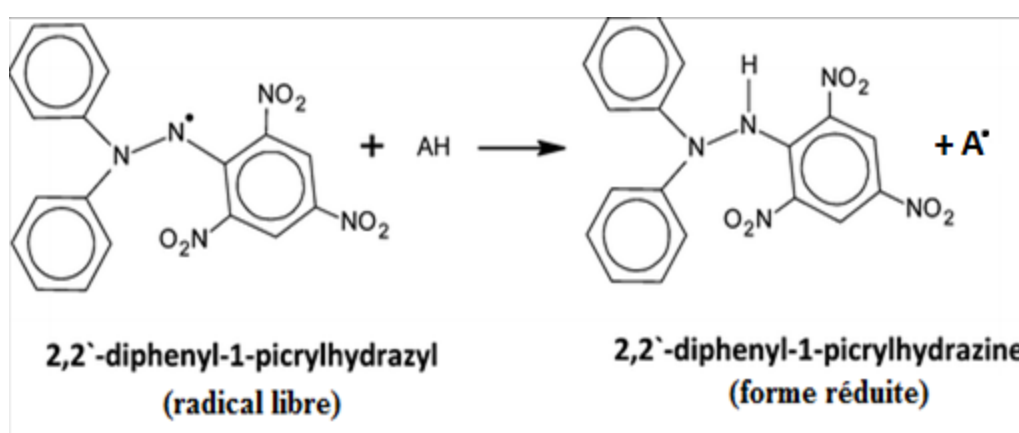


Figure.5 : Structure chimique du radical 1,1-Diphényl-2-Picryl -Hydrazyl et sa forme réduite.

1mL de chaque extrait dilué est additionné à 1mL d'une solution de DPPH (250 μ M) préparée dans le méthanol. Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis il est maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à une température ambiante pour que la réaction s'accomplisse. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm contre un blanc. Les mesures de la densité optique de chaque solution d'extrait à différentes dilutions nous ont permis de calculer à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration de chaque extrait le paramètre EC₅₀ qui représente la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres. Egalement, nous avons testé la vitamine C et la vitamine E comme des antioxydants commerciaux pris comme antioxydants de références.

Le pouvoir d'inhibition est exprimé en %, et déterminé en appliquant la formule suivante :

$$PI\% = \frac{A_t - A_{ech}}{A_t} \times 100$$

A_t : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A_{ech} : absorbance en présence d'extrait.

II.2.4.2. Test chimique Phosphate molybdate

Les extraits sont évalués par la méthode de phosphomolybdène de Prieto *et al* (1999). Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO₄²⁻ à molybdène Mo (V) MoO₂⁺ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Molybdate (V) à pH acide. (Prieto *et all* ,1999).

Un volume de 0.2 ml de chaque extrait méthanolique est mélangé avec 2 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 70°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 2 ml de la solution du réactif et 0.2 ml du méthanol, et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Il est nécessaire de mettre en évidence l'efficacité de cet antioxydant de référence à ce test et cela en traçant une courbe d'étalonnage de la vitamine E.

Matériel et méthodes

Une courbe d'étalonnage a été établie pour des différentes concentrations de vitamine E afin de référer le pouvoir antioxydant exprimé en VEEAC (vitamine E Equivalent Antioxydant Capacity) pour chaque extrait.













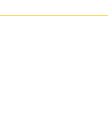
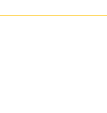
III. Résultats et discussions

III.1. Quantification des extraits phénoliques

Les extraits obtenus ont été conservés au réfrigérateur avant d'être analysés. Les extraits phénoliques ainsi obtenus présentent généralement un aspect pâteux, de couleur jaune ou miel

Tableau.2.

Tableau.2 : Etat physique, couleur et le rendement d'extraction des extraits phénoliques.

Extraction	Aspect	Sorgho rouge		Sorgho blanc	
		Couleur de l'extrait	Rendement d'extraction (%)	Couleur de l'extrait	Rendement d'extraction (%)
2h30min (80/20)	Pâte	Miel 	1.675	Miel 	1.847
4h (80/20)	Pâte	Miel 	1.225	Rouge 	5.376
6h (80/20)	Pâte	Miel 	2.036	Rouge 	1.624
24h (80/20)	Pâte	Miel 	2.418	Rose 	5.056
24h (70/30)	Pâte	Rouge 	9.268	Miel 	2.004
24h (30/70)	Pâte	Jaune 	5.436	Jaune 	3.725
24h (20/80)	Pâte	Jaune 	2.72	Jaune 	3.478

❖ Rendement en extraits bruts

Le rendement d'extraction a été calculé par rapport au poids des tourteaux. Le rendement d'extraction observé dépend à la fois de la variété, de la polarité de solvant et du temps de macération.

On constate que quelle que soit la variété utilisée, le rendement d'extraction obtenu après 24 heures de macération pour la fraction 80/20 est toujours le plus élevé sauf pour le sorgho

Résultats et discussions

blanc ou la valeur du rendement obtenu dans le temps 4heure (5,376%) se rapproche à celle du temps 24heure (5,056%).

Si on s'intéresse sur la polarité du solvant nous déduisons que la fraction (80/20) possède le rendement le plus élevé suivi par la fraction (30/70) avec un taux de 3,725% dans le cas du sorgho blanc.

Pour le sorgho rouge le taux d'extraction varie entre 9,268% et 2.418%, le rendement le plus élevé obtenu à partir de la fraction 70/30.

Il faut noter ici que les valeurs obtenues des teneurs en composés phénoliques totaux ne reflètent pas les quantités réelles de ces substances dans les espèces investiguées car il y a plusieurs facteurs qui influent sur le rendement d'extraction en l'occurrence, le type, l'acidité et le volume du solvant, la température et le temps du contact avec la matière première ainsi que le mode d'extraction (Djeridane *et al.*, 2006)

III.1.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)

III.1.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques

Les différents extraits bruts, obtenus par extraction solide-liquide ont été analysés quantitativement par un spectrophotomètre UV-visible pour leur contenu en composés phénoliques. Les résultats sont exprimés en termes équivalent d'acide gallique à l'aide d'une courbe d'étalonnage. **Figure.6.**

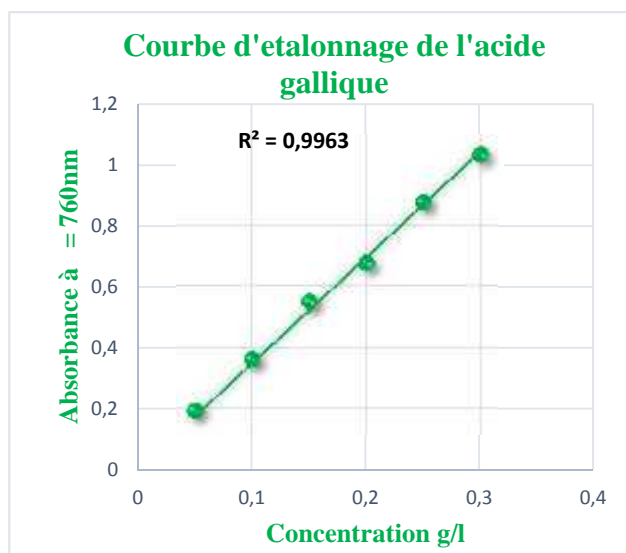


Figure.6 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

En se basant sur les valeurs de l'absorbance des diverses solutions d'extraits, ayant réagi avec le réactif de Folin-Ciocalteu et comparées à la solution étalon en équivalence d'acide gallique,

les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux sont regroupés dans le **Tableau.3**.

D'après la synthèse de l'ensemble de résultats obtenus lors de la quantification des composés phénoliques totaux, on peut constater que les teneurs en composés phénoliques varient en fonction de la polarité du solvant et du temps de macération.

Si on s'intéresse sur l'influence du facteur de temps, le taux des composés phénoliques le plus élevé a été détecté dans la durée de 24 heures tandis que la teneur la plus basse est remarquée dans la durée de 2h30mn dans le cas du sorgho rouge. Pour le sorgho blanc le taux des composés phénoliques se rapproche et varie de 16,033mgEAG/100g des tourteaux à 19,066mgEAG/100g des tourteaux. Donc le taux des composés phénoliques varie en même sens avec le temps sauf le cas du duré 4 heure pour le sorgho blanc, on peut constater que le temps de macération influencé sur le rendement phénolique.

On a essayé d'étudier aussi l'influence de la polarité du solvant, on a trouvé que le taux le plus élevé est extrait de la fraction 80/20 MeOH/H₂O V/V quelle que soit la variété étudiée. Le choix du mélange méthanol/eau à 80/20, considéré comme un mélange à polarité élevée, est basé sur les résultats de plusieurs travaux antérieurs qui ont montré que les solvants polaires sont efficaces pour extraire les composés phénoliques (**Przybylski et al., 1998; Trabelsi et al., 2010**) et que le rendement d'extraction augmente de manière significative lors de l'utilisation de l'éthanol aqueux et du méthanol aqueux par rapport à des extractions aux solvants organiques seuls (**Kozłowska et Zielinski, 2000; Mussatto et al., 2011**). Plus précisément, l'addition d'eau de 20% à 30% aux solvants polaires améliore l'extraction des composés phénoliques en particulier à l'éthanol, le méthanol ou l'acétone (**Trabelsi et al., 2010**). Ce comportement peut être expliqué par le fait que la présence de l'eau (ayant un moment dipolaire plus fort que celui des alcools) déstabilise les parois cellulaires. Par conséquent, en pénétrant plus profondément dans la matrice végétale, le solvant peut entrer en contact avec une quantité plus grande du soluté, favorisant ainsi l'extraction (**Mami, 2015**). D'autre part, la diminution du taux d'extraction à des concentrations plus faibles de 50% (dans les deux fractions 30/70 et 20/80 pour les deux échantillons étudiés) peut être attribuée à la diminution de la capacité du solvant, devenant de plus en plus pauvre en alcool (**Mussatto et al, 2011**).

Cependant, une telle extraction par le méthanol ne donne pas que les composés phénoliques mais probablement d'autres substances non phénoliques telles que les sucres, les protéines et les pigments qui peuvent interférer pendant le dosage des phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu.

Tableau.3 : L'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux et les flavonoïdes.

