



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



Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou  
Faculté des Sciences biologiques et Sciences Agronomiques  
Département des Sciences agronomiques

## Thèse de Doctorat

Présentée par

M<sup>ME</sup> AGOUAZI Ounissa épouse MEHRI

Spécialité : Sciences Agronomiques

Options : Sciences de la Vigne et Préservation des Ressources Phylogénétiques

### Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de la vigne rouge

#### Devant le jury :

Président :	Mr AIT SAID Samir	MCA	Université de Tizi-Ouzou
Examineurs :	Mme Benahmed Djillali Adiba	MCA	Université de Tizi ouzou
	Mme OUAFI Saida	Professeur	U.ST.H.B.
	Mme CHABANE Djamilia	Professeur	U.S.T.H.B.
	Mr OULHADJ Akli	MCA	
Directeur de thèse :	Mr ARAB Karim	Professeur	Université de Boumerdes

L'année universitaire : 20202021

## Résumé

Parmi les fruits les plus riches en antioxydants figure le raisin (*Vitis vinifera*). Ce dernier est largement consommé en tant que tel ou utilisé dans la production industrielle de jus, raisin sec et confiture. L'objectif de ce travail consiste à valoriser un cépage algérien local Ahmar Bouamar, de la région de Benchécao (wilaya de Médéa), en tant que source d'antioxydants. Les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existants dans les feuilles et le jus, notamment les polyphénols et les flavonoïdes. Ces derniers ont été extraits par des méthodes d'extractions en utilisant de solvants spécifiques à polarité différentes pour chaque extrait, et l'huile des pépins par Soxlet. Les extraits obtenus sont dosés puis caractérisés respectivement par une analyse chromatographique liquide à haute performance et par une chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse. L'évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* par des méthodes colorimétriques à savoir le test de 2,2- diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), de réduction de fer et celui de décoloration de la bêta-carotène a montré un pouvoir antioxydant élevé comparée à celle de l'acide ascorbique et du BHA. Cependant, le meilleur effet a été obtenu avec l'extrait polyphénolique de jus, soit un IC50 de 0,03 mg/ml. L'effet antimicrobien varie selon la nature de la souche et l'extrait testé. Cependant l'extrait méthanolique des feuilles et l'huile des pépins ont manifestés un effet inhibiteur important sur la majorité des souches testées. En conclusion, la présente étude a permis de montrer l'importance de cépage Ahmar Bouamar, de confirmer l'innocuité de la variété et d'apporter une preuve biologique mesurable de son pouvoir antioxydant et antimicrobien.

**Mot clés :** *Vitis Vinifera*, cépage local, polyphénols, flavonoïdes, HPLC, GCMS, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

## *REMERCIEMENTS*

*Tout d'abord, je remercie le bon Dieu tout puissant de m'avoir donné la volonté et la santé pour terminer ce travail.*

*Une thèse, tant nominative soit elle, est avant tout un travail de réflexion collective, donc au terme de ce travail, il m'est à la fois un plaisir et un devoir de remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **ARAB Karim** pour avoir accepté mon encadrement dans ma thèse de doctorat. Je le remercie d'abord pour ses qualités humaines, pour l'attention qu'il m'a accordée à la direction, à l'orientation et à la réalisation de mes travaux de recherches et surtout pour ces encouragements, qui m'ont été d'une précieuse aide. Je tiens à le remercier particulièrement pour son accueil chaleureux lors de mon arrivée au laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques de l'Université de Boumerdes. Grâce à lui, j'ai pu développer mes connaissances en phytochimie et en l'identification des substances naturelles. Qu'il trouve ici le témoignage de mon grand respect et de mon estime.*

*Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse :*

*Je veux exprimer ici, ma respectueuse gratitude à **Mr AIT SAID Samir**, maître de conférences « A » à la Faculté des Sciences Biologiques de l'université de Mouloud Mammeri, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury.*

*Je tiens à remercier Madame OUAFI Saïda , Professeur à l'USTHB,  
d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à Madame CHABANE Djamilia ,  
Professeur à USTHB de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Mes plus vifs remerciements sont adressés à Madame Benahmed  
Djillali Adiba, maître de conférence « A » à la Faculté des Sciences  
Biologiques de l'université de Mouloud Mammeri, d'avoir ménagé son  
temps pour juger et critiquer ce travail.*

*Je remercie également Mr OULHADJ Akli, maître de conférence « A »  
à l'université » de Mouloud Mammeri, de me faire bénéficier de son  
expertise en acceptant de juger ce travail et de consacrer du temps à  
l'examen de ce manuscrit.*

*Je tiens aussi à remercier Mr ZERIRI Djamel de m'avoir facilité  
l'accès et le travail au CRD de Sonatrach de Boumerdes, ainsi qu'aux  
personnels de laboratoire de l'environnement.*

*Un immense merci à Mr GUERMOUCHE, responsables du service des  
analyses chromatographiques de SAIDAL d'Alger, qui m'a beaucoup  
aidé à la réalisation et l'interprétation de HPLC.*

*J'adresse également un grand merci aux techniciennes de laboratoires  
à l'université de Boumerdes, pour leur aide, leur accueil et surtout leur  
générosité.*

*Ces remerciements ne seraient pas complets sans avoir remercié ma  
famille, dont le soutien permanent y est pour beaucoup dans  
l'achèvement de ce travail.*

*Enfin, j'adresse un remerciement tout particulier à mon mari, pour m'avoir épaulée sans fléchir durant ces six ans de thèses.*

*Mes remerciements vont enfin à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et je souhaite que cette thèse puisse être un support assez valorisant et profitable pour ceux qui auront à l'utiliser.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*à mes Parents « mohammed, malika », aucune phrase ne pourrait remercier suffisamment ceux qui m'ont tout donnée : amour, confiance, soutien moral ainsi que pour leurs efforts, sacrifices et*

*encouragements durant tout mon parcours vers un avenir meilleur. Merci mes très chers parents, mon mari, mes sœurs, mes frères, Ceux à qui toute ma vie ne suffirait pas pour leur rendre une part de leur amour. Il n'y aura jamais de mots qui suffiront à vous dire combien je vous suis reconnaissant. Merci pour tout ce support moral, mental, émotionnel, financier... tout mon cursus académique ainsi que cette thèse n'auraient pu être possible sans votre soutien. Je vous aime.*

*A mes tendres anges NAZIM et JDAOUAD, je vous adore.*

*A mes grands-parents et ma belle famille*

## Liste des abréviations

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

**ATCC** : American Type Culture Collection

**BBCH** : Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt et Chemische Industrie

**BHT** : Butylated HydroxyToluene (hydroxytoluène butylé)

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**DO** : Densité optique

**EAQ**: Extrait aqueux

**EAE**: Extrait d'acétate d'éthyle

**EB**: Extrait butanolique

**EM** : extrait méthanolique

**EDTA** : Ethylène DiamineTétra Acétate

**FRAP**: Ferric Reducing Antioxidant Power

**GN** : Gélose Nutritive

**HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance

**IC 50** : Concentration inhibitrice de 50 %

**I %** : Pourcentage d'inhibition

**MH** : Mueller Hinton

**OIV** : Organisation international de vigne et de vin

**Rdt** : Rendement

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**TCA** : Acide trichloroacétique

**LDL** : Lipoprotéine de basse densité

**NaCl** : Chlorure de sodium

**MeOH** : Méthanol

## Liste des figures

Figure 1	Aspect général <i>Vitis vinifera sp silvestris</i> Linné, 1753	3
Figure 2	Cycle végétatif et reproducteur de la vigne dans l'hémisphère Nord	6
Figure 3	Origine des différents radicaux libres oxygénés et ERO impliqués en biologie	9
Figure 4	Voie biochimique de synthèse des principales classes de polyphénols solubles présents dans la baie de raisin	11
Figure 5	Structure des acides phénoliques du raisin	13
Figure 6	Structures chimiques de quelques stilbènes	14
Figure 7	Squelette de base des flavonoïdes	14
Figure 8	Structures chimiques de quelques flavonols	15
Figure 9	Structures chimiques de quelques anthocyanidines	15
Figure 10	Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés	17
Figure 11	Structure de l'épicatéchine-3-O-gallate	17
Figure 12	Exemples de proanthocyanidines de type B et A des raisins	18
Figure 13	Procédés classiques d'extraction d'huile à partir de graines oléagineuses	22
Figure 14	Les feuilles et les grappes de la variété Ahmar Bouamar.	26
Figure 15	Localisation géographique de la zone de récolte des feuilles et des baies de raisin Ahmar Bouamar	26
Figure 16	Protocole d'extraction des flavonoïdes	32
Figure 17	Montage d'un soxhlet	34
Figure 18	Réduction du radical libre DPPH en DPPHH	35
Figure 19	Réduction du fer trivalent (Fe <sup>3+</sup> ) en fer divalent (Fe <sup>2+</sup> ) (Oyaizu, 1986)	36
Figure 20	Revivification et préparation des boîtes d'antibiogramme	39
Figure 21	L'aspect de l'huile obtenue des pépins	44
Figure 22	Spectre infrarouge des extraits de la variété Ahmar Bouamar	50
Figure 23	Profil chromatographique HPLC des polyphénols totaux de l'extrait méthanolique des feuilles	52
Figure 24	Profil chromatographique HPLC des anthocyanes de l'extrait méthanolique des feuilles	53
Figure 25	Profil chromatogramme HPLC de la fraction butanolique	55
Figure 26	Profil chromatogramme HPLC de la fraction acétate d'éthyle	56
Figure 27	Profil chromatographique HPLC de l'huile des pépins	56
Figure 28	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH	57
Figure 29	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH	65
Figure 30	Pouvoir antiradicalaire de l'huile	66
Figure 31	Activité de réduction ferrique de test FRAP de l'extrait polyphénolique des feuilles et de jus de la variété Ahmar Bouamar	68
Figure 32	Activité de réduction ferrique de test FRAP des fractions de l'extrait flavonoïdique de la variété Ahmar Bouamar	69
Figure 33	Activité de réduction ferrique de l'huile des pépins	70
Figure 34	Cinétique de la décoloration du β-carotène induite par les extraits de la variété Ahmar Bouamar, l'acide ascorbique et le contrôle négatif.	71
Figure 35	Pourcentage d'inhibition de la décoloration de la β-carotène.	72
Figure 36	Cinétique de la décoloration du β-carotène induite par les différentes fractions de l'extrait flavonoïdique	73
Figure 37	Cinétique de la décoloration du β-carotène induite par les différentes fractions de l'extrait flavonoïdique	75
Figure 38	Cinétique de la décoloration du β-carotène induite par l'huile des pépins	76
Figure 39	Zone d'inhibition (mm) de la croissance des souches microbiennes sur milieu Mueller-Hinton et Sabouraud	78
Figure 40	Zones d'inhibition (mm) de la croissance des souches bactériennes vis-à-vis des fractions de l'extrait flavonoïdique.	79
Figure 41	Zone d'inhibition (mm) de la croissance des souches microbiennes testées vis-à-vis de l'huile des pépins	81

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	• Propriétés biologiques de quelques composés phénoliques dans l'organisme	20
<b>Tableau 2</b>	• Comparaison des techniques d'extraction d'huile en terme de qualité, de rendement en huile et de consommation de solvant	23
<b>Tableau 3</b>	• Composition biochimique des pépins en pourcentage de poids frais (Cabanis et al. 1998).	24
<b>Tableau 4</b>	• Souches bactérienne testées	25
<b>Tableau 5</b>	• Tests de screening phytochimique	28
<b>Tableau 6</b>	• Estimation de la sensibilité des souches	39
<b>Tableau 9</b>	• Résultats de screening phytochimique	41
<b>Tableau 10</b>	• Rendements et teneurs en flavonoïdes des différentes fractions de l'extrait des feuilles de la variété Ahmar Bouemar	43
<b>Tableau 11</b>	• Rendement en huile de poudre de pépins et sa teneur en flavonoïde	44
<b>Tableau 12</b>	• Résultats de l'analyse par infrarouge de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles	47
<b>Tableau 13</b>	• Résultats de l'analyse par infrarouge de l'extrait butanolique des feuilles	47
<b>Tableau 14</b>	• Résultats de l'analyse par infrarouge de l'extrait aqueux des feuilles	48
<b>Tableau 15</b>	• Résultats de l'analyse par infrarouge de l'huile des pépins	49
<b>Tableau 16</b>	• Principaux composés flavonoidiques des fractions de l'extrait flavonoidique de la variété Ahmar Bouamar	58
<b>Tableau 17</b>	• CG-SM de l'extrait méthanolique de la variété Ahmar Bouamar	59
<b>Tableau 18</b>	• CG-SM du jus de la variété Ahmar Bouemar	60
<b>Tableau 19</b>	• CG-SM de l'extrait butanolique des feuilles	61
<b>Tableau 20</b>	• CG-SM de l'extrait acétate d'éthyle	61
<b>Tableau 21</b>	• CG-SM de l'extrait aqueux	62
<b>Tableau 22</b>	• CG-SM de l'huile des pépins	63
<b>Tableau 23</b>	• Valeurs des IC50 notés pour les différentes fractions de l'extrait flavonoïque.	65
<b>Tableau 24.</b>	• . Résistance et sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques	77
<b>Tableau 25.</b>	• Résistance et sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques	77
<b>Tableau 26.</b>	• Résistance et sensibilité de <i>E.coli</i> aux antibiotiques	77

## Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....1

### Chapitre I Généralités sur la vigne rouge

I.1. Généralités sur la vigne rouge.....3

I.1.1.Position systématique.....3

I.1.2.Description Botanique.....4

I.1.3. Cycle de développement .....4

I.1.4. Usage traditionnel.....6

I.2. Stress oxydatif.....7

I.2.1. Généralités.....7

I.2.2. Principaux radicaux libres oxygénés.....8

I.2.3. Source des espèces réactives de l'oxygène.....8

I.2.4. Effets du stress oxydant sur les structures moléculaires.....9

I.2.5. Rôles des radicaux libres oxygénés dans la physiologie.....10

I.2.6. Maladies liées au stress oxydatif.....10

I.3. Composés polyphénoliques de la vigne .....11

I.3.1. Généralités biochimiques.....11

I.3.2. Rôles et intérêts des composés phénoliques.....19

I.3.4. Les huiles végétales.....21

### Chapitre II : Matériels et Méthodes

I.1. Matériel.....25

I.1.1. Matériel végétal : .....25

I.1.2. Souches microbiennes testées.....25

II.2. Méthodes.....25

II.2.1. Récolte, séchage et broyage .....25

II.2.2. Caractérisation phytochimique.....26

II.2.3. Extraction et caractérisation des métabolites secondaires.....29

II.2.3. Activités biologiques .....34

II.2.3.1. Activités antioxydante .....34

II.2.4.1.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....34

II.2.4.1.2. Réduction de fer (test FRAP) .....	36
II.2.4.1.3. Test de blanchissement par la $\beta$ carotène.....	3
II.2.4.2. Activités antimicrobienne.....	37
II.2.4.2.2. Préparation des suspensions bactériennes.....	38
II.2.4.2.3. Repiquage des souches microbiennes et mesure du diamètre d'inhibition.....	38
II.2.5. Analyses statistiques .....	38
Chapitre III Résultats et discussion	
III-Étude phytochimique des extraits de la variété Ahmar Bouemaret évaluation des activités antioxydantes.....	40
III-1-Tests phytochimiques.....	40
III.2. Rendement d'extraction et dosage des polyphénols.....	41
III.3. Rendements et dosages des flavonoïdes des feuilles de cépage Ahmar Bouamar .....	42
III.4. Rendements et dosages des flavonoïdes de l'huile des pépins de la variété Ahmar Bouemar .....	44
III.5. Caractérisation chromatographique des extraits .....	45
III.5.1. Caractérisation par infrarouge.....	45
III.3.1.1. L'extrait méthanolique des feuilles .....	45
III.3.1.2. le jus des baies.....	46
III.3.1.3. L'extrait flavonoïdique des feuilles.....	46
III.3.2. Caractérisation des polyphénols totaux par HPLC quantitative.....	51
III.3.2.1. L'extrait méthanolique des feuilles.....	51
III.3.2.2. Le jus des baies.....	52
III.3.2.3. Les flavonoides .....	53
III.3.3. Caractérisation des extrais par la GCMS.....	58
III.3.3.1. L'extrait méthnolique .....	58
III.3.3.2. La caractérisation du jus.....	60
III.3.3.3. L'extrait flavonoïque.....	61
III.3.3.4. L'extrait acetate d'éthyle.....	61
III.3.3.5. L'extrait aqueux.....	62
III.3.3.6. Caractirisation de l'huile.....	62
III.4. Evaluation de l'activité antioxydante in vitro .....	64
III.4.1. Piégeage du radical libre DPPH .....	64

III.4.1.1. Pouvoir antioxydant de l'extrait polyphénolique et le jus de la variété Ahmar Bouamer.....	64
III.4.1.2. Pouvoir antioxydant des flavonoides.....	65
III.4.1.3. Pouvoir antiradicalaire de l'huile des pépins.....	67
III.4.2. Méthode de la réduction du fer FRAP.....	68
III.4.2.1. Pouvoir réducteur de l'extraits polyphénolique des feuilles et le jus.....	68
III.4.2.2. Pouvoir réducteur des extraits flavonoiques des feuilles.....	69
III.4.2.3. Pouvoir réducteur de l'huile des pépins .....	70
III.4.3. Méthode de décoloration du $\beta$ -carotène .....	72
III.4.3.1. Les extraits polyphénoliques.....	72
I.4.3.2. Le pouvoir reducteur des flavonoides.....	73
III.4.3.3. Le pouvoir réducteur de l'huile des pépins.....	75
IV. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	76
IV.1. Tests de sensibilité aux antibiotiques (L'antibiogramme).....	76
IV.2. Pouvoir antimicrobien des extraits des plantes.....	78
IV.2.1. L'extrait polyphénolique des feuilles et le jus.....	78
IV.2.2. L'effet antimicrobien des extraits flavonoidiques.....	79
IV.2.3. L'effet antimicobien de l'huile.....	80
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	82
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	84
ANNEXES	

Depuis de nombreux siècles, les Hommes exploitent les plantes pour se nourrir, mais également pour se soigner. En effet, l'emploi des plantes médicinales est un savoir-faire très ancestral. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne principalement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires aux propriétés biologiques inédites. De plus, avec le développement des connaissances en chimie, les substances actives renfermées dans les plantes ont pu être isolées puis étudiées pour prouver leur efficacité, et il est possible aujourd'hui de les utiliser directement, de les modifier légèrement par hémisynthèse ou de les synthétiser pour les employer notamment en allopathie. Ainsi, l'utilisation des plantes, que ce soit en phytothérapie ou en allopathie, grâce aux substances actives purifiées de ces dernières, ne cesse de se développer.

La vigne fait partie d'une des plus anciennes plantes cultivées sur terre. La médecine antique et la pharmacie en ont tiré profit depuis des millénaires. Au fil du temps cette plante n'a cessé de révéler de nombreuses vertus. La recherche biomédicale s'intéresse beaucoup aux substances contenues dans la vigne et dans ses produits,

Les composés phénoliques sont des substances naturellement présentes dans les fruits, les légumes, les graines, les fleurs et aussi les herbes où ils contribuent à la pigmentation et aux propriétés sensorielles telles que l'amertume et l'astringence. Ils sont impliqués aussi dans des fonctions essentielles telles que la reproduction, la croissance et la protection contre les pathogènes (Ribéreau-Gayon, 1964). Ces composés sont réputés pour leur caractère antioxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de maladies. Ils sont donc à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme humain et méritent l'intérêt croissant que la recherche leur porte (Kanner *et al.*, 1994).

En Algérie, le cépage Ahmar Bouamar est une variété de raisin rouge de table par excellence, très recherchée. Une étude ethnobotanique de cette plante a fait ressortir un usage particulier de ses feuilles comme antalgique. Les travaux réalisés en Algérie se résument à l'activité antimicrobienne des extraits flavonoidiques et taniques des feuilles de la vigne sauvage (Amara *et al.*, 2010), l'activité antiradicalaire de différents extraits de pépins de la (Ghouila *et al.*, 2016), et l'effet des extraits de feuilles sur les maladies cardiovasculaires (Ferhi *et al.*, 2019).

