

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE d'ADRAR
FACULTE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER EN CHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT

Thème

Effet d'un traitement thermique sur les
polyphenols du millet et leur pouvoir
antioxydant

Soutenu le : 2014

Présenté par :

Djamila AZOUZI

Leila LAKSACI

Membres de jury :

Président :

M^r. Maamar YOUNSI Univ.d'ADRAR

Promoteur :

M^r Abdelhafid NANI

Univ.d'ADRAR

Examineurs

Mme Malika BAHIANI

U.R.E.R.M.S/Adrar

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier Allah, le clément et le miséricordieux de nous avoir donné la force et la patience de mener à bien ce modeste travail.

*Nous voudrions exprimer nos vifs remerciements à monsieur **Abdelhafid NANI** Maitre-assistant classe "A" à l'Université d'Adrar pour sa disponibilité, son sérieux, ses conseils judicieux, Sa pédagogie, son écoute, son ouverture d'esprit et sa vision de la recherche scientifique,*

Nous remercions les membres du jury :

*Monsieur **Maamar YOUNSI**, Maitre-assistant classe "A" à l'Université d'Adrar
Melle : **Malika BAHIANI**, Attachée de Recherche à l'URER/MS, Adrar d'avoir accepté de juger notre modeste travail.*

*Nous remercions chaleureusement Monsieur **BOUKHATACHE Ishak**, pour ses aides, ses encouragements et ses conseils judicieux durant toute la période du projet.*

En définitive, nous remercions toute personne qui a participé de près ou de loin, de façon directe ou indirecte, à la réussite de ce travail pour lequel nous avons tant consacré en y mettant aussi tout notre cœur.

Dédicace

*Je dédie ce travail, tout d'abord à mes parents
qui m'ont soutenu tout au long de mes études
par leur dévouement et abnégation.*

A ma sœur Meriem et mes frères.

A tous mes amis.

Leila.



Dédicaces

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

♥ *A ma famille* ♥

♥ *Djamila* ♥

Abstract

Polyphenols are plant's secondary metabolites that have been largely studied last years. The objective of this study was to evaluate the impact of a habitual heat process on the content of polyphenols and flavonoids in a cereal crop that grows in Adrar region, called pearl millet or *Pennisetum glaucum*. The objectif of this study is to evaluated the heat traitement .

The antioxidant activity of different phenolic compounds of treated seeds was evaluated by the method of DPPH.

Our results showed that heat traitement rose the pourcentage polyphenols to 43 .27%. Also, flavonoids to 38.29%.

The antioxidant activity of different extracts (evaluated by the method of trapping free radical DPPH*) has revealed that roasted seeds exhibited, at high concentrations, a high antioxidant capacity which were compared with standard (Gallic acid -Vitamin C).

Keywords: Extraction, flavonoids, phenolic compounds, antioxidant activity, the DPPH free radical trapping.

ملخص

المركبات الفينولية هي مركبات أيضية ثانوية نباتية عرفت بفوائدها المتزايدة في السنوات الاخيرة.

تضمنت الدراسة استخلاص بعض المركبات الثانوية المتمثلة في البوليفينولات والفلافونويدات من نبات البشنة (الذخن) *Pennisetum glaucum* الذي ينتمي إلى عائلة الحبوب والمنتشر في منطقة أدرار. وكان الهدف من هذه الدراسة تقييم التأثير الحراري على هذه المركبات المستخلصة مع دراسة نشاطها المضاد للاكسدة وأظهرت النتائج أن هذه المعالجة الحرارية زادت من مردود البوليفينولات بنسبة (43.27%) ومن مردود الفلافونويدات (38.29%)

تم تحديد فاعلية المضادة للاكسدة لهذه المستخلصات بواسطة طريقة تثبيط الجذور الحرة DPPH• و مقارنتها بمركبات قاسية هي Vitamine C, Acide gallique. **الكلمات المفتاحية:** استخلاص، البشنة، الانشطة المضادة للاكسدة، الذخن، البوليفينولات، الفلافونويدات.

Résumé

Les polyphénols sont des métabolites secondaires des plantes qui suscitent un intérêt croissant ces dernières années du fait de leurs effets biologiques multiples telle leur propriété antioxydante. Notre étude a pour objectif de vérifier l'effet d'un traitement thermique domestique sur les composés phénoliques d'une céréale qui pousse dans la région d'Adrar appelée millet ou *Pennisetum glaucum*. Ainsi le potentiel antioxydant des polyphénols du millet ayant subi le même traitement a été évalué. Nos résultats ont montré que le traitement thermique appliqué rend les polyphénols du millet plus extractibles, avec un pourcentage de 43,27 %. Aussi, l'extraction des flavonoïdes a été améliorée à 38,29 %. Le pouvoir antioxydant (piégeage du radical DPPH[•]) exercé par les polyphénols du millet cuit, à des grandes concentrations, est jugé comparable à ceux exercés par les antioxydants de référence utilisés (Vitamine C et acide gallique).

Mot clés : *Pennisetum glaucum*, polyphénols, pouvoir antioxydant, flavonoïde

Table des matières

| | |
|------------------------|--|
| Remerciements | |
| Dédicaces | |
| Liste des abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Résumé | |
| Introduction générale | |

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Radicaux libres et stress oxydatif

| | |
|---|----------|
| 1. Un radical libre | 2 |
| 2. Production des radicaux libres..... | 2 |
| 2.1 Méthode chimique..... | 2 |
| 2.2 Méthode physiques..... | 3 |
| 2.3 Méthode électrochimique..... | 3 |
| 3. Radicaux libres en biologie | 3 |
| 3.1 Les radicaux libres oxygénés (ROS)..... | 3 |
| 3.2 Les radicaux libres azotés (RNS)..... | 4 |
| 3.3 Les radicaux libres soufrés..... | 5 |
| 4. Le stress oxydant..... | 6 |
| 4.1 Définition du stress oxydant | 6 |
| 4.2 Impacts du stress oxydant sur l'organisme humain..... | 7 |

Chapitre II : Le pouvoir antioxydant

| | |
|--|----------|
| 1. les antioxydants..... | 8 |
| 1.1. Définition des antioxydants..... | 8 |
| 1.2. Classification des antioxydants suivant la nature chimique..... | 8 |
| 1.2.1 Les antioxydants naturels..... | 9 |
| 1.2.1.1 Les antioxydants enzymatiques..... | 9 |
| 1.2.1.2 Les antioxydants non enzymatiques..... | 9 |
| 1.2.2 Les antioxydants synthétiques..... | 10 |
| 1.3 Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action..... | 11 |
| 1.3.1 Antioxydants du groupe I..... | 11 |
| 1.3.2 Antioxydants du groupe II..... | 11 |

| | |
|---|----|
| 2. Evaluation de la capacité antioxydante <i>in vitro</i> | 12 |
|---|----|

Chapitre III : Les polyphénols

| | |
|---|----|
| 1. Définition..... | 15 |
| 2. Structure et classification des composés phénoliques..... | 15 |
| 2.1 Les acides phénoliques..... | 15 |
| 2.1.1 Les acides hydroxybenzoïques..... | 15 |
| 2.1.2 Les acides hydroxycinnamiques..... | 16 |
| 2.2 Les flavonoïdes..... | 18 |
| 2.3 Les anthocyanes..... | 19 |
| 2.4 Les tanins..... | 19 |
| 2.5 Les stilbènes..... | 20 |
| 2.6 Les lignanes..... | 20 |
| 3. Propriétés biologiques et pharmacologiques du polyphénols..... | 21 |

Chapitre IV: Le millet

| | |
|---|----|
| 1. Présentation générale..... | 22 |
| 2. Production du millet..... | 24 |
| 3. Valeur nutritive du millet..... | 24 |
| 4. Consommation et utilisation du millet..... | 25 |

Partie 2 : Etude expérimentale

Chapitre V : Matériels et méthode

| | |
|---|----|
| 1. Préparation du matériel biologique végétal..... | 27 |
| 2. Matériels utilisés..... | 28 |
| 3. Les Produits Chimiques..... | 28 |
| 4. Détermination du taux d'humidité..... | 29 |
| 5. Extraction des polyphénols et dosage des composés phénoliques..... | 31 |
| 5.1 Extraction des polyphénols..... | 31 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.2 | Dosage des polyphénols..... | 32 |
| 5.3 | xtraction des flavonoïdes..... | 34 |
| 5.4 | Dosage des flavonoïdes..... | 36 |
| 6. | Etude de l'activité antioxydante (pouvoir antioxydant)..... | 37 |
| 6.1 | Méthode DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) | 37 |
| 6.1.1 | Principe | 38 |
| 6.1.2 | Mode opératoire..... | 38 |

Chapitre VI : Résultats et interprétation

| | | |
|----|---------------------------------------|----|
| 1. | Determination du taux d'humidité..... | 39 |
| 2. | Teneurs en polyphénols..... | 40 |
| 3. | Teneurs enFlavonoïdes | 43 |
| 4. | Le pouvoir antioxydant évalué..... | 45 |

Conclusion général

Références bibliographiques

Liste des unités et des abréviations

- **T**: Température
- **%** : pourcentage
- **°C** : degré Celsius
- **μ**: micro
- **μL** : microlitre
- **μg /mL**: microgramme par millilitre
- **cm** : centimètre
- **g** : gramme
- **g/L** : gramme par litre
- **h** : heure
- **J** : jour
- **DO**: Densité Optique
- **L**: litre
- **M** : molaire
- **MeOH**: méthanol
- **EtOH**: éthanol
- **mg** : milligramme
- **min** : minute
- **mL**: millilitre
- **mol** : mole
- **mol/mL**: mol par millilitre
- **M.S.**: matière sèche
- **RF** : réactif de *Folin-Ciocalteu*
- **V/V**: volume par volume
- **AGE**: Acide Gallique Equivalent
- **CEQ**: Catéchine Equivalent
- **ERO**: espèce réactif de l'oxygène.
- **AAO** : Activité antioxydante
- **AlCl₃** : Trichlorure d'aluminium
- **DHPE** : 3,4-dihydroxyphényléthanol
- **DPPH** : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl

- **EAG/g.MS** : Equivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche
- **EC₅₀** : Efficient concentration value
- **ERN** : Espèces réactives du Nitrogène
- **ER/g.MS**:Equivalent de rutine par gramme de matière sèche
- **GSH** : Reduced glutathione
- **GSSG** : Glutathionedissulfide
- **H₂O₂** : Eau Oxygénée ou peroxyde d'hydrogene
- **H₂OD** : Eau distillée
- **LDL** : Low density lipoprotein ou lipoprotéine de basse densité
- **MeOH** :Méthanol
- **PP** : Polyphénol
- **RLs** : Radicaux libres
- **ROS** : Reactive oxygen species
- **s** : Seconde
- **SOD** : Superoxyde dismutase
- **t** : Temps
- **NB** : Nitrobleu de tétrazolium
- **[]**: concentration

Liste des figures

| | |
|--|----------|
| Figure 01. Formation et décomposition de l'ion peroxy-nitrite | 5 |
| Figure 02: Formation de Gluthationdisulfid | 5 |
| Figure 03: Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aiguë et chronique des ROS et RNS..... | 7 |
| Figure 04 : Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces..... | 9 |
| Figure 05 : Les systèmes de défense contre les radicaux libres | 12 |
| Figure 06: Structure de l'acide hydroxybenzoïques | 15 |
| Figure 07 : Structure de l'acide hydroxycinnamiques | 16 |
| Figure 08: Les différentes classes des composés | 17 |
| Figure 09: Squelette de base des flavonoïdes | 18 |
| Figure 10 : 3,3 ,4 tri hydroxy-4-méthoxy 7,7 -epoxy-lignan) | 21 |
| figure 11 : Particules du millet | 27 |
| Figure 12: Les grains du millet | 27 |
| Figure 13 : Dessiccation des échantillons..... | 30 |
| Figure 14 : Etuve iso-therme..... | 30 |
| Figure 15 : Macération de l'échantillon sous agitation. | 31 |
| Figure 16 : La filtration de l'extrait..... | 31 |
| Figure 17 : Dégraissage du filtrat..... | 32 |
| Figure 18: Evaporation des solvants d'extraction dans un rotavapor | 33 |
| Figure 19 : La gamme d'étalonnage et extrait des polyphénols à doser | 33 |
| Figure 20 : Le montage a soxhlet pour le millet cru et cuit..... | 34 |
| Figure 21 : La phase organique (cru et cuit) à évaporer dans un rotavapor..... | 34 |
| Figure 22 : Dégraissage de la phase aqueuse avec l'hexane | 35 |
| Figure 23: La phase aqueuse dégraissée est fractionnée par l'acétate d'éthyle..... | 35 |
| Figure 24 : la phase aqueuse fractionnée par n-butanol..... | 35 |

| | |
|---|----|
| Figure 25 : Spectrophotomètre UV Visible Cary.60..... | 35 |
| Figure26: Proportions d'humidité et de matière sèche dans le millet cuit..... | 39 |
| Figure27 : Proportions d'humidité et de matière sèche dans le millet cru..... | 39 |
| Figure 28 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux du millet (mg GAE/g M.S)..... | 41 |
| Figure 29 : Teneurs en polyphénols pour les deux cas étudiés (mg GAE/g M.S).... | 42 |
| Figure 30: La courbe d'étalonnage des flavonoïdes du millet en mg CEQ/g de M.S..... | 43 |
| Figure 31: Histogramme représente la teneur en flavonoïdes de millet en mg CEQ/g M.S..... | 44 |
| Figure 32: Les concentrations en mg CEQ/g M.S..... | 45 |
| Figure 33: Histogramme représente l'EC ₅₀ de chaque extrait..... | 47 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 01 : Principaux radicaux libres et leur structure chimique | 6 |
| Tableau 02: Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires..... | 10 |
| Tableau 03: Les Acides hydroxybenzoïques (dérivé de l'acide benzoïque) | 16 |
| Tableau 04 : Les acides hydroxycinnamiques (dérivé de l'acide cinnamique) | 17 |
| Tableau 05 : Les flavonoïdes et leur sources naturelles..... | 19 |
| Tableau 06 : Classification classique du <i>Pennisetum glaucum</i> | 23 |
| Tableau 07 : La production mondiale du millet..... | 24 |
| Tableau 08 : Valeur nutritive de 100 g de millet..... | 25 |
| Tableau 09: Formules chimiques des produits utilisés..... | 28 |
| Tableau 10: Teneur en polyphénols totaux du millet en mg CEQ/g M.S.... | 41 |
| Tableau 11: Teneur en flavonoïdes de millet en mg CEQ/g M.S..... | 44 |
| Tableau 12 : Les valeurs d'EC ₅₀ de différents extraits étudiés..... | 46 |

Introduction générale

A l'origine, la nature constituée d'êtres végétaux, servait d'alimentation aux animaux et aux hommes peuplant la terre. Mais à côté de cette fonction nutritionnelle, l'homme découvrit bien d'autres fonctions que pouvaient lui procurer les plantes, notamment le pouvoir de guérison. En effet cette faculté de guérison des plantes fut connue longtemps de nos ancêtres depuis les temps reculés. Elle deviendra plus tard la médecine traditionnelle avec toutes les avancées notoires qu'on peut lui attribuer (**Beloued , 1998**).