Plante	Extraction	Teneur en phénols totaux (mg EAG/100g Tourteaux)	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/100g Tourteaux)	Taux en flavonoïdes %
Sorgho rouge	2h30min (80/20)	25.700 ±0,03	4.00 ± 0.0004	15,5642
	4h (80/20)	39.275 ± 0,01	5.283 ± 0.0005	13,45215
	6h (80/20)	35.850 ± 0.001	5.316 ± 0.0005	14,83031
	24h (80/20)	81.986 ± 0.04	11.093 ± 0.0011	13,53065
	24h (70/30)	47.233 ± 0.01	5.85 ± 0.0006	12,38532
	24h (30/70)	17.433 ± 0.01	1.616 ± 0.0002	9,273426
	24h (20/80)	20.166 ± 0.01	2.233 ± 0.0002	11,07438
Sorgho blanc	2h30min (80/20)	16.033 ± 0.01	1.38 ± 0.0001	8,60707
	4h (80/20)	19.066 ± 0.02	1.891 ± 0.0002	9,921329
	6h (80/20)	18.533 ± 0.03	1.795 ± 0.0002	9,685254
	24h (80/20)	18.516 ± 0.01	3.015 ± 0.0003	16,28263
	24h (70/30)	17.4 ± 0.02	1.438 ± 0.0001	8,266282
	24h (30/70)	12.683 ± 0.01	0.735 ± 0.0001	5,795008
	24h (20/80)	16.766 ± 0.02	0.573 ± 0.0001	3,41948

Les valeurs sont des moyennes (n = 3)

Il est aussi possible de déduire que les graines de sorgho rouge sont riches en polyphénols si on les compare avec des graines étudiées en même condition **Tableau.4**.

Tableau.4 : La teneur en phénols totaux et flavonoïdes des graines extraite par le solvant MeOH/eau (80/20) v/v

Les extraits (MeOH/eau)(v/v)	Teneur en phénols totaux (mg/100g)
Mil (Hadbaoui , 2012)	32
Citrouille (Benalia , 2016)	46,39

III.1.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits bruts a été déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Les résultats sont exprimés en termes d'équivalent quercétine à l'aide d'une courbe d'étalonnage **Figure.7**.

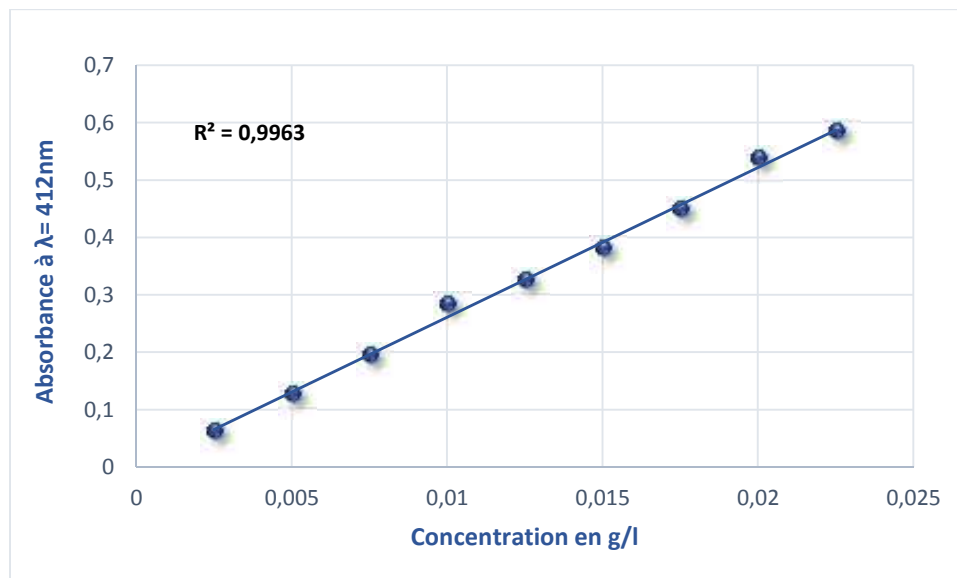


Figure.7 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

A la lumière des résultats présentés dans le **Tableau.3**, on déduit que la variation de la teneur en flavonoïdes d'une variété à l'autre est moins importante par rapport à celle des phénols totaux.

Pour le sorgho rouge le taux des flavonoïdes varié entre 4 et 11,09 mg EQ/100g des tourteaux pour les durés 2h30mn et 24 heure respectivement. La fraction 80/20 donne le taux des flavonoïdes le plus élevé.

Par ailleurs pour le sorgho blanc, la variation de teneur de flavonoïdes a comme étendu, 3,015 mg EQ/100g des tourteaux pour l'échantillon 80/20 pendant 24 heure.

Du point de vu comparatif, les extraits du sorgho rouge sont plus riches en flavonoïdes pour les deux facteurs (temps et polarité du solvant) par rapport au sorgho blanc.

Dans un souci de simplifier, nous présentons, dans l'histogramme ci-dessous, les différentes valeurs du contenu en phénols totaux, en flavonoïdes pour chaque extrait. **Figure.8**

La comparaison entre la quantité des flavonoïdes et polyphénols totaux dans chaque extrait, nous permis de dire que la variation des quantités des flavonoïdes n'est pas relative à celle des composés phénoliques, cela peut être exprimé par la composition de chaque extrait par les différents types de phénols totaux (acide phénolique, flavonoïdes, flavonols.....).

Résultats et discussions

D'après la comparaison entre le contenu en phénols totaux et flavonoïdes dans nos extraits on peut aussi déduire que la quantité des flavonoïdes est supérieure à 3,41 % et inférieure à 16,28 % suivant les résultats obtenus.

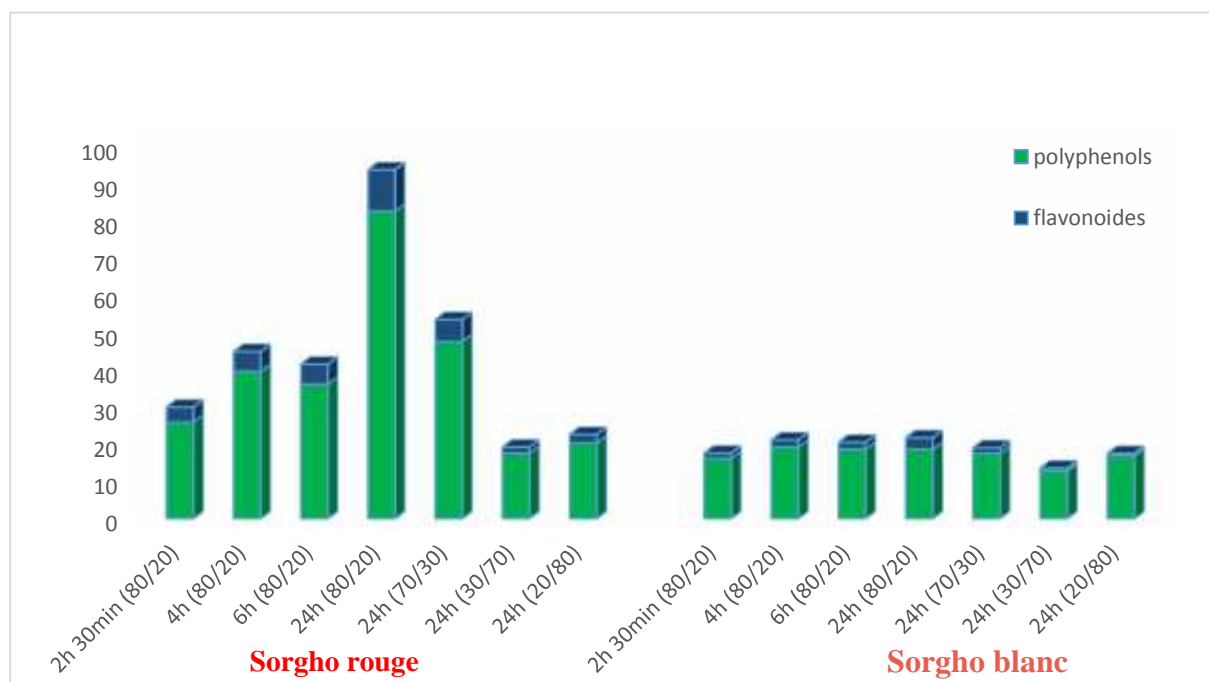


Figure.8 : Comparaison du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des extraits des deux variétés du sorgho.

On constate que les espèces investiguées renferment un matériel polyphénolique pauvre en composés flavonoïdiques, mais on note que ses résultats sont relatifs parce qu'ils sont calculés par rapport à la quercétine, mais notre espèce peut être pauvre en quercétine et riche en d'autres composés flavonoïdiques tels que la catéchine, rutine.....etc.

Nous avons également tracé les courbes représentant la relation entre les teneurs en composés phénoliques et le taux des flavonoïdes, pour les différents extraits **Figure.9**. D'après les graphes de la **Figure.9**, il est clair qu'il existe une très bonne corrélation entre la teneur en phénols totaux et le taux des flavonoïdes dans le sorgho rouge ($R^2=0,9753$), et une moyenne corrélation ($R^2=0,449$) pour le sorgho blanc, quelle que soit la durée de macération ou la fraction du solvant utilisé. Ce résultat peut être traduit par le fait que la quantité des flavonoïdes varie proportionnellement avec tout le contenu en polyphénols d'une variété à une autre.

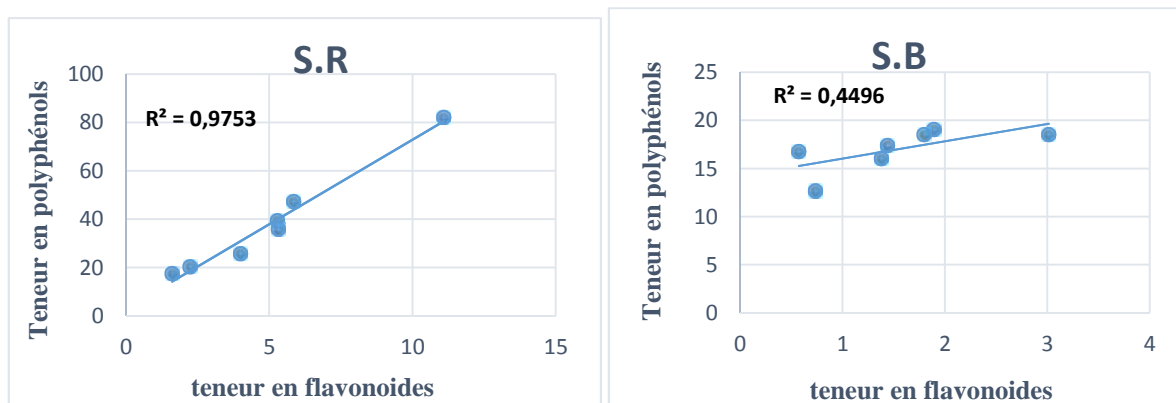


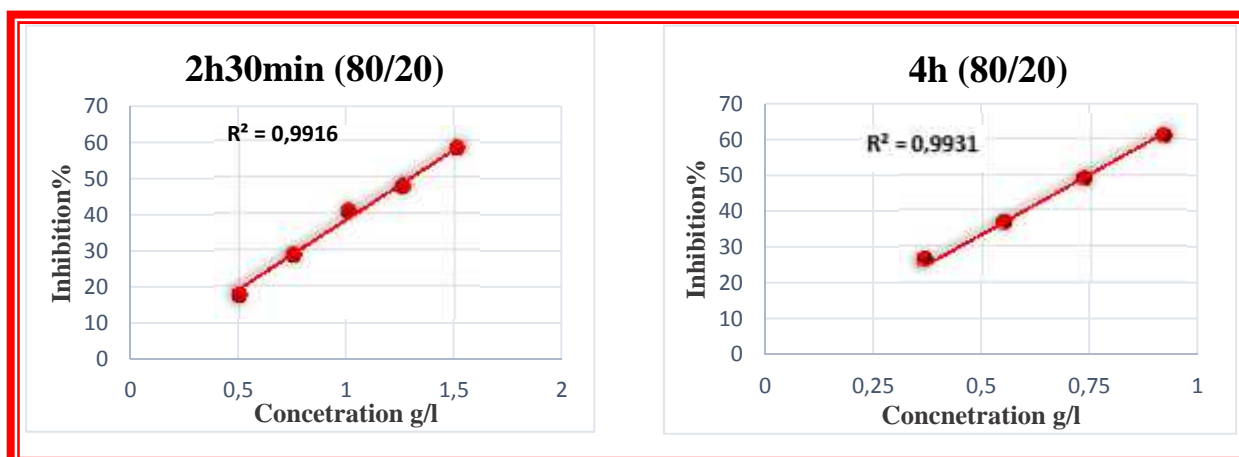
Figure.9 : Variation de la teneur des polyphénols en fonction de la teneur en flavonoïdes.