Cette thèse s'inscrit ainsi dans cette volonté de proposer des alternatives à la médecine à travers l'utilisation d'extraits végétaux à forte valeur antioxydante. De cette manière, une attention particulière a été portée vers ce cépage local « Ahmar Bouamar » dans le but de la valorisation des cépages autochtones algériens. L'étude porte sur l'estimation de la teneur de cette espèce végétale en composés actifs en particulier les polyphénols, les flavonoïdes et les huiles obtenus dans les différentes parties de la plante et l'évaluation de leurs activités biologiques. Pour ce faire, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Analyse quantitative et qualitative de l'huile des pépins, des polyphénols et des flavonoïdes ;
- Evaluation *in vitro* de l'effet antioxydant par l'utilisation des trois méthodes : Piégeage du radical libre DPPH, - Réduction de fer de test FRAPet Activité la  $\beta$  carotène des extraits majeurs isolés ;
- Evaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne des extraits de la plante étudiée par la méthode de diffusion sur gélose nutritive ;

Ce travail sera décliné en trois chapitres :

- **Le chapitre 1 intitulé** « recherche bibliographique », présentera des généralités sur la vigne et ses produit polyphénoliques.
- **Le chapitre 2** « matériels et méthodes », s'attachera à la description précise du matériel utilisé et de la méthodologie expérimentale adoptée. Il exposera ainsi, les matières premières, les procédés d'extraction et de purification, les plans d'expériences, les analyses quantitatives et qualitatives et les méthodes de calculs.
- **Le chapitre 3**, « résultats et discussion », traitera les résultats obtenus quant à l'optimisation de l'extraction des composés polyphénoliques des feuilles, jus et des pépins de cépage Ahmar Bouamar, et sur la détermination du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits obtenus.

Enfin, le travail s'achève par une conclusion récapitulant l'essentiel des résultats obtenus et les perspectives de recherche.

## I.1. Généralités sur la vigne rouge

### I.1.1. Position systématique

Les vignes spontanées ou cultivées sont des Spermaphytes (ou Phanérogames, plantes à fleurs), Angiospermes (ovules cachés dans un ovaire), appartenant à la classe des Dicotylédones, à la sous-classe des Rosidées, au phylum des Térébinthales-Rubiales, à l'ordre des Rhamnales et à la famille des Vitacées (autrefois Ampélidées ou Ampélidacées) (Carmona *et al.*, 2008). Les Vitacées comptent dix-neuf genres et 60 espèces inter-fertiles (Galet, 2008). Le genre *Vitis* est divisé par Planchon en deux sous-genres, *Euvitis* (ou *Vitis*) et *Muscadinia*, en tenant compte des différences anatomiques, morphologiques et cytologiques des espèces. A l'intérieur du sous-genre *Euvitis*, trois ou quatre groupes peuvent être distingués selon les auteurs : américain, asiatique, tropicale et euro-asiatique (ou européen) (Carmona *et al.*, 2008).

#### I.1.1.1. Les Vignes américaines

En raison de leur bonne résistance aux pathogènes, ces espèces de vignes sont utilisées comme porte-greffe dans 85% du vignoble mondial (Huglin et Schneider, 1998). Parmi les espèces les plus importantes du point de vue de leur utilisation viticole, on compte : la Vigne-framboisier (*Vitis labrusca* L., 1753), la vigne des rivages (*Vitis riparia* Michx, 1803), la vigne des rochers (*Vitis rupestris* Scheele, 1848), la vigne espagnole (*Vitis berlandieri* Planch., 1880) et la muscadine (*Vitis rotundifolia* Michx, 1803) (This *et al.*, 1997) (Fig. 1).



(480\*313)

**Figure 1.** Aspect général *Vitis vinifera* sp *silvestris* Linnée, 1753 (Linné,1753)

*A : aspect de la vigne cultivée, B : grappes de raisins*

### I.1.1.2. Les Vignes asiatiques

Ce groupe renferme 29 espèces non résistantes aux maladies. Certaines, comme le raisin Amur (*Vitis amurensis* Rupt.) sont utilisées dans les programmes de croisements interspécifiques pour leur résistance au froid (Carmona *et al.*, 2008).

### I.1.1.3. Les Vignes tropicales

Ces vignes regroupent plusieurs espèces dont les plus connues sont la vigne du Caraïbe (*Vitis caribaea*), *Vitis balansaeana*, *Vitis blancii*, la vigne japonaise (*Vitis flexuosa* Thunb.) et la vigne muscate (*Vitis lanata* Roxb.) (Carmona *et al.*, 2008).

### I.1.1.4. La Vigne européenne

Ce groupe de vigne est représenté par une seule espèce. Il s'agit de la vigne rouge (*Vitis vinifera* Linné, 1753). Celle-ci comprend un archétype, *Vitis vinifera sylvestris* (sauvage) et *Vitis vinifera sativa* (cultivée). Cette dernière est la seule sous espèce largement exploitée dans l'industrie vinicole globale (Galet, 1998), et comprend plusieurs milliers de variétés classées par Negrul en trois branches suivant des critères écologiques, géographiques et morphologiques : la *prole pontica*, la *prole occidentalis* et la *prole orientalis* (Carmona *et al.*, 2008). Cette vigne cultivée a progressivement été domestiquée par l'Homme par sélection de plantes hermaphrodites et présente aujourd'hui un polymorphisme remarquable en relation avec son caractère fortement hétérozygote.

## I.1.2. Description Botanique

La vigne est un arbrisseau grimpant qui s'attache aux supports par des vrilles (attaches). Les tiges, taillées en culture, peuvent atteindre dans la nature de très grandes longueurs en grimpant dans les arbres. Les feuilles à nervure palmée comportent cinq lobes principaux plus ou moins découpés, et sont en forme de cœur à la base. Les fleurs sont très petites, verdâtres et regroupées en grappes composées. Les fruits murs sont des baies de forme et de couleur variables. Ils sont blancs, jaunâtres, violets ou noirs, et presque toujours noirs à l'état sauvage (Lebon *et al.*, 2008).

## I.1.3. Cycle de développement

Le développement de la vigne se fait sur deux ans et en deux cycles : le cycle végétatif et le cycle reproducteur. Le premier se caractérise par une phase de croissance au printemps et en été, une phase d'accumulation de réserves dans le bois jusqu'à la fin de l'automne, puis une

phase hivernale de repos. Le second mène au développement et à la maturation des baies de raisin.

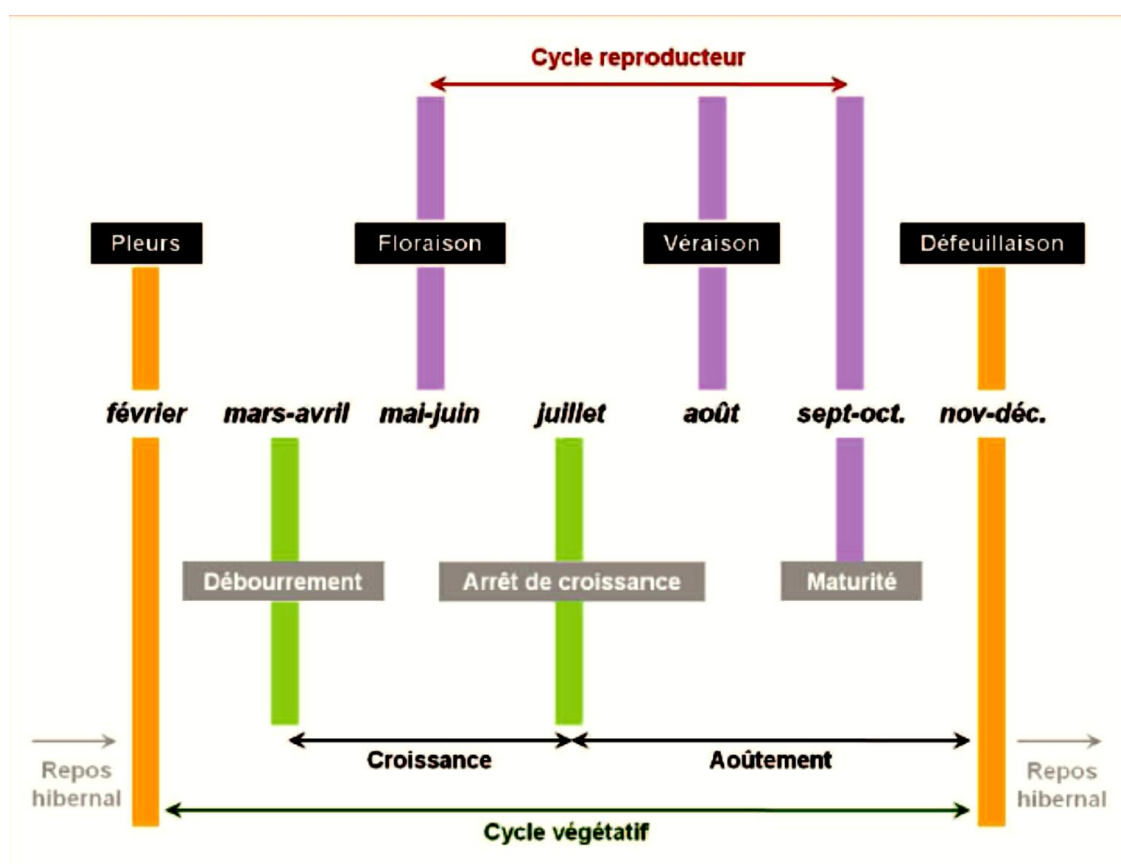
### **I.1.3.1. Le cycle végétatif**

Le cycle végétatif avec ces différents stades phénologiques correspond à la croissance des organes : rameaux, feuilles, vrilles et racines (**Baggiolini, 1952**). Il débute au printemps après une phase de dormance hivernale quand les températures du sol dépassent les 10° C. En présence d'un élagage, des pleurs de sève brute peuvent apparaître (**Carmona et al., 2008**). Cette période de « pleurs » est suivie par le débourrement qui marque la reprise d'activité du bourgeon latent et de la croissance. Le bourgeon gonfle, les écailles s'écartent et les premières feuilles commencent à se développer. Le début du débourrement varie en fonction du cépage et de la température (**Blouin et Guimberteau, 2000**). Un rameau émerge du bourgeon latent et continue à croître et à s'allonger. Les feuilles s'étalent et s'accroissent, et de nouvelles feuilles apparaissent. Des inflorescences apparaissent au sommet des pousses entre les premières feuilles (**Carmona et al., 2008**). Ce sont les bourgeons latents qui assurent à la fois la reproduction et la croissance végétative (**German, 2000 ; Wang, 2003**). Jusqu'à la floraison, la photosynthèse ne permet pas de subvenir à l'intégralité des besoins énergétiques de la vigne (**Lebon et al. 2008**). Celle-ci vit sur les réserves de l'année précédente. La phase de croissance se poursuit jusqu'au milieu de l'été, caractérisé par un brunissement de l'écorce des rameaux, des vrilles et des grappes. Le liège se forme et des réserves s'accumulent sous forme d'amidon et de lignine dans les sarments. Les teneurs en eau dans les tissus du bois diminuent de façon synchrone. La vigne commence à perdre ses feuilles au début de l'automne, ce qui marque la fin du cycle végétatif de l'année. L'aoûtement se poursuit jusqu'à la fin de l'automne, avant les premières gelées. La vigne passe ensuite en dormance hivernale jusqu'au printemps suivant (**Schneider, 1998**).

### **I.1.3.2. Le cycle reproducteur**

Le cycle reproducteur qui mène vers la formation des baies est un processus qui dure deux années et est interrompu par la dormance hivernale. Les inflorescences sont initiées et préformées dans les bourgeons latents de l'année précédant leur développement après débourrement (**Lebon et al., 2008**). La différenciation des fleurs commence au printemps avec la reprise d'activité du bourgeon latent. Les inflorescences apparaissent au sommet des pousses entre les premières feuilles, se séparent et commencent à prendre la forme d'une grappe (**Guebailia, 2007**). La floraison aboutit à la libération du pollen et est rapidement

suivie de la fécondation. Des gelées tardives et des conditions climatiques trop fraîches ou pluvieuses peuvent provoquer une fécondation partielle et incomplète. Des ovaires mal fécondés produisent des baies de taille réduite qui n'arrivent jamais à maturité. Dès que les ovaires commencent à se développer, on parle de nouaison. Les ovules évoluent en graines (pépins) et des baies commencent à se développer pour protéger les graines. On commence alors à parler de « grappe ». Les inflorescences stériles deviennent des vrilles. Les baies restent vertes jusqu'au milieu de l'été, pour atteindre la véraison. Les baies ramollissent et changent de couleur, ce qui traduit le début de la maturation, laquelle se prolongera jusqu'à la fin de l'été (Fig. 2).



**Figure 2.** Cycle végétatif et reproducteur de la vigne dans l'hémisphère Nord (Galet, 2006).

#### I.1.4. Usage traditionnel

L'action thérapeutique de la vigne rouge est différente selon la partie utilisée. L'Agence Européenne des Médicaments reconnaît aux extraits de vigne rouge (feuille, pépins, fruit selon le cas) des propriétés anti-inflammatoires, anti-œdémateuses, protectrices sur le foie, antimicrobiennes, anti-oxydantes, et diurétiques (Souquet, 2000).

**I.1.4.1. Les feuilles de vigne rouge**

Les feuilles de vigne rouge sont utilisées dans le traitement de l'insuffisance veineuse, des hémorroïdes, des varices, des jambes lourdes et des ulcères variqueux. En raison de leur richesse en tanins, les vignes ont un effet angioprotecteur en renforçant la résistance des capillaires sanguins (Nivelle, 2017). Les feuilles et le fruit constituent un vieux remède de médecine populaire contre les troubles de la ménopause. Ils rétablissent une bonne circulation du sang, luttent contre les hémorragies utérines et préviennent tous les accidents de l'âge critique (Billard, 2002).

**I.1.4.2. Le marc de raisin**

Le marc de raisin est une association de la pellicule du raisin et de ses pépins qui permet d'améliorer la circulation capillaire et veineuse, ce qui favorise l'épuration du sang. La présence du mucilage permet de limiter l'assimilation par l'organisme des graisses et des sucres, ce qui représente un bénéfice pour les maladies cardiovasculaires. En effet, il apporte une nette augmentation de la fonction endothéliale (élasticité des parois des vaisseaux qui se dilate et se contracte) puis une réduction de l'oxydation du mauvais cholestérol et aussi une baisse de la tension artérielle. Il a été démontré aussi que son apport en flavonoïdes pourrait inhiber l'activité d'une enzyme nécessaire à la survie de cellules cancéreuses (Demelin, 2012).

**I.1.4.3. Les larmes de vignes**

Il s'agit d'une sécrétion obtenue lorsqu'une branche est cassée. C'est un excellent diurétique et collyre. Les décoctions de vrilles sont constrictives dans les diarrhées. La vigne rouge (*Vitis vinifera var. tinctoria*) possède quant à elle des propriétés particulières. Les anthocyanes sont des facteurs vitaminiques puissants qui protègent et tonifient les capillaires et les veines. On l'utilise dans les cas de couperose, jambes lourdes, hémorroïdes, varices, ménopause et bouffées de chaleurs (Brandt, 2000).

**I.2. Stress oxydatif****I.2.1. Généralités**

Les radicaux libres sont des atomes ou groupes d'atomes très instables possédant un nombre impair d'électrons sur la loge extérieure. Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques, en raison de leur importance pour l'organisme à un niveau de base. Dans les circonstances normales, la balance antioxydant / prooxydant est en équilibre. Dans le cas d'un excès en ces radicaux, soit par déficit en antioxydant ou par une surproduction de ces derniers,

un stress oxydant apparaît et on assiste à un déséquilibre de la balance antioxydant / prooxydant (**Pham-Huy, 2008**).

### I.2.2. Principaux radicaux libres oxygénés

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, un ensemble restreint de radicaux primaires jouent un rôle particulier en physiologie. Les radicaux secondaires, se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Pham-Huy, 2008**). Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène et d'autres composés non-radicalaires très réactifs. Certaines espèces réactives de l'azote (ERA ou RNS) possèdent un atome d'oxygène et se comportent de manière similaire aux ERO vis-à-vis du stress oxydant (**Favier, 2006**). Les principaux radicaux libres comprennent : le radical hydroxyle ( $\text{OH}\bullet$ ), l'anion superoxyde ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), le monoxyde d'azote ( $\text{NO}\bullet$ ), le dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ), le nitroxyde ( $\text{NOO}\bullet$ ), le radical peroxy ( $\text{ROO}\bullet$ ) et le peroxy lipidique ( $\text{LOO}\bullet$ ). Citons en outre, le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'ozone ( $\text{O}_3$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), l'acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ), l'acide nitreux ( $\text{HNO}_2$ ), le peroxy nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), le trioxyde de diazote ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) et le peroxyde lipidique ( $\text{LOOH}$ ), qui ne sont pas des radicaux libres au sens propre mais qui sont très réactifs et peuvent donc conduire à l'oxydation des molécules dans l'organisme (**Favier, 2006**).

### I.2.3. Source des espèces réactives de l'oxygène

La source principale des ERO dans les cellules des mammifères est d'origine enzymatique. La NADPH oxydase, les peroxysomes, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases et les lipoxygénases sont parmi les sources endogènes d'ERO les plus importantes. Générés par l'oxygène libéré par les mitochondries lors des réactions de respiration cellulaire, ces derniers sont dotés de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, ...). Au niveau moléculaire, ils peuvent agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies. Les ERO sont également générées sous l'effet des stress environnementaux comme la pollution, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition prolongée au soleil, l'effort intense et prolongé ainsi que le tabagisme (**Favier, 2006 ; Laetitia, 2017**). La figure 3 illustre les origines des différents radicaux libres oxygénés et des ERO impliquées en biologie. Cependant, la principale source

des ERO est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Cet organe cellulaire produit en effet 90% des ERO cellulaires (Brandt, 2000).

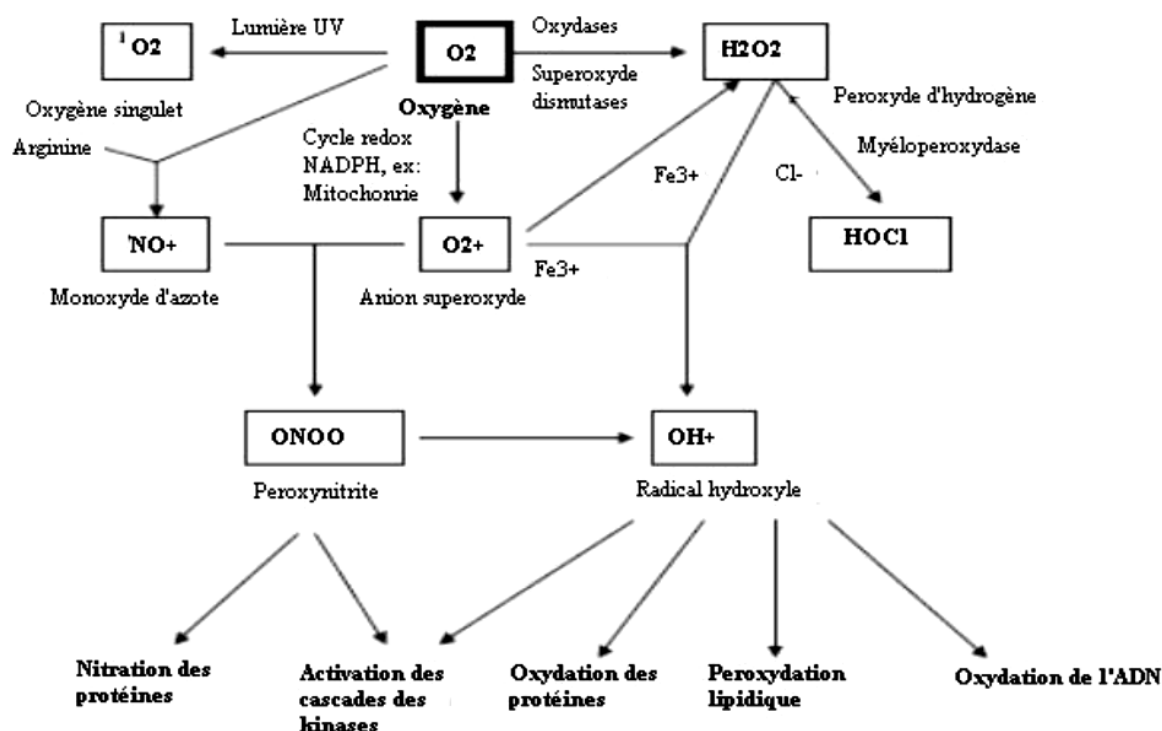


Figure 3. Origine des différents radicaux libres oxygénés et ERO impliqués en biologie (Favier, 2003)

## I.2.4. Effets du stress oxydant sur les structures moléculaires

### I.2.4.1. Effet sur l'ADN

Les radicaux libres en général et les espèces réactives de l'oxygène en particulier peuvent causer d'importantes modifications au niveau des bases nucléotidiques (purines et pyrimidines). Les radicaux OH• sont parmi les radicaux les plus délétères du stress oxydatif, ils sont ainsi capables de réagir avec les désoxyriboses ou les phosphodiesteres de la molécule d'ADN (Demelin, 2012). Grâce aux mécanismes d'excision et de resynthèse effectuées par les enzymes de réparation de l'ADN, les dégâts engendrés peuvent être réparés. Cependant, si les systèmes de protection sont affectés par les radicaux libres, le matériel génétique sera altéré et les mutations engendrées peuvent être à l'origine des cancers (Brandt, 2000).