L'homme est toujours émerveillé par la beauté de leurs couleurs, la forme de leurs fleurs ou de leurs fruits. Il les considère comme des produits essentiels vers lesquels il se retourne en raison des bienfaits qu'elles procurent et pour leur grande utilité, ce sont de vraies panacées et de véritables pharmacies naturelles (**Beloued, 1998**).

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Il est difficile de définir les molécules responsables de l'action pharmacologique (**Bahorun, 1997**).

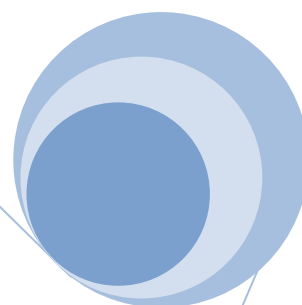
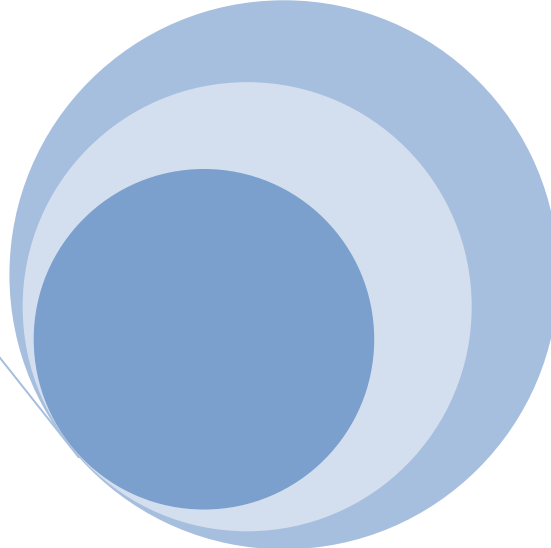
Actuellement plus de 80 % de la population africaine ont recours aux drogues faites essentiellement de matières végétales qui poussent autour de leurs villes . En plus dans le monde, près de 25% des prescriptions sont à base de plantes et 60 à 70% des médicaments antibactériens et anticancéreux sont des substances d'origine naturelle. (**BOURAS et HOUCHI , 2013**).

Les plantes de la famille des poacées (ex-**graminés**) sont des sources d'antioxydants naturels et elles restent encore sous exploitées dans le domaine médicale. Dans l'industrie pharmaceutique, sachant que les antioxydants sembleraient de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre du jour (**BOURAS et HOUCHI ,2013**).

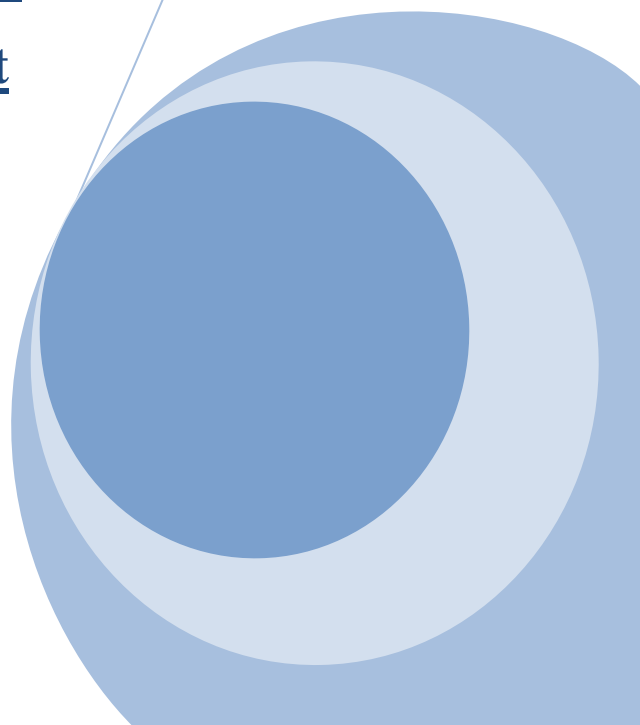
Pour le besoin de la présente étude, nous avons choisi le mille (*Pennisetum glaucum*),appelé également le mil perlé, parmi les plantes médicinales qui est le moins fréquemment employé dans notre pays à cause de l'ignorance de sa valeur nutritionnelle et médicale. Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance de cette plante médicinale de la région d'ADRAR en décortiquant la composition en certains constituants phytochimiques et évaluant le potentiel antioxydant de composes phytochimiques isolés,

Dans ce présent travail, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Evaluer l'effet d'un procédé domestique, la cuisson, sur le contenu en polyphénols et en flavonoïdes du millet.
- Evaluer l'effet de ce traitement thermique sur le pouvoir piégeur (scavenger) des différents composés phénolique vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH).



Chapitre I :
Radicaux libres
et stress oxydant



L'oxygène (ou dioxygène, O_2) est un gaz indispensable à la vie, apparu sur la Terre il y a plus de 2 500 millions d'années, simultanément au développement de la photosynthèse par les algues bleues. A l'exception de certains organismes anaérobies et aérotolérants, l'oxygène est nécessaire à tous les animaux, plantes et bactéries pour produire de l'énergie par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons telles que celle existant dans les mitochondries des cellules eucaryotes. Au cours de l'évolution, l'adaptation des espèces vivantes à l'oxygène s'est traduite par l'apparition d'enzymes facilitant non seulement sa consommation, mais également la détoxification de ses métabolites réduits qui sont le radical superoxyde O_2^- et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces espèces sont appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO) car elles sont beaucoup plus toxiques que ne l'est l'oxygène lui-même. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine des phénomènes de stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée.

Les radicaux libres interviennent dans un grand nombre de domaines en chimie, aussi bien en chimie sous rayonnement ionisant, chimie des radioéléments, qu'en chimie organique, inorganique, photochimie.... Généralement les réactions d'oxydoréduction font intervenir des intermédiaires radicalaires. Ces réactions sont omniprésentes dans le milieu vivant et gouvernent des processus aussi importants que la reproduction des espèces, la mutagénèse, la défense contre les maladies. Ces réactions interviennent dans le vieillissement et dans certaines pathologies **(Bouguerne, 2012)**.

1. Un radical libre

Par définition, un radical libre est un composé possédant un électron célibataire. Dans une molécule les doublets électroniques sont localisés dans des orbitales liantes, non liantes ou anti-liantes. L'orbitale d'un électron célibataire peut, de même, être liante, non liante ou anti-liante, et ceci a des conséquences sur les propriétés chimiques et structurales du radical libre **(Bouguerne, 2012)**.

Un radical libre est le plus souvent instable, donc réactif et sa durée de vie est très courte (de l'ordre d'une micro à nano-seconde) **(Bouguerne, 2012)**.

2. Production des radicaux libres

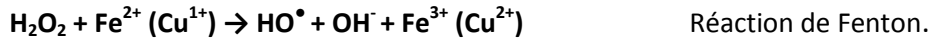
La principale voie de production des radicaux libres est la rupture homolytique d'une liaison covalente en deux entités possédant chacune un électron, les autres étant l'élimination ou l'addition d'un électron. Ces réactions sont endergoniques. Une fois produits, les radicaux sont souvent instables. Il faut donc des méthodes de détection adéquates **(Bouguerne, 2012)**.

Les méthodes utilisées pour produire des radicaux libres sont:

2.1 Méthode chimique

L'oxydoréduction: l'exemple le plus important est la réaction de Fenton. En 1876, H.J.H. Fenton décrit l'oxydation de l'acide tartrique ($C_4H_6O_6$), par addition de fer(II), **(Wardman et Candeias, 1996)**.

Il mit en évidence l'action catalytique du fer en 1895. C'est une réaction permet la production du radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène en présence d'un métal (Cu,Fe).

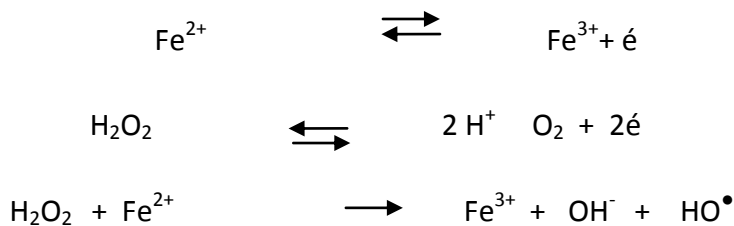


2.2 Méthodes physiques

On distingue : Thermolyse, photolyse, radiolyse et sono-chimie.

2.3 Méthode électrochimique

La production du radical hydroxyle (OH^\bullet) s'effectue par une réaction appelée Electro-Fenton. Elle consiste à réduire électro-chimiquement via des électrodes de mercure ou de graphite le fer ferrique en fer ferreux et l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Ce système permet de produire les deux espèces nécessaires à la réaction de Fenton



3. Radicaux libres en biologie

La biochimie des radicaux libres est née en 1960, quand McCord et Fridovch ont montré que l'anion superoxyde est sécrété en milieu vivant. En 1969, ces mêmes chercheurs découvrent le superoxyde dismutase (SOD). En 1970, **Murad et Ignarro** ont mis en évidence les effets relaxants du monoxyde d'azote NO^\bullet , ce qui leur vaut le prix Noble de médecine en 1998 (**Houée et al., 2005**).

3.1 Les radicaux libres oxygénés (ROS)

L'anion superoxyde O_2^\bullet et sa forme acide ont une faible réactivité. En revanche et en présence de cation métallique, l'anion superoxyde O_2^\bullet donne naissance au radical hydroxyle HO^\bullet très réactif.

Lors de la respiration mitochondriale, le dioxygène se réduit en eau. Les étapes de la réduction sont de 1 ou 2 électrons, mais aucun intermédiaire moléculaire ou radicalaire ne devrait sortir. Or il se produit des fuites de radicaux O_2^{\bullet} qui sortent dans le cytosol (1 à 2 % du dioxygène respiré). L'autre source de ce radical est la NADPH oxydase, qui est exprimée par la plupart des cellules et en particulier dans les neutrophiles.

Dans le cytosol (pH = 7.4) les radicaux superoxydes sont sous forme déprotonée, ce sont des oxydants ou des réducteurs doux, peu réactifs avec les bio-polymères qui ne contiennent pas un cation métallique. A titre d'exemple, ces radicaux peuvent à la fois oxyder la forme réduite du cytochrome c (Cyt c) ou réduire sa forme oxydée.



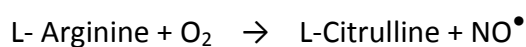
Oxydation et réduction du cytochrome C, Cyt c.

Dans les organites cellulaires acides tels que les lysosomes (pH \sim 5), l'anion superoxyde est sous sa forme acide appelée radical hydroperoxyde HO_2^{\bullet} qui est suffisamment oxydant pour initier une peroxydation lipidique.

Du fait de leur constante de vitesse réactionnelle très élevée ($> 10^7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{S}^{-1}$), les radicaux HO^{\bullet} peuvent oxyder les protéines, les acides nucléiques et peroxyder les acides gras.

3.2 Les radicaux libres azotés (RNS)

L'oxyde azotique NO^{\bullet} est principalement produit par un système enzymatique, la NO synthase, qui transforme l'arginine en citrulline en présence de la NADPH (1.5 équivalent).



Il est aussi possible de le produire par réduction des nitrites en nitrates sans l'aide d'enzyme. Le NO^{\bullet} peut réagir avec les fonctions thiols en donnant naissance aux S-nitroso thiols (RSNO),

avec les métaux de transition (fer, cuivre) et avec l'anion superoxyde pour former le peroxy-nitrite.

La forme acide du peroxy-nitrite (ONOOH) est un oxydant fort, dont la rupture produit deux oxydants puissants (NO_2^\bullet , HO^\bullet). Il peut également s'additionner au CO_2 pour donner un adduit instable, qui donne par la suite les radicaux NO_2^\bullet et CO_3^\bullet (Fig 1) (Eiserich *et al.*, 1998).

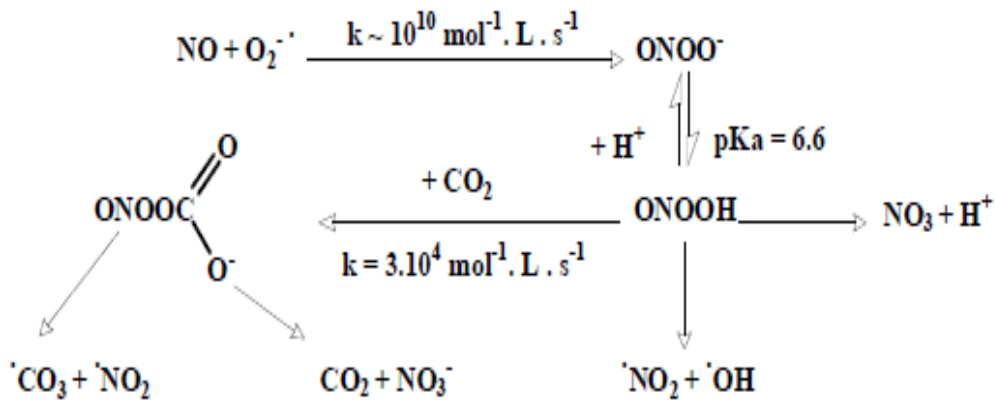


Figure 1. Formation et décomposition de l'ion peroxy-nitrite (Bouguerne, 2012).

3.3 Les radicaux libres soufrés

Ils ont comme origine l'oxydoréduction à un électron du couple disulfure/ dithiol de protéines ou de petits peptides. (Houée *et al.*, 2005).

Le principal disulfure cellulaire est le glutathion, qui est un tripeptide dont la concentration dans le cytosol peut aller jusqu'au l'ordre de mM. Dans le milieu intracellulaire réducteur, il est présent à l'état réduit thiol (GSH). Lors d'une attaque oxydante, il se dimérise pour donner GSSG, tout en passant par le radical thiyle (GS^\bullet) qui est un oxydant fort, puis un disulfure (GSSG^\bullet) (Fig 2).

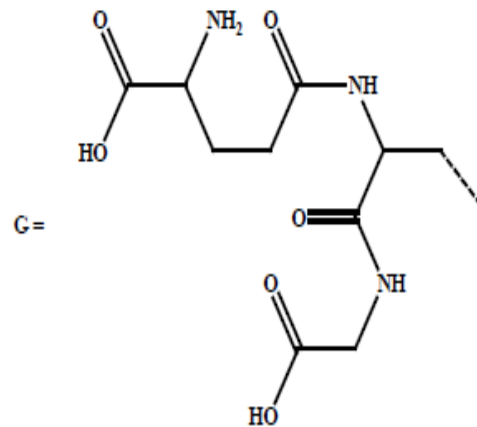


Figure 2: Formation de Glutathionedisulfide (Bouguerne, 2012).

Tableau 1: Principaux radicaux libres et leur structure chimique (Haton, 2005).

| | |
|-----------------------|-------------------------|
| Radical hydroxyle | HO^\bullet |
| Radical hydroperoxyde | HOO^\bullet |
| Radical peroxyde | ROO^\bullet |
| Radical alkoxyde | RO^\bullet |
| Peroxyde d'hydrogène* | H_2O_2 |
| Peroxynitrite | ONOO^\bullet |
| Anion superoxyde | $\text{O}_2^{\bullet-}$ |

* : Espèce active de l'oxygène, non radicalaire.

4. Le stress oxydant

4.1 Définition de stress oxydant

En 1991, Sies et al. ; a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des ROS, suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue de ROS, soit à une diminution de la capacité de défenses antioxydantes.