III.1.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante

❖ Le test chimique DPPH

Les mesures de la diminution de l'absorbance du DPPH provoquées par la présence des extraits après 30 minutes ont permis de déterminer le pouvoir antioxydant des différents extraits. Le pouvoir d'inhibition (PI) a été exprimé en présence de différentes dilutions (PI% en fonction de la concentration après 30min d'incubation à température ambiante à l'obscurité). Les dilutions sont effectués de sorte que le coefficient de corrélation (R^2) de ces tracés soit supérieur à 0,90.

L'efficacité antioxydante des extraits phénoliques testés exprimée ensuite par le paramètre EC_{50} « efficient concentration » qui représente la concentration de l'inhibiteur nécessaire pour diminuer 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel. Les valeurs de EC_{50} sont déterminées pour chaque extrait phénolique à partir des représentations graphiques $\%_{inhibition} = f(\text{concentrations d'extraits})$, **Figure.10,11**. De même, nous avons calculé l' EC_{50} des antioxydants de référence la vitamine E et vitamine C (l'annexe) à fin de les comparer avec ceux des extraits phénoliques. Les valeurs calculées d' EC_{50} (mg/ml) par rapport aux tourteaux et les valeurs calculées d' EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) par rapport à l'acide gallique pour les différentes concentrations des extraits sont regroupées dans le **Tableau.5**.



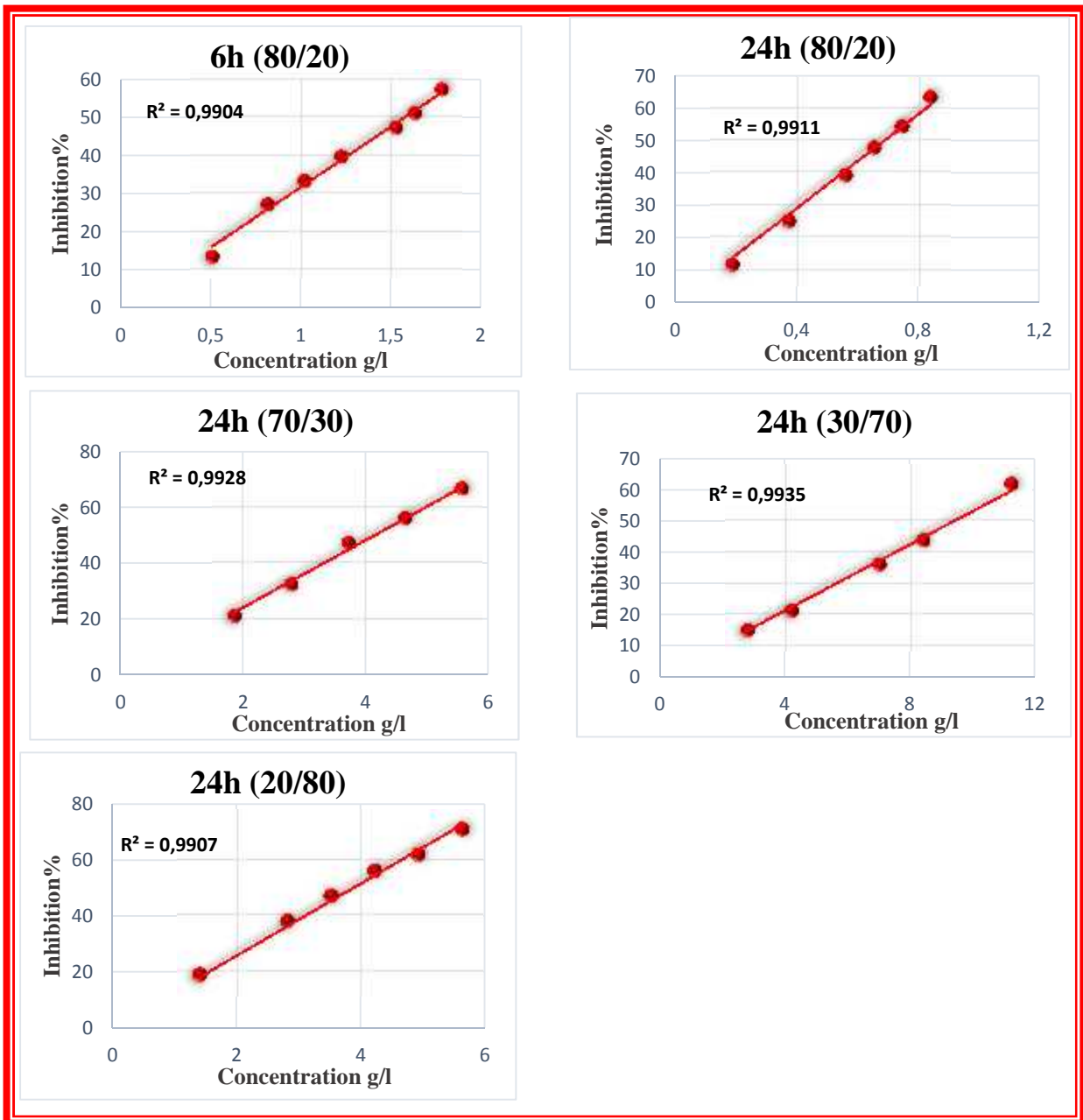
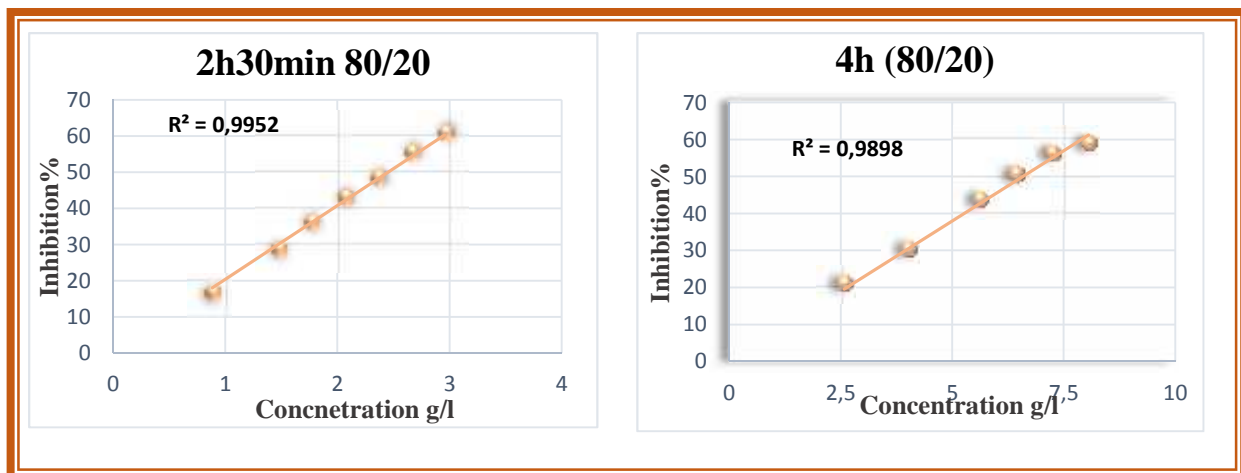


Figure.10: Courbes de la variation de PI% en fonction de la concentration phénoliques du S.R en g/l par rapport aux tourteaux pour le test DPPH