### I.2.4.2. Effet sur les lipides

Un des indices des dommages oxydatifs effectués aux lipides est la peroxydation lipidique et la dégradation des acides gras membranaires. En effet, les espèces réactives oxygénées

arrachent un atome d'hydrogène aux chaînes insaturées des acides gras pour former des radicaux alkyles, au cours de la phase de propagation. Ces derniers réagissent avec l'oxygène moléculaire au de la membrane pour former des radicaux peroxydes. Ces réactions en chaîne engendrent une altération de la fluidité membranaire et par conséquent une désorganisation globale (Li *et al.*, 2015). Parmi les espèces réactives de l'oxygène, les radicaux hydroxyles et hydroperoxydes sont les plus réactifs vis-à-vis des acides gras polyinsaturés (Brandt, 2000).

#### I.2.4.3. Effet sur les protéines

De nombreuses protéines sont la cible des attaques radicalaires. A titre d'exemple, les fibres de collagène de la peau, l'albumine et les molécules de reconnaissance moléculaire comme les enzymes, les anticorps et les récepteurs membranaires sont quotidiennement exposés aux radicaux libres. Les espèces réactives oxygénées (ERO) les plus réactives avec les protéines sont le radical hydroxyle  $\text{OH}\cdot$  et le peroxy-nitrite  $\text{ONOO}^-$  (Li *et al.*, 2015). Les ERO peuvent modifier les protéines par oxydation, nitrosylation, nitration ou encore par chlorination d'acides aminés spécifiques, provoquant ainsi une altération de leur activité biologique (Brandt, 2000). En effet, dans les conditions physiologiques, les acides aminés les plus sensibles aux ERO rapportés par la littérature sont : les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine), les acides aminés basiques (arginine, histidine et lysine), et les acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane) (Li *et al.*, 2015). En présence des ERO les protéines peuvent se dénaturer, se fragmenter ou perdre leur structure primaire ou secondaire.

#### I.2.5. Rôles des radicaux libres oxygénés dans la physiologie

Sur le plan physiologique, les radicaux libres oxygénés préviennent d'une part la maladie par l'implication du système immunitaire, la médiation de la signalisation cellulaire et l'implication dans l'apoptose. D'autre part, ils peuvent intervenir dans la cancérogénèse et les maladies cardiovasculaires en endommageant d'importantes macromolécules cellulaires (Mambrini, 2004).

#### I.2.6. Maladies liées au stress oxydatif

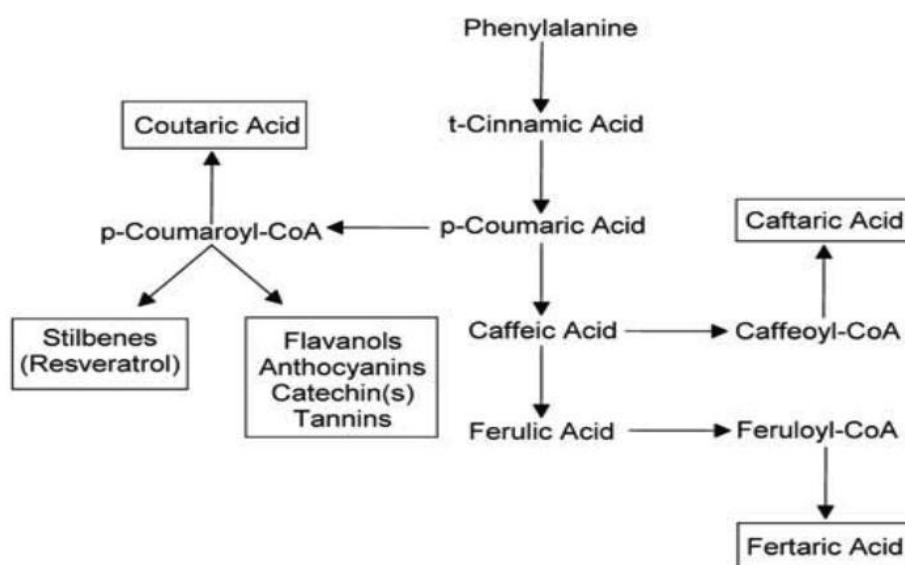
La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. Le stress oxydatif est impliqué dans de nombreuses maladies, et il est considéré comme un facteur associé à des complications et progression de pathologies notamment dans

la genèse des maladies cardiovasculaires, neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson), métaboliques (diabète) ainsi que dans le vieillissement et la formation de cancers. On peut aussi distinguer d'autres maladies dont le stress oxydatif est la cause principale comme l'hypertension artérielle, suite à un dysfonctionnement endothélial, et l'athérosclérose liée à une diminution de la circulation sanguine et une hausse de la pression artérielle (Chira *et al.*, 2008).

### I.3. Composés polyphénoliques de la vigne

#### I.3.1. Généralités biochimiques

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques généralement de haut poids moléculaire issues du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénols associés en structures plus ou moins complexes (Frankel, 1993). Il s'agit de composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 30000 daltons, et dotés de plusieurs activités biologiques notamment un pouvoir antioxydant élevé (Macheix *et al.*, 2005). Environ 10 000 composés ont été caractérisés dont la plupart sont formés à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et surtout la phénylalanine. Ces acides aminés sont produits de façon variable d'une espèce végétale à une autre (Adams, 2006). La figure 4 représente la voie de biosynthèse des composés phénoliques dans la baie de raisin.



**Figure 4.** Voie biochimique de synthèse des principales classes de polyphénols solubles présents dans la baie de raisin (Adams, 2006)

Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. Toutes les classes des composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes par le nombre et la position des groupements hydroxyles et méthoxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent être glycosylées, estérifiées, ou acylées (**Cheyrier *et al.*, 2006**). Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénols, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30 000 daltons, comme les tanins. Leur synthèse dans les tissus est stimulée lorsque la plante est exposée à un stress provoqué par des parasites ou des contraintes de l'environnement telles que le rayonnement ultra-violet. En effet, certains composés amers ou astringents, limitent la palatabilité et la digestibilité de certaines plantes, alors que d'autres font face à la progression des pathogènes en participant à la lignification des parois. Les tanins par leur complexations avec les polysaccharides pariétaux renforcent la structure des parois cellulaires. Les polyphénols par leur couleur interviennent dans les mécanismes de pollinisation et de dissémination des graines (**Jourdes, 2003**). Certains fruits présentent des concentrations très fortes en composés phénoliques, tels que la baie de raisin, la prune ou le kaki. Le raisin contient de grandes quantités de composés phénoliques, dont les catéchines concentrées principalement dans les pépins et les pellicules (**Frankel *et al.*, 1993**). Ces composés jouent un rôle essentiel dans les propriétés technologiques, nutritionnelles et organoleptiques des produits de transformation des végétaux destinés à l'alimentation.

### **I.3.1.1. Composés non-flavonoïdes**

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques ainsi que les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette « flavone ».

#### **I.3.1.1.1. Acides phénoliques**

##### **a. Les acides hydroxycinnamiques**

Caractérisés par un squelette carboné en C6-C3 (Fig. 5), l'acide cinnamique est produit par une désamination de la phénylalanine catalysée par la Phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL), l'acide *para*-coumarique (p-coumarique) est alors produit par l'hydroxylation de l'acide cinnamique. L'acide cinnamique et les acides hydroxycinnamiques sont aussi désignés sous le terme de phénylpropanoïdes (**Jakobek *et al.*, 2007**). Leur squelette de base est un noyau benzénique avec une chaîne aliphatique à trois carbones, renfermant un ou plusieurs groupements hydroxyles souvent estérifiés en ester d'alcool aliphatique. Ils incluent l'acide

*para*-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique. Ils sont produits par des séries d'hydroxylation et de méthylation et ils s'accumulent souvent sous forme d'esters d'acide tartrique : acide coutarique, caftarique et fertarique, esters respectifs des acides *p*-coumarique, férulique et sinapique. Le composé majeur des acides hydroxycinnamiques dans le raisin est l'acide caftarique (ester caffeoyl-tartrique) (Makris *et al.*, 2006).

### b. Acides benzoïques

Ils possèdent un squelette carboné en C6-C1, composé d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone (Fig. 5). On trouve l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide gentisique et l'acide gallique. Ils existent sous forme libre ou estérifiée par des flavanols. Dans le raisin, l'acide gallique est le plus abondant au niveau des pépins (Frankel *et al.*, 1993). La forme naturelle est le *trans* (E) mais les isomères *cis* (Z), existent en faible quantité (Cheynier *et al.*, 2006).

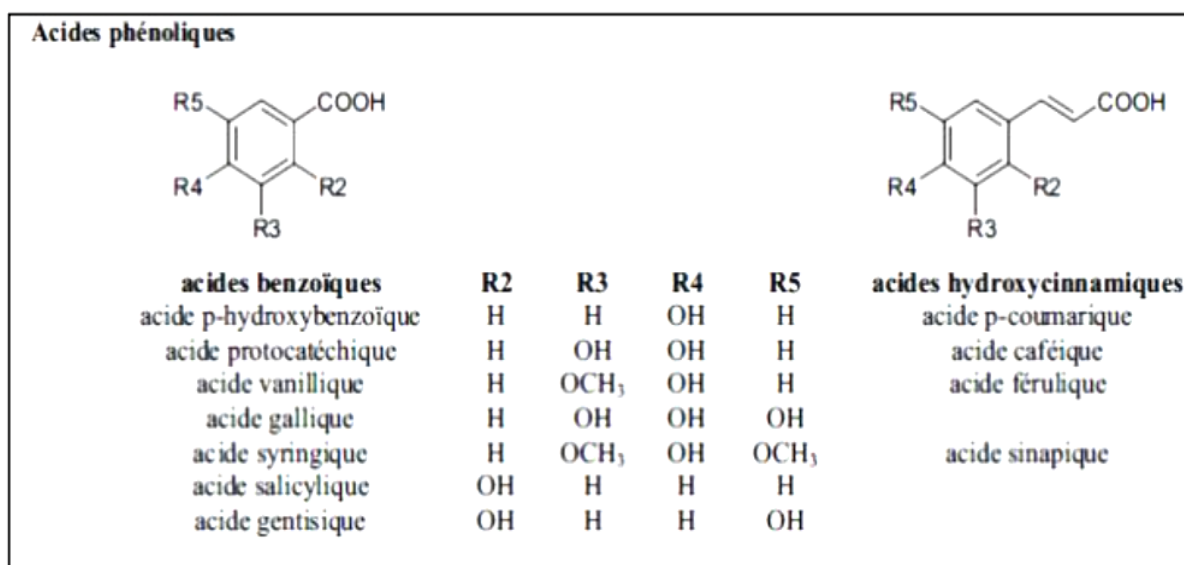


Figure 5. Structure des acides phénoliques du raisin (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

#### I.3.1.1.2. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué (Fig. 6). Les plus abondants dans le raisin sont le *trans*-resvératrol et son dérivé glucosylé (le picéide), et les dimères (le resvératrol, *trans*-déhydrodimère et l' $\epsilon$ -viniférine) (Langcake, 1981 ; Waterhouse et Lamuela-Raventos, 1994).

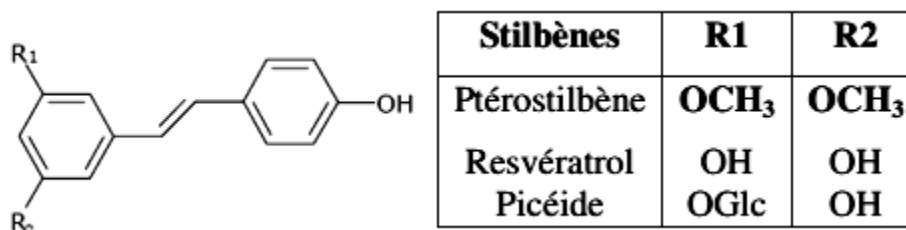


Figure 6. Structures chimiques de quelques stilbènes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998)

Ce type de molécules existe aussi sous la forme de dérivés trimériques à pentamériques (Sultanbawa, 1981 ; Kawabata, 1989 ; Kayser, 1997 ; Tanaka *et al.*, 1998). Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (LDL). Ils pourraient ainsi jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires (Frankel *et al.*, 1993). On leur attribue aussi des activités chimiopréventives contre le cancer (Jang *et al.*, 1997).

### I.3.1.2. Composés flavonoïdes

Les flavonoïdes forment une grande famille de composés phénoliques ayant une structure commune en C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane, comportant deux cycles benzéniques reliés par un oxygène contenant un cyclepyrène (Fig. 7). Certains d'entre eux sont responsables des couleurs très vives des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils se divisent en plusieurs sous familles selon le degré d'oxydation et la substitution en position 3 et 4 du cycle pyranique C (Orallo, 2006). Il existe environ une douzaine de classes reconnues de flavonoïdes dont les principaux sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. Les anthocyanes, les flavonols et les flavan-3-ols sont les principaux flavonoïdes présents dans les raisins de type *Vitis vinifera* (Chira *et al.*, 2008)

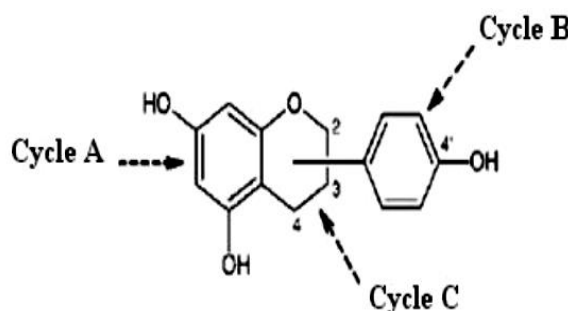
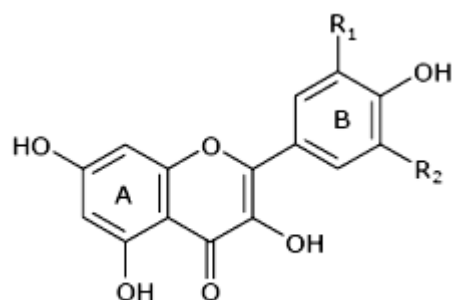


Figure 7. Squelette de base des flavonoïdes (Chira *et al.*, 2008)

I.3.1.2.1. Flavonols

Quatre flavonols sont majoritairement présents dans le raisin: le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine (Fig. 8). Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants. Ceux de la myricétine semblent être spécifiques aux variétés de raisins rouges (Remy, 1999). On leur attribue des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies du cœur et des cancers, ou encore des activités chimiopréventives (Lacaille-Dubois et Wagner, 1996).

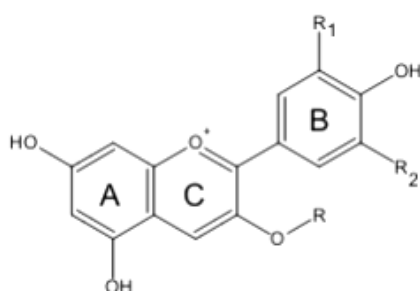


Flavonols	R1	R2
Kaempférol	H	H
Quercétine	OH	H
Myricétine	OH	OH

Figure 8. Structures chimiques de quelques flavonols (Chira *et al.*, 2008)

I.3.1.2.2. Anthocyanes

Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration des raisins rouges. Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavone » généralement glucosylé en position C-3 (Fonknechten, 1983). 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. On distingue cinq anthocyanidines dans le genre *Vitis* (Fig. 9).



Anthocyanidines R* = H	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Malvidine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Péonidine	OCH <sub>3</sub>	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH <sub>3</sub>	OH
Cyanidine	OH	H

Figure 09. Structures chimiques de quelques anthocyanidines (Perret, 2001)

\* : Forme monoglucoside, R : glucose

Contrairement à d'autres espèces qui présentent des teneurs importantes en anthocyanes diglucosylés en position C-3' et C-5', l'espèce *Vitis vinifera* n'en contient que des traces et se caractérise par la présence majoritaire de 3-monoglucosides d'anthocyanidines, en particulier de la malvidine 3-*O*-glucoside et de ses dérivés acylés (**Baldi et al., 1995**). Le pH est un facteur important dans le changement de la couleur des anthocyanes. La forme flavylium, de couleur rouge est stable en milieu acide et se transforme, en milieu basique, soit en base carabinol (incolore), en chalcone (jaune) ou en base quinonique (bleue). Pour la malvidine-3-*O*-glucoside, la forme hémiacétal (AOH) est largement majoritaire. Toutefois, le cation flavylium est en quantité suffisante pour que sa couleur rouge prédomine (**Frémont, 2000**).

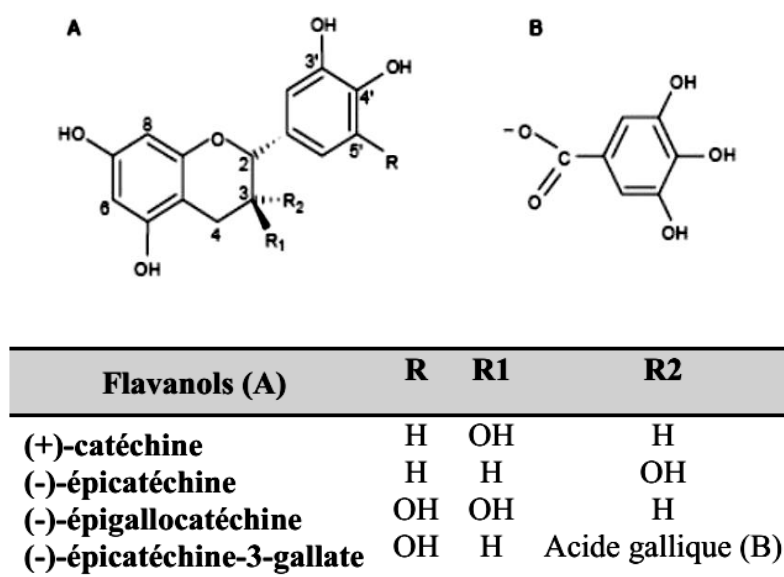
#### I.3.1.2.4. Tanins condensés (flavan-3-ols)

Les tanins condensés appelés aussi proanthocyanidines, sont des polymères de flavanols. Ils sont largement répandus dans notre alimentation (fruits, thé...) et jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits. Dans le raisin, les flavanols se présentent soit sous formes de monomères, soit sous forme de polymères formant alors les tanins condensés dans les couches hypodermiques de la peau et le parenchyme mou des pépins entre la cuticule et le tégument dur (**Vivas et al., 2003 ; Macheix et al., 2005 ; Cadot et al., 2012**). Dans la baie de raisin, la pellicule et les pépins sont les zones de concentration de tanins (**Kennedy et al., 2000**). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs carbones asymétriques, leur degré d'oxydation et leur nombre de substituant galloylés (**Soquet et al., 1996**). Les tanins des pépins sont des procyanidines, partiellement galloylés, basés sur des unités catéchines, épicatechines et 3-*O*-Gallate d'épicatéchine, liées entre elles par des liaisons C4-C6 ou C4-C8. Les tanins de pellicule comprennent aussi des prodéphinidines et présentent des proportions de gallates inférieures à celles des tanins de pépins (**Cheyrier et al., 2006**). L'étude menée par **Nunez et al., (2004)** a montré que la distribution des flavan-3-ols est généralement déterminée par des facteurs génétiques et influencée par les conditions climatiques.