La pollution, le tabagisme, l'alcoolisme, la prise des contraceptifs, l'exposition prolongée au soleil ou à des radiations, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont des sources de production des ROS. Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants exogènes nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité antioxydante. Le stress oxydant peut être de courte durée et, grâce aux systèmes antioxydants, limité, avec un retour rapide à un état redox physiologique.

Un déséquilibre redox prolongé a des conséquences en pathologie et dans le vieillissement des tissus (**Fig3**). (Sies *et al*, 1991).

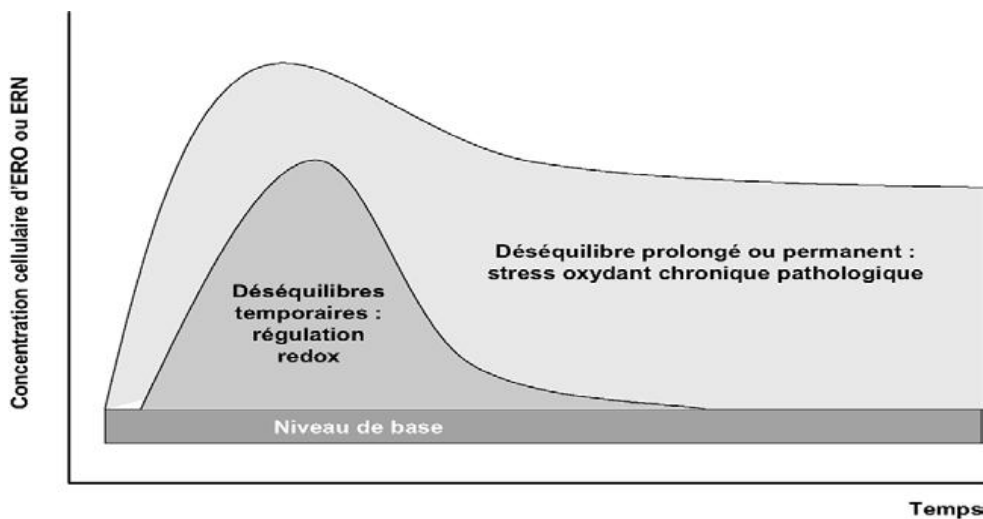
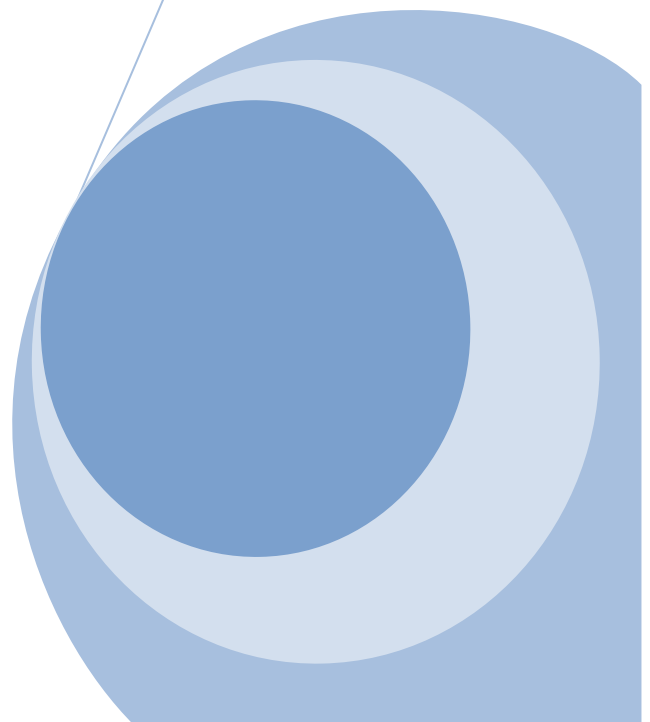
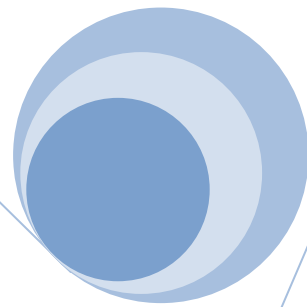
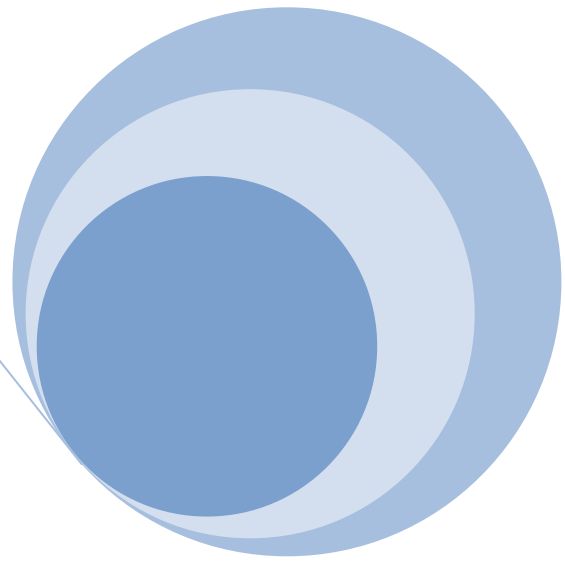


Figure 3. Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aigue et chronique des ERO et ERN. (Peynet et al., 2005)

4.2 Impacts du stress oxydant sur l'organisme humain

En raison de leur réactivité élevée, les espèces réactives interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré. En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine). Cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires, maladie de Parkinson, les inflammations gastro-intestinale, ulcères, les oedèmes et vieillissement prématuré de la peau (**Roberts et Sindhu .,2009**).

Chapitre II
le
pouvoir antioxydant



De nombreuses espèces oxydantes sont produites et bien qu'elles soient souvent indispensables à l'organisme, elles ne sont pas moins responsables de dégâts importants. Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défenses que l'on qualifie d'antioxydants. Mais bien que le terme « antioxydant » soit fréquemment utilisé, il est difficilement définissable car il couvre un large nombre de molécules et des domaines très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

1. Les antioxydants

1.1 Définition des antioxydants

Un antioxydant est toute substance, présente à une concentration inférieure à celle du substrat oxydable, qui est capable de retarder ou de prévenir l'oxydation de ce substrat. (**Helliwell et Gutteridge, 1999**)

Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine. Quelques antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres telles les vitamines et polyphénols, doivent être apportés par notre alimentation (**Pincemail et Defraigne, 2004**).

La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement par leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique.

1.2 Classification des antioxydants suivant la nature chimique

Plusieurs antioxydants synthétiques et quelques composés naturels (tocophérol, acide ascorbique, Béta-carotène) sont officiellement autorisés pour l'utilisation dans l'alimentation. Leur présence s'avère également nécessaire au sein des produits pharmaceutiques et de cosmétiques afin d'éviter leur dégradation.

Cependant, des études toxicologiques ont jugé certains antioxydants synthétiques comme sources de danger (**Barlow, 1990; Evans et al., 1992**). La recherche de nouveaux antioxydants naturels est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques. Dans la littérature, des milliers de publications ayant pour sujet les antioxydants naturels ainsi que leur effet sur l'organisme humain peuvent être consultées (**Namiki, 1990; Wanasundara et al., 1994; Larson, 1997; Pietta, 2000; Moure et al., 2001**).

1.2.1 Les antioxydants naturels

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (**Diplock, 1991**).

1.2.1.1 Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO.

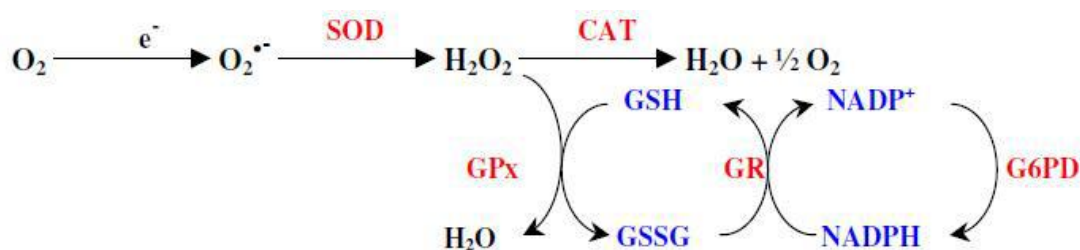


Figure 4 : Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives

1.2.1.2 Les antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et les polyphénols ces derniers suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant (**Kanoun, 2011**).

Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de l'implication des polyphénols, dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardio-vasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires (**Rock, 2003**). Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Tableau 2 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées
Koechlin-Ramonatxo, C. (2006)

| Principaux nutriments | Sources alimentaires |
|------------------------------------|--|
| Antioxydants | |
| Vitamine C | Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron |
| Vitamine E | Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, oeufs ,noix |
| β -carotène | Légumes et fruits orangés, et vert foncés |
| Sélénium | Poisson, oeufs viandes, céréales, volaille |
| Zinc | Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers |
| Flavonoïdes | Fruits, légumes, thé vert |
| Tanins | Lentilles, thé, raisins, vin |
| Métabolisme decystéine, glutathion | Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou OEufs, poissons, viandes |
| Acides phénoliques | Céréales complètes, baies, cerises |

1.2.2 Les antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la

nourriture (**Lisu et al., 2003**). Cependant, il a été démontré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (**Yu et al., 2000**). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomaux du foie et des organes extra-hépatiques (**Barlow, 1990**). Le BHT présenterait des effets carcinogènes chez le rat (**Ito et al., 1985**).

1.3 Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés ou en épurant les radicaux libres oxygénés. En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (**Gardès et Albert, 2003**).

1.3.1 Antioxydants du groupe I

Plusieurs noms ont été attribués à ce groupe par exemple, antioxydants primaires, chain breaking, piègeur des radicaux libres. Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives. Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques (AH) capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire. Les antioxydants de ce groupe réagissent de façon prédominante avec les radicaux peroxyés, pour deux raisons : la concentration élevée de ces radicaux et la faible énergie du groupement (ROO \cdot), en comparaison avec les autres radicaux comme le (RO \cdot) et la faible concentration du piègeur du radical libre dans l'aliment. Un piègeur du radical libre, même à des concentrations faibles, entre en compétition avec les lipides pour rendre le radical libre inactif par l'intermédiaire d'une réaction de libération d'un électron, suivie d'une déprotonation (**Frankel et al., 2000 ; Huang et al., 2005**).

1.3.2 Antioxydant du groupe II

Les composés de ce groupe sont catalogués comme préventifs ou antioxydants secondaires. Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes et ne transfèrent pas le radical libre sous sa forme non-radicalaire. Avec quelques exceptions, les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation. Le groupe II inclut : des chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des désactivateurs de l'oxygène singulet, des piègeurs de

la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative, enzymes antioxydantes et destructeurs des hydroperoxides. (Fig5)

Parfois, quelques antioxydants peuvent exercer plusieurs fonctions anti-oxydatives, par exemple, l'acide ascorbique peut être un piègeur du radical libre, désactivateur des oxygènes singlets dans une solution aqueuse et effectivement régénérer du tocophérol. Plusieurs flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux libres et chélateurs de métaux (Miller *et al.*, 1996).

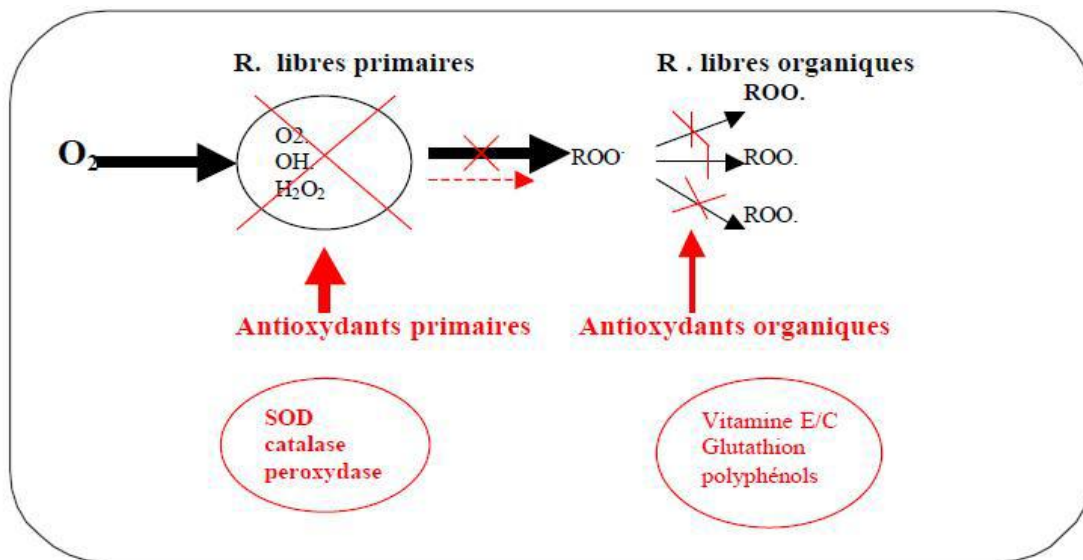


Figure 5 : Les systèmes de défense contre les radicaux libres (Binov, 2001).

2. L'évaluation de la capacité antioxydant *in vitro*

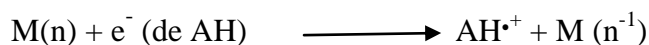
Les antioxydants peuvent réagir à différentes étapes du procédé d'oxydation et ils peuvent avoir plus d'un mécanisme d'action, ce qui ne facilite pas leur classification (Frankel et Meyer, 2000).

Selon Huang *et al.*, (2005), les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* peuvent être divisées en deux grandes catégories suivant les réactions mises en jeu :

- Les tests basés sur le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT, Hydrogen Atom Transfer), dans lequel l'antioxydant et le substrat sont en compétition pour les radicaux peroxydes ROO•:



- Les tests basés sur le transfert d'un électron (**SET**, Single Electron Transfer), dans le cadre desquels on mesure la capacité d'un antioxydant à réduire un oxydant, qui change de couleur quand il est réduit :



Les lipides sont les principaux constituants alimentaires vulnérables à l'oxydation, qui se traduit par une détérioration généralisée de l'aliment. La dégradation oxydative des lipides conduit à des modifications de texture, d'odeur, de goût (évolution vers le rancissement), il s'ensuit une perte de stabilité de l'aliment, qui se répercute alors sur sa durée de conservation. Diverses méthodes de dosage de l'activité antioxydante *in vitro* dans des aliments ou dans des systèmes biologiques, induisent l'oxydation de lipides ou lipoprotéines dans des conditions standardisées. L'activité antioxydante est déterminée à partir de la mesure de l'inhibition de cette oxydation.

- D'autres protocoles de dosage mesurent l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libres, c'est-à-dire l'activité antiradicalaire.

En résumé, il n'existe pas de test *in vitro* de référence pour évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon, sachant de plus que cet échantillon peut présenter divers mécanismes d'action. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester :

- Le test au ène – acide linoléique, basé sur la destruction oxydative du ène sous l'effet de la chaleur, de la lumière et de l'oxygène, ce qui entraîne la décoloration du ène. L'activité antioxydante est déterminée à partir de la mesure de l'inhibition de cette oxydation (**Miller, 1971**) ;

- Le test au DPPH• (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl), basé sur le piégeage du radical libre stable DPPHl par une molécule antiradicalaire, ce qui entraîne la décoloration du DPPH• (**Morales et Jimenez, 2001**).