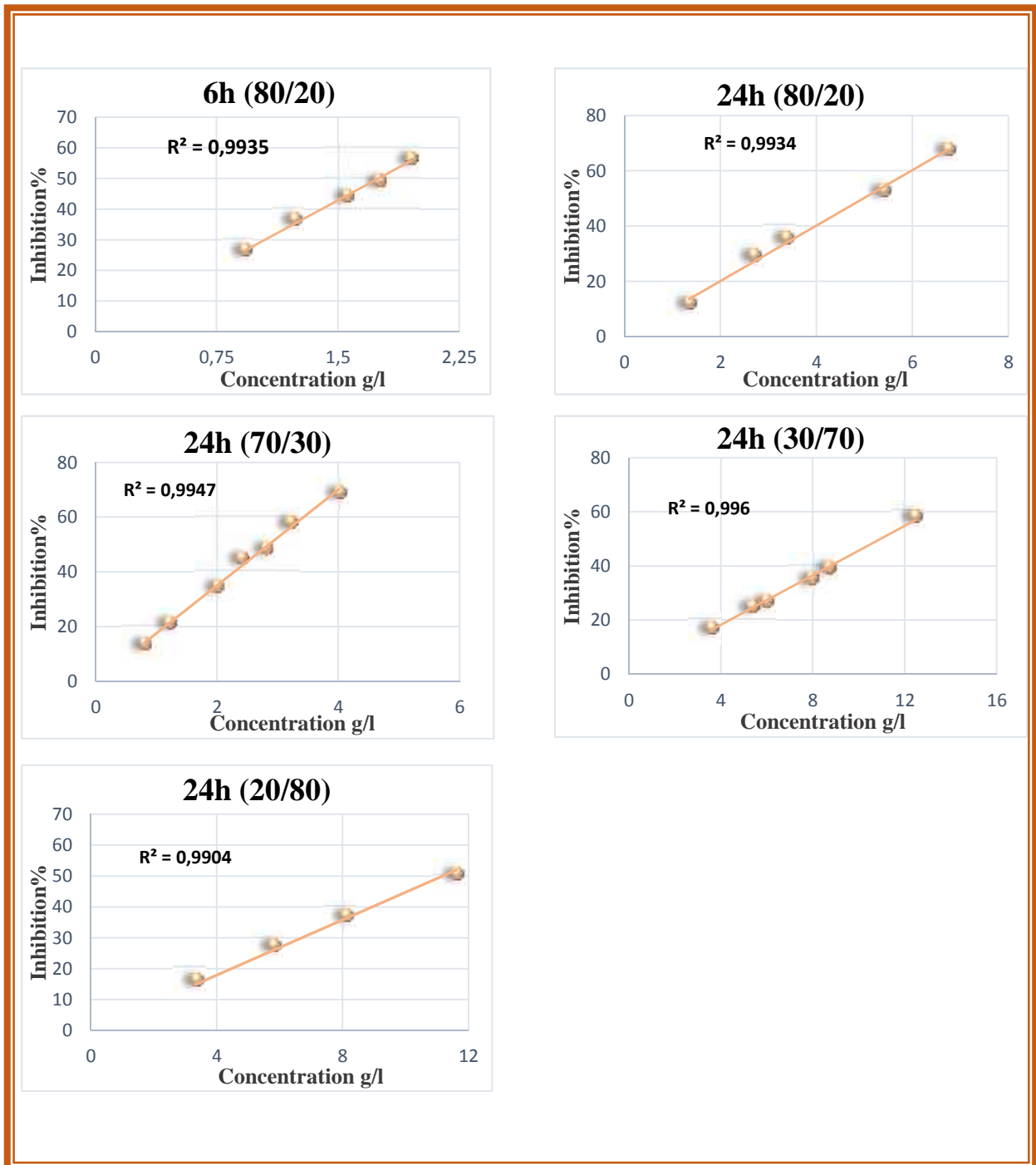


Figure.11: Courbes de la variation de PI% en fonction de la concentration phénoliques du S.B en g/l par rapport aux tourteaux pour le test DPPH.

Tableau.5 : Le pouvoir d'inhibition EC₅₀ des différents extraits phénoliques pour le test DPPH.

Extrait	EC ₅₀ des extraits phénoliques			
	S.R		S.B	
	EC ₅₀ /tourteaux (mg/ml)	EC ₅₀ /AG (µg/ml)	EC ₅₀ /tourteaux (mg/ml)	EC ₅₀ /AG (µg/ml)
2h 30min (80/20)	1,23 ± 1.80	0.1	2,46 ± 0.21	0.106
4h (80/20)	0,75 ± 0.33	0.120	6,65 ± 0.08	0.117
6h (80/20)	1,60 ± 1.58	0.135	1,77 ± 0.40	0.1
24h (80/20)	0,68 ± 1.06	0.304	4,92 ± 0.44	0.091
24h (70/30)	4,30 ± 0.62	0.106	2,75 ± 0.41	0.124
24h (30/70)	9,81 ± 0.23	0.151	10,92 ± 0.01	0.186
24h (20/80)	3,81 ± 0.24	0.144	10,39 ± 0.14	0.270
EC₅₀ Vitamine C : 0,005552 mg/ml				
EC₅₀ Vitamine E Commerciale : 0,031482 mg/ml				

Les valeurs sont des moyennes (n = 2)

Le paramètre EC₅₀ a été présenté récemment pour l'interprétation des résultats de la méthode de DPPH (autrement appelé la valeur IC₅₀). Ceci est défini comme la concentration de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Ce paramètre a été présenté par Brand-Williams et ses collaborateurs (*Brand-Williams et al, 1995 ; Bondet et al, 1997*). L'inconvénient de ce paramètre est que plus l'activité antioxydante est élevée plus la valeur d'EC₅₀ est inférieure. C'est un inconvénient en particulier quand des résultats sont présentés en forme de graphiques comme un diagramme à barres même si les mêmes données sont également disponibles en forme numérique puisque les valeurs d'EC₅₀ présentent les concentrations d'inhibiteurs nécessaires pour balayer 50% des radicaux libres et qui sont inversement proportionnelles à l'activité antioxydante.

Les profils de l'activité antiradicalaire obtenus révèlent que l'ensemble des extraits phénoliques du sorgho rouge ont un pouvoir antioxydant supérieur aux extraits phénoliques du sorgho blanc dans le cas des EC₅₀ présenté en mg/ml par rapport aux tourteaux.

Si on s'intéresse sur l'influence de deux facteurs (la durée du macération et la polarité du solvant) on a obtenu que le pouvoir antioxydant ne varie pas en même sens. Avec le temps à titre d'exemple dans le sorgho rouge, le EC₅₀ de 2h30mn est 1.23mg/ml par contre la durée de 6h le EC₅₀ est égal à 1.6mg/ml même remarque est signalée pour le sorgho blanc. Concernant l'influence de rapport du solvant, les valeurs de EC₅₀ sont entre 0,68 et

Résultats et discussions

9,81mg/ml pour le sorgho rouge et entre 2,75 à 10,92 mg/ml pour le sorgho blanc mais l'activité antioxydante de ce test est indépendante de la fraction du solvant.

Les extraits phénoliques dévoilent des capacités antiradicalaire inférieures à celles des antioxydants de référence (vitamine C et vitamine E). On note ici que les valeurs d'EC₅₀ en g/l sont calculées à partir des tourteaux.

La différence d'activité antioxydante observée entre nos extraits et les standards utilisés, pourra être expliquée par le fait que les antioxydants de référence sont des agents purs qui peuvent agir directement et avec leur concentration totale sur la réaction radicalaire.

Par contre, les extraits testés sont des mélanges qui renferment plusieurs molécules dont certaines sont inactives et leurs pourcentages d'inhibitions ont été calculés par rapport à la concentration totale du mélange qui prend en considération toutes les substances actives et non actives.

Si nous comparons la valeur de EC₅₀ calculée par rapport à l'acide gallique **Tableau.5** avec celle de Vasudeva G. Kamath (EC₅₀=17,66 µg/ml) (**Vasudeva et al., 2004**), nous remarquons que le sorgho étudié est relativement plus actif quel que soit le facteur influencé (la durée de macération et la polarité du solvant) et la variété étudiée. Ces différences sont dues peut être à : l'origine de l'espèce, le climat, le sol et la méthode d'extraction des composés phénoliques.

On a essayé de trouver une corrélation linéaire entre les valeurs d'EC₅₀ et les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes, mais on a obtenu des coefficients de corrélation faible ($R^2 < 0.3$) les figures sont citées en annexe. La seule explication de cette indépendance est que la composition des extraits en polyphénols et flavonoïdes sont différents. Ainsi, l'existence de certaines molécules individuelles responsables de cette activité peut influencer sur le pouvoir antioxydant. A cet effet, nous avons voulu trouver une corrélation entre le taux (pourcentage) des flavonoïdes de chaque échantillon et les valeurs d'EC₅₀. La **Figure.12** représente la variation des valeurs d'EC₅₀ en fonction du pourcentage de flavonoïdes.

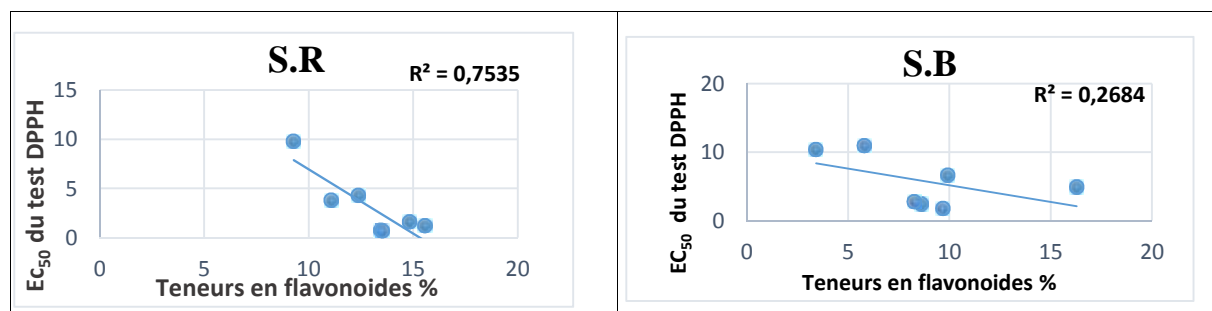


Figure.12 : Corrélation entre les EC₅₀ du test DPPH des tourteaux et les teneurs (%) en flavonoïdes.

Les extraits phénoliques du sorgho rouge présentent une corrélation significative a été observé entre les valeurs d'EC₅₀ du test DPPH et les teneurs (%) en flavonoïdes ($R^2 = 0,7537$), et une faible corrélation pour le sorgho blanc ($R^2 = 0,2684$).

❖ III.1.2.4. Le test chimique phosphate molybdate

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits a été déterminée à partir de courbe étalonnage vitamine E **Figure.13**, exprimé en VEEAC (vitamine E Equivalent Antioxydant Capacity) pour chaque extrait.

Les courbes donnant le pouvoir antioxydant exprimé la variation de l'absorbance en fonction de l'inverse du nombre de dilution pour les extraits phénoliques sont présentées dans les **Figures.14, 15**.

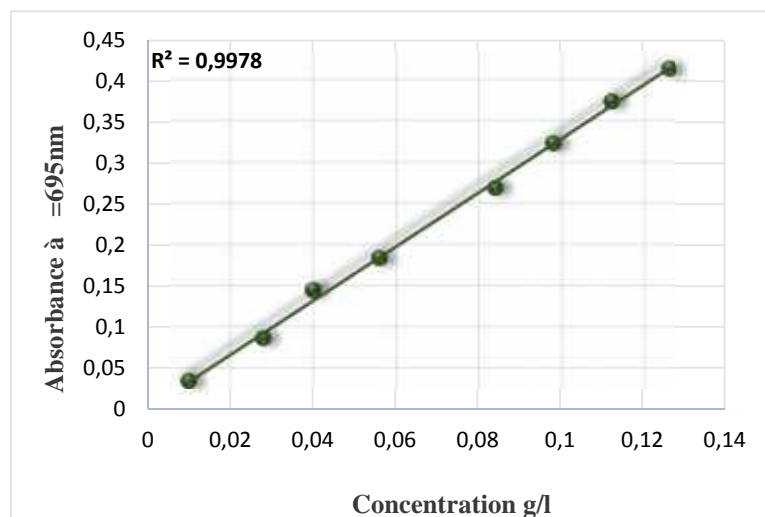


Figure.13 : Courbe d'étalonnage de la vitamine E du test Phosphate molybdate.

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus **Tableau.6** montre que l'activité antioxydante des extrais phénoliques des deux échantillons étudiés sorgho blanc et rouge est variable entre ces deux variétés.