##### a- Unités monomériques

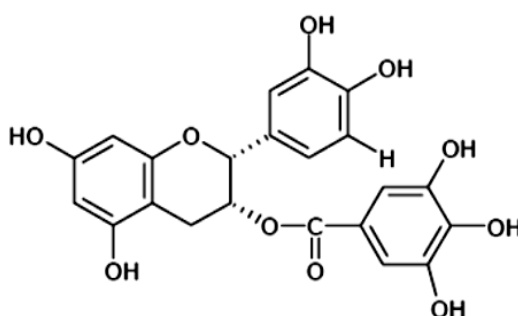
Les formes monomériques des flavanols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C-2 et C-3, la présence de substituant galloylés, ainsi que par le niveau d'hydroxylation du noyau B (Fig. 10). On distingue ainsi les formes di-hydroxylées (famille des catéchines) et les formes tri-hydroxylées (famille des gallocatéchines). Ces dernières n'ont pas été identifiées dans le raisin sous leurs formes monomériques, mais leur présence dans les

formes polymériques, notamment dans les pellicules et la pulpe de *Vitis vinifera*, suggère leur existence en tant que monomères (Soquet *et al.*, 1996 ; Adams, 2006).



**Figure 10.** Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés (Mori *et al.*, 2003)

Ces unités peuvent être substituées par l'acide gallique en position C-3, en particulier l'épicatéchine, formant ainsi l'épicatéchine-3-*O*-gallate (Fig.11) (Cheynier *et al.*, 2006).



**Figure 11.** Structure de l'épicatéchine-3-*O*-gallate (Cabrita, 2000)

### b- Tanins condensés (type A et B)

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison inter monomérique (réaction de Bate-Smith) (Cheynier *et al.*, 1997). Dans le raisin, et selon la nature de l'anthocyane libérée, on distingue deux types de proanthocyanidines : les procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine), et les

prodelphinidines (polymères de gallo catéchine et d'épigallocatechine), qui libèrent par hydrolyse la cyanidine et la delphinidine respectivement (Fig. 12) (Cheynier *et al.*, 1997). Les proanthocyanidines se distinguent par leur nombre d'unités monomériques et le type de liaison les reliant entre-elles. Ainsi, une trentaine de proanthocyanidines dimériques, trimériques et tétramériques ont déjà été identifiées (Boukharta *et al.*, 1988 ; Prieur *et al.*, 1994 ; Escribo-Bailon *et al.*, 1995). Le type B se caractérise par une liaison inter monomérique qui peut être soit C4-C8 ou C4-C6, de conformation *trans* par rapport à l'hydroxyle en position C-3. La stéréochimie du carbone C-2 est généralement (R), mais il existe quelques exceptions. Les structures des principaux dimères de type B du raisin sont représentés par la figure 12. Les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C-2 et les hydroxyles 5 ou 7 du noyau A. Les flavan-3-ols, présents dans le raisin, se rencontrent majoritairement sous la forme de polymères. Les tanins de pépins sont constitués de procyanidines partiellement galloylés (Prieur *et al.*, 1994), alors que ceux des pellicules contiennent également des prodelphinidines (Soquet *et al.*, 1996). Le nombre moyen d'unités monomériques, défini comme le degré moyen de polymérisation, peut aller jusqu'à 18 dans une fraction issue de pépins (Icardo da Silva *et al.*, 1991) et avoisine les 30 unités dans un extrait de pellicule (Soquet *et al.*, 1996). D'importants travaux ont mis en évidence certaines propriétés biologiques et pharmaceutiques des tanins: antivirales, antitumorales, chimiopréventives (Lacaille-Dubois et Wagner, 1996) et antioxydants (Hemingway et McGraw, 1983 ; Icardo da Silva *et al.*, 1991 ; Plumb *et al.*, 1998).

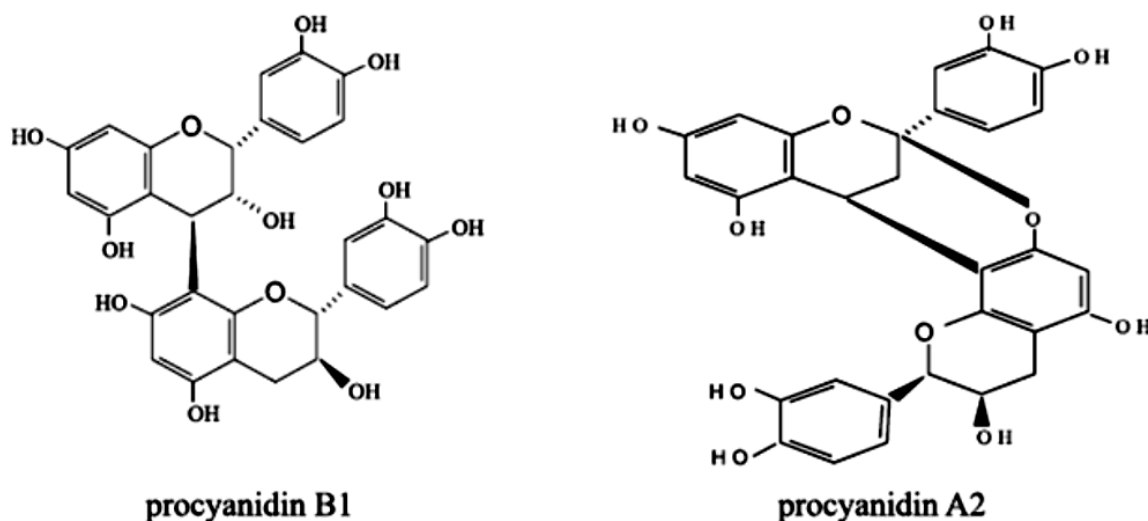


Figure 12. Exemples de proanthocyanidines de type B et A des raisins

### I.3.2. Rôles et intérêts des composés phénoliques

#### I.3.2.1. Chez les végétaux

Les composés phénoliques interviennent dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), et dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV) (Macheix *et al.*, 2005).

#### I.3.2.2. Chez l'homme

Le rôle des composés phénoliques est largement démontré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (Macheix *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré que les polyphénols peuvent protéger la santé humaine contre beaucoup de maladies entre autre les maladies parodontales (Escribo-Bailon *et al.*, 1995). Le raisin est un fruit riche en composés phénoliques qui pourraient donc jouer un rôle préventif lorsqu'ils sont consommés régulièrement et intégrés à l'alimentation. Néanmoins, les méthodes disponibles pour mesurer les effets de ces composés *in vivo* sont insuffisantes et les données sur les effets à long terme de la consommation des polyphénols sont particulièrement rares (Flanzy, 1998 ; Frémont, 2000).

#### I.3.2.3. Pour l'industrie

Les polyphénols, notamment les flavonoïdes sont également utilisés comme colorants pour les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. La pigmentation des anthocyanes dépend de nombreux facteurs : la proportion et les formes d'anthocyanes présentes; les associations existantes entre les anthocyanes et les autres molécules présentes, les nombreux facteurs physiques et chimiques tels que le pH, la nature du solvant, la température ainsi que de la présence de sels métalliques (Cheynier *et al.*, 1997).

### I.3.3. Propriétés biologiques

Les composés phénoliques du raisin possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques, en particulier pour certaines pathologies chroniques comme l'athérosclérose, le diabète, l'hypertension et certains cancers (Tableau 1). D'après Chira *et al.*, (2008), les mécanismes d'action des composés phénoliques impliqués dans la prévention de pathologies chroniques reposent sur les possibilités suivantes :

- Un effet de piégeage direct sur les radicaux libres ;
- Un effet d'économie d'antioxydants endogènes (vitamine E, vitamine C,  $\beta$ -carotène...);
- Un effet d'économie d'enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) ;
- Un effet de diminution de la cholestérolémie et de « rééquilibrage » des lipides sanguins (HDL/LDL) ;
- Un effet de chélation sur des cofacteurs d'oxydation comme certains métaux ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) essentiels pour des fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant : le fer pour la catalase, le cuivre et le zinc pour la superoxyde dismutase;
- Un effet d'inhibition sur des enzymes oxydatives comme les cyclooxygénases et les lipooxygénases ;
- Un effet sur la synthèse du monoxyde d'azote endothélial (facteur de relaxation) : au niveau cellulaire de la paroi artérielle entraînant une vasorelaxation et une hyperpolarisation de la membrane par relargage de potassium extracellulaire ;
- Un effet inhibiteur dans la genèse de production de la NAPH oxydase au niveau des cellules de la paroi vasculaire (aorte thoracique et cœur), entraînant ainsi une diminution de la production de radicaux libres.

**Tableau 1.** Propriétés biologiques de quelques composés phénoliques dans l'organisme

Polyphénols	Activité biologiques	Auteurs
Acides phénol (cinnamiques et benzoïque)	-Antibactérienne, - Antiulcéreuse, -Antiparasitaire, Antifongique, -Antioxydante,	- <b>Sannomiya <i>et al.</i>, 2005 ;</b> - <b>Barros <i>et al.</i>, ;</b> - <b>Gurbuz <i>et al.</i>, 2009.</b>
Coumarines	-Anticancérigène, anti- inflammatoire, antiallergique ;	- <b>Kostova, 2005</b>
Flavonoïdes	-Antioxydant ; -Réduit l'agrégation plaquettaire ; uAntithrombotique ; Antiulcéreuse.	- <b>O'Byrne <i>et al.</i>, 2002 ;</b> - <b>Keevil <i>et al.</i>, 2000 ;</b> <b>Freedman <i>et al.</i>, 2001 ;</b> <b>Sannomiya <i>et al.</i>, 2005.</b>
Anthocyanes	-anti-inflammatoire- antiulcéreuse -Antioxydante	- <b>Revilla et Ryan. 2000 ; Cisse <i>et al.</i>, 2009 ;</b> - <b>Antal <i>et al.</i>, 2003</b>
Pronthocyanidines	-Protection contre les maladies cardiovasculaires	- <b>Mink <i>et al.</i>, 2009 ;</b>
Tanins galliques et catéchiques	-Anti-cancéreux -Activité antibactérienne vaste	- <b>Veluriet al., 2006 ;</b> - <b>Doss et al., 2009.</b>

#### I.3.4. Huiles végétales

Les huiles essentielles sont généralement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont plus ou moins colorées et leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels, entraînaibles à la vapeur d'eau, très peu solubles dans l'eau (**Bail *et al.*, 2008**).

##### I.3.4.1. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles n'existent que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface des tissus de plantes

et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles (*Lauraceae* ou *Zingiberaceae*), dans des poils sécréteurs (*Lamiaceae*), dans des poches sécrétrices (*Myrtaceae* ou *Rutaceae*) ou dans des canaux sécréteurs (*Apiaceae* ou *Asteraceae*). Elles peuvent être stockées dans divers organes végétaux : les fleurs, les sommités fleuries, les feuilles, les racines, les rhizomes, les fruits, le bois ou les graines (Bruneton, 1999).

**I.3.4.2. Procédés d'extraction de l'huile à partir des graines oléagineuses**

Trois procédés sont classiquement utilisés pour extraire l'huile à partir des graines oléagineuses: la pression unique ou double, l'extraction directe par solvants et le procédé mixte, couplant le pressage à une extraction par solvant sur le tourteau (Dijkstra et Segers, 2007). Le procédé global d'extraction de l'huile à partir des graines oléagineuses est présenté par la figure 13.

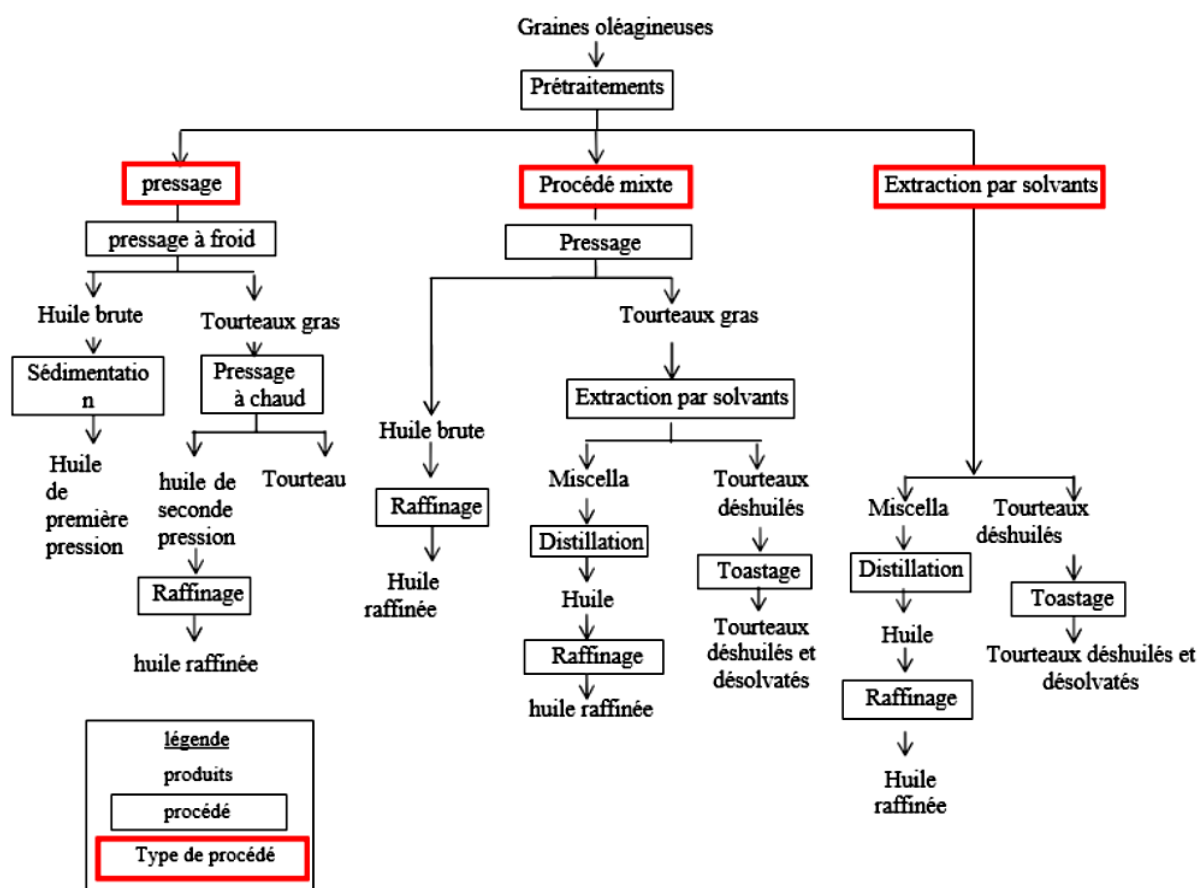


Figure 13. Procédés classiques d'extraction de l'huile à partir de graines oléagineuses (Gros, 2005)

La préparation des graines comprend plusieurs étapes. Elles sont préalablement nettoyées et séchées. Durant le procédé, les graines subissent différents prétraitements de nature physique et thermique (Anderson, 2005). Les plus fréquemment utilisés avant pressage sont la cuisson, le floconnage ou l'aplatissage des graines. Un depelliculage des graines est parfois utilisé pour faciliter le pressage des graines (Dijkstra et Segers, 2007), ou dans une optique nutritionnelle (Matthäus, 2012). Le pressage est un procédé physique permettant l'exsudation de l'huile d'une matière poreuse sous l'effet d'une force de compression (Dijkstra et Segers, 2007). A l'issue de cette étape, le tourteau obtenu est qualifié de « gras », et sa teneur en huile résiduelle de l'ordre de 10 à 20% (Matthäus, 2012).

Pour le procédé d'extraction par solvant, l'hexane est préférentiellement utilisé. Cependant, l'inflammabilité de ce composé, sa toxicité et son prix indexé à celui du pétrole sont des inconvénients majeurs de son utilisation (Johnson, 2002). L'extraction de l'huile se fait aussi soit par des solvants alternatifs tels que l'éthanol (Ferreira-Dias et al., 2003), l'iso-propanol (Zhang et al., 2002), l'isohexane (Wan et al., 1995), ou l'heptane (Gandhi et al., 2003). Le tableau 02 synthétise les avantages qualitatifs et quantitatifs des différentes techniques d'extraction des huiles.

**Tableau 2.** Comparaison des techniques d'extraction d'huile en terme de qualité, de rendement en huile et de consommation de solvant (Bouzzara, 2001 ; Willems, 2007; Latif, 2009 ; Muniglia et al., 2010)

Procédé d'extraction	Rendement d'extraction	Qualité de l'huile*	Séparation solvant/huile	Consommation de solvant (Kg solvant/Kg d'huile)
Enzymatique	-	+	-	1 à 25
Solvants organiques	+	-	+/-	2
Pressage mécanique continu	+	+	+	0
Pressage Hydraulique	-	+	+	0
CO <sub>2</sub>	+	+	+	100

**I.3.4.4. Avantages de l'huile de pépins de raisin pour l'alimentation**

L'huile de pépins est très appréciée pour conserver la saveur des aliments et pour sa polyvalence. Elle possède un point de fumée plus élevée que les autres huiles végétales notamment l'huile d'olive, de maïs, ou de sésame. La composition chimique de l'huile de pépin de raisin est portée sur le tableau 3.

**Tableau 3.** Composition biochimique des pépins en pourcentage de poids frais  
(Cabanis *et al.*, 1998).

Composées	Pourcentage (%)
Eau	25-45
Composés Glucidiques	34-36
Lipides	8-13
Polyphénols	4-10
Composés Azotés	4-6.5
Minéraux	2-4

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

Ahmar Bouamar, cépage rouge, local (Algérien), autochtone et tardif. C’est une variété aromatique à baie colorée, de raisin de table par excellence. C’est un cépage vigoureux et productif, affectionne tout particulièrement les sols de coteaux bien exposée tels que Tlemcen, Mascara et Médéa où on rencontre les superficies les plus importantes.

II.1.2. Souches microbiennes testées

Les souches utilisées pour déceler l’activité antibactérienne des extraits des feuilles de la variété Ahmar Bouamar font partie de six genres de microorganismes. Certaines sont des souches référentielles de l’American Type Culture Collection (ATCC). D’autres sont des souches cliniques isolées de patients hospitalisés (au centre hospitalier universitaire de Dellys (CHU) (Tab. 4).

Tableau 4. Souches microbiennes testées

	Souches microbiennes	Gram	Références
<b>Bactéries</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC27853
	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC25922
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC25923
<b>Levure</b>	<i>Candida albicans</i>		Souche pathogène isolé à partir d’urine
<b>Moisissure</b>	<i>Saccharomyces cereviceae</i>	/	
	<i>Aspergillus niger</i>		

II.2. Méthodes

II.2.1. Récolte, séchage et broyage

Les feuilles et les grappes de la variété Ahmar Bouamar, cépage rouge local (Algérien) et tardif ont été cueillie à la fin de mois de Novembre, dans la région de Benchécao de la wilaya de Médéa (Fig. 14 et 15). Une fois récoltés, les feuilles sont séchées à l’abri de la lumière pendant 15 jours puis broyées et tamisés pour récupérer la poudre qui servira pour les différentes analyses. Quant aux baies, elles ont été nettoyées de leurs pépins et foulées manuellement pour récupérer le moût. Les pépins ont été lavés, séchés à l’abri de la lumière pendant 15 jours puis broyés et tamisés pour récupérer la poudre qui servira pour l’extraction

de l'huile. Les poudres obtenues ont été conservé dans des flacons hermétiques à l'abri de l'humidité.



Figure 14. Feuilles et grappes de la variété Ahmar Bouamar



Figure 15. Localisation géographique de la zone de récolte des feuilles et des baies de raisin Ahmar Bouamar

### II.2.2. Caractérisation phytochimique

Le screening phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans un échantillon donné. Les tests phytochimiques réalisés sur le cépage Ahmar Bouamar, ont pour objectif de rechercher les substances bioactives (métabolites primaires ou secondaires) synthétisées par cette plante. Ils sont effectués soit sur la poudre, soit sur l'infusé à 5 %, ou bien sur le jus. Les méthodes de

caractérisation utilisées dérivent de celles décrites par **Wong *et al.*, (2006)** et **Raaman *et al.*, (2006)**. Les métabolites recherchés sont les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les tanins totaux, les tanins galliques, les irridoïdes, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les sénosides, les quinones, les coumarines, les mucilages, et les saponosides. Le tableau 5 montre la méthode appliquée à la recherche de chacun de ces métabolites secondaires.