L'avantage de l'utilisation combinée de ces deux différents tests réside dans leur complémentarité. En effet, le premier est basé sur l'inhibition de la peroxydation lipidique et mesure une activité antioxydante ; le deuxième est basé sur le piégage de radicaux libres et mesure une activité antiradicalaire. Aussi, le test au DPPH•, test rapide et facile à mettre en oeuvre, s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules testées. D'autre part, le test au ène – acide linoléique a été choisi car c'est une méthode un peu laborieuse mais reproductible et fiable.

- Le test au nitrobleu de tétrazolium (NBT) (**Vivas *et al.*, 1997**), basé sur la réduction du tétrazolium en bleu de formazan par les radicaux superoxydes, fait aussi partie du savoir-faire du laboratoire, mais n'a pas été utilisé dans le cadre de ce mémoire.

- Actuellement en cours de validation au laboratoire, deux nouveaux tests peuvent être cités: la mesure du pouvoir réducteur (**Jayaprakasha *et al.*, 2001**) et l'activité de chélation des ions Fe^{2+} (**Huang *et al.*, 2005**).

Le test sur le pouvoir réducteur met en avant la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron. Cette molécule pourra donc réduire les radicaux libres.

- Le test sur la chélation des ions Fe^{2+} quand à lui, met en avant la capacité d'une molécule à fixer les ions Fe^{2+} . Les ions Fe^{2+} jouent un rôle important lors de la production des radicaux libres notamment lors de la réaction de Fenton, qui survient à chaque fois qu'une molécule d' H_2O_2 est en contact d'ions Fe^{2+} et qui est à l'origine de la production des radicaux hydroxyl (OH), un des radicaux les plus réactifs. Le fer joue aussi un rôle dans la phase de propagation de la lipoperoxydation ainsi que dans la formation du radical O_2^-

- Le test **ORAC**.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three blue circles of varying sizes, each composed of concentric circles in different shades of blue. Two thin blue lines intersect at a point, forming a V-shape that frames the circles. The circles are positioned at the top, middle, and bottom of the V-shape.

Chapitre III

Les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes. Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (Stanley *et al.*, 2003)

En plus de leurs effets thérapeutiques, les polyphénols sont également utilisés comme additifs dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Orgogozo *et al.*, 1997).

1. Définition

Les polyphénols ou les composés phénoliques sont des composés métaboliques secondaires de source botanique, l'élément clé dans la formation de ceux-ci est la présence d'au moins un noyau benzénique lié à un groupe hydroxyle libre (OH), ou substitué. Avec d'autres groupes (éther, ester, le glucide...) avec de multiples structures.

2. Structure et classification des composés phénoliques

Cheynier *et al.*, (1997) ont classé les polyphénols en se basant sur la nature des substitutions et la structure de squelette de base comme suit :

2.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone (Singleton *et al.*, 1978). Il existe deux types des acides phénoliques selon leur substitution qui sont :

2.1.1 Les acides hydroxybenzoïques (dérivé de l'acide benzoïque)

Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure en C₆-C₁, composés d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone (Chira *et al.*, 2008). On trouve l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide gentisique et l'acide gallique (Ribereau, 1968)

Figure 6 : Structure de l'acide hydroxybenzoïques

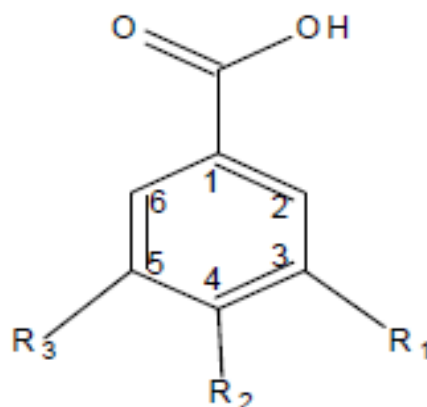


Tableau de 3: Les Acides hydroxybenzoïques (dérivé de l'acide benzoïque)

| Le nom | R1 | R2 | R3 |
|----------------------------|----|------------------|----|
| Acide benzoïque | H | H | H |
| Acide gallique | OH | OH | OH |
| Acide 4-hydroxy benzoïque | H | OH | H |
| Acide protocatéchique | OH | OH | H |
| Acide 4- méthoxy benzoïque | H | OCH ₃ | H |

2.1.2 Les acides hydroxycinnamiques (dérivé de l'acide cinnamique)

L'acide hydroxycinnamique est un composé C₆-C₃ produit par une désamination de la phénylalanine catalysée par la phénylalanine ammonia-lyase, l'acide paracoumarique (p-coumarique) est alors produit par l'hydroxylation de l'acide Cinnamique (**Ribereau, 1968**).

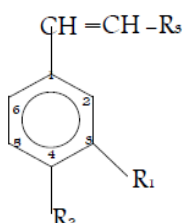


Figure 7 : Structure de l'acide hydroxycinnamique

Tableau 4 : Les acides hydroxycinnamiques (dérivé de l'acide cinnamique)

| Le nom | R1 | R2 | R3 |
|--------------------|------------------|------------------|------|
| Acide cinnamique | H | H | COOH |
| Acide p-coumarique | H | OH | COOH |
| Acide cafeïque | OH | OH | COOH |
| Acide Féruïque | OCH ₃ | OH | COOH |
| Acide Isoferuïque | OH | OCH ₃ | COOH |

Les composés phénoliques sont solubles dans les solvants organiques polaires et aussi dans les solutions de l'Hydroxyde de sodium et des Carbonates de sodium. (ولد الطيب, 2012).

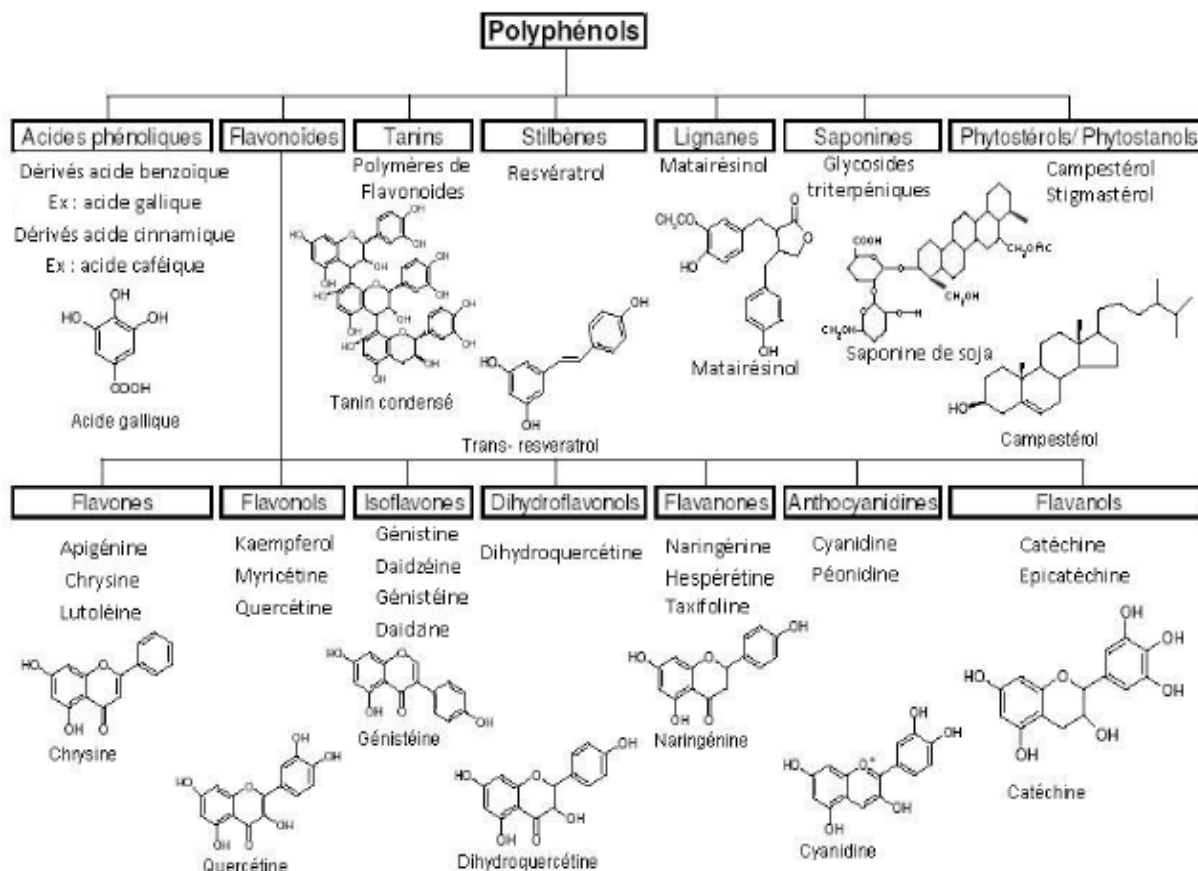
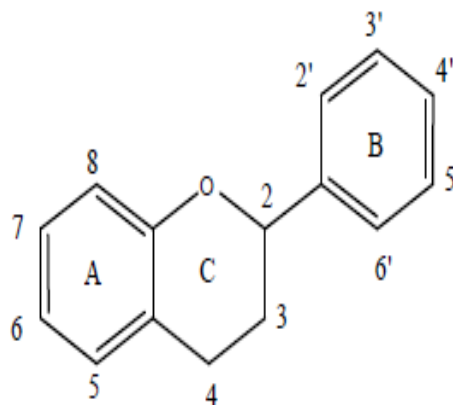


Figure 8 : Les différentes classes des composés phénoliques (ولد الطيب 2012)

2.2 Les flavonoïdes

D'après **Hinreiner et Geissman (1952)**, les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques comprenant 15 atomes de carbone formant une structure C₆-C₃-C₆, soit deux noyaux aromatiques C₆ (A et B) reliés par un pont de 3 carbones. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils ont des rôles variés dans les plantes en tant que métabolites secondaires, étant impliqués dans les processus de défense contre les UV, la pigmentation, la stimulation des nodules de fixation de l'azote et la résistance aux maladies (**Crozier, 2003**).

Figure 9 : Squelette de base des flavonoïdes



2.2.1 Propriétés antioxydants et piègeuses des radicaux libres de flavonoïdes

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), anions superoxydes (O_2^-) et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :



Les radicaux libres apparaissent dans plusieurs situations, telles que :

- l'anoxie : qui engendre la production de l'anion superoxyde (O_2^-),
- l'inflammation : qui correspond à la production d'anions superoxydes (O_2^-) par la NADPH⁻ oxydase membranaire des leucocytes activés, et, par dismutation, à celle du très réactif radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$); l'auto-oxydation des lipides : c'est au cours du stress oxydant que les espèces radicalaires, libres de tout contrôle, vont attaquer des cibles bioactives telles que les protéines, altérant ainsi les récepteurs cellulaires et les enzymes, les acides nucléiques (favorisant la survenue des mutations délétères à l'origine de divers cancers) et les lipides, notamment les particules de LDL de l'intima vasculaire, une phase qui constitue le primum movens dans la cascade athérogène. (**Ghedira, 1997**)

Les flavonoïdes peuvent être divisés en six sous groupes parmi ceux-ci nous trouvons

| Flavonoïdes | sources naturelles (produits alimentaires ou plantes médicinales) |
|--|---|
| Flavones apigénine | <i>Apium graveolens, Passiflora incarnata, Petroselinum sativum</i> |
| Flavones glycosylés Baicaline | <i>Scutellaria baicalensis</i> |
| Flavonols quercétine | <i>Allium cepa, Crataegus cuneata, Ginkgo biloba, Glycyrrhiza glabra, Morus alba, Olea europea, Solanum lycopersicum, Thea sinensis, Vaccinium macrocarpon, Vitis vinifera, Pueraria thumbergiana</i> |
| Flavonols glycosylés rutine (rutoside) | <i>Eucalyptus macrorrhyncha, Fagopyrum esculentum, Stellaria media, Sophora japonica</i> |
| Flavan-3-ols catéchine | <i>Thea sinensis, Vitis vinifera</i> |
| Flavanones naringénine | fruits du genre <i>Citrus</i> (sp. <i>aurantium, limon</i> , etc.) |

Tableau 5 : Les flavonoïdes et leurs sources naturelles

2.3 Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycolyses (**Guignard, 1996**). Les anthocyanines sont des flavonoïdes porteurs d'une charge sur l'oxygène d'hétérocycles C. La structure de base des anthocyanines est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C3 (**Ribereau, 1968**).

Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment.

Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (**Harbone, 1967**). Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu.

A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau (**Grayer, 1988**). Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, on trouve également les *anthocyanes* dans les racines, tiges, feuilles et graines.

2.4 Les tanins

On peut indiquer d'un point de vue général que les tannins sont des composés phénoliques présents dans la nature sous forme polymérisée. Dans les végétaux il existe en effet deux types de polymères ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 g/mol (**Doat, 1978**). Ils peuvent se diviser en deux classes :

- Les pyrogalliques (ou les hydrolysables).
- Les catéchiques (ou condensés non hydrolysables).

2.5 Les stilbènes

D'après **BEN DOUBA** (2013), Les stilbènes sont des composés polyphénoliques qui ont une structure C6-C2-C6, deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène. Ils sont produits par les plantes en réponse à des attaques fongiques, bactériennes ou virales, ce qui a été démontré pour le trans-resvératrol. La réaction de synthèse du resvératrol est catalysée par la stilbene synthase, les produits impliqués étant les mêmes que pour la synthèse des flavonoïdes, la seule différence concernant l'enzyme catalysant la réaction.

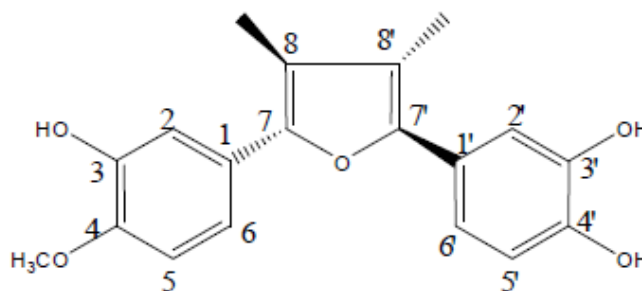
Le resvératrol se trouve sous forme cis et trans, et est présent dans les tissus végétaux principalement sous forme de trans-resvératrol-3-O-glucosides (trans-piceideet trans astringine).

Il existe des formes oligomères des stilbenes, identifiées dans le raisin, telles que le pallidol et les viniferines (**Kohlmeier *et al.*, 1997**) ou plus récemment un tétramère de resvératrol : l'hopeaphenol (**Gusman, 2001**).

2.6 Les lignanes

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C6-C3)₂, l'unité (C6 - C3) est considérée comme un propylbenzène. Les plantes les élaborent par dimérisation oxydante de deux unités d'alcool coniférique. Quand cette dimérisation implique une liaison oxydante par les C- 8 des chaines latérales propényles de deux unités d'alcool coniférique liées, formant la liaison (C8-C8), les métabolites résultants portent le nom de lignane.