On remarque aussi que l'extrait phénolique du sorgho rouge 24heure (80/20) v/v présente un pouvoir réducteur le plus important 1.26 mg VEEAC/g.

Tableau.6 : La capacité réductrice des différents extraits phénoliques

Extraits	Extraits phénoliques <i>mg VEEAC/g</i>	
	S.R	S.B
2h 30min (80/20)	0.34 ± 0,09	0.44 ± 0,07
4h (80/20)	0.45 ± 0,11	0.63 ± 0,05
6h (80/20)	0.39 ± 0,07	0.48 ± 0,1
24h (80/20)	1.26 ± 0,08	0.6 ± 0,09
24h (70/30)	0.55 ± 0,07	0.53 ± 0,06
24h (30/70)	0.19 ± 0,02	0.18 ± 0,04
24h (20/80)	0.22 ± 0,13	0.25 ± 0,05

Les valeurs sont des moyennes (n = 3)

En ce qui concerne le facteur de la fraction du solvant, les extraits phénoliques du sorgho obtenu par les fractions 80/20 et 70/30 découvrent un pouvoir réducteur fort en possédant des valeurs de VEEAC très proches et sont supérieurs aux VEEAC de deux autres fractions (30/70 et 20/80) à titre d'exemple la fraction 70/30 est 3 fois plus puissant que le rapport 30/70 dans le sorgho rouge et sorgho blanc. **Figure.14.**

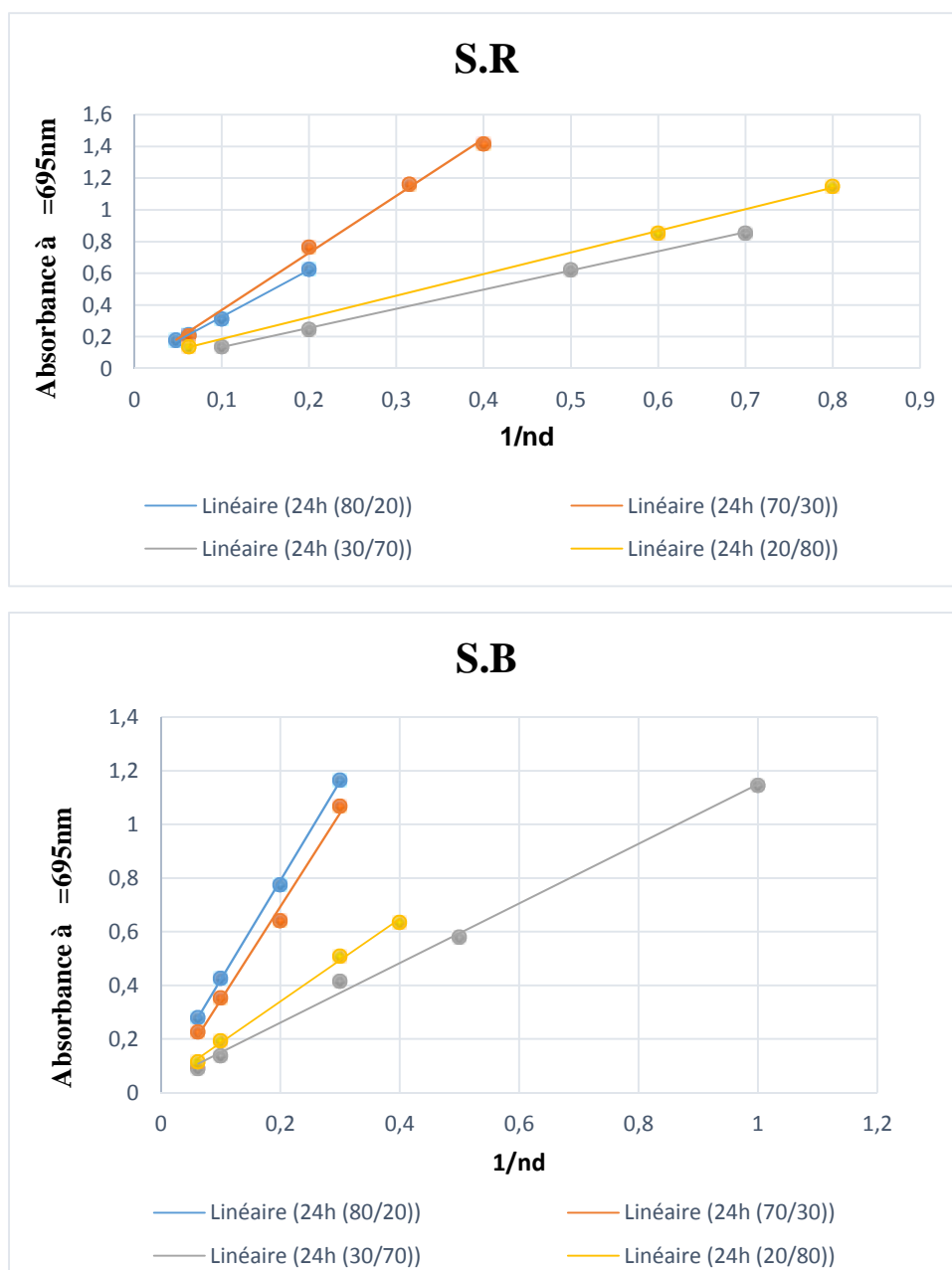


Figure.14 : Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits phénoliques Par le test de Phosphate molybdate (influence de la fraction du solvant)

Concernant l'influence de la durée de macération sur l'activité antioxydante, on note que le pouvoir réducteur varie en même sens avec la durée de macération sauf pour la macération 4h (80/20 V/V) on trouve que sa valeurs est toujours supérieur à la macération 6h (80/20) quel que soit la variété du sorgho, et les valeurs de VEEAC se rapprochent pour les deux échantillons étudiés ce qui est indiquée dans les **Figures.15**.

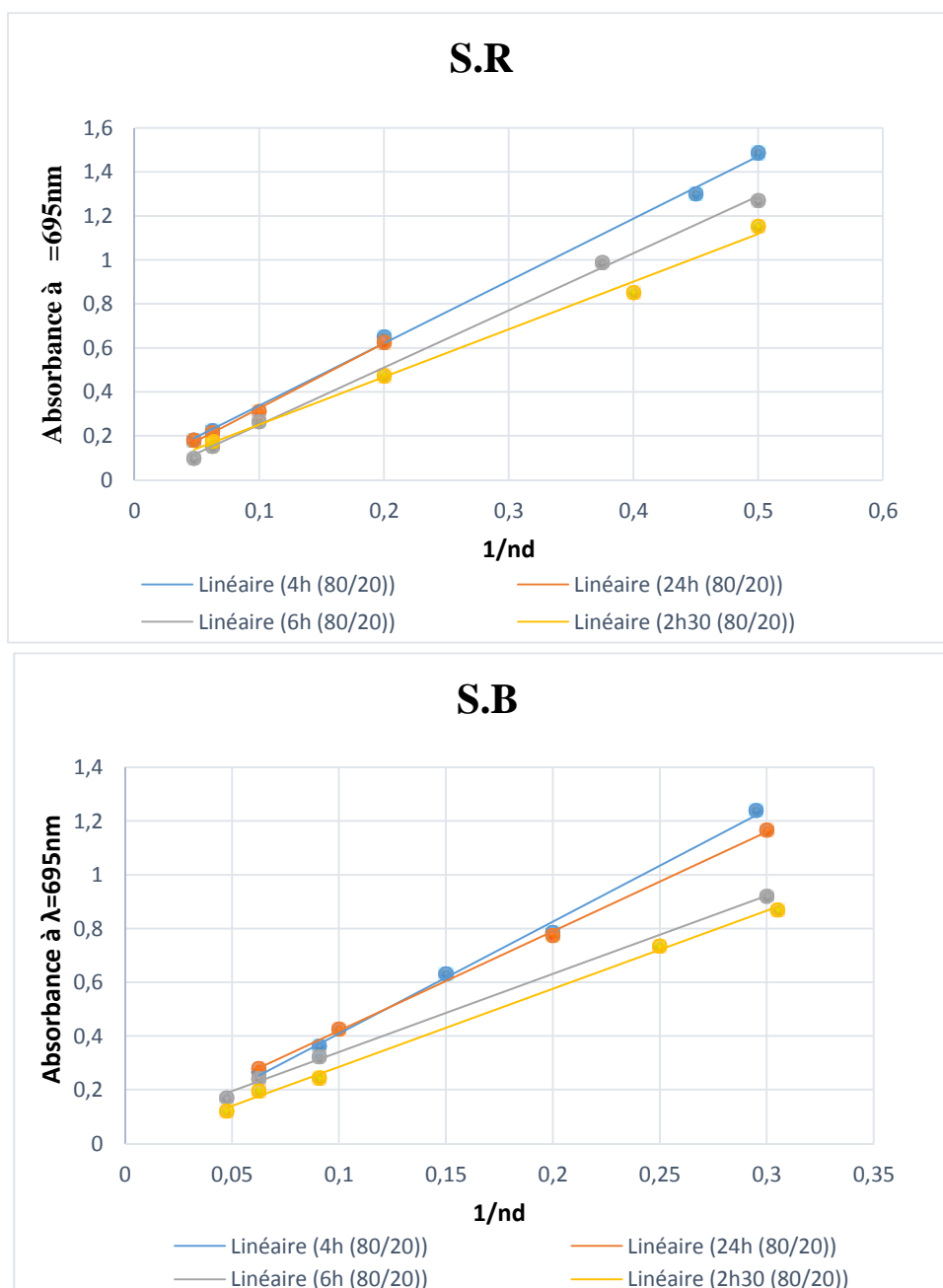


Figure.15 : Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits phénoliques Par le test de Phosphate molybdate (influence du temps).

Nous avons également, tracé les courbes représentant la relation entre les valeurs de VEAAC et les teneurs en polyphénols, pour les différents extraits **Figure.16** Les extraits phénoliques du sorgho présentent une corrélation significative a été observée entre les valeurs de VEAAC avec les teneurs en polyphénols ($R^2 = 0,9727$ pour le sorgho rouge et $R^2 = 0,7225$ pour le sorgho blanc), cette coordinance confirme que l'activité antioxydante dépend principalement à la fraction minoritaire ce qui est confirmé par la

Résultats et discussions

bibliographie qui indique que les composés phénoliques sont des capteurs puissants des électrons dans le sorgho (Awika et Rooney , 2004 ; Prashant.S, 2005).