Tableau 5. Tests de screening phytochimique

Métabolites	Méthodes	Résultat attendu
<b>Anthocyanes</b>	Quelques gouttes d'HCl sont additionnées à 5ml de l'infusé	Coloration rouge
<b>Leuco-anthocyanes</b>	A 2 g de poudre végétale est ajouté 20 ml de propanol / acide chlorhydrique (1/1). L'ensemble est porté à ébullition au bain Marie.	Coloration rouge
<b>Tanins totaux</b>	Rajouter à 5ml de l'infusé quelques gouttes de FeCl <sub>3</sub>	Coloration bleue noire
<b>Irridoïdes</b>	Quelques gouttes d'acide chlorhydrique sont mélangées à 2 ml de l'infusé. L'ensemble est chauffé un peu.	Coloration bleue
<b>Tanins galliques</b>	1ml d'infusé est additionné à 2g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl <sub>3</sub> .	Coloration bleue foncée
<b>Alcaloïdes</b>	Mélanger 5g de poudre et 50 ml d'éther : chloroforme 3/1. Filtrer après 24h puis épuiser avec du HCl.	Précipité rouge
<b>Flavonoïdes</b>	Rajouter à 5 ml d'infusé 5 ml d'acide chlorhydrique, un coupon de Zinc et 1 ml d'alcool iso-amylque.	Coloration rouge orangée
<b>Sénosides</b>	2,5 g de poudre est additionnée à 50 ml d'eau distillée et 2 ml d'acide chlorhydrique concentré, puis chauffer pendant 15min. Après avoir rajouté 40 ml d'éther, la couche étherée est séparée, séchée avec le sulfate de sodium anhydre. Le résidu refroidi, est additionné à 5 ml d'ammoniaque diluée (1/2)	Coloration violette rouge
<b>Quinones</b>	Humecter 2 g de poudre par 2 ml d'acide chlorhydrique et 20 ml de chloroforme. Après 3heures, le filtrat est agité avec 5 ml.	Coloration rouge
<b>Coumarines</b>	Faire bouillir à reflux 2 g de poudre dans 20 ml d'éthanol pendant 15 minutes. 5 ml du filtrat sont mélangés avec 10 gouttes d'hydroxyde de potassium à 10 % et quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 10 %.	Formation d'un trouble
<b>Mucilages</b>	5 ml d'éthanol absolu sont ajoutés à 1 ml d'infusé. Le mélange est incubé pendant 15minutes	Précipité floconneux
<b>Saponosides</b>	A 2 ml d de l'infusé, on ajoute quelques gouttes d'acétate de plomb.	Formation d'un précipité blanc.

### II.2.3. Extraction et caractérisation des métabolites secondaires

#### II.2.3.1. Les polyphénols

##### II.2.3.1.1. Extraction et stockage

Les composés phénoliques des feuilles sont obtenus en utilisant la méthode décrite par Revilla *et al.*, (2001). Pour cela, 30g de la poudre végétale sont macérés dans 100 ml d'un mélange méthanol - eau distillée (v : v 80 /20), pendant 3 jours à 4°C. Une fois filtrée, la solution méthanolique est évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type BUCHI R-210 à 60°C. Le résidu sec pesé est conservé à 4°C jusqu'à utilisation. Pour les baies, l'extrait utilisé est le jus brut. Le rendement est calculé par le rapport de la masse des polyphénols sur la masse de la matière végétale sèche, selon la formule suivante :

$$R (\%) = [P1 - P2 / P3] \times 100$$

Tel que :

- **P1** : poids du ballon après évaporation ;
- **P2** : poids du ballon avant évaporation ;
- **P3** : poids de la matière végétale de départ.

##### II.2.3.1.2. Dosage des composés phénoliques totaux par la méthode Folin-Ciocalteu

Le dosage est fait selon la méthode décrite par Hogan *et al.*, (2009). Le test consiste à mettre 200 µl de chaque extrait dans des tubes à essais, additionné à un mélange de 1 ml de Folin ciocalteu 10 fois dilué et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7,5%. Les tubes sont agités et conservés durant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 765 nm. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée. Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/g ms).

##### II.2.3.1.3. Caractérisation des extraits par CLHP (chromatographie liquide à haute performance)

La séparation chromatographique des composées phénoliques a été effectuée avec une colonne Ascentis C18 HPLC (250 mm X 4,6 mm, 5 ml, 5microns), chauffée à 40 °C. La première phase mobile (A) utilisée pour la séparation est composée d'eau, du méthanol, et d'acide acétique avec les proportions 89/10/1(v/v/v). La deuxième phase mobile (B) est formée d'eau, du méthanol et d'acide acétique avec les portions 9, 90,1 (v/v/v). En mode gradient, la détection a été réalisée à 254 nm. Le détecteur uv /visible est de type WATERS

2996 (PDA). Le volume d'extrait injecté est de 20  $\mu$ l. Après chaque cycle, le système est reconditionné pendant 60 minutes. L'identification et la quantification des composés phénoliques contenu dans les extraits se fait par comparaison du temps de rétention, des surfaces des standards utilisés par rapport à ceux obtenus en analysant les extraits. Les analyses ont été répétées 3 fois.

#### II.2.3.1.4. Caractérisation des extrais par infrarouge

La caractérisation par infrarouge permet d'avoir une idée sur les groupements fonctionnels d'un extrait. L'appareil utilisé est de type Perkin Elmer qui dispose d'une source lumineuse, d'un filtrage numérique destiné à compenser les émissions de CO<sub>2</sub> et l'absorption de H<sub>2</sub>O en temps réel, d'un interféromètre, d'un dispositif permettant de générer les interférences, d'un compartiment échantillon qui permet d'accueillir plusieurs types d'accessoires (porte-échantillon) dépendant du mode de mesures utilisé (réflexion ou transmission), d'un détecteur ou capteur photosensible et d'un convertisseur analogique numérique qui transforme le signal analogique en un signal numérique manipulable par le système informatique.

#### II.2.3.1.5. Caractérisation des extrais par GCMS

L'analyse de la composition chimique des extraits par chromatographie en phase gazeuse couplée de spectrométrie de masse de marque Perkin Elmer 600 a été faite dans les conditions opératoires suivantes :

- Une colonne Rtx-VMS (60m de long, 250 $\mu$ m de diamètre) ;
- Le gaz vecteur est l'Hélium. ;
- Un débit de 1ml/ min;
- Une température de 70°C pendant 1 min, rampe de 3°C jusqu'à 160°C, pendant 1 min, rampe 2°C/min jusqu'à 230°C pendant 5 min.
- La température de l'injecteur est de 230°C. ;
- 0,2  $\mu$ l de l'huile à analyser est injectée à l'aide d'une seringue spéciale ;
- L'identification des composants a été basée sur la comparaison de leurs indices de rétention par rapport au temps de rétention d'une série de n-alcanes avec une interpolation linéaire, avec les composés authentiques ou des données de la littérature ;
- L'ordinateur correspond à des bibliothèques spectrales de masses commerciales (Adams 1995; Köning *et al.*, 2001; Mc Lafferty et Stauffer, 1994; NIST, 1999)

**II.2.3.2. Préparation et caractérisation des extraits flavonoïdiques**

L'extraction des flavonoïdes est réalisée selon la méthode de **Hogan *et al.*, (2009)** avec des modifications. Une masse de 30 gramme de poudre des feuilles sont macérés dans 100 ml d'un mélange méthanol - eau distillée (v : v ; 70/30), pendant 72 heures. L'extrait méthanolique récupéré est ensuite évaporé à sec ( $T=60^{\circ}\text{C}$ ) à l'aide d'un rotavapeur de type Buchi R-200. Le résidu sec obtenu est partagé avec 10 millilitres d'acétate d'éthyle et 10 millilitres d'eau distillée chaude dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée puis séchée par un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris par 3 ml de méthanol. La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est partagée avec 10 millilitres de n-butanol. La phase butanolique est séchée au rotavapeur à  $60^{\circ}\text{C}$ . Le résidu sec pesé, est repris par 3 millilitres de méthanol (Fig. 16). Le rendement en flavonoïdes est le rapport de la masse des flavonoïdes sur la masse de la matière végétale sèche. Pour le dosage des flavonoïdes contenus dans l'extrait, la méthode adoptée est celle de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) citée par **Bahorun *et al.*, (1966)**. Pour ce teste, un mélange composé de 1ml de l'extrait flavonoïque et de 1 ml de solution de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) à 2% est incubé à température ambiante pendant 30 min, puis l'absorbance est mesurée à 420 nm. La concentration des flavonoïdes est exprimée en mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g). Les composés sont analysés par Chromatographie liquide à haute performance et par chromatographie en phase gazeuse.

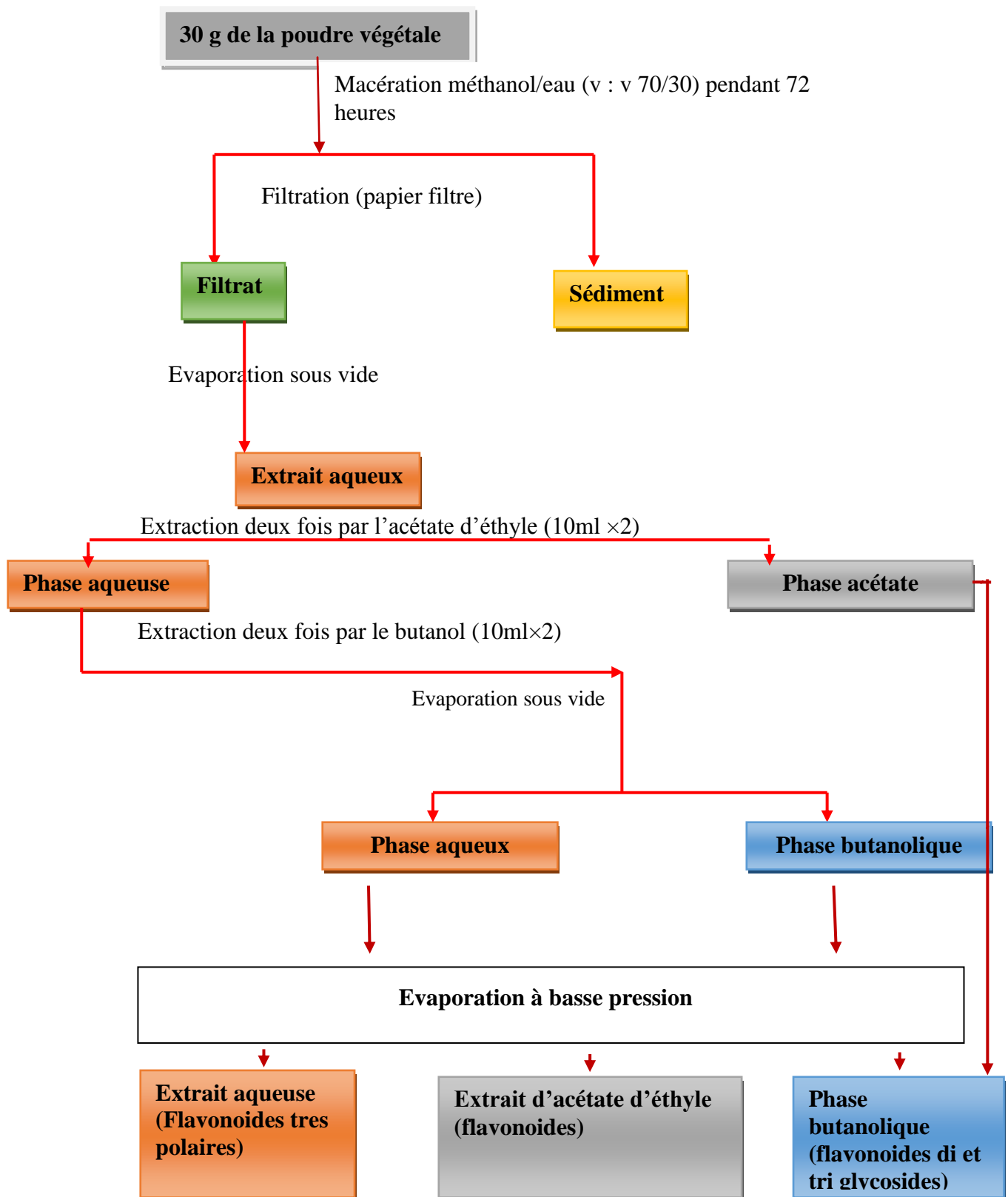


Figure 16. Protocole d'extraction des flavonoïdes Hogan *et al.* (2009)

### II.2.3.3. Extraction et caractérisation de l'huile des pépins

La technique optée pour l'obtention de l'huile des pépins est l'extraction par Soxhlet. Environ 43g de l'échantillon broyé (poudre de pépin de raisin) d'une granulométrie inférieure à 0,5 mm est humectée avec 600 ml d'éther de pétrole, le mélange a été chauffé à 70 C° pendant 1 h. Le résultat a été lavé avec de l'eau distillée préalablement chauffée dans un bain Marie à 70C° jusqu'à l'élimination totale d'acide à l'aide d'un papier pH. Ensuite placé dans la cartouche en cellulose fermée par du coton cardé de Soxhlet.

Un extracteur Soxhlet est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique qui permet de faire l'extraction continue par solvant d'un solide (Fig. 17). Il se compose d'un corps en verre (4) dans lequel est placée une cartouche en papier filtre épais (5), d'un tube siphon (6/7) et d'un tube d'adduction (3). Le corps de l'extracteur est placé sur un ballon (2) contenant le solvant d'extraction. Les résidus à extraire sont placés dans l'extracteur surmonté d'un réfrigérant (9). Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvants passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'adducteur, faisant ainsi macérer les résidus dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés solubles. La taille du corps en verre étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives pour récupérer une quantité suffisante d'extraits. La caractérisation des composants est faite par chromatographie gazeuse couplée à une spectroscopie de masse.

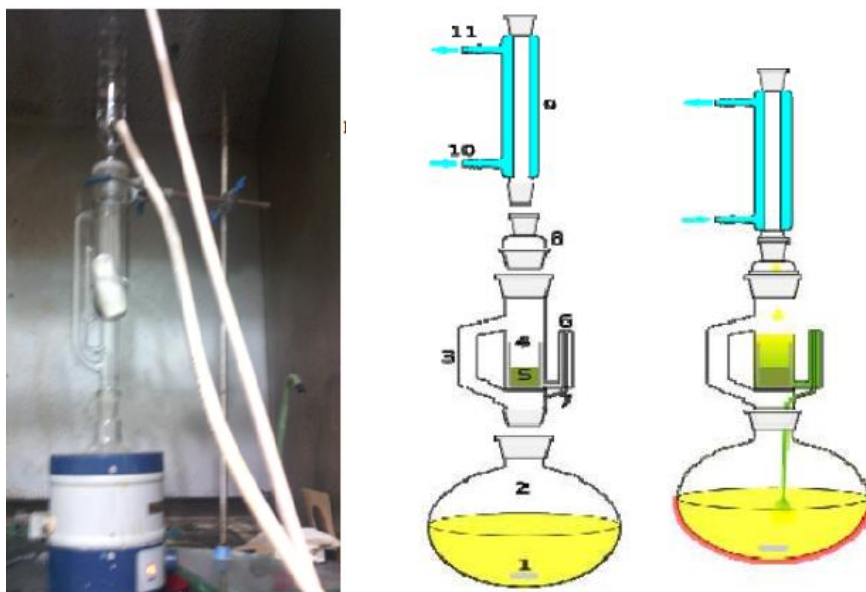


Figure 17. Montage d'un soxhlet

Le rendement en huile grasse est défini comme étant le rapport de la masse de l'huile grasse sur la masse de la matière végétale sèche, exprimé dans les mêmes unités de masse. La formule appliquée est la suivante :

$$R(\%) = (m_{HG} / m_{MV}) \times 100$$

Tel que :

- **R** : Rendement de l'extraction ;
- **m<sub>HG</sub>** : Masse de l'huile grasse en (g) ;
- **m<sub>MV</sub>** : Masse de matière végétale sèche en (g).

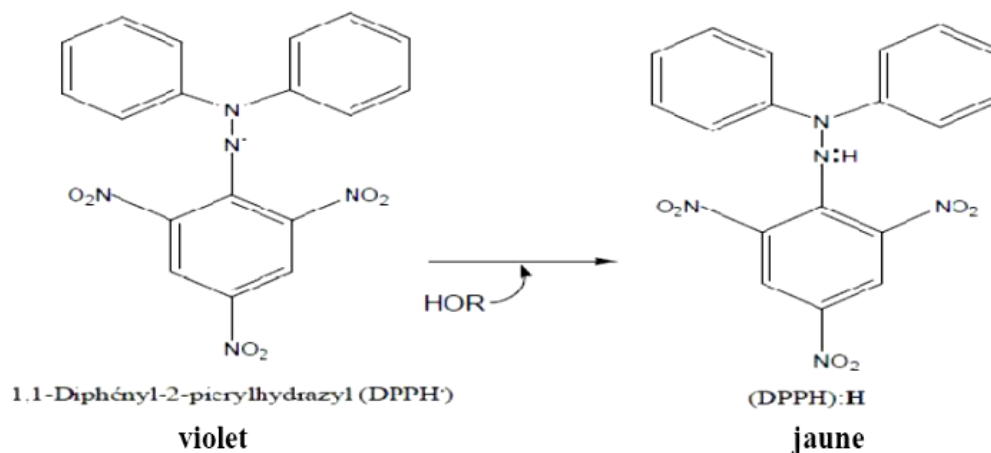
## II.2.4. Activités biologiques

### II.2.4.1. Activités antioxydante

#### II.2.4.1.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picryl hydrazyle) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (Bozin *et al.*, 2008). La méthode de DPPH présente plusieurs avantages du fait qu'elle est indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur

capacité à réduire le radical DPPH. La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde (Fig. 18).



**Figure 18.** Réduction du radical libre DPPH en DPPHH

L'évaluation de l'effet antioxydant par le test de piégeage du radical libre DPPH est faite en se référant à la méthode décrite par **Bozin et al., (2008)** qui consiste à mélanger 975µl de la solution méthanolique de DPPH (Sigma Chemical Co., Etats-Unis) (0,0024g/l) à 25µl de chaque extrait à différentes concentrations (de 0,2 à 1mg/ml). A titre comparatif un test négatif est réalisé avec 25µl de méthanol et 975µl de la solution méthanolique de DPPH. Après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm. Parallèlement et afin d'estimer l'intensité de l'activité antioxydante, un contrôle positif est préparé par un antioxydant standard, le BHT, tout en mesurant l'absorbance dans les mêmes conditions que les échantillons. Le test est répété trois fois pour chaque concentration, et le pouvoir d'inhibition est exprimé en % et en appliquant la formule suivante :

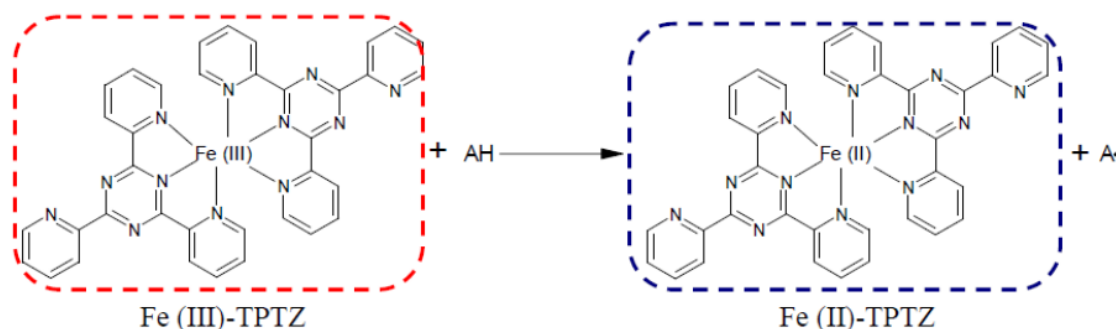
$$\% \text{ d'inhibition} = \left( 1 - \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}}{\text{Abs contrôle}} \right) \times 100$$

**Tel que :**

- Abs contrôle : absorbance moyenne du radical seul ;
- Abs test : absorbance du radical libre en présence d'antioxydant après trente minutes de contact.