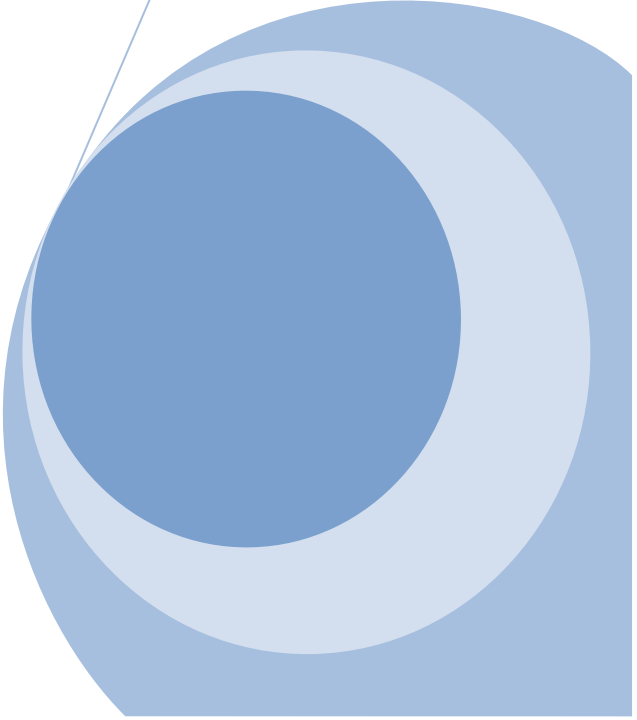
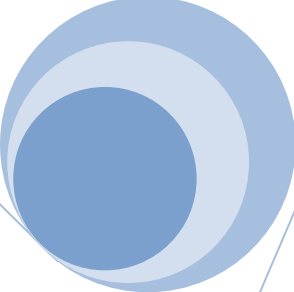
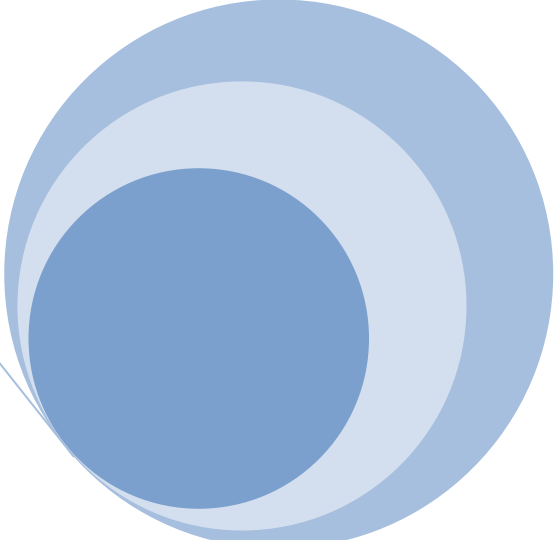
Figure10 : 3,3,4 tri hydroxy-4-méthoxy 7,7 -epoxy lignane (lignan)



3. Propriétés biologiques et pharmacologiques des polyphénols

La principale propriété initialement reconnue aux polyphénols est d'être «veino-actifs». Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance. Cette propriété leur a valu, par ailleurs, le nom de «vitamineP». Ces composés phénoliques sont en outre des agents antioxydants capables de piéger les radicaux libres (RL). Ces derniers apparaissent dans plusieurs situations comme le métabolisme oxydatif de l'oxygène, l'anoxie, l'inflammation et l'auto-oxydation des lipides (**Clarkson *et al.*, 2000**). En effet, au cours du stress oxydant, les espèces radicalaires libres de tout contrôle vont attaquer des cibles

bioactives telles que les protéines (altérant ainsi les récepteurs cellulaires et les enzymes) et les acides nucléiques. Ces altérations favorisent la survenue de mutations délétères à l'origine de divers ils sont également capables de chélate les ions métalliques, largués à partir de leur protéine de fixation ou de transport. Ces ions métalliques renforcent les effets délétères du stress oxydant en stimulant la production des radicaux hydroxyles (OH^\ominus) (**Sahnoun *et al.*, 1998**).



Chapitre IV:

-
-

le millet



1. Présentation générale

Les grains des céréales constituent le pilier de l'alimentation de plusieurs populations dans différents coins du monde. Elle sont une source importante d'énergie, des hydrocarbures, des protéines des fibres alimentaires, des minéraux, et des oligo-éléments (**Varsha et al., 2009**). Le millet est une céréale qui constitue la base de l'alimentation quotidienne des 50 millions d'habitants du Sahel (la Gambie, Mali, Niger, Nigeria, Sénégal et le Tchad). Extrêmement résistant à la sécheresse et bien adapté aux sols pauvres, il reste la seule culture correspondant véritablement aux conditions du milieu et aux habitudes alimentaires traditionnelles (**Vigouroux, 2009**).

Le « millet » est un terme générique qui désigne plusieurs espèces dont les grains servent dans l'alimentation humaine et animale. Le plus souvent, le terme réfère toutefois à une espèce particulière, le mill perlé (*Pennisetum glaucum*) qui appartient à la famille des Poacées (**Tableau 6**). C'est l'espèce la plus répandue à travers le monde. En Amérique du Nord, on la retrouve surtout sous sa forme décortiquée ou alors moulue en farine (**Caballero et al., 2003 ; Lorenzo et al., 1991**). Le millet est une céréale cultivée depuis plus de 3500 ans dans tout le Sahel et les pays tropicaux d'Afrique de l'Ouest. Originaire du Niger et du Mali, sa culture s'est diffusée en Afrique équatoriale puis vers l'Inde, notamment grâce à une adaptation génétique à différents climats, un des facteurs clés de la domestication et de la diffusion des plantes cultivées (**Vigouroux, 2009**). En Algérie sa culture est surtout répandue au Sud-ouest du pays. Dans la région d'Adrar, il est anciennement cultivé partout dans les oasis de différentes régions (Touat, Gourara et Tidikelt) (**Rahal et al., 2006**).

Le mil perlé est extrêmement résistant à la sécheresse et bien adapté aux sols pauvres et aux régions semi-arides et subtropicales (**Lestienne et al., 2007 ; Vigouroux, 2009**). Le semer s'effectue au début d'été, et la maturité a lieu dans 50 à 60 jours (**Myers et Ph.D, 2002**). La hauteur de la plante varie entre 1 et 3 m. Dans les zones humides, les plantes peuvent même atteindre 4 m de hauteur. Le système racinaire est concentré dans les trente premiers centimètres du sol, mais certaines racines peuvent descendre jusqu'à trois mètres de profondeur. Les feuilles ont une longueur variant de 20 à 100 cm pour une largeur variant entre 5 et 50 mm. La longueur de panicule (ou chandelle) varie de 10 cm à plus de 100 cm (**CIRAD, 2002**).

Tableau 6: Classification du *Pennisetum glaucum* (Dabre, 2008)

| | |
|------------------------|---|
| Classification | <i>Pennisetum glaucum</i> |
| Règne : | <i>Plantae</i> |
| Division : | <i>Magnoliophyta</i> |
| Classe : | <i>Liliopsida</i> |
| Ordre : | <i>Cyperales</i> |
| Famille : | Poacées (Graminées) |
| Sous famille : | <i>Panicoidae</i> |
| Tribu : | <i>Paniceae</i> |
| Section : | <i>Pennicillariae</i> |
| Genre : | <i>Pennisetum</i> |
| Espèce : | <i>Glaucum</i> |
| Nom botanique : | <i>Pennisetum glaucum</i> |
| Nom commun : | <i>millet blanc, panic millet. Millet perle</i> |

2. Production du millet

Les pays d’Afrique et d’Asie produisent 94 % de la production mondiale du mil, estimée à 28 millions de tonnes dans les années 1990. Le millet pénicillaire compte pour environ 15 millions de tonnes et il est très important dans les régions les plus chaudes et les plus sèches du monde. Presque tous les millets sont produits pour des fins alimentaires par des paysans qui pratiquent une [agriculture](#) à petite échelle, et seules de très petites quantités se trouvent sur le marché international, mais les statistiques restent incomplètes (Claire, 2012).

Tableau 7: La production mondiale du millet (FAO, 2005).

| Classement | Pays | Production (MT) |
|------------|------------------------------|-----------------|
| 1 | Inde | 8,000,000 |
| 2 | Nigeria | 6,100,000 |
| 3 | Niger | 2,500,000 |
| 4 | Chine | 2,200,000 |
| 5 | Burkina Faso | 1,250,000 |
| 6 | Russie | 1,050,000 |
| 7 | Mali | 815,000 |
| 8 | Soudan | 784,000 |
| 9 | Sénégal | 628,426 |
| 10 | Etats-Unis | 250,000 |

3. Valeur nutritive du millet

Les principaux composants du grain de millet sont le germe, le son et l’endosperme. Comparé au germe des autres céréales, celui du millet occupe une plus grande proportion du

grain entier. Puisqu'une grande part des nutriments (vitamines, minéraux, protéines et lipides) est contenue dans le germe, cela lui confère une bonne valeur nutritive. Par contre, la teneur et la disponibilité de la plupart de ces nutriments est diminuée par le décorticage et les différents procédés de raffinage du grain (**Wrigley *et al.*, 2004**).

Le millet entier est une source importante de vitamines du complexe B particulièrement la thiamine et la riboflavine, de vitamine E, de l'acide nicotinique, et de minéraux comme le potassium, le phosphore, le fer et le zinc, ce qui confère au millet entier une bonne valeur nutritive (**Wrigley *et al.*, 2004**). La composition en sels minéraux des graines du mil est extrêmement variable. Plus que les facteurs génétiques, ce sont les conditions écologiques des régions de culture qui ont une incidence sur la teneur en sels minéraux de ces céréales (**FAO, 1995**). Comparé aux autres céréales, le millet contient une teneur considérable en lipides, ainsi les protéines du millet sont jugées de bonne valeur nutritive dû de leur richesse en lysine que la plus part des céréales sont en déficitaires (**Burton *et al.*, 1972**).

Tableau 8 : Valeur nutritive de 100 g du millet (Fachman, 2000)

| Pour 100 G | Millet cru décortiqué |
|------------------|-----------------------|
| Energie (Kcal) | 349 |
| Protéines (g) | 10,6 |
| Glucides (g) | 68,8 |
| Fibres (g) | 3,80 |
| Lipides (g) | 3,90 |
| Vitamine E (mg) | 4 |
| Vitamine B1 (mg) | 0,43 |
| Vitamine B6 (mg) | 0,52 |
| Phosphore (mg) | 275 |
| Magnésium (mg) | 100 |

| | |
|-------------|------|
| Cuivre (mg) | 0,61 |
|-------------|------|

4. Consommation et utilisation du millet

La consommation de millet varie d'un pays à l'autre. Elle est plus élevée en Afrique, où le mil est une denrée de base essentielle. En Asie, l'utilisation du mil en alimentation humaine est importante dans certaines régions de l'Inde et de la Chine. Elle est négligeable en Amérique latine et dans les pays développés, sauf l'ex-URSS. Le mil est un aliment très énergétique, nutritif, recommandé pour les enfants et les personnes âgées ou en convalescence et également les animaux (**Claire, 2012**).

Cette céréale est utilisée dans l'alimentation humaine généralement pour la préparation de bouillie, comme on le fait avec le riz. elle pourrait être aussi réduite en farine pour cette même préparation ou en faire d'autres comme les galettes, les muffins et les crêpes. La farine de millet peut être associée à celle de blé pour faire du pain. Le mil est également utilisé pour assurer la nourriture des oiseaux et des animaux de la basse-cour (**Laurent, 2013**).

Il y a peu d'autres formes d'utilisation du mil. De petites quantités d'éleusine sont utilisées par des brasseries commerciales (**Claire, 2012**).

The page features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a lighter blue outer ring and a darker blue inner circle. These circles are arranged vertically, with the largest at the top, a medium one in the middle, and the largest at the bottom. Two thin blue lines intersect at the top left and extend diagonally across the page, framing the circles.

Chapitre V:

matériel et méthodes

1. Préparation du matériel biologique végétal

Le matériel biologique végétal a été récolté le mois d'Aout, 2013 d'une mise en valeur située dans la région d'Aougrou. Après séchage à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, après un broyage et stockage dans des flacons de verre.

D'autre part, afin d'examiner l'effet d'un procédé rencontré dans notre habitude culinaire locale, sur le profil phénolique une quantité des grains échantillonnés a été sujette à un procédé domestique utilisé pour la préparation de la plante avant d'être consommée comme suit :

- Les grains du millet ont été cuits dans un pot de cuisson sur un petit feu pour quelques minutes jusqu'au moment où les grains développent une couleur caractéristique et émettent une arôme distinguée.
- Les grains grillés sont refroidis à une température ambiante, broyés et conservés dans des flacons de verre.



Figure 11 : Particules du millet



Figure 12: Les grains du mil perlé

2. Matériels utilisés

- **verrerie:** ampoules à décanter, cristallisoirs, béchers, Eprouvettes graduées Büchner, Entonnoirs, Erlenmeyers et Flacons pour conservation.
- agitateur magnétique, Barreau magnétique;
- spatule;
- dessiccateur;

- pissette;
- capsules vides ;
- balance
- spectrophotomètre UV-Visible **CT.60**;
- pompe à vide ;
- papier filtre ;
- étuve iso -therme (**Memmert**) ;
- rotavapor ;

3. Les Produits chimiques

Tableau 9: Formules chimiques des produits utilisés

| Désignations | Formules chimiques |
|--------------------------|--|
| Méthanol | OHHC_3 |
| Acétone | $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ |
| Hexane | C_6H_{14} |
| Ether de pétrole | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ |
| Acétate D'éthyle | $\text{HC}_3\text{OOC}^- \text{C}_2\text{H}_5$ |
| Soude | NaOH |
| n-butanol | $\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$ |
| Acide gallique | $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5\text{H}_2\text{O}$ |
| Trichlo-ride d'Aluminium | AlCl_3 |
| Carbonate de sodium | Na_2CO_3 |
| Catéchine | $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ |
| Eau distillée | H_2O |

4. Détermination du taux d'humidité : (Audigié *et al.*, 1980)

- **Principe**

La détermination du taux d'humidité est effectuée par une dessiccation de l'échantillon dans une étuve isotherme de 103 à 105°C jusqu'à une masse pratiquement constante. Pour éviter toute reprise d'humidité, il convient d'opérer dans des capsules placées dans un dessiccateur.

- **Mode opératoire**

- Les capsules sont séchées à l'étuve pendant 30 min à 103°C avec couvercles inclinés ;
- Après refroidissement dans un dessiccateur durant 20 à 30 min, les capsules sont pesées avec leurs couvercles (**P1**);
- Dans chaque capsule, 2 g de l'échantillon sont introduit, l'ensemble est pesé avec les couvercles fermés (**P2**) ;
- Après un étuvage de 3 h à 105°C avec couvercles inclinés puis refroidissement dans un dessiccateur pendant 15 min, les capsules sont pesées, ensuite elles sont remises à couvercles inclinés dans l'étuve durant 1 h à 105°C ;
- Après refroidissement comme précédemment, les capsules sont pesées (**P3**) ;
- La différence entre deux pesées doit être inférieure à 2 mg, si non l'opération est renouvelée jusqu'à poids constant.



Figure 13 : Dessiccation des échantillons.



Figure 14 : Etuve iso-therme

- **Expression des résultats**

Le taux d'humidité de exprimé en pourcentage, est calculé selon la formule suivante:

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = [(P2-P3) / (P2-P1)] \times 100$$

P1 : masse en g de capsule vide.

P2 : masse en g de la prise d'essai avant séchage.

P3 : masse en g de la prise d'essai après séchage.

A partir du taux d'humidité nous avons déterminer le taux de la matière sèche qui est donné par la formule suivante:

$$\text{Taux de matière sèche \%} = 100 - \text{Taux d'humidité \%}$$

Les différentes techniques appliquées consistent à extraire le maximum de molécules polyphénoliques contenues dans la plante en utilisant des solvants organiques mélangés avec de l'eau.