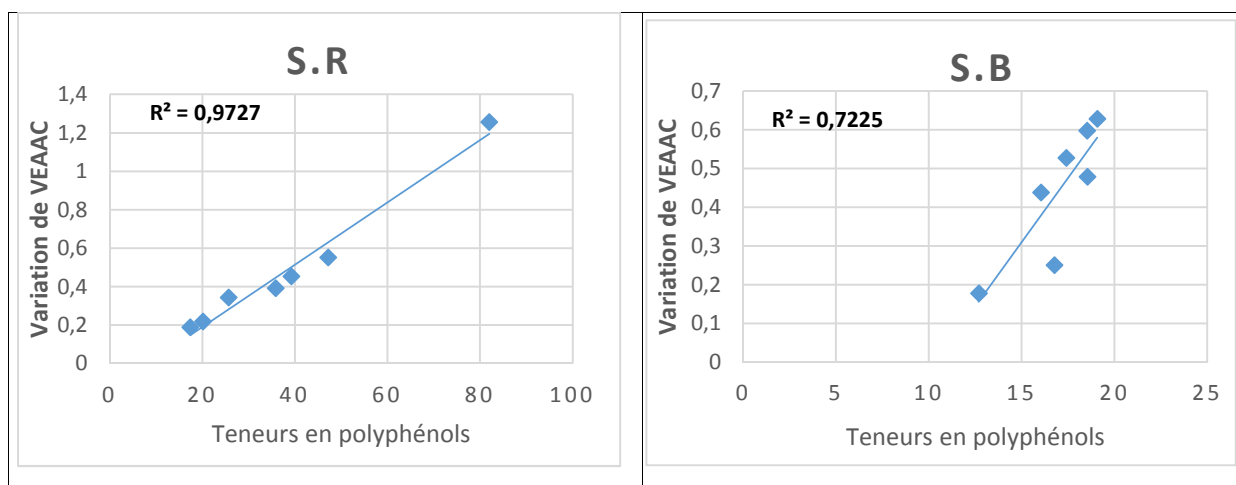


Figure.16 : Corrélation entre La capacité réductrice et Les teneurs en polyphénols du sorgho blanc et sorgho rouge.

Dans le but d'établir la relation entre la réduction de molybdate V et les teneurs en flavonoïdes, la **Figure.17** illustre la variation de VEAAAC en fonction du taux en flavonoïdes. Les résultats obtenus indiquent une bonne corrélation avec $R^2=0,9512$ de sorgho rouge, $R^2=0,6955$ pour le sorgho blanc. Ceci nous permet de déduire que la capacité réductrice est due à la participation de 95,12% et 69,55 % des flavonoïdes de sorgho blanc et rouge respectivement.

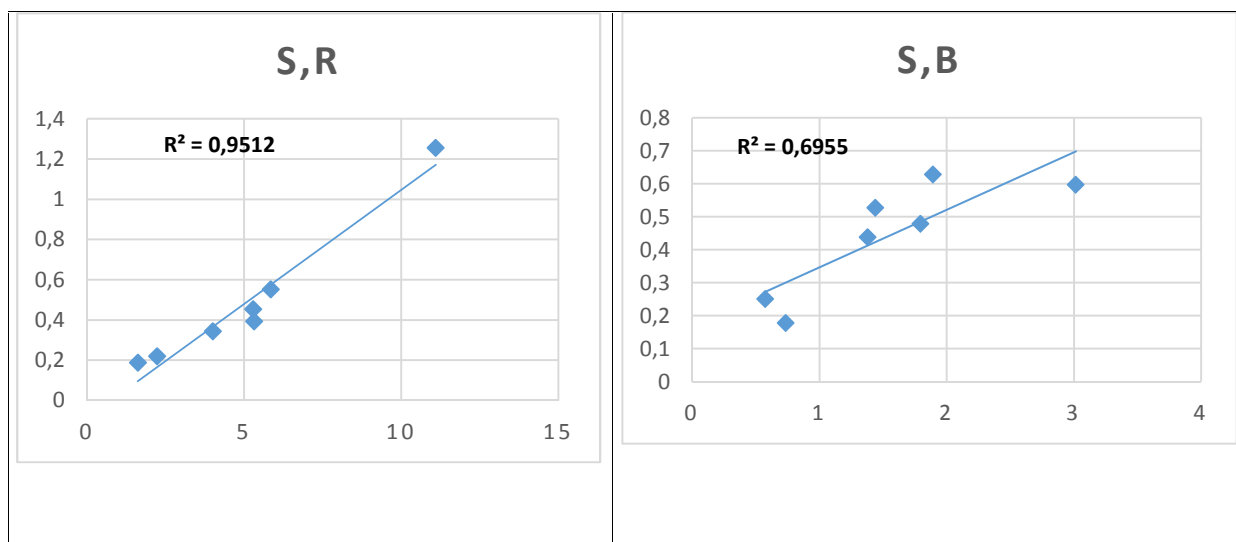


Figure.17 : Corrélation entre La capacité réductrice et Les teneurs en flavonoïdes du sorgho blanc et sorgho rouge.

Résultats et discussions

La position de la double liaison dans le cycle C ainsi que le nombre et/ou la position des groupements hydroxyles (OH), sont les éléments les plus importants pour expliquer l'augmentation ou la diminution de l'activité antiradicalaire de nos extraits phénoliques **Figure.18**.

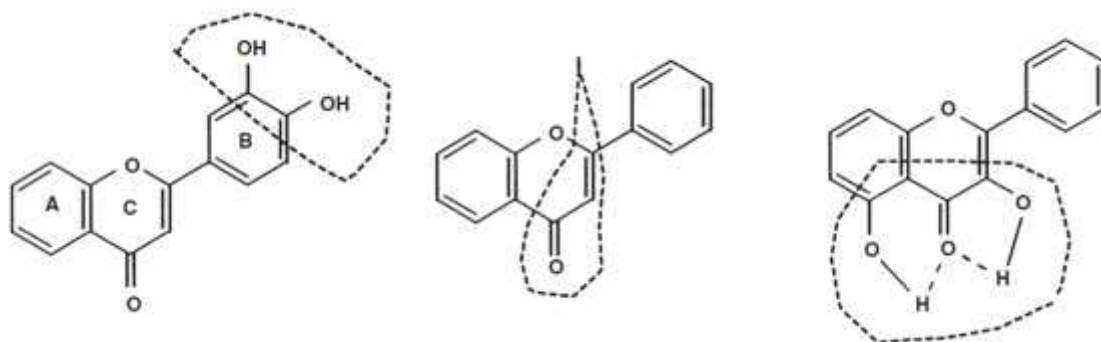


Figure.18 : Les doubles liaisons et nombre et la position des groupements OH influençant sur l'activité antiradicalaire

Nous avons aussi voulu trouver une corrélation entre l'activité anti radicalaire (test DPPH) des extraits phénoliques, et le test PPM après le calcul de pourcentage de la capacité réductrice et détermination de l'EC₅₀ **Figure.19**

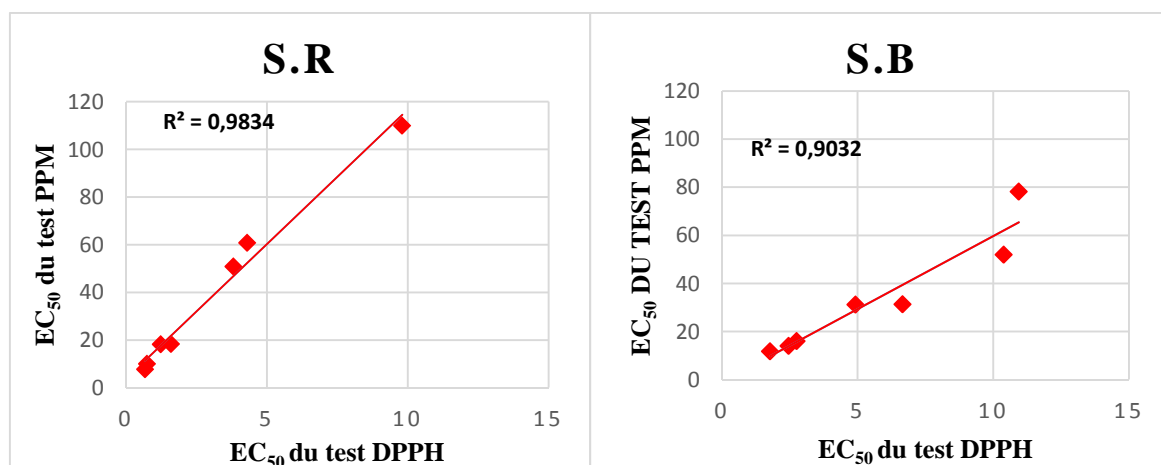


Figure.19 : corrélation entre le EC₅₀ du test DPPH et EC₅₀ du test PPM.

Il est clair qu'il existe une très bonne corrélation entre ces deux tests ($R^2 = 0.9834$) pour le sorgho rouge et ($R^2 = 0.9032$) pour le sorgho blanc quel que soit le facteur étudié, ce qui montre une bonne affinité entre ces deux tests et peut être le même mode d'action.

IV. Conclusion générale

Même si les antioxydants de synthèse sont efficaces et bon marché et que leurs doses autorisées sont largement limitées pour éviter tout problème de toxicité, on a assisté depuis des années à un engouement pour les produits naturels, et au développement d'extraits végétaux à usage antioxydants, qui auraient des propriétés biologiques pouvant contribuer à réduire le risque de certaines pathologies bien que le sujet soit en évolution permanente, Il nous a paru nécessaire de faire le point sur cette question, d'autant que l'intérêt pour les antioxydants naturels, partie particulièrement les polyphénols s'expliquent aussi par leur rôle potentiel *in vivo* vis-à-vis des radicaux libres, via l'alimentation ou la pharmacologie. De ce fait, l'objet de notre travail a porté sur l'activité antioxydante des extraits phénoliques d'une espèce saharienne peu connue à savoir le sorgho bicolor. L.

Les résultats de l'analyse quantitative des phénols totaux montrent que les variétés des graines étudiées contiennent des teneurs variables en polyphénols allant de 20.16 à 81.98 mg EAG /100g des tourteaux pour le sorgho rouge et de 12.68 à 19,06mgEAG /100g des tourteaux pour le sorgho blanc, pour les teneurs en flavonoïdes ils varient entre 1.61 et 11.09mgEQ /100g des tourteaux pour le sorgho rouge et entre 0.57 et 3.01mgEQ /100g des tourteaux pour le sorgho blanc, ces résultats ont montré que le sorgho rouge est plus riche en polyphénols par rapport au sorgho blanc, ces résultats ont montré aussi que la macération 24h (80/20) V/V donne la quantité en polyphénols et en flavonoïdes la plus importante sauf pour le sorgho blanc la quantité la plus importante a été marquée par la macération 4h (80/20) V/V.