### II.2.4.1.2. Réduction de fer (test FRAP)

La réduction du fer est un bon indicateur de l'activité de donneur d'électrons, mécanisme important de l'action antioxydante des composés phénoliques. Le pouvoir réducteur est détecté par le changement de couleur de la solution d'essai, passant ainsi du jaune au bleu, en fonction de la concentration de l'extrait végétal. Pour évaluer la réduction du fer par les extraits de la variété Ahmar Bouamar, nous avons adopté la technique **d'Oyaizu (1986)**. Le test consiste à mélanger 1ml des différentes concentrations des extraits de la vigne rouge (0,1 à 1mg/ml) avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain Marie à 50°C pendant 20 min. Pour stopper la réaction, 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% est ajouté au mélange. Après avoir centrifugés les tubes à 3000 rpm pendant 10 minutes, 2,5ml du surnageant sont mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution de chlorure ferrique à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700 nm contre un blanc semblablement préparé. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons (Fig. 19).



**Figure 19.** Réduction du fer trivalent ( $Fe^{3+}$ ) en fer divalent ( $Fe^{2+}$ ) (Oyaizu, 1986)

### II.2.4.1.3. Test de blanchissement par la $\beta$ carotène

L'activité antioxydante des extraits de cépage Ahmar Bouamar est mesurée selon la méthode de **Tepe et al., (2005)** et **Sun et al., (2007)**. Dans ce test, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de  $\beta$ -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique. L'émulsion de l'antioxydant est préparée en faisant dissoudre 2 mg de  $\beta$  carotène (Fluka, Allemagne) dans 10 ml de chloroforme. 1 ml de cette solution est mélangé avec 20 mg d'acide linoléique purifié (Sigma

Chemical Co., Etats-Unis) et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme a été éliminé en utilisant un bain Marie et le résidu obtenu est repris par 50 millilitres de peroxyde d'hydrogène. Un volume de 200 µl d'extrait brut méthanolique ou d'antioxydant de référence (acide ascorbique) à une concentration de 2,5 mg/ml sont ajoutés à 5 ml de l'émulsion. Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, comprenant 5 millilitres de l'émulsion de β-carotène et 200µl de méthanol. Le mélange est bien agité et la lecture de l'absorbance à 470 nm se fait immédiatement à t<sub>0</sub> contre un blanc qui contient l'émulsion sans β-carotène. Les tubes sont mis dans un bain Marie à 50 °C et la lecture de l'absorbance est faite toutes les 10 minutes durant 60 minutes. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la décoloration du β-carotène en employant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [1 - (A_0 - A_t / A^{\circ}_0 - A^{\circ}_t)] \times 100$$

Tel que :

- A<sup>°</sup> : absorbance de l'échantillon à t<sub>0</sub> ;
- A<sub>t</sub> : absorbance de l'échantillon [après incubation de 60 minutes] ;
- A<sup>°</sup><sub>0</sub> : absorbance du contrôle négatif à t<sub>0</sub> ;
- A<sup>°</sup><sub>t</sub> : absorbance du contrôle négatif [après incubation de 60 minutes].

#### II.2.4.2. Activité antimicrobienne

La technique que nous avons utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait flavonoidique des feuilles et de l'huile grasse des pépins est l'antibiogramme. Ce dernier est une méthode de diffusion en milieu gélosé standardisée par NCCLS (National Comite for Clinical Laboratory Standards) cité par **Celiktas *et al.*, (2007)**. Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de la croissance des agents microbiens par la mesure du diamètre d'inhibition autour du disque imprégné de nos extraits. Toutes les souches utilisées sont obtenues du laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Dellys wilaya de Boumerdes.

##### II.2.4.2.1. Revivification des souches microbiennes

La revivification des souches microbiennes a pour objectif l'obtention d'une culture pure et jeune. Elle est réalisée par la méthode des stries (quatre cadrans). Les souches sont alors revivifiées à partir des tubes de conservation sur milieu GN. Les cultures sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 pour les bactéries et à 27°C pendant 72 h pour les moisissures.

**II.2.4.2.2. Préparation des suspensions bactériennes**

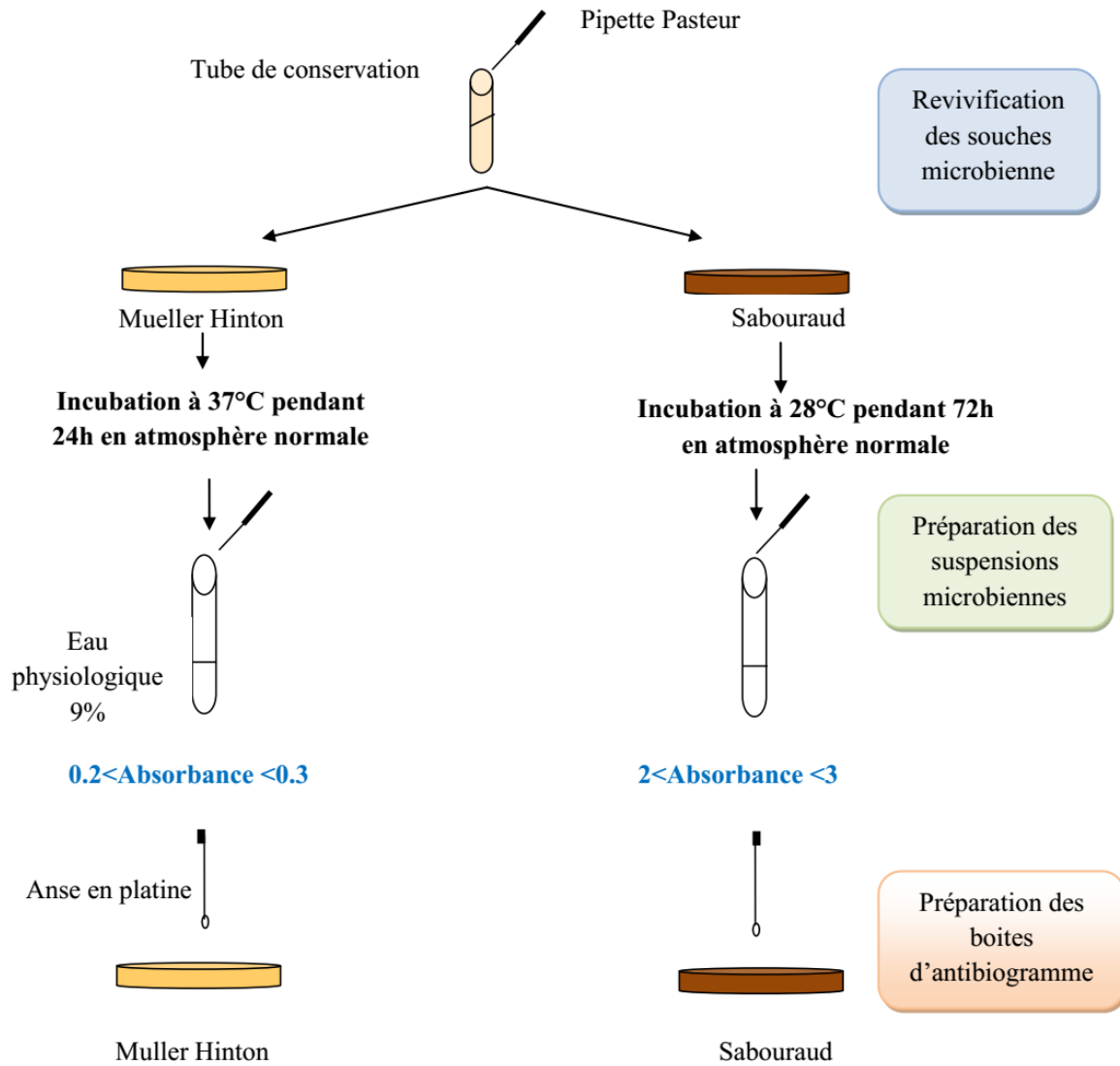
Après incubation, 4 à 5 colonies bien isolées sont transférées, avec une pipette pasteur stérile, dans un tube contenant l'eau physiologique stérile afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine à celle de 0,5 Mc Farland ( $10^6$  UFC/ml). Cette charge microbienne est mesurée à l'aide d'un densitomètre (DENSIMAT).

**II.2.4.2.3. Repiquage des souches microbiennes et mesure du diamètre d'inhibition**

L'ensemencement des souches sur milieu gélosé est fait par écouvillonnage en stries serrées. Ensuite, des disques en papier Wattman de 6 mm de diamètre renfermant 10  $\mu$ l d'extrait ont été déposés à la surface des milieux de culture. L'incubation a été faite à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries et à 28 °C pendant 48 h pour les souches fongiques. L'activité antimicrobienne des trois extraits est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Parallèlement, des boîtes témoins dotées de disques imprégnés de méthanol ont été préparées, afin de tester l'effet du solvant d'extraction sur les souches microbiennes. De plus, et à titre comparatif, des antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés. Trois répétitions sont réalisées pour chaque souche microbienne (Fig. 20). La lecture de l'activité antimicrobienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse de type Horex (Tab. 6).

**II.2.5. Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  l'Erreur Standard à la Moyenne. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel Statistica (version 6, Genistat Conseils Inc, Montréal). Après analyse de variance, la comparaison des moyennes est effectuée par le test de student.



**Figure 20.** Revivification des souches microbiennes et préparation des boîtes d'antibiogramme

**Tableau 6.** Estimation de la sensibilité des souches (Moreira *et al.*, 2005)

Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Sensibilité des souches
d < 7	Non sensible / résistante (-)
d [7 – 14]	Très sensible (+ +)
d > 20	Extrêmement sensible (+++)

### III. Étude phytochimique des extraits de la variété Ahmar Bouamar et évaluation des activités biologiques.

#### III.1. Tests phytochimiques

Les plantes médicinales renferment une variété de composés secondaires qui peuvent être bénéfiques ou néfastes. Toutefois, il ne s'ensuit pas nécessairement que les mêmes composés soient aussi toxiques ou bénéfiques lorsqu'ils se trouvent dans la plante que lorsqu'ils en sont extraits.

Le screening phytochimique a permis de nous renseigner sur les familles chimiques des composants des feuilles et de moût de Ahmar Bouamar. Ceci facilitera le choix des substances bioactives à étudier. L'ensemble des résultats du screening phytochimique effectué sont résumés dans le tableau 9.

Il est à constater que la plante étudiée est très riche en métabolites secondaires dotées de plusieurs activités biologiques, représentés principalement par des flavonoïdes, des tanins condensés, des anthocyanes, des stéroïdes et des saponines. Elles ont une faible richesse en anthocyanes, amidon et glucosides. Il est à signaler une absence totale des tanins galliques, des irridoïdes, des quinones libres et des sénosides. Cependant, il ressort que les feuilles sont plus riches en ces métabolites secondaires. Le jus se distingue par sa richesse en métabolites primaires (protéines et sucres réducteurs). La richesse en métabolites secondaires a été signalée par Kappel (2010).

Les résultats de la présente étude sont en accord avec ceux trouvés par Amara et Melouk (2016) ayant travaillé sur l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles de la vigne sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*). En effet, ces auteurs signalent la présence des tannins galliques, flavonoïdes, saponosides et alcaloïdes et l'absence des tannins catéchiques, anthocyanes, leuco anthocyanes, quinones, sénosides et coumarines. Il est à signaler que la présence ou l'absence d'un métabolite secondaire n'est que le résultat de l'influence des conditions abiotiques sur le développement de la plante. Selon Reynier (2007) et Baustita et al., (2007),

L'exposition d'une variété de vigne à des environnements différents a influencé la production des métabolites secondaires tant en quantité qu'en qualité. Cette étude a également montré l'existence d'une réelle biodiversité moléculaire, qui confère à la vigne rouge des vertus médicinales importantes à valoriser. Parmi les métabolites secondaires mis en évidence, on peut citer :

- Les flavonoïdes avec leur nombreux vertus médicinale : antioxydantes (Iserin, 2001), antiinflammatoires, inhibiteurs d'enzymes, antiallergiques, antiulcérogènes, et effets protecteurs vasculaires (Ghedira, 2005), et antimicrobiens (Cushnie *et al.*, 2005) ;
- Les tanins avec leurs propriétés anti diarrhétiques, antibactériennes et antifongiques (Maugé, 2010) ;
- Les anthocyanes dotés de puissants effets antioxydants (Iserin, 2001).

Cette répartition inégale des polyphénols totaux entre les organes de la même plante a été rapportée par plusieurs auteurs (Maugé, 2010 ; El-Haci, 2012). Elle est étroitement liée selon Champagnol (1984) aux besoins de la plante et au rôle joué par les métabolites dans la reproduction et dans la protection.

**Tableau 9.** Résultats de screening phytochimique

Métabolites	jus	Infusé (5%)	Métabolites	Jus	Infusé (5%)
<b>Tanins totaux</b>	++	+++	Musilages	+++	+++
<b>Leuco-anthocyanes</b>	++	+++	Saponosides	+++	+++
<b>Anthocyanes</b>	++	+++	Caroténoïdes	+	++
<b>Amidon</b>	-	-	Tanins galliques	-	+
<b>Glucosides</b>	+	+	Protéines	++	+
<b>Sucres réducteurs</b>	+++	+	Flavonoïdes	++	+++
<b>Sénosides</b>	-	-	Quinones libres	-	-
<b>Alcaloïdes</b>	-	-	Lipides	-	-
<b>Iridoïdes</b>	-	-	Sénosides	-	-

(-) : absence de substance ; (+) : faible présence de substance ; (++) : Moyenne présence de substance ; (+++) : Forte présence de substance.

### III.2. Rendement d'extraction et dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode de Folin- Ciocalteu. Cette dernière nécessite préalablement l'établissement d'une courbe d'étalonnage avec de l'acide gallique comme étalon (Annexe). Le rendement de l'extrait méthanolique obtenu des feuilles est de 33,13%. Amara *et al.*, (2016) ont obtenu un rendement de 16,76 % dans une étude menée à El Mefteh (wilaya de Blida) sur la vigne sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*).

Les teneurs en polyphénols totaux obtenus sont de l'ordre de  $334,18 \pm 2,306$  mg EAG/ g MS pour les feuilles et de l'ordre de  $98,9 \pm 3,23$  mg EAG/ g MS pour le moût. Ces valeurs sont en accord avec celles données par Dani *et al.*, (2007) qui ont rapporté un taux en PPT de  $982,0 \pm 58,97$  mg/kg de poids frais dans les jus de raisin rouge de *Vitis labrusca*. Marinova *et al.*, (2005) ont trouvé des teneurs respectives de 184,1 et 213,3 mg/100g du poids frais de raisin blanc et noir (*Vitis Vinifera*). Il ressort de cette comparaison que les cépages rouges sont plus riches en métabolites secondaires. La richesse des cépages rouges telle que le Merlot, Cabernet Sauvignon et Syrah en polyphénols totaux est signalée par Flanzky *et al.*, (1998). Cette constatation est en parfait accord avec le résultat obtenu pour le cépage Ahmar Bouamar. La teneur phénolique d'une plante dépend également d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques, en particulier les conditions climatiques, la maturité à la récolte et les conditions de stockage (Podsędek, 2007 ; Falleh , 2008).

Il a été rapporté par Waterhouse *et al.*, (1997) que les vins rouges californiens contenaient entre 1 850 et 2 200 mg/l de composés phénoliques totaux, alors que les vins blancs présentaient des concentrations allant de 220 à 250 mg/l pour ces mêmes composés

Les vignes rouges sont de loin les plus riches en polyphénols, ils contiennent dix fois plus de composés phénoliques totaux que les vignes blanches (Vigor, 2013).

### III.3. Rendements et dosages des flavonoïdes des feuilles de cépage Ahmar Bouamar

L'extraction des flavonoïdes à partir de la poudre des feuilles de Ahmar Bouamar a permis d'obtenir trois extraits : Extrait d'Acétate d'Ethyle (EAE), Extrait Butanolique (EB) et l'Extrait Aqueux (EA).

Dans la présente étude, un rendement élevé est obtenu avec l'EA ( $6,7 \pm 0,78$  %) d'un aspect liquide et d'une couleur marron, contenant les flavonoïdes les plus hydrosolubles. Le rendement de l'EB, renfermant surtout les di et tri glycosides est relativement élevé ( $5,93 \pm 0,23$ %). En revanche, le rendement de l'EAE contenant les monoglycosides est le plus faible que celui de l'EA et l'EB ( $2,81 \pm 0,04$ ).

Le rendement, les concentrations en mg EQ /g et la couleur des différentes fractions obtenus sont mentionnées dans le tableau suivant :

**Tableau 10.** Rendements et teneurs en flavonoïdes des différentes fractions de l'extrait des feuilles de la variété Ahmar Bouamar

Fractions	Rendement (%)	Teneur (MEQ/gMs)	couleurs
Acétated'éthyle (EAE)	2,81± 0,04c	19,73 ±0,11c	Vert foncé
Butanolique (EB)	5,93 ±0,23b	24,38± 0,05b	Rouge foncé
Aqueux (EAQ)	6,7± 0,78 a	26,41 ±0,24a	Marron foncé

Les résultats sont représentés par des valeurs portant des lettres différentes a, b, c et d tel que (a > b > c). Les concentrations portant des lettres différentes présentent une différence significative (p<0.05).

La Quercétine prise comme contrôle positif, nous a permis de réaliser une courbe d'étalonnage avec R<sup>2</sup> égal à 0,997 ; résultat qui a permis de calculer la teneur en flavonoïdes pour les différentes fractions qui est exprimée en mg équivalent de Quercétine (EQ) par gramme de matière végétale sèche.

Il ressort des résultats, que le rendement en flavonoïdes varie de 2,81± 0,04% (EAE) à 6,7± 0,78% (EA) avec des concentrations respectives de 19,73±0,11 MEQ/gMs et 26,41 ±0,24MEQ/gMs. Amara *et al.*, (2016) ont travaillé sur les feuilles de la Vigne Sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*) récoltées pendant la période de floraison à El Kharoub dans la région de Mefteh (Blida) ont noté un rendement en flavonoïdes de 16,76%. Ces résultats sont proches de ceux de Du *et al.*, (2012) (228,7 mg équivalent rutine/100g du poids frais de 8 différentes variétés de raisins) et ceux trouvées par Yang *et al.*, (2009). Guerrero *et al.* (2009) ont montré sur 5 variétés de raisin rouge cultivées en Andalousie des teneurs en flavonoïdes comprises entre 221 et 538 mg/kg de baies. Dans une autre étude rapportée par Waterhouse *et al.*, (1997), il a été démontré que les vins rouges californiens contenaient entre 1850 et 2200 mg/l de composé phénolique totaux, alors que les vins blancs présentaient des concentrations allant de 220 à 250 mg/l pour ces mêmes composées, ce qui confirme encore la richesse des cépages rouges en principes actifs.

La teneur en flavonoïdes dépend selon Kappel (2010) des saisons et des variétés prises en compte. Par ailleurs, il est important de signaler que la richesse des variétés rouges de raisins en composés phénoliques a été déjà décrite par Flanzky (1989) et Dani *et al.*, (2007). Cependant, la synthèse de ces métabolites secondaires par la vigne rouge est liée aux facteurs

climatiques et à la méthode d'extraction utilisée, les conditions du développement et de croissance, le génotype, la maturité, et les conditions de stockage (Sun *et al.*, 2007).

#### III.4. Rendement et dosage des flavonoïdes de l'huile des pépins de la variété Ahmar Bouamar

L'huile a été extraite des pépins de raisin par la méthode soxhlet, en utilisant l'éther de pétrole (30-60°) comme solvant. C'est une huile fluide, relativement inodore et avec une couleur allant du jaune foncé au verdâtre. Cela est expliqué par la présence d'éléments chimiques comme les chlorophylles et les caroténoïdes (pigments).



**Figure 21.** Aspect de l'huile obtenue des pépins

L'huile extraite est stockée au réfrigérateur à l'abri de la lumière et de l'humidité dans des tubes à essais en verre (couverts par du papier aluminium). Le rendement en huile des pépins du cépage étudié et la teneur en flavonoïdes sont présentés dans le tableau 11.