5. Extraction et dosage des composés phénoliques

5.1 Extraction des polyphénols (Liyana et Shahidi, 2006)

- **Mode opératoire**

Afin d'obtenir un extrait qui servira pour un dosage colorimétrique, un procédé d'extraction de l'échantillon est effectué comme suite:

- 20 g de chaque échantillon (millet cuit, millet cru) sont pesés , et mélangés avec 200 ml de mélange MeOH-acétone-eau (7 /7 /6; V/V/V);
- le mélange a été soumis à une macération avec agitation à l'aide d'un Agitateur magnétique, pendant 2 heures ensuite, le mélange a été filtré;
- le filtrat a été récupéré et l'échantillon a été ré-extrait avec 200 mL du mélange (MeOH-acétone-eau) pendant 2h;
- Après filtration, les deux filtres sont réunis;
- l'extrait filtré a été dégraissé en le décantant, à volume égale, avec l'hexane (Chiremba *et al.*, 2012) dans une ampoule à décanter.



Figure 15 : Macération de l'échantillon sous agitation.



Figure 16 : La filtration de l'extrait.



Figure 17 : Dégraissage du filtrat.

5.2. Dosage des polyphénols : méthode de Folin–Ciocalteu (1927)

- Principe

Ce dosage est basé sur le couplage du Folin-Ciocalteu avec les composants phénoliques du matériel végétal (**Brune *et al.* 1991**).

- **Mode opératoire**

***Dosage colorimétrique**

La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique ($H_{30}PM_{12}O_{40}$) du réactif de Folin-Ciocalteu (un acide de couleur jaune, constitué de polyhétérocycles acides contenant du molybdène et tungstène) par les polyphénols en milieu alcalin (**Catalano *et al.*, 1999**). Elle se traduit par le développement d'une coloration bleu foncée due à la formation d'un complexe Molybdène ($M_{80}O_{23}$) tungstène (W_8O_{23}) mesuré au spectrophotomètre en utilisant l'acide gallique comme étalon.

Les polyphénols sont dosés par colorimétrie comme suite :

- à 500 μ l de l'extrait de chaque échantillon nous avons ajouté: 2500 μ L Folin-Ciocalteu (dilué 10 \times) plus 200 μ L Na_2CO_3 à 7.5%;
- le mélange bien agité est incubé à l'obscurité pendant 1h à 20°C;
- la lecture de l'absorbance des différentes concentrations est faite contre un blanc à 765 nm.

Gamme d'étalonnage qui consiste à lire les absorbance des différentes concentrations d'acide gallique, étalon, à 765nm est préparée comme suite :

- 3 mg d'acide gallique sont pesés, puis mélangés avec 10 ml du MeOH à 99.6%: c'est la solution mère de concentration 0.3 mg/ml;
- à partir de cette solution mère, nous avons préparé des concentrations filles suivantes: 0,21-0,15-0,105-0,075-0,06-0,045-0,024 mg/ml.



Figure 18 : Evaporation des solvants d'extraction dans un rotavapor



Figure 19 : La gamme d'étalonnage et les extraits des polyphénols à doser.

5.3 Extraction des flavonoïdes (Dauguet et Foucher, 1982)

Mode opératoire:

- 7.5g du matériel végétal sont pesées et mélangés avec 100 mL (MeOH-eau) (80/20; V/V);
- l'ensemble a été porté à l'ébullition dans un montage de type soxhlet pendant 2h;
- une fois l'extraction est terminée, le mélange est filtré, puis la phase organique a été évaporée sous vide à 45°C;
- la phase aqueuse restante a été dégraissée avec l'hexane (**Chiremba et al., 2012**);
- la phase aqueuse dégraissée est fractionnée par l'acétate d'éthyle (AcOEt) dans une ampoule à décanter;
- la phase organique a été évaporé à sec à 45 °C et, la phase aqueuse a été fractionner par n-butanol ;
- évaporation entre 45°C de ces dernière phases et garder la phase aqueuse pour la vérification ;
- A prés décantation les deux phases sont évaporées à 45°C ensuite ; l'extrait sec de chaque phase est récupéré avec 6 ml MeOH.



figure 20 : Extraction des flavonoides dans montage soxhlet .



Figure 21 : Evaporation de la phases organique après extraction.



Figure 22 : Dégraissage de la phase aqueuse avec l'hexane.



Figure 23: La phase aqueuse dégraissée, fractionnée par l'acétate d'éthyle



Figure 24 : La phase aqueuse fractionnée par n-butanol

Figure 25 : Spectrophotomètre UV Visible Cary.60.

5.4 Dosage des flavonoïdes (Ardestani et Yazdanparast, 2007)

Principe

Les groupements hydroxyles des flavonoïdes forment un complexe avec le Trichlorure d'Aluminium (AlCl_3).

Mode opératoire

- 700 μl d'extrait de flavonoïdes sont mis dans un tube à essai, auquel sont ajoutés 2000 μl d'eau distillée, puis 150 μl NaNO_2 à 15%;
- Après deux intervalles consécutifs de 6 min, 150 μl (AlCl_3 , $6\text{H}_2\text{O}$) à 10%, puis 2000 μl NaOH à 4 % ont été rajoutés.
- Les tubes sont incubés pendant 15 min à température ambiante;
- La lecture de l'absorbance des différentes concentrations est faite contre un blanc à 510 nm.

La courbe d'étalonnage a été établie comme suit:

Une solution mère de catéchine à 0,4 mg/ml est préparée en dissolvant 4 mg catéchine dans 10 ml MeOH ; À partir d'une solution mère nous avons préparé des dilutions de différentes concentrations : (0,36-0,28-0,2-0,12-0,08-0,04) mg/ml. Puis 500 µl de chaque concentration sont traités avec la même procédure décrite ci-dessus pour l'échantillon

6. Etude l'activité antioxydante (pouvoir antioxydant) (Ross et Singleton, 1965)

6.1 Méthode DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits phénoliques a été réalisée par : le piégeage du radical libre DPPH.

6.1.1 Principe

L'activité antiradicalaire des composés polyphénoliques contenus dans les extraits préparés est évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction (capté par les produits testés) (Zeghad, 2009).

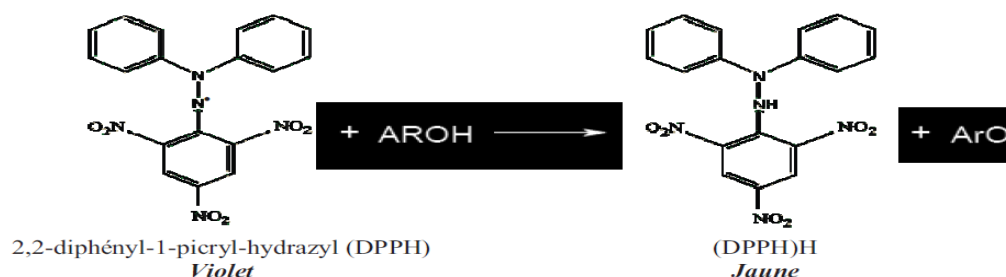


Figure 26 : réduction de DPPH.

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène.

6.1.2 Mode opératoire :

Le pouvoir piégeur des radicaux libres par les différents extraits a été évalué en utilisant un radical libre stable (DPPH) selon la méthode de Masuda *et al.* (1999) avec de

légères modifications. Différentes concentrations (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2) mg/ml sont préparées. Puis, dans des tubes à essai, 50 µl de chaque concentration (diluée dans 2000 µl MeOH) est mélangé avec 50 µl DPPH méthanolique à 5 mM. Les tubes sont, ensuite, placés à l'obscurité à 37°C pendant 30 min. l'absorbance de chaque extrait contenant le DPPH (A1) est lu dans un spectrophotomètre UV-Visible à 517 nm. L'absorbance de chaque extrait dilué sans DPPH (As), et uniquement la solution du DPPH méthanolique sans extrait (A0, control) sont aussi enregistrés pour déterminer le pouvoir piégeur du radical DPPH selon une méthode modifiée de Tachibana et al. (2001). Le pourcentage du pouvoir antiradicalaire de chaque extrait est déterminé sur huit concentrations dans un intervalle dose-réponse (7-99% réduction) est calculé comme suite :

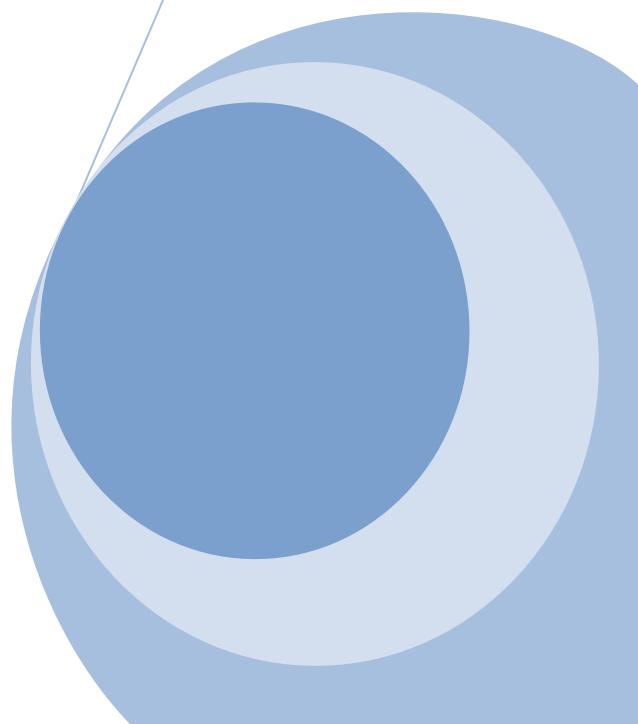
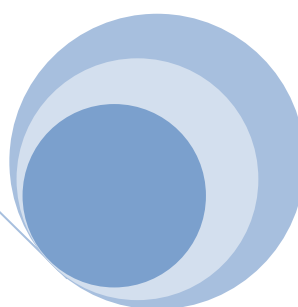
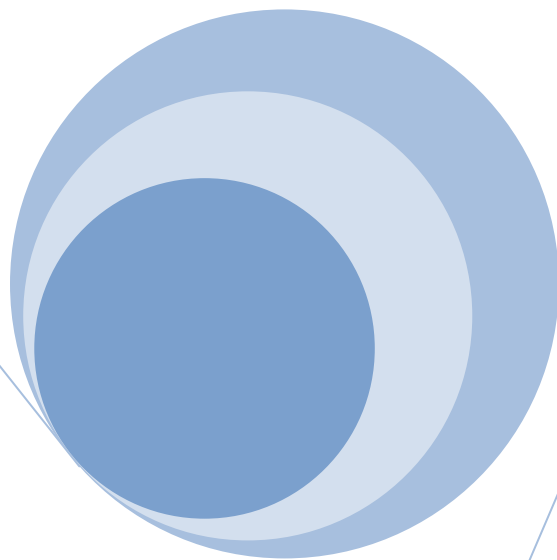
$$\% \text{de piégage} = [(A_0 - (A_1 - A_s)) / A_0] \times 100$$

A₀ : absorbance de la solution contrôle (contenant uniquement DPPH) ;

A₁ : l'absorbance en présence de l'extrait polyphénolique dans la solution DPPH méthanolique ;

A_s : est utilisé pour corriger l'erreur issue des non-identiques couleurs de la solution des échantillons, est l'absorbance de l'extrait sans DPPH.

**Chapitre VI:
Résultats et Discussion**



1. Détermination du taux d'humidité

L'analyse des taux d'humidité dans les échantillons étudiés a révélé un taux moyen estimé à 6,84% pour le millet cru et environ 4,73% pour le millet cuit.

A partir de ces valeurs nous avons pu déterminer les pourcentages en matière sèche (MS) qui sont 93,1% et 95,27% pour le millet cru et le millet cuit respectivement.

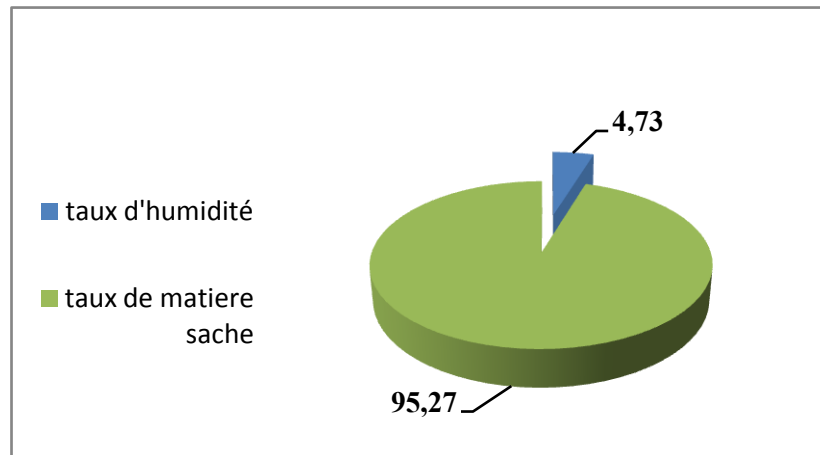


Figure26: Proportions d'humidité et de matière sèche dans le millet cuit

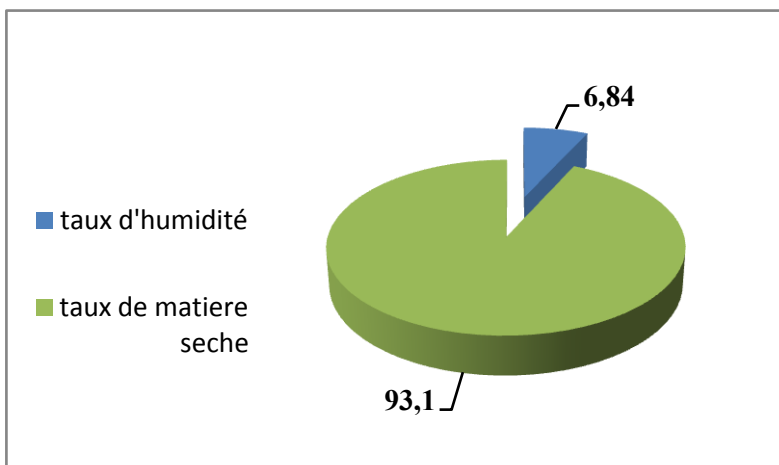


Figure27 : Proportions d'humidité et de matière sèche dans le millet cru

L'appréciation de la teneur en matière sèche repose sur la détermination du taux d'humidité contenue dans l'échantillon à analyser. Cette humidité, qui reste un indice très important, donne une idée sur la qualité de notre échantillon; il est rapporté que l'humidité favorise le développement des microorganismes lors du stockage (NANI, 2011).

Dans notre étude, c'est le traitement thermique appliqué qui a réduit le taux d'humidité dans les grains du millet cuit.

2. Teneurs en polyphénols

Les polyphénols constituent aujourd'hui un vaste sujet de recherches et intéressent non seulement le chimiste, mais aussi les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier sur la saveur des aliments. Leur incidence sur la conservation des produits retient également l'attention dans le secteur alimentaire, mais aussi dans celui des cosmétiques et de la pharmacologie. Les propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires des polyphénols suscitent également beaucoup d'intérêt dans le domaine médical par leur caractère préventif à l'égard de diverses pathologies, comme les maladies cardiovasculaires ou dégénératives (Cuénat, 2007).

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique au réactif de *Folin-Ciocalteu*. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (Fig. 28).