A partir des résultats des tests du pouvoir antioxydant, nous avons présenté quelques observations et proposé des interprétations concernant l'activité antioxydante de nos espèces. Tout d'abord, le test DPPH a montré une réponse inhibitrice du radical variable d'une espèce à une autre. Ainsi, l'étude de l'influence du facteur rapport du solvant et le temps de macération sur l'activité antioxydante, les résultats obtenus montrent que les valeurs de EC_{50} ne varient pas dans le même sens ni avec la fraction ni avec le temps donc l'effet inhibiteur est indépendant à ces deux facteurs. Evidemment, les valeurs d' EC_{50} des extraits phénoliques ont été faiblement corrélées avec le contenu des composés phénoliques ($R^2 < 0.3$), ce qui confirme que la capacité antioxydante de ces espèces pourrait principalement être due à la présence de certaines molécules potentiellement actives. Par contre, la contribution des flavonoïdes dans le pouvoir antioxydant peut être confirmée par les corrélations positives ($R^2 = 0,7535$ et $R^2 = 0.2684$) entre les valeurs d' EC_{50} des extraits et le taux (%) de ces composés (deux variétés). Ces résultats confirment que le niveau de l'activité antioxydante dans nos

Conclusion générale

différentes graines dépend de la capacité antioxydante variable des composés phénoliques individuels dans chaque extrait.

Pour le test PPM les macérations (80/20) et (70/30) montrent des valeurs de VEEAC très importantes par rapport aux autres extraits de la macération (30/70) et (20/80). Concernant l'influence du temps on trouve que la macération 24heure donne des valeurs de VEEAC les plus élevés pour les deux échantillons.

En plus de ça, une bonne corrélation de $R^2 = 0.9834$ pour le sorgho rouge et $R^2 = 0.9032$ a été trouvée entre l'activité anti radicalaire (test DPPH) des extraits phénoliques, et les EC_{50} du test phosphate molybdate.

En effet, les paramètres qui peuvent agir sur les capacités antioxydantes des extraits sont le pH du milieu réactionnel, la solubilité, la concentration et la structure des composés phénoliques ainsi que la présence de certains agents biologiques qui peuvent agir en synergie avec les molécules.

Comme perspective, il est important de compléter ce travail on étudiant d'autre méthodes d'extraction aussi d'autres parties de cette espèce pour voir quelle est la méthode d'extraction la plus efficace et quelle partie de cette espèce donne l'activité antioxydante la plus élevée.

V. Références bibliographiques

- **Awika J.M., Rooney L.W., 2004.** Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochem.* 65(9):1199-221.
- **Benalia M., 2016.** Etude de la fraction lipidique de quelques graines de cucurbitacées, Université KASDI MERBAH- OUARGLA (Thèse de Doctorat).
- **Blainski A., Lopez G.C., Palazzo de Mello J.C., 2013.** Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L, 1420-3049, p 6852-6865; doi:10.3390/molecules18066852.
- **Bondet V., Brand-Williams W. and Berset C., 1997.** Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaftund Technologie*, Volume 30 (6), 609–615.
- **Bonnaillie C., Salacs M., Vassiliova E., Saykova I., 2012.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.), *Revue de génie industriel* 7, 35-45.
- **Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C., 1995.** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel - Wissenschaft Technologie*, Volume 28 (1), 25-30.
- **Brink M., Belay G., 2006.** Ressources végétales de l'Afrique tropicale 1.Céréales et légumes secs. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas/Bachuys Publisher, Leiden, Pays-Bas/CTA, Wageningen, Pays-Bas. 328 p.
- **Chantereau J., Cruz J.F., Ratnadass A., Trouche G., Fliede .G., 2013.** *Agricultures tropicales en poche. Le sorgho.* CTA, Wageningen, Pays-Bas/Edition Quae, Versailles Cedex, France/Presses agronomiques de Gembloux, Belgique. 248p.
- **Cotelle N., Bernier JL., Catteau JP., Pommery J., Wallet JC., Gaydou EM., 1996.** Antioxidant properties of hydroxylflavones. *Free Radic Biol Med.*, 20(1): 35-43.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., & Vidal N., 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.
- **Djeridane., A., 2008.** Evaluation du pouvoir antioxydant et de l'inhibition d'enzymes (la Carboxylestérase et l'Acylase) par des extraits phénoliques de dix-neuf plantes médicinales locales, .L'école Normale Supérieure De Kouba-Alger. (thèse de doctorat).

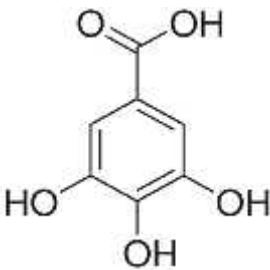
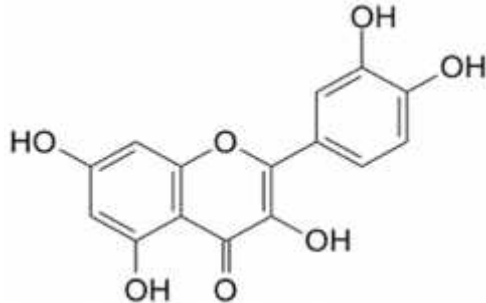
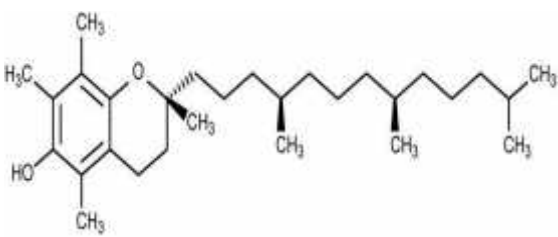
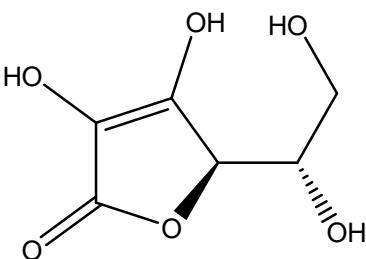
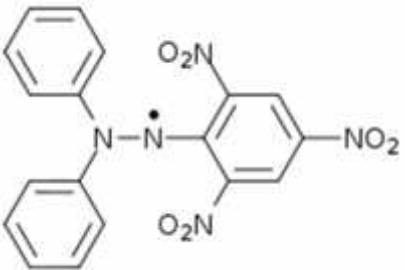
- **FAOSTAT**, 2014, in faostat, (<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>).
- **Guéritte F.**, 2009. La nature pour inspirer le chimiste : Substances naturelles, phytochimie et chimie médicinale, molécules virtuelles, Journal Horizons du FNS, 81, 101-115.
- **Hadbaoui Z.**, 2012. Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidique,protéiques et phénoliques de sorgho et de mil locaux ,Université KASDI MERBAH- OUARGLA (Thèse de Doctorat).
- **House L.R.**, 1987. Manuel pour la sélection du sorgho. Deuxième édition. Patancheru, A.P. 502 324, Inde: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- **Jadhav A.P., Kareparamban J.A., Nikam P.H., Kadam V.J.**, 2012. Spectrophotometric Estimation of Ferulic Acid from Ferula asafoetida by Folin -Ciocalteu's Reagent, 0976-8688, Der Pharmacia Sinica, 3 (6):680-684.
- **Mahmoud S., khali M., Mahmoudi N.**, 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.), Revue « Nature & Technologie». B- Sciences Agronomiques et Biologiques. Pages 35-40.
- **Mami Z.**, 2015. Activités biologiques du Seigle et du Sorgho chez le rat « Wistar » rendu diabétique par la Streptozotocine. Université Abou Bekr Belkaid .Tlemcen (Thèse de doctorat).
- **Mokrane H.**, 2010. valorisation des matières protéiques de céréales locales sorgho et mil. L'école Normale Supérieure De Kouba-Alger. (thèse de doctorat).
- **Mussatto SI., Ballesteros L.F., Martins S., Teixeira J.A.**, 2011. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83:173-179.
- **Naczka M., Shahidi F.**, 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, 1054. pp 95-110.
- **Naznin A., Hasan N.**, 2009. *In Vitro* Antioxidant Activity of Methanolic Leaves and Flowers Extracts of *Lippia Alba*, Research Journal of Medicine and Medical Sciences, 4(1): 107-110.
- **Nkhili E-Z.**, 2009. Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant, Laboratoire, Sciences des Aliments, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech. UMR A 408 UAPV-INRA, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Avignon (Thèse de doctorat).

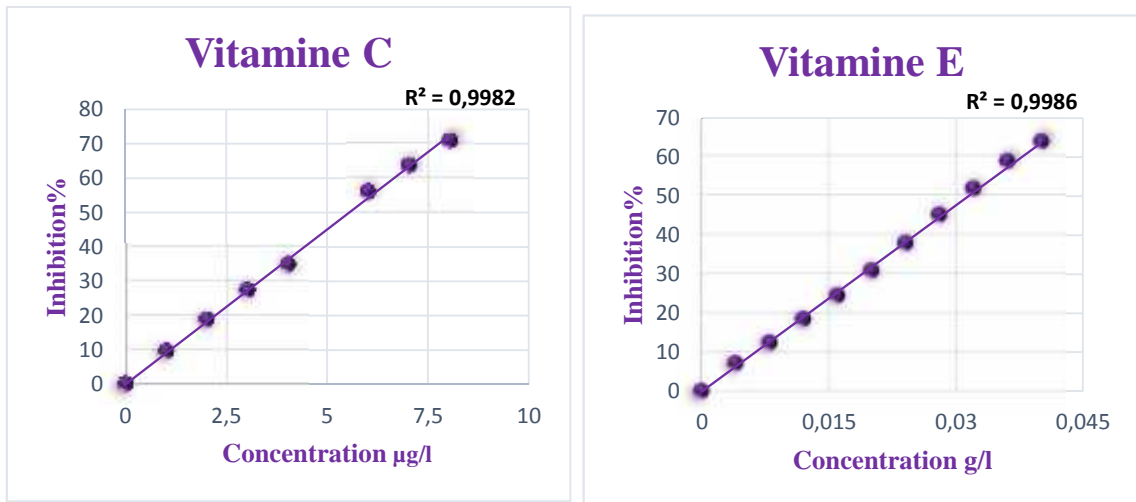
- **Popovici C., Saykova I., et Tylkowski B.,** 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *e-Revue de génie industriel* [en ligne], Numero 4 (2009), 23 août 2010. Disponible sur Internet : <http://www.revue-genie-industriel.info/document.php?id=951>. ISSN 1313-8871.
- **Prashant S., Hegde, T.S. Chandra,** 2005. ESR spectroscopic study reveals higher free radical quenching potential in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) compared to other millets *Food Chemistry* 92 (2005) 177–182.
- **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: 337–341.
- **Przybylski R., Lee Y.C., Eskin N.A.,** 1998. Antioxidant and radical scavenging activities of buckwheat seed components. *J Am Oil Chem Soci.* 75: 1595-1601.
- **Schaich K.M., Tian X., Xie J.,** 2015. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”, Department of Food Science, Rutgers University, 65 Dudley Rd., New Brunswick, NJ 08901-8520, USA, *Journal of Functional Foods* 18, pp782-796.
- **Singleton V. L., Rossi J. R.,** 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic –phosphothungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic*, 16: 144–158.
- **Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S., Hajlaoui H., Abdelly C.,** 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT Food Science and Technology*, 43(4):632-639.
- **Vasudeva G. Kamatha., Arun Chandrashekarb., Rajinia P.S.,** 2004. Antiradical properties of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) flour extracts *Journal of Cereal Science* 40 (2004) 283–288.
- **Waniska R.D.,** 2000. Structure, phenolic compounds, and antifungal proteins of sorghum caryopses. In: *Technical and institutional options for sorghum grain mold management*. Pages 72-106. Proceedings of an international consultation. ICRISAT, May 18-19, Patancheru, India.
- **Zielinski H., Kozłowska H.,** 2000. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J Agric Food Chem.* 48: 2008-2016.