**Tableau 11.** Rendement en huile des pépins et sa teneur en flavonoïdes

Masse de poudre de pépin utilisée	Masse de l'huile obtenue	Rendement	Teneur en flavonoïdes
43 g	6,0565 g	14,08 % ± 5	21,5 mg ±1 EQE/gMS

Le rendement en huile obtenu dans la présente étude est de 14,08% avec une teneur en flavonoïdes de 21,5 mg  $\pm$  1 EQE/gMS, valeurs proches de celles obtenues par Rombaut (2013) et qui varient de 7 à 16,4% avec de concentrations en polyphénols totaux de 316  $\pm$  10 à 399  $\pm$  12 mg EAG/kg d'huile.

Nos résultats sont beaucoup supérieurs à ceux obtenus dans une étude menée sur deux variétés algériennes provenant de la région de Sidi Belabes et Mascara où le rendement en huile est respectivement 6,05% et 12,50% avec des teneurs en polyphénols totaux de 78,58  $\pm$  0,07 à 41,36  $\pm$  1,50mg EAG/g d'huile (Belmiloud, 2018).

Selon Garcia-Jares et *al.*, (2015), les flavanols sont les polyphénols les plus abondants dans les extraits de graines de raisins et représentent 98-99% de la composition totale en polyphénols. La teneur rapportée par cet auteur et ses collaborateurs était de 3,190 mg/g de MS.

Selon Garcia-Jares et *al.*,(2016) et Pantelic et *al.*,(2016) environ 60- 70% de composés phénoliques totaux sont trouvés principalement dans les graines de raisin. Ou ils ont trouvé des teneurs en polyphénols variant de 79,5  $\pm$  0,5 à 168  $\pm$  6 mg EAG/g de MS dans les pépins de raisin de quelques variétés de raisin Rombaut (2013) a trouvé des teneurs en polyphénols qui varient de 58 à 960 mg/g de matière sèche. En outre, les études menées par Pantelic et *al.*, (2016) sur quelques variétés de raisins ont trouvé des teneurs en polyphénols dans les pépins qui varient de 38,02 à 101,25 mg EAG/g de MS. Ces concentrations varient selon les variétés. Une autre étude menée par Zhou et *al.*, (2016) a révélé une concentration en polyphénols totaux qui est de l'ordre de 22,97  $\pm$  0,14 mg EAG/g de matière sèche dans les graines de raisin.

Dans une étude menée par Ghouila et *al.*, (2016), la teneur en polyphénols totaux de la poudre des pépins varie de 29.86 $\pm$ 0.36 mg EAG/g MS à 70.50  $\pm$  0.81mg EAG/gMS selon la méthode d'extraction.

### III.5. Caractérisation chromatographique des extraits

#### III.5.1. Caractérisation par infrarouge

##### III.3.1.1. L'extrait méthanolique des feuilles

Dans l'extrait méthanolique de feuilles de la variété Ahmar Bouamar , la large bande autour de 3306,30cm<sup>-1</sup> est associée à la vibration d'élongation de la liaison O-H, la bande à 1636,52 cm<sup>-1</sup> correspond à la vibration de valence de la liaison C=C des cycles aromatiques et l'élongation (C=O) de la liaison carboxilique de l'acide galactonique. La richesse que possède cet extrait en double liaisons lui confère une activité antioxydante importante. a constaté la

présence de cinq groupements fonctionnels : 3400 (OH), 2940 (OCH), 2840-2805 (O-CH-), 1630-1520 (aromatique), 1253 (furane), 1280, 1235, 1035 (lignane). Selon les groupements fonctionnels présents dans l'extrait aqueux la Grande ortie sont des aldéhydes, des alcènes, des amines, des amides, des alcools, des phénols, des acides carboxyliques et des anhydrides, des esters et des lactones, d'éthers, des nitriles, des isonitriles, des quinones et des glucides.

### III.3.1.2. Le jus des baies

L'étude de spectre IR du jus de la variété Ahmar Bouamar (figure 22) révèle le presence d'une bande d'élongation située entre 3200-3500  $\text{cm}^{-1}$  qui est attribuée à la vibration d'élongation des groupements hydroxyles (-OH) ; Les bandes situées entre 1000 et 1200  $\text{cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations d'élongation de la liaison C-O.

La bande située vers 2900  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations d'élongation de la liaison C-H.

La bande intense située vers 1800  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations d'élongation de la liaison C=O de la famille des carbonyles (cétones, acides carboxyliques, esters...). Les pics d'intensité moyenne à faible situés entre 2000 et 1500  $\text{cm}^{-1}$  peuvent être attribués aux vibrations d'élongation de la liaison C=C. Les bandes situées entre 1000 et 1500  $\text{cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations d'élongation de la liaison C-O. De même, les absorptions observées aux alentours des 1613 $\text{cm}^{-1}$  et 1418 $\text{cm}^{-1}$ , sont attribuées aux groupements carboxylates (-COO-) . Dans cette zone, la bande située à 1619 $\text{cm}^{-1}$  correspond à la vibration d'élongation de la fonction C=O du groupement carboxylique (COOH).

### III.3.1.2. L'extrait flavonoïdique des feuilles

#### a. L'acétate d'éthyle

D'après le spectre (IR) enregistré dans la figure 22, la large bande autour de 3306,30  $\text{cm}^{-1}$  est associée à la vibration d'élongation de la liaison O-H la vibration d'élongation du groupement (N-H) apparaissent à 3330  $\text{cm}^{-1}$ , une bande de vibration située à 2380 $\text{cm}^{-1}$  indique les (C N), L'absorption enregistrée à 1650  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée à la vibration d'élongation du groupement (C=C). L'absorption enregistrée à 1220 $\text{cm}^{-1}$  est attribuée à la vibration du groupement C-N.

**Tableau 12.** Résultats de l'analyse par infrarouge de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles

Fractions falvonoidique	Longueur D'onde (cm-1)	Liassons	Nature de la liaison	Fonction
Phase d'acétate d'éthyle	1100	O-H	Bande Faible	Alcool
	1220	C-N	Bande Faible	Amine
	1650	C=C	Bande Moyenne	Alcène
	2380	C-N	Bande Faible à Moyenne	Nitrile
	3330	N-H	Bande moyenne	Amide

**b- L'extrait butanolique**

**Tableau 13.** Résultats de l'analyse par infrarouge de l'extrait butanolique des feuilles

Fractions Falvonoidique	Longueur D'onde (cm-1)	Laiisons	Nature de la liaison	Fonction
Phase butanolique	1200	Ctet-OH	Faible élongation	Alcool
	1683	C=O	Elongation Moyenne	Acide ascorbique
	2390	C-N	Bande Faible à Moyenne	Nitrile
	2900	CH <sub>2</sub>	Forte élongation	Alcane
	3440	NH <sub>2</sub>	Elongation Moyenne	Amine
	3600	OH	Forte bande	Alcool

Le spectre montre une bande d'absorption à une faible élongation à 1200 cm-1 attribuée à la vibration (Ctet-OH) du groupe Alcool et une élongation Moyenne de pour la fonction d'acide ascorbique (C=O) à 1683 cm-1, et une bandes d'absorption à 2390 de (C-N) et 2900 cm-1 de la fonction (CH<sub>2</sub>) Alcane avec une forte élongation et une élongation moyenne de (NH<sub>2</sub>) à 3440 cm-et enfin une forte bande à 3600 cm-1de la fonction Alcool (OH).

## C . Extrait aqueux :

Tableau 14. Résultats de l'analyse par infrarouge de l'extrait aqueux des feuilles

Fractions	Longueur D'onde (cm-1)	liaisons	Nature de la liaison	fonction
Falvonoidique	1650	C=O	Bande forte	Amide
	2130	C <sup>°</sup> C	Bande forte élongation	Alcyne
Phase aqueuse	2420	OH	Faible à moyenne bande	Acide carboxylique
	3300	C-H	Forte bande	ALcyne

Les spectres (IR) enregistrés dans les bandes de vibrations illustrés dans les figures (22) et le tableau 8 suivant : l'absorption située à 1650cm - 1 est attribuée à (C=O) fonction élongation amide. et celle de 2130 cm - 1 correspondent à la vibration d'élongation (C<sup>°</sup>C) fonction Alcyne et une faible à moyenne bande apparaissent 2420 cm - 1 et une forte bande de (C-H) se situe à 3300 cm - 1.

## d. L'huile des pépins

Les bandes de vibrations illustrés dans les figures (22) et le tableau suivant : l'absorption située à 1250 cm - 1 est attribuée à (C-O) fonction élongation Acide carboxylique par une forte bande. et celle de 1600 cm - 1 correspondent à une liaison variable de la fonction Aromatique et la vibration d'élongation (CH<sub>3</sub>) de la fonction Alcane et une forte bande apparaissent 2980 cm - 1 et (OH) une fonction Alcool se situe à 3600 cm - 1.

**Tableau 15.** Résultats de l'analyse Infrarouge de l'huile des pépins

Fractions flavonoidique	Longueur D'onde (cm-1)	Liaisons	Nature de la liaison	fonction
L'extrait d'huile	1250	C-O	Forte bande	Acide carboxylique
	1600	C=C	Variable	Aromatique
	2980	CH <sub>3</sub>	Forte bande	Alcane
	3600	OH	Forte bande	Alcool

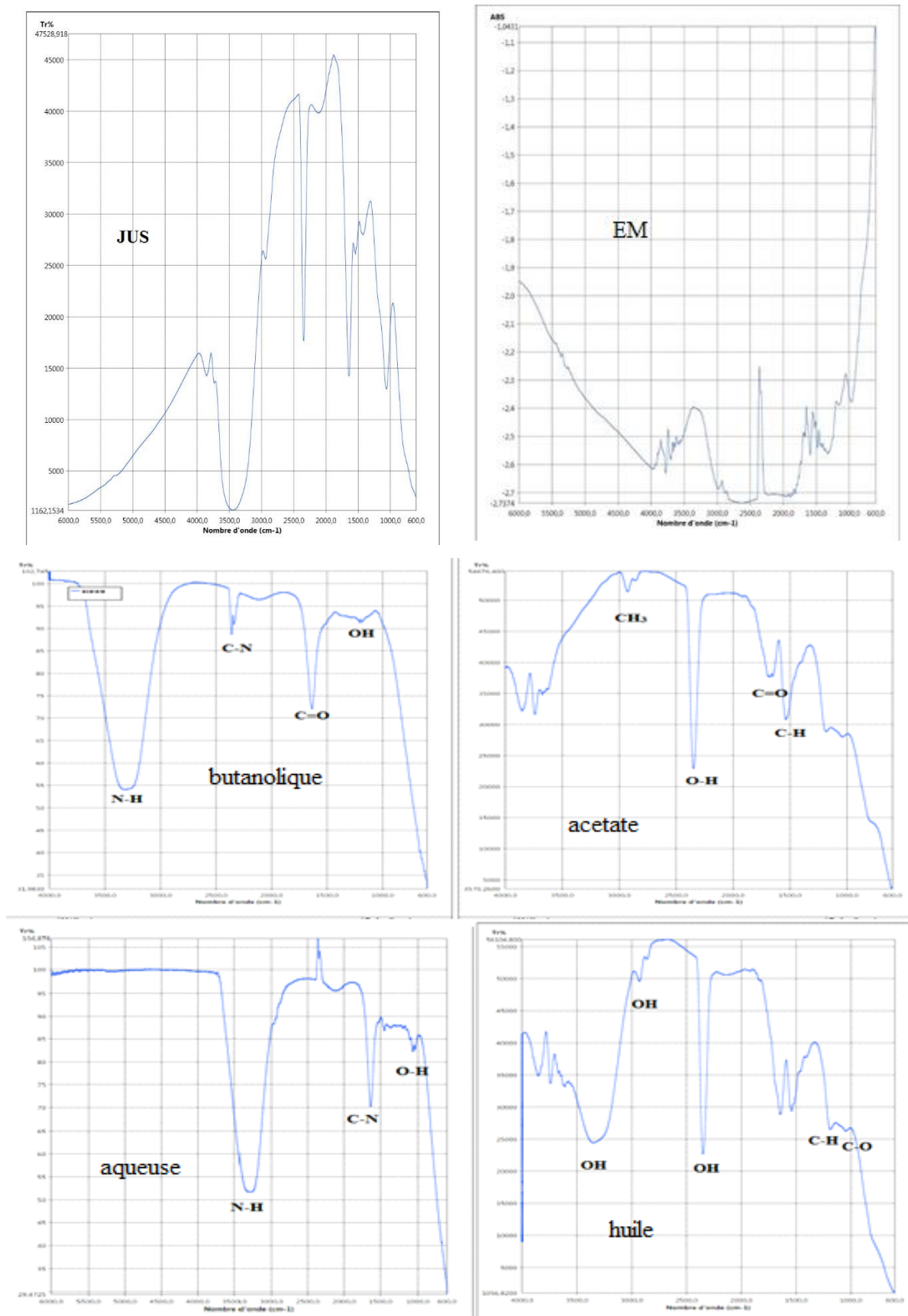


Figure 22. Spectre infrarouge des différents extraits de la variété Ahmar Bouemar

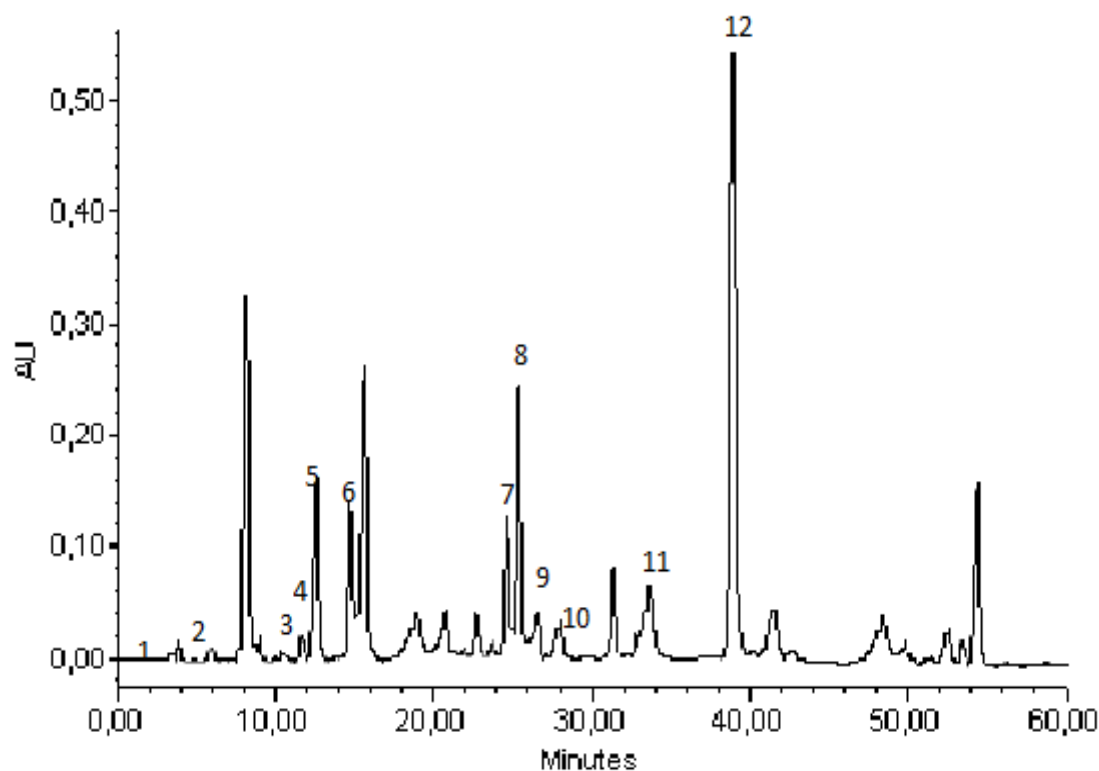
### III.3.2. Caractérisation des polyphénols totaux par HPLC quantitative

Les composés ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et leurs spectres UV-vis par comparaison avec des chromatogrammes de références dans les mêmes conditions de travail.

#### III.3.2.1. Extrait méthanolique des feuilles

L'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique des feuilles a fait ressortir 24 pics de polyphénols totaux, dont 12 ont été identifiés. Les métabolites majoritaires sont les coumarines (24,31%), acide gallique avec 13,31% et l'acide syringique avec un pourcentage de 10,19%. Les minoritaires sont l'acide férulique, l'acide fumarique, la catéchines, l'acide vanilique, l'acide caféique, le dehydrophenyl-acétique, l'acide chlorogénique, l'acide syringique, et l'acide p-coumarique avec un taux inférieur ou égal à 7,72%.

L'acide chlorogénique, l'acide caféique et l'acide ferrulique ont été identifié dans la vigne rouge (Syrah et le Merlot) de la région Békaa au Liban dans une étude faite par Ojeuil et *al.*, (2010). Selon Cadot et *al.*, (2011), le principale représentant des acides hydroxybenzoïques dans le raisin est l'acide gallique.



**Figure 23.** Profil chromatographique HPLC des polyphénols totaux de l'extrait méthanolique des feuilles

1 : acide fumarique ; 2 : acide gallique ; 3 : catéchines ; 4 : acide vanilique ; 5 : acide caféique ;

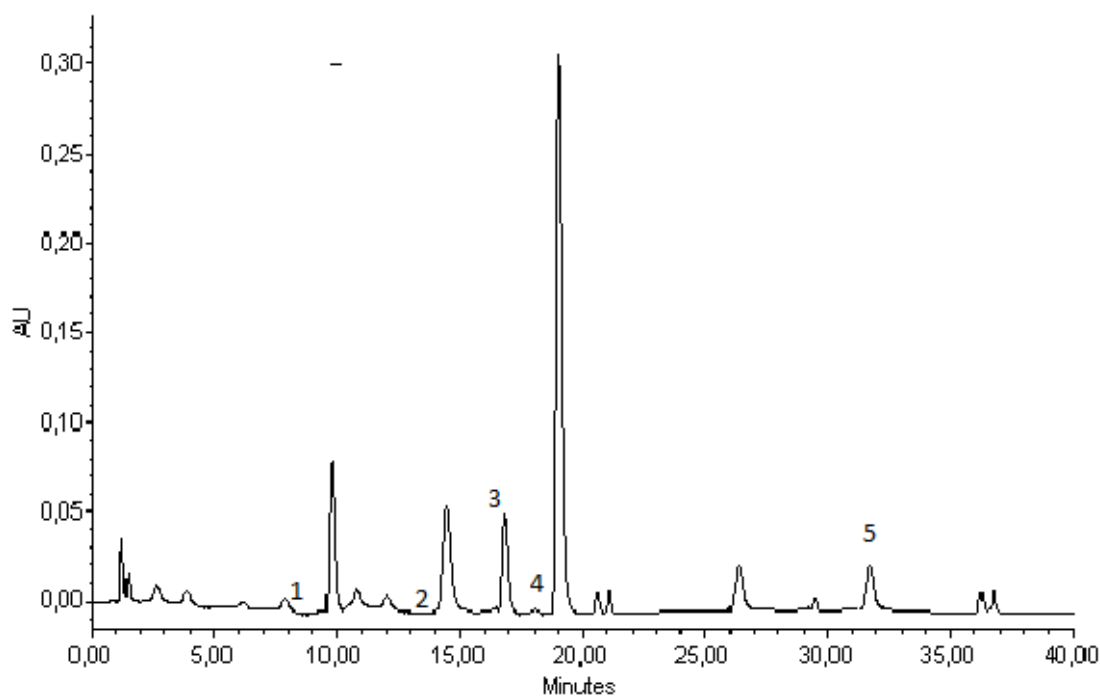
6 : Dehydrophenylacétique ; 7 : acide chlorogénique ; 8 : acide syringique ; 9 : acide p-coumarique ; 10 : acide férulique ; 11 : l'acide naringique ; 12 : coumarines

### III.3.2.2. Jus des baies

Par ailleurs, la caractérisation des anthocyanes du jus des baies à 518 nm a fait ressortir 18 pics d'anthocyanes dont 5 ont été identifiés. Il s'agit du Malvidol-3-glucoside (52,24%), Cyanidol-3-glucoside (12,12%), Petunidol-3-glucoside (10,61%) Malvidol- Peonidol-3-glucoside (9,87%), et 3-coumarylglucoside (4,27%). Dans une étude faite par Benmeziane (2015), le Malvidol-3-glucoside a été identifié aussi comme anthocyane majoritaire dans le Gros noir et le Muscat avec un taux de 72,73%.