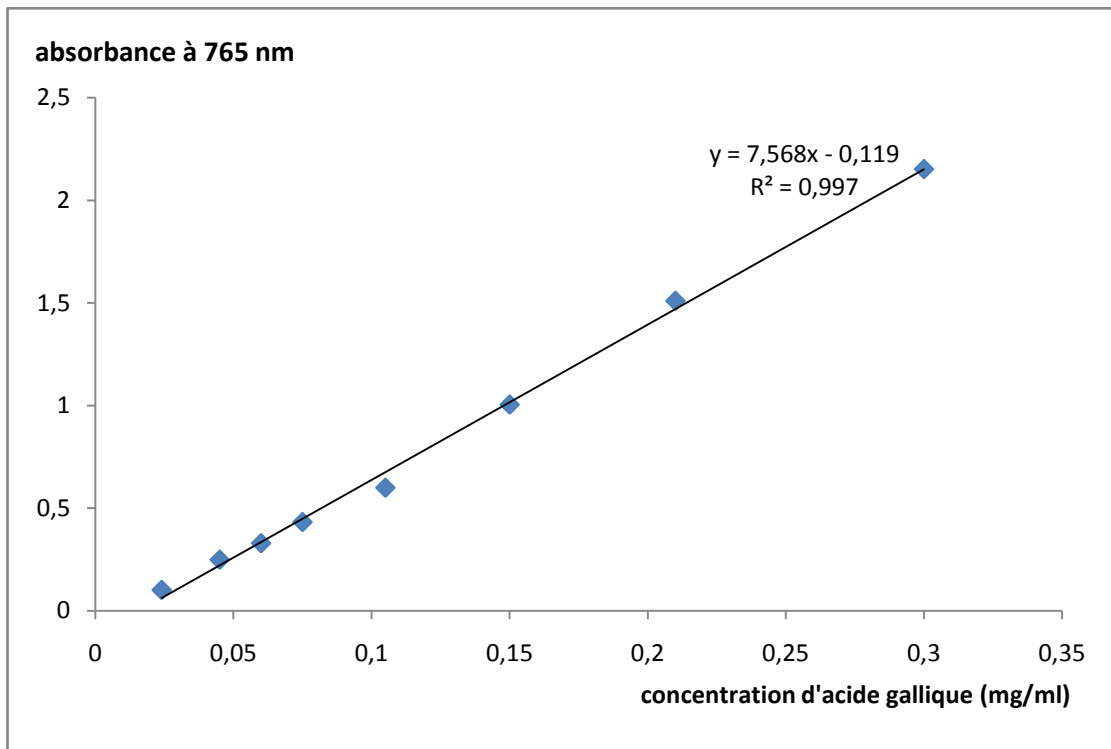


Figure 28 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux du millet (mg GAE/g M.S)

Pour les deux cas étudiés, nous avons remarqué des teneurs variées en polyphénols. Comme le rapporte (**fig 29**), la teneur la plus élevée en polyphénols est celle du millet cuit avec une concentration de 1.3965 mg GAE/g, suivie par le millet cru avec une concentration de 0.9747 mg GAE/g.

Tableau 10: Teneur en polyphénols totaux du millet en mg CEQ/g M.S.

| Millet cru mg GAE/g MS | Millet cuit mg GAE/g MS |
|------------------------|-------------------------|
| 0,9747 | 1,3965 |

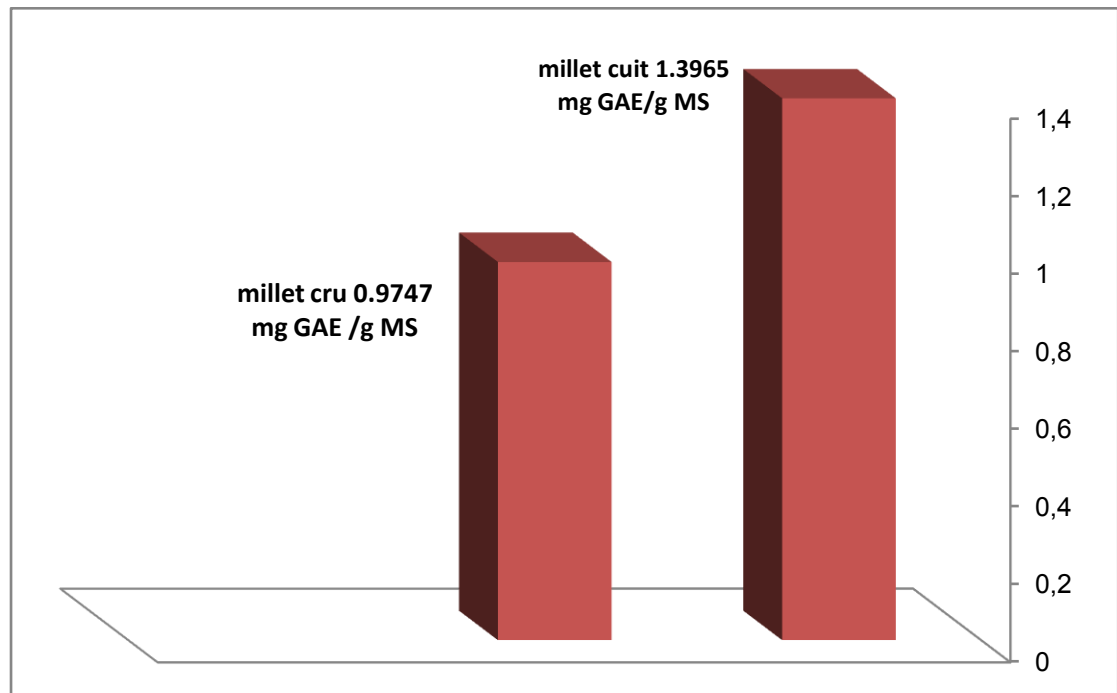


Figure 29 : Teneurs en polyphénols pour les deux cas étudiés (mg GAE/g M.S)

Les différentes teneurs en composés phénoliques entre les plantes résultent de l'effet d'un certain nombre de facteurs dont les principaux sont la lumière, les précipitations, la topographie, la saison et la maturité. A ce propos, **Macheix *et al.*,(1990)** signalent que la concentration des polyphénols est très variable d'une espèce à une autre et d'une variété une autre et diminue régulièrement durant la maturation et le stockage.

Nombreux travaux menés sur la détermination de la composition phénolique du millet ont été faits (**Sanaa *et al.*, 2006 ; Gavirangappa et Krishnapura, 2012 ; Irakli *et al.*,2014**)

sanna *et al.*(2006) ont rapporté une valeur des polyphénols contenus dans les grains du millet qui n'ayant subi aucun traitement thermique, estimé à 1,387 mg GAE/g MS.

Ainsi un travail qui avait comme objectif de vérifier les effets des différents traitements thermiques sur la composition polyphénols et leur bioaccessibilité de quelques millets, a montré que les grains du millet cru contiennent environ 2.58 mg GAE /g MS. Un taux qui augmente sous l'effet de cuisson pour atteindre la valeur de 2.91 mg GAE/g MS. cette

dernier étude confirme que la cuisson influe le taux des polyphénols extraits à partir du matériel biologique des végétaux. Cette observation pourrait être expliquée par la facilité d'extraction des polyphénols par les solvants utilisés suite à la fragilisation de la paroi cellulosique végétale rigide par le traitement thermique appliqué (NgohNeewilah, *et al.*, 2005).

3. Teneurs en Flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium (AlCl_3). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg CEQ/g) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la catéchine (Fig. 30).

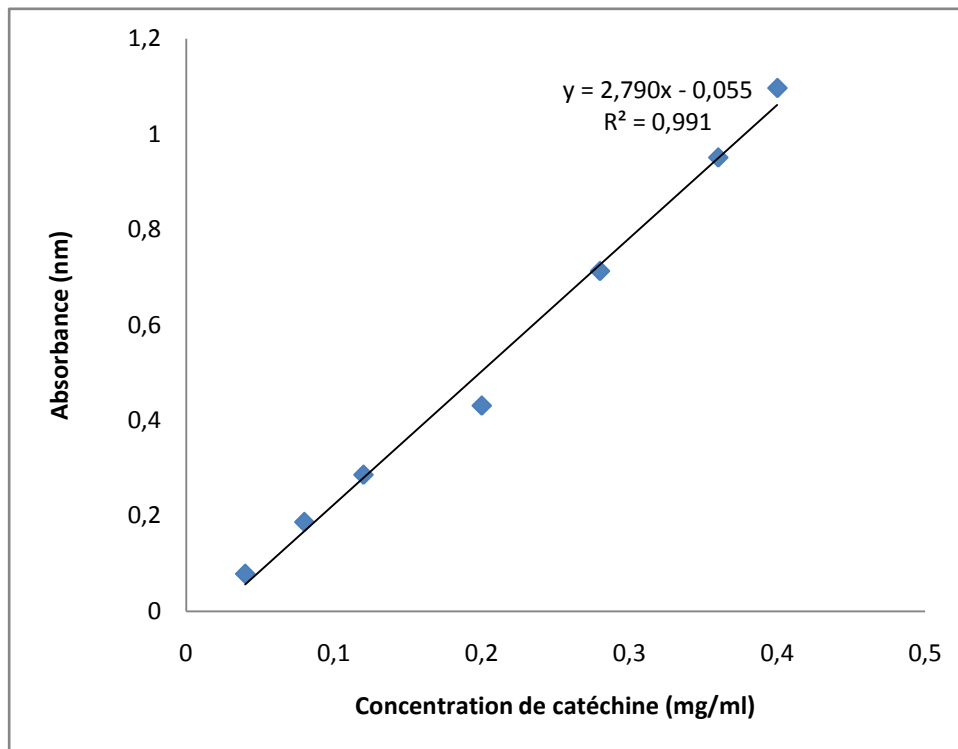
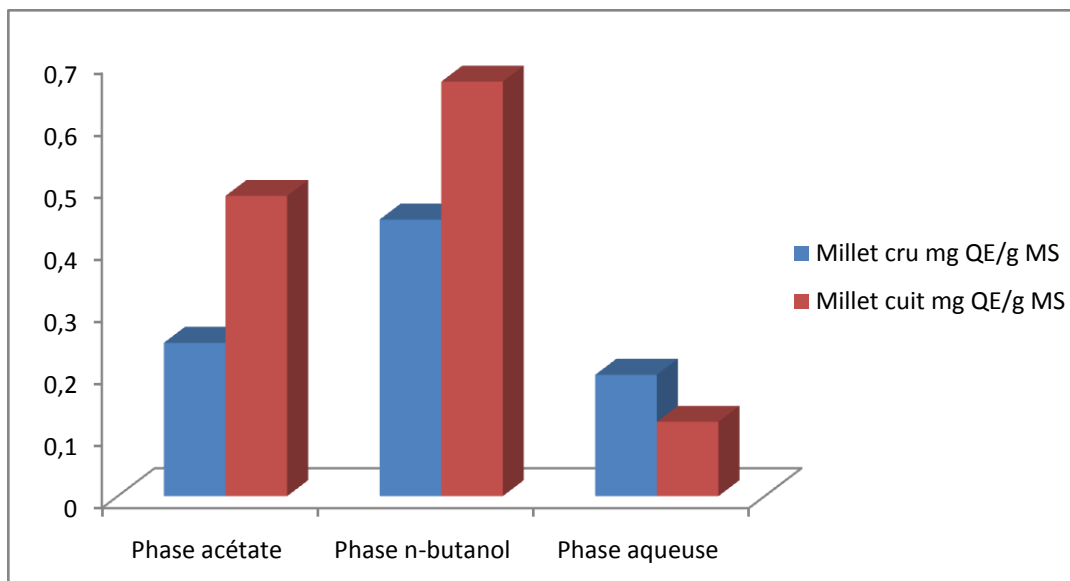


Figure 30: La courbe d'étalonnage des flavonoïdes du millet en mg CEQ/g de M.S.

Tableau 11: Teneur en flavonoïdes de millet en mg CEQ/g M.S.

| Phases | Millet cru mg QE/g MS | Millet cuit mg QE/g MS |
|-----------------|-----------------------|------------------------|
| Phase acétate | 0,2470 | 0,4836 |
| Phase n-butanol | 0,4454 | 0,6675 |
| Phase aqueuse | 0,19541 | 0,119 |

**Figure 31: Histogramme représente la teneur en flavonoïdes de millet en mg CEQ/g M.S.**

Similairement aux polyphénols les flavonoides déterminés dans le millet cuit sont plus importants que ceux déterminés dans le millet cru. Et pour les deux échantillons le n-butanol a fractionné le plus en le comparant avec l'acétat d'éthyle ou bien avec l'eau.

Des études menées sur le profil phénolique du millet ont trouvé que la lutéoline, une flavone, présente une activité antioxydante, anti-inflammatoire, anti-arrhythmique et des effets préventifs contre le cancer (Duk, 1992).

4. Le pouvoir antioxydant évalué

Le radical DPPH• est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al.*, 2008).

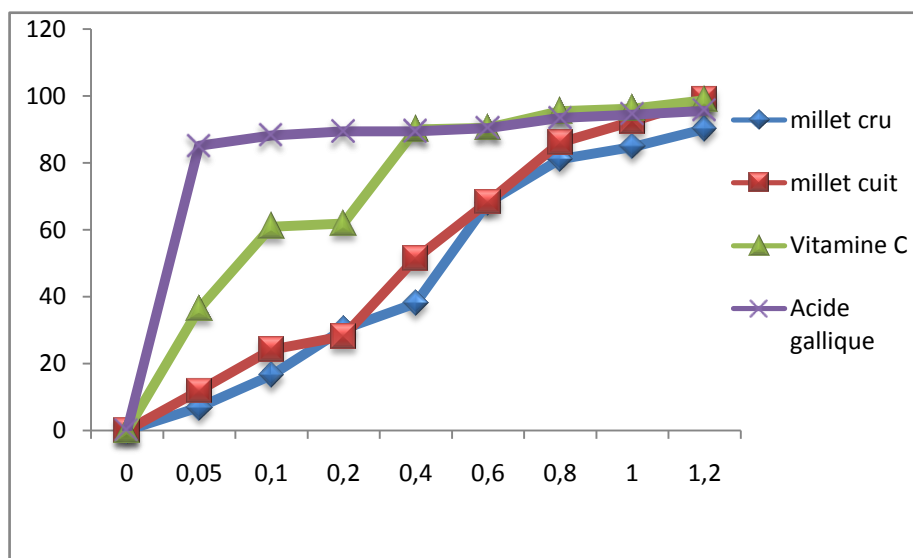
L'activité est définie en pourcentage de piégeage du radical libre DPPH, où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution contrôle)

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide gallique et la vitamine C (Alzhri, 2007).

Dans ce travail, nous avons étudié l'activité antioxydante des polyphénols du millet cru et les polyphénols du millet cuit. L'acide gallique et la vitamine C ont été considérés comme des composés antiradicaux de références.

Nous avons remarqué que les polyphénols du millet cru et les polyphénols du millet cuit ont des pouvoirs antiradicaux qui se rapprochent mais plus au moins variables

Après la concentration 0,8mg/ml, on a constaté que les polyphénols du millet cuit ont un pouvoir antiradicalaire supérieur à celui des polyphénols du millet cru et comparable à celui des références utilisées (acide gallique et vitamine C).