VI. Annexe

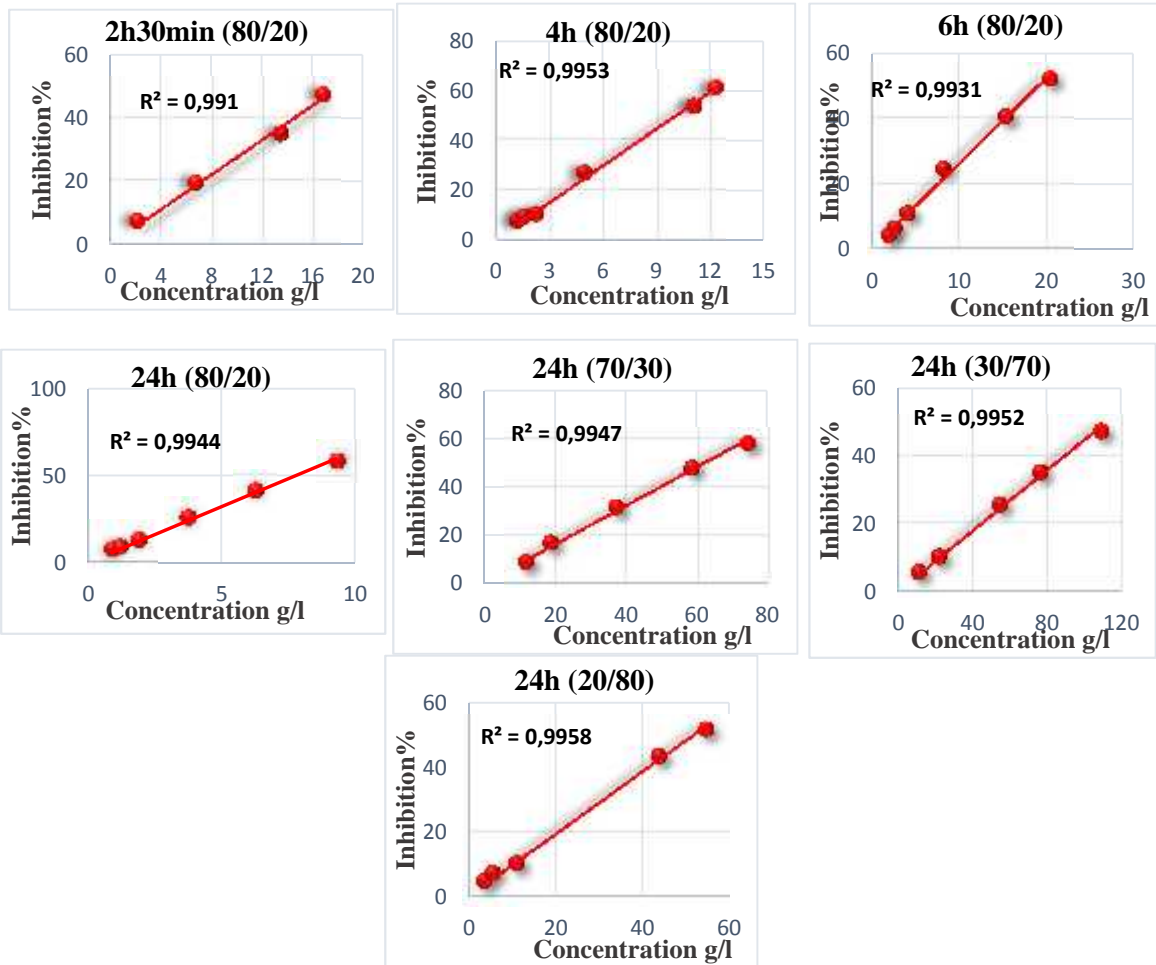
Matériels et Verreries utilisées

- Balance
- Rotavapeur
- Erlenmeyer
- Becher
- Ampoule à décanté
- Ballon
- Eprouvette graduée

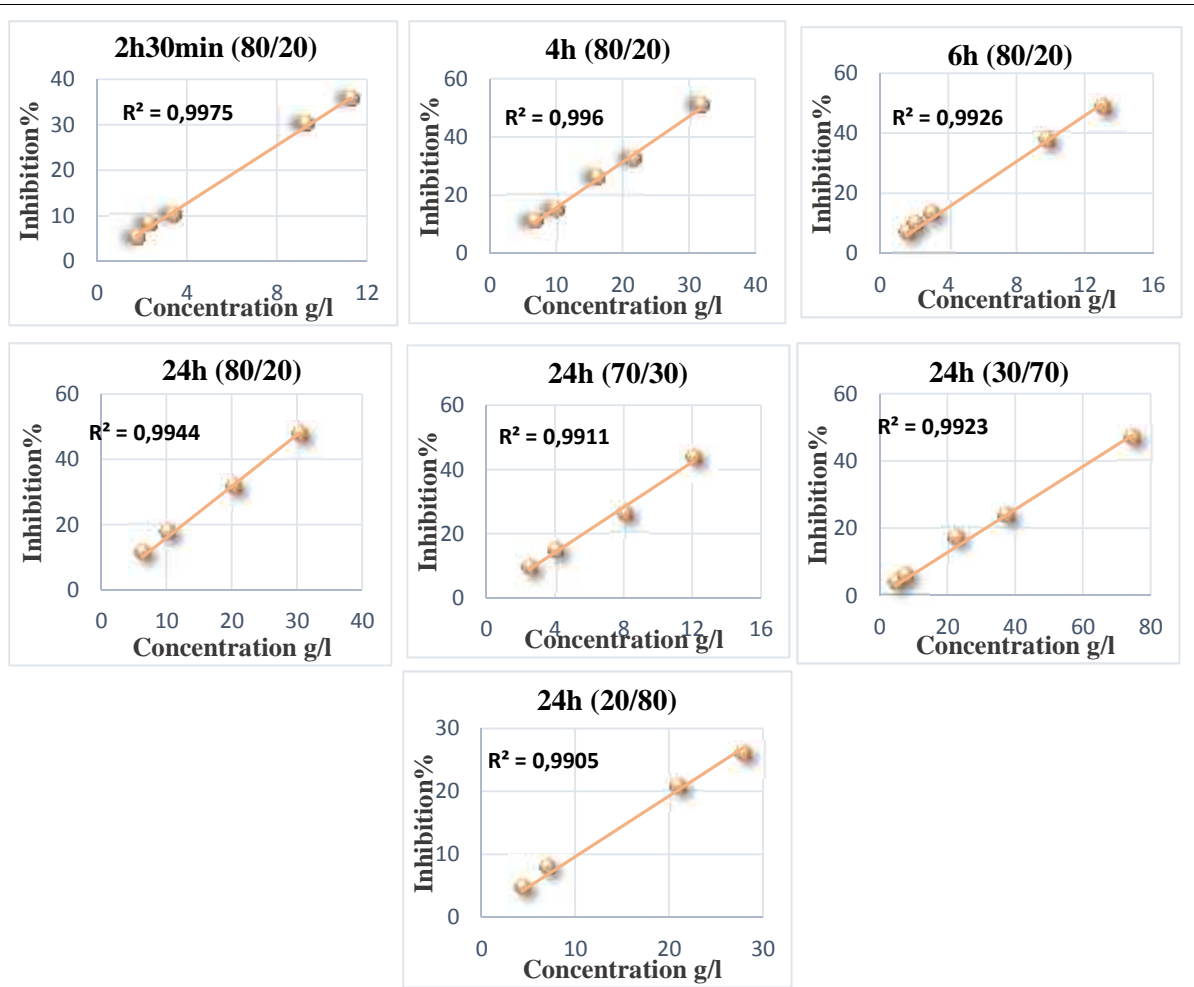
 <p style="text-align: center;"><i>Acide gallique</i></p>	 <p style="text-align: center;"><i>Quercetine</i></p>
 <p style="text-align: center;">-tocophérol <i>Vitamine E</i></p>	 <p style="text-align: center;"><i>Acide ascorbique</i> <i>Vitamine C</i></p>
 <p style="text-align: center;">2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl <i>DPPH</i></p>	



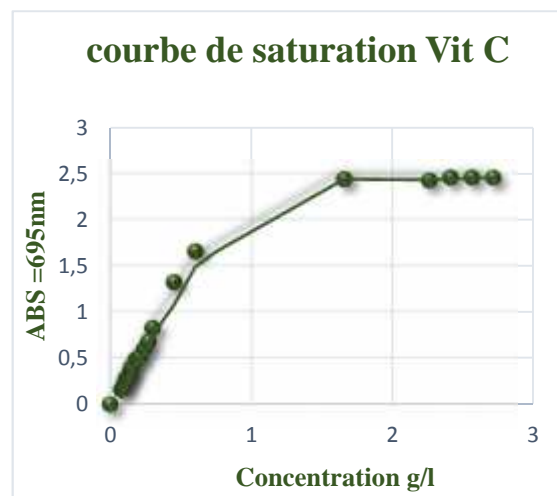
Courbes des standards pour le test de DPPH



Courbes de la variation de PI% en fonction de la concentration phénoliques du S.R pour le test molybdate phosphate.



Courbes de la variation de PI% en fonction de la concentration phénoliques du S.B pour le test molybdate phosphate.



Courbe de la saturation de vitamine C (test PPM)

Extrait	EC ₅₀ des extraits phénoliques mg/ml	
	S.R	S.B
2h 30min (80/20)	18,22 ± 0.11	16,05 ± 0.07
4h (80/20)	10,11 ± 0.05	31,35 ± 0.03
6h (80/20)	18,41 ± 0.01	11,86 ± 0.68
24h (80/20)	7,809 ± 0.16	31,32 ± 0.04
24h (70/30)	60,82 ± 0.02	14,13 ± 0.01
24h (30/70)	110,0 ± 0.01	78,21 ± 0.01
24h (20/80)	50,88 ± 0.01	52,06 ± 0.02

Le pouvoir d'inhibition EC₅₀ des différents extraits phénoliques en (mg/ml) pour le test Phosphate molybdate PPM.