No. **Figure 32: Pouvoir antiradicalaire en mg CEQ/g M.S.** S et **houchi (2013)** a montré que les polyphénols de *Rumex vesicarius* L., sont des antioxydants puissants. (**Sanaa, 2006**) trouvé que les céréales exercent dotées d'activités antioxydantes.les même auteurs ont rapportés que les polyphénols du *Sorghum* exercent le pouvoir antioxydant le plus important.

Calcul des EC₅₀:

EC₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH, Les EC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et les standards (**BOURAS et HOUCHI, 2013**).

Les profils de l'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante, les EC₅₀ de chacun des différents extraits ont été déterminées.

Tableau 12 : Les valeurs de l'EC₅₀ de différents extraits étudiés

| | EC ₅₀ (mg/ml) |
|------------|--------------------------|
| millet cru | 0.48 |

| | |
|----------------|-------------|
| millet cuit | 0.39 |
| vitamine C | 0.07 |
| acide gallique | 0.03 |

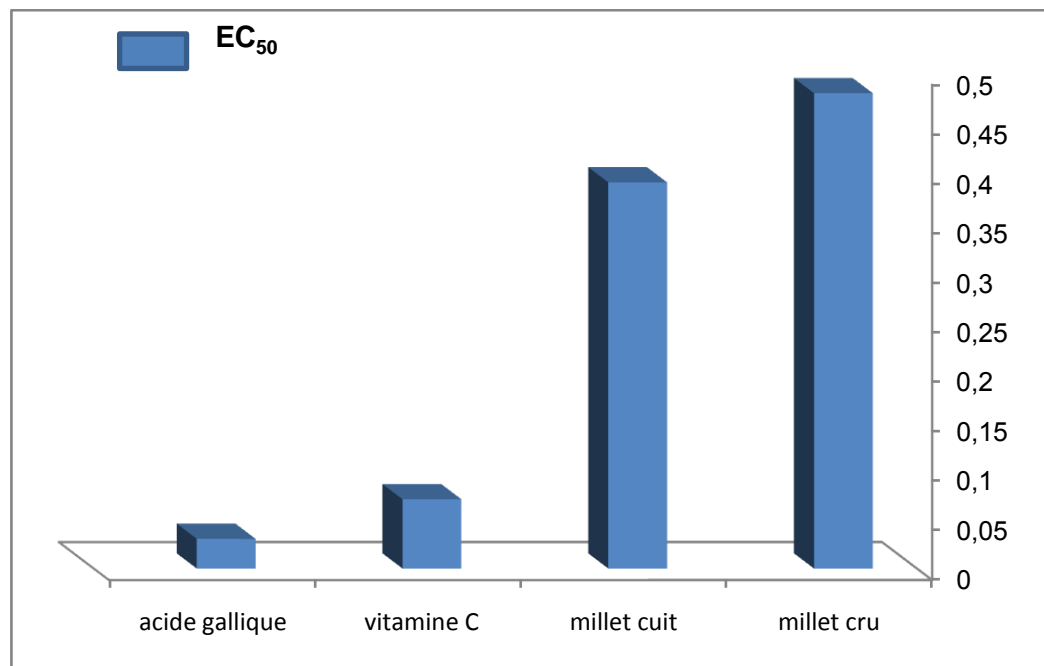


Figure 33: Histogramme représente l'EC₅₀ de chaque extrait.

A des fins comparatives, deux antioxydants standards sont utilisés, l'acide gallique et la vitamine C, ils ont montré une activité antiradicalaire puissante avec des EC₅₀ de l'ordre de 0,03mg/ml et 0,07 mg/ml et l'acide gallique respectivement. Le pouvoir antioxydant de l'acide gallique semble identique à celui de la vitamine C au-delà la concentration 0,4 mg/ml.

Entre les deux extraits testés de la plante étudiée, l'extrait polyphénolique du millet cuit s'est avéré le plus actif avec une EC₅₀ de l'ordre de 0,39 mg /ml.

Conclusion

Les espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , radicaux libres superoxydes O_2^{\bullet} et hydroxyles HO^{\bullet}) sont produites d'une manière accrue lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène est perturbée (stress oxydant). Ces espèces sont responsables, d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...), pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires. Actuellement, un grand intérêt est porté sur l'exploration des substances végétales bioactives qui pourraient lutter contre ce stress oxydatif. Les polyphénols, qu'on trouve dans les céréales, les fruits et autres végétaux, sont parmi les métabolites secondaires ayant fait l'objet des recherches les plus importantes à cause de leurs propriétés antioxydantes.

Cette étude a été conduite sur l'évaluation sur l'effet d'un traitement thermique sur la teneur en polyphénols et en flavonoïdes d'une céréale qui constitue la base de l'alimentation de nombreuses populations du monde. Ainsi, le potentiel antioxydant a été évalué en testant le pouvoir antiradicalaire de l'extrait polyphénolique de chaque échantillon étudié.

Les résultats obtenus ont montré que le traitement thermique appliqué améliore considérablement l'extraction des polyphénols à 43,27 % et celle de flavonoïde à 38,29 %. Concernant l'activité antioxydante, nous avons étudié le pouvoir antioxydant par la capacité de piégeage de radical DPPH $^{\bullet}$, afin de vérifier si le traitement thermique influe le potentiel antioxydant des polyphénols du millet. Comparant aux polyphénols du millet cru, nous avons constaté que les polyphénols du millet cuit, à des grandes concentrations, réduisent remarquablement le radical DPPH $^{\bullet}$. Aussi, le pouvoir antioxydant exercé par les polyphénols du millet cuit, à partir de la concentration 1 mg/ml, est jugé comparable à ceux exercés par les antioxydants de référence utilisés (Vitamine C et acide gallique)

Cependant, pour le piégeage du radical libre DPPH[•] et en comparant les IC₅₀ des différents extraits testés par rapport l'acide ascorbique et l'acide gallique, nous avons remarqué une activité antioxydante très importante.

De ceci, on peut conclure que l'extraction des polyphénols et des flavonoides augmente considérablement suite à une légère cuisson des grains du millet. Ainsi, les polyphénols du millet cuit s'avèrent des antioxydants puissants.

Ce travail mérite d'être approfondi en testant l'effet d'autres procédés utilisés dans les préparations culinaires de cette céréale tel l'effet du micro-onde ou l'ébullition sur le profil polyphénolique du millet. Aussi le pouvoir antioxydants, par autres méthodes, des composés phénoliques ainsi obtenus.

Références

- **Ardestani A, Yazdanparast R. (2007).** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucriumpoliuon* *in vitro* protein glycoxidation, *Foodand Chemical Toxicology*, 45, 2402–2411.
- **Beloued. (1998).** Plantes medicinales d'algerie. Dép De Botanique A L'institut Nationalagronomique d'El-Harrch-Algérie.P:277.
- **BEN DOUBA Meriem (2013):** Contribution à une Caractérisation Phytochimique d'une plante saharienne: la Morelle noire, *Solanum nigrum* L.
- **BOURAS F, HOUCHI A. (2013):** Etude de l'activité antioxydantes de la *Srumexvesicarius*.
- **Barlow, S.M. (1990).** Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, *Food Antioxidants*: 253-307.
- **Burton, G. W.(1972).**Vitamin E: Application of the principles of physical organic Chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research*, 19 : 194-201.
- **Caballero B, Trugo LC, Finglas PM. (2003).** *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*.
- **CIRAD . (2002).** *Le mémento de l'agronome*. Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement. Elsevier Science Ltd, Grande-Bretagne
- **Constance Chiremba, John R.N. Taylor, Lloyd W. Rooney, Trust Beta. (2012):** Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness.*Food Chemistry*, 1-8.
- **Chira K., Suh J.-H., Saucier C., Teissédre P-L.(2008).** Université Victor-Segalen, Bordeaux-Ii, Faculté D'oenologie – Umr 1219 – Isvv, Laboratoire De Chimie Appliquée, 351, Cours De La Libération, F-33405 Talence Cedex, France.

- **Cheyrier V, Fulcrand H, Sarni P, Moutounet M (1997).** Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de leur vinification. *In vino Analytica Scientia. Analysis* 25: 14-44
- **Crozier A.(2003).** Classification and Biosynthesis of Secondary Plant.
- **D. Chen et al.** « Green tea and tea polyphenols in cancer prevention »),
- **Doat .J. novembre (1978):**les tanins dans les bois tropicaux .
- **Evans, R.J ; Reynhout, G.S. (1992).** Alternates to synthetic antioxidants, *Food Science and human Nutrition*, 29: 27-42.
- **Frankel, E. N; Meyer. A. S. (2000).** "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants", *Journal of Science and Food Agriculture*, 80: 1925-1941.
- **FAO. (1991).** Annuaire de la production 1990. Vol. 44. Série statistique de la FAO n° 99. Rome.
- **FAO. (2004).** Agricultural data: FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/faostat/default.jsp>. [Consulté en Juillet 2009].
- **Houée Levin C, Sicard Roselli C and Bergès J.(2005):** “*Chimie et Biochimie Radicalaires*”, Belin edition.
- **G. Alyafi Alzhri. (2007):** Determination of chemical composition of Prangos and the possibility to use in the applied field, Damascus University. P 54.
- **Gavirangappa Hithamani, Krishnapura Srinivasan. (2011):** Effect of domestic processing on the polyphenol content and bioaccessibility in finger millet (*Eleusine coracana*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*)
- **Geissmann, T.A., Hinreiner, E.(1952):**Theories of biogenesis of flavonoid compounds. *Botanical Review*, 18 : 77-244.
- **Halliwell, B; Gutteridge, J.M.C. (1999).** Free radicals in biology and medicine, Oxford, UK
- **Haton C., (2005).**Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale.Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, pp : 43.

- **Huang, D; Ou, B; Prior, R.L. (2005).** "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856.
- **Ito N.(1986).**hirose M Fukushima ,Tsuda H,Shirci T,Tatematsu M. Studies on antioxidants: Ther carcinogenic and modifying effets on chemical caranogenesis . *Fd Chem Toxic ;24:1071-1082.*
- **K. Ghedira. (1997):** Les flavonoïdes structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique)
- **K. Kanoun (2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine) Mémoire de Magister Université de Tlemcen. p 26-29-48-49.
- **Koehlin-Ramonatxo,C. (2006).**Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutritionclinique et métabolisme,20* : 165–177.
- **Lejeune H & Descazeaud A. (2007).** Le syndrome métabolique : épidémiologie et physiopathologie. *Sexologies, 16* : 1-5
- **Larson, R.A. (1997).** Naturally occurring antioxidants, Ed. Boca raton
- **Laurent, L. (1991)** Eléments minéraux. In : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Volume 4. Lavoisier (Ed). Paris, pp78-98.
- [Liyana-Pathirana C. M., Shahidi F, \(2006\). Importance Of Insoluble-Bound Phenolics To Antioxidant Properties Of Wheat. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, 54, 1256–1264.](#)
- **Lisu. W; Jui-Hung, Y; Hsiao-Ling, L; Ming-Jiuan, W. (2003).** Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn), *Journal of food and drug analysis*, 11(1): 60-66.
- **.M. Laughton et al:** « Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability »
- **Madi. (2008):** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de Magister Université de Constantine. p 12-15-18-19- 42-47-49.

- **Maria N. Irakli a, Victoria F. Samanidou b, Costas G. Biliaderis c, Ioannis N. Papadoyannis.(2013):** Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction
- **Meziti. (2007):** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. Étude in vitro et in vivo. Mémoire de Magister Université de Batna. p 30-35-49-67.
- **Mogode Debete Judith, (2005):** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricava* Vahl (Caesalpiniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad, mémoire de doctorat en pharmacie, université de Bamako).
- **Myers & Ph.D. (2002).** PEARL MILLET: A new grain crop option for sandy soils or other moisture-limited conditions. *Published by the Jefferson Institute, Columbia.* Development of this publication was funded by the USDA-CSREES Fund for Rural America program, as part of a cooperative project with the University of Missouri.
- **Miller, N.J ; Sampson, J ; Candeias, L.P., et al. (1996).** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, *FEBS Lett*, 384 : 240-2.
- **MILLER, H. E. (1971).** "A simplified method for the evaluation of antioxidants." *Journal of the American Oil Chemists Society*, **48**: 91.
- **MORALES, F. J. and S. JIMENEZ-PEREZ (2001).** "Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence." *Food chemistry*, **72**: 119-125.
- **Moure, A; Cruz, J.M; Franco, D; Dominguez , J.M. et Sineiro, J. (2001).** Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, **72**: 145-171.
- **Nani A. (2011).** Etude de quelques effets métaboliques du millet "*Pennisetum glaucum*" chez des rats diabétiques. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister en Agronomie, Option : « Nutrition », Uni. Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen.

- **NgohNeewilah et al., (2005)** : EFFET DE LA CUISSON SUR LA TENEUR EN POLYPHENOLS TOTAUX DE QUELQUES CULTIVARS DE BANANIERS (Musa sp.) AU CAMEROUN.
- **Namiki, M. (1990)**. Antioxidants/Antimutagens in Food. CRC critical reviews in *Food Science and Nutrition*, 29: 273-300.
- **Orgogozo et al., (1997)**: « Wine consumption and dementia in the elderly: A prospective community study in the Bordeaux area », *ReNeurol.*, vol. 153., p. 185-192).
- **Peynet J, Bbeaudeux J L, Legand A. (2005)**: stress oxidant et athérosclérose et athérosclérose. Aspects biologique et pathologique. *tec doc lavoisier ed .physiopathologie. Sexologies*, 16 : 1-5.
- **Pincemail ,J ; Defraigne, J.D. (2004)**. Les antioxydants un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Service de Chirurgie Cardio-vasculaire, Pro biox SA. Sart Tilman 4000 Liège, Belgique.
- **Pietta, P.G. (2000)**. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63: 1035-1042.
- **Rahal-Bouziane H, Mossab-Bouaboud K, Kharsi M. (2006)**. Fourrages Cultivés des oasis du Touat, Gourara et Tidikelt : caractéristique ethnobotaniques, morphologiques et valeur alimentaire. pp39.
- **Ribereau Gp. (1968)**. Les Composés Phénoliques Des Végétaux. Dunod, Paris, 254.
- **Singleton V L., Timberlake C F., Lea A G H. (1978)**. The Phenolic Cinnamates Of Grapes And Wine, *Journal Of Sciences And Food Agriculture*. 29, 403-410 P.
- **Stanley et al., (2003)**: « Antioxidants and the Free Radical Theory of Degenerative.
- **Sanaa Ragaee et al., (2006)**: Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use.
- **VIGOUROUX Y. (2009)**: Le mil, aliment du futur au Sahel. Institut de recherche pour le développement (IRD). Fiche n°325.

- **Yu, R; Mandlekar, S; Tony Kong, A.N. (2000).** "Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c". *Molecular Pharmacology*, 58: 431- 437. EPHE
- **Wardaman P, and candeias.Fenton.(1996):** centennial symposium. *Radiation research*. 145:523-531.
- **Wannes ,W.A; Mhamdi, B; Sriti ,J; Ben Jemia ,M; Ouchikh ,O; Hamdaoui ,G; Kchouk ,me; Marzouk, B. (2010).** Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis var. italica* L.) leaf stem and flower, *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1362–1370.
- **Zeghad .(2009) ;** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne Mémoire de Magister Université de Constantine. p 17-19-41-69.
- **ولد الطيب م. (2012):** دراسة الفاعلية المضادة للاكسدة لنبات الحناء.