Ces mêmes anthocyanes ont été aussi identifiés dans un cépage de la même région d'étude (Médea) dans une étude menée par Ferhi *et al.*, (2016). Dans le genre *Vitis*, on distingue cinq anthocyanidines: la cyanidine, la pionidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine. La

malvidine-3-O-glycoside est la plus abondante des anthocyanes des de raisin, ce qui confirme les résultats de la présente étude.



**Figure 24.** Profil chromatographique HPLC des anthocyanes de l'extrait méthanolique des baies

### III.3.2.3. Les flavonoïdes

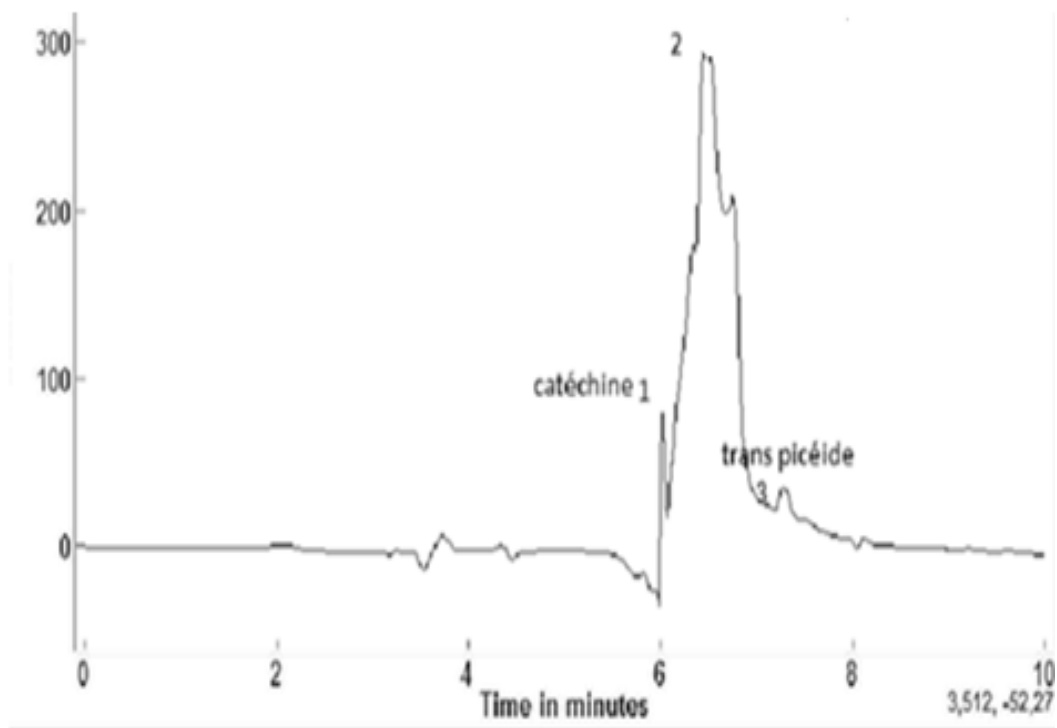
Les composés ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et leurs spectres UV vis par comparaison avec des chromatogrammes de références dans les mêmes conditions opératoires. L'analyse quantitative par HPLC des flavonoïdes des extraits a permis d'identifier cinq composés, représentés dans les figures 25, 26 et 27. Ces flavonoïdes ont été détectés par Jean-Denis (2005) dans l'extrait méthanolique de deux variétés de raisin (Chasselas et Solaris). La catéchine et l'épicatéchine ont été aussi identifiées dans les pépins issus de marc de raisins (Waterhouse *et al.*, 1997 ; Podsędek, 2007 ; Faleh *et al.*, 2008). Une autre recherche réalisée par Guebailia (2007), a apporté un nombre plus important de molécules autre que celle détectée lors de notre étude concernant l'extrait phénolique des sarments et des rafles de la vigne (*Vitis vinifera* L.). En plus de catéchine, épicatéchine, cis-picéide, trans-picéide et le  $\delta$ -viniférinol, l'extrait renferme le pallidol, le picéide et l'astilbin, le (+) – hopéaphénol, (-) Trans  $\epsilon$ -viniferin, la trans scirpusin A et le nepalensinol B. La structure chimique de ces composés a été déterminée en utilisant les méthodes

spectroscopiques classiques RMN du proton : trans resvératrol ( $C_{14}H_{12}O_3$ ), trans picéide, trans picéatannol ( $C_{14}H_{12}O_4$ ), Picéide ( $C_{20}H_{22}O_8$ ). Il est à signaler que le picéide, glucoside du resvératrol a été trouvé dans les suspensions cellulaires de vigne par Waffo-Teguo *et al.*, (2001). Concernant les activités biologiques du picéide, il a été décrit comme antiinflammatoire (Ulrich *et al.*, 2005), anticancéreux (Kimura et Okuda, 2000), et pourraient être liés à l'inhibition de la synthèse d'ADN dans les 50 cellules cancéreuses et à l'inhibition de l'angiogénèse des lignées HUVECs (Kimura, 2005).  $\epsilon$ -viniférine ( $C_{28}H_{22}O_6$ ) est pour la première fois été isolé de *Vitis vinifera* en 1977 par Langcake et Pryce. Il a ensuite à nouveau été isolé de la vigne par Li *et al.*, (1996). On le trouve dans la sève des sarments, et possède des propriétés anti-tâches. La viniférine est un composé appartenant au groupe des stilbènes. Ce dernier dimérique est produit par les processus d'oxydation du resveratrol. La viniférine est aussi produite par la vigne en réponse à l'attaque fongique (Baderschneider et Winterhalter, 2000).

Cette molécule a non seulement une meilleure activité antifongique mais également de meilleurs pouvoirs antioxydants que le resveratrol (Langcake, 1981 ; Baderschneider et Winterhalter, 2000). Selon Piver *et al.*, (2003), la trans  $\epsilon$ -viniférine a montré des effets inhibiteurs des enzymes des cytochromes P450 humains impliquées dans la bioactivation de nombreux carcinogènes. La trans- $\epsilon$ -viniférine, possède une activité antioxydante (Privat *et al.*, 1976) et antihépatotoxique (Langcake, 1981).

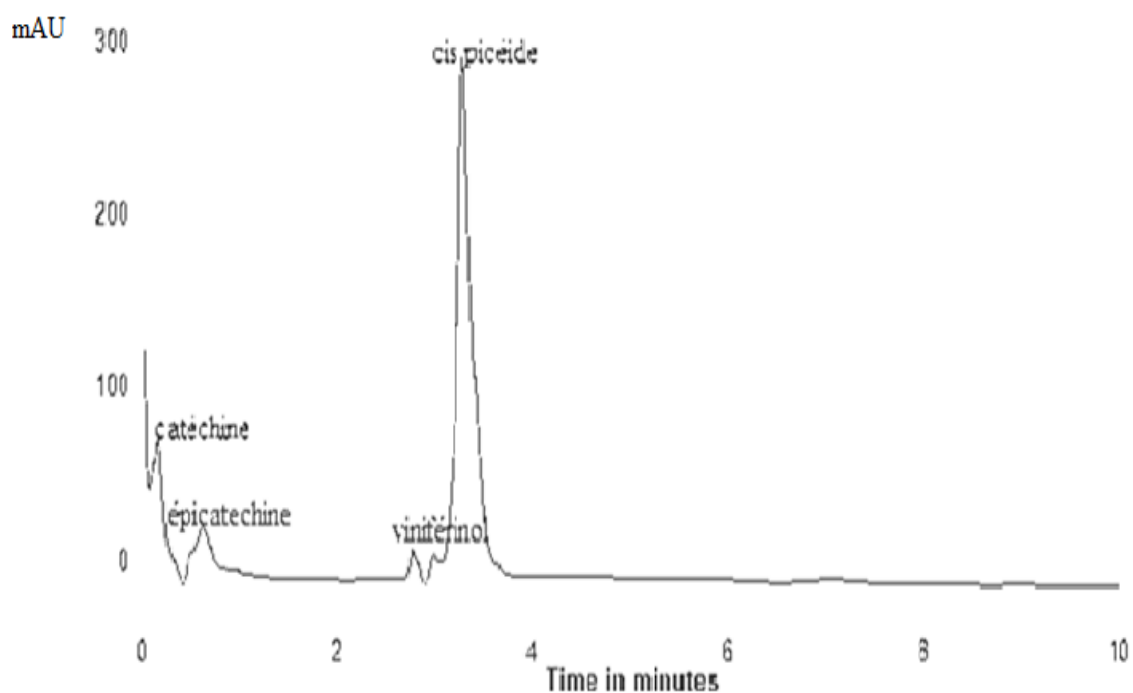
En effet, les composés majoritaires détectés dans les différentes fractions sont des stilbènes, qui sont assimilés à des phytoalexines, molécules dont les propriétés biocides (antifongiques, antibactériennes ...) ont été démontrées *in vitro* dans plusieurs études. La synthèse de ces composés est induite en réponse à des éliciteurs biotiques dans les feuilles de Vigne, tel que, *Botrytis cinerea*, *Plasmopora viticola*, agent du mildiou qui sont très répandu dans les vignobles algériens.

Le resvératrol se trouve sous forme cis et trans, et est présent dans les tissus végétaux principalement sous forme de trans-resveratrol-3-O-glucosides (trans-picéide et trans astringine) (Baderschneider et Winterhalter, 2000) .



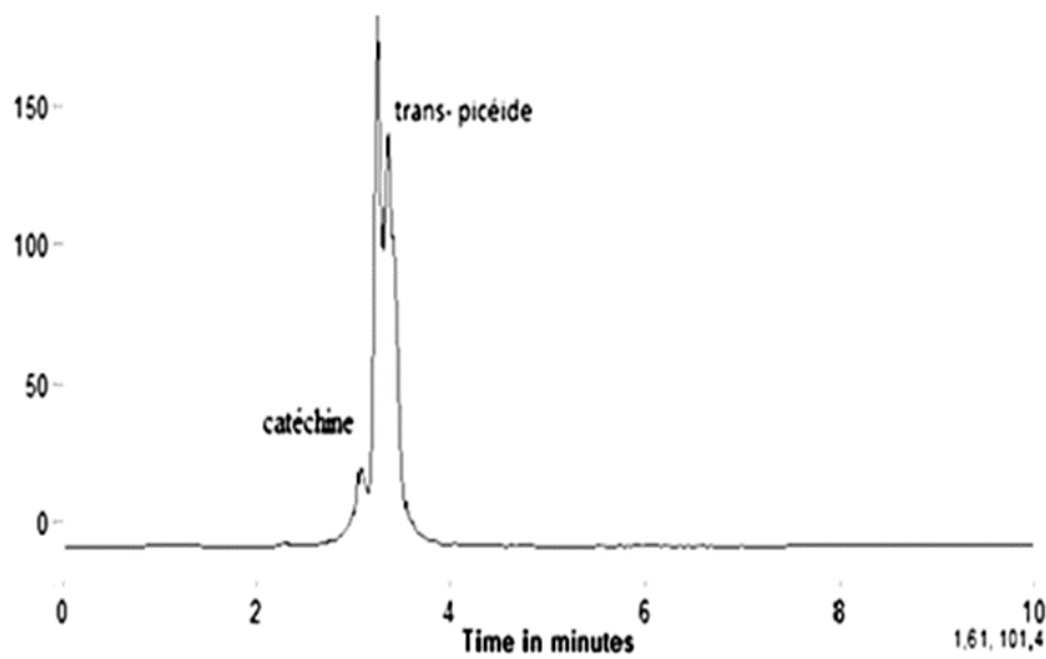
**Figure 25.** Profil chromatogramme HPLC de la fraction butanolique

*1 : catéchine ; 2 : viniférinol ; 3 : trans-picéide.*



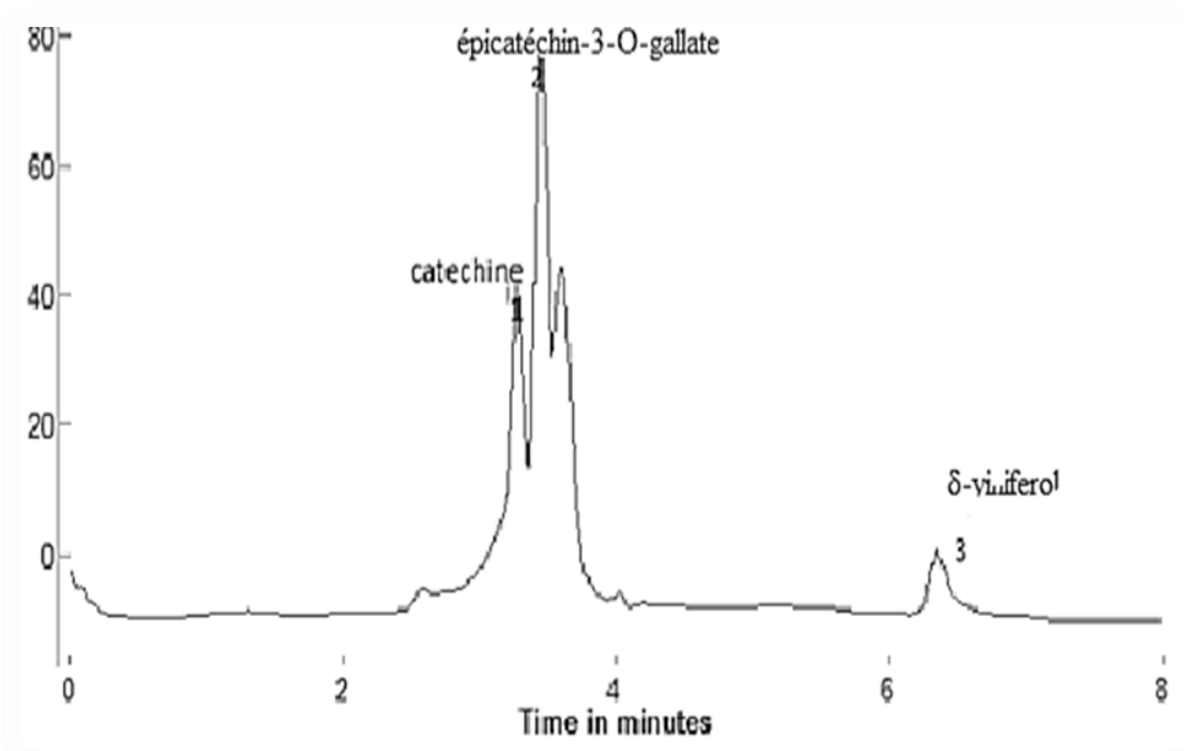
**Figure 26.** Profil chromatogramme HPLC de la fraction acétate d'éthyle

1 : catéchine ; 2 : épicatechine ; 3 :  $\delta$ -viniférol ; 4 : cis-piciéde



**Figure 27.** Profil chromatographique de la fraction Aqueuse

1 : catéchine ; 2 :  $\delta$ -viniférinol ; 3 : cis-picéide



**Figure 28.** Profil chromatographique HPLC de l'huile des pépins

1 : catéchine ; 2 : épicatechine-3-O-gallate ; 3 :  $\delta$ -viniférinol

Dans les raisins de table, les teneurs en ces composées sont comprises entre 243 et 1 108 mg/kg, dont plus de 89 % sont généralement localisées dans les pépins (Gabaston, 2018).

**Tableau 16.** Principaux composés flavonoidiques des fractions de l'extrait flavonoidique de la variété Ahmar Bouamar

Fraction	Composée	X <sub>T</sub> (min)	Max (nm)
E B	Catéchine	6,2	278
	Viniférinol	68	283
	Trans-piciéde	7,3	320
E AE	Catéchine	0,2	280
	Epicatchine	0,7	285
	δ-viniférinol	2,9	286
	cis-piciéde	3,5	341
E AQ	Catéchine	3,1	269
	Trans-piciéde	3,6	306
Huile des pépins	Catéchine	3.49	291
	Épicatchine-3-O-gallate	3.62	296
	δ -viniférinol	6.41	331

Les aires des pics obtenus montrent que les quantités diffèrent d'une fraction à une autre au sein de la même variété.

Nous remarquons que la catéchine et le δ-viniférinol ont été identifiés dans toutes les fractions.

Le cis-piciéde est le flavonoïde majoritaire de la fraction acétate d'éthyle, le δ-viniférinol est le majoritaire pour la fraction butanolique et aqueuse, et l'épicatchin-3-O-gallate pour l'huile.

### III.3.3. Caractérisation des extrais par la GCMS

Les résultats de la caractérisation par CG-SM de chaque extrait de cépage étudié sont représentés dans les profils chromatographiques CG-SM (voir annexes) et les tableaux suivant.

#### I.3.3.1. L'extrait méthanolique

**Tableau 17.** CG-SM de l'extrait méthanolique de la variété Ahmar Bouemar

N°	Rt(min)	Nom de composant	M/Z
1	3.05	Glycérine	61
2	5.34	Methyl2-hydroxybutyrate	96
3	5.39	Furfural	73
4	7.81	Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	73
5	8.78	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl	73
	10.32	hexenoic acid, ethyl ester	96
6			
7	10.98	1,6,10-dodecatrien-3-ol	73
8	11.59	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl	227

**RT(min)** : temps de rétention, **M/Z** : la masse sur la charge (g/masse)

L'analyse des composés volatils de l'extrait méthanolique des feuilles de la variété Ahmar Bouemar (tab.17) a permis de quantifier 8 composés, y compris des terpènes (1,6,10-dodecatrien-3-ol), des esters aliphatiques et aromatiques (furfural, Methyl2-hydroxybutyrate, Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester). Le Methyl2-hydroxybutyrate a été aussi identifié dans les vins rouges par Gabaston (2018).

## III.3.3.2. La caractérisation du jus

Tableau 18. CG-SM du jus de la variété Ahmar Bouamar

N°	Rt(min)	Nom de composant	M/Z
1	5.23	Furfural	76
2	6.67	2(5H)-Furanone	55
3	7.63	Methyl 3-furoate	75
4	7.99	Pyranone	144
5	8.38	DL-Arabinose	61
6	9.10	5-Hydroxymethylfurfural	87
7	9.74	Furan, 3-phenyl	115
8	10.37	Acetoxyacetic acid, 3-methylbutyl	71
9	11.11	D-Glucopyranose, 1,6-anhydro	60
10	13.80	octanoic acid, 3-methylbutyl ester (iso-amyl octanoate)	81

L'étude par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse du jus de cépage Ahmar Bouamar permet d'identifier plusieurs substances volatiles appartenant à la fraction phénolique des arômes tels que le furfural, Furan, 3-phenyl, 5-Hydroxymethyl furfural, des esters comme l'acide octanoic , 3-methylbutyl ester (iso-amyl octanoate) et des exoses qui sont essentiellement, le Pyranone, DL-Arabinose et le D-Glucopyranose, 1,6-anhydro .

Le 5-Hydroxymethyl furfural est le composé aromatique majoritaire de l'extrait étudié.

### III.3.3.3. L'extrait flavonoïque

**Tableau 19.** CG-SM de la fraction butanolique

Le profil chromatographique de la GCMS de la fraction butanolique (tab.19) nous a permis d'identifier cinq composés (tab.19) : acide Formique, acide resorcylique, acide Pentadecanoic, 3-methylbutyl et le 5-Hydroxymethylfurfural .

L'aldéhyde furanique ; 5-Hydroxymethylfurfural est le majoritaire de l'extrait butanolique (EB). Cette molécule est présente à des teneurs élevées dans la vigne rouge, souvent au-dessus de leur seuil de perception (Slaghenaufi, 2012).

N°	Rt(%)	Nom de composant	M/Z
1	3.03	Formic acid	45
2	3.49	Resorcylic acid	40
3	3.64	Glycidyl butyl ether	40
4	11.13	Pentadecanoic acid, 3-methylbutyl	60
5	11.80	5-Hydroxymethylfurfural	144

### III.3.3.4. L'extrait acétate d'éthyle

**Tableau 20.** CG-SM de l'extrait acétate d'éthyle

L'analyse GC-MS de la fraction acétate d'éthyl (ADE) a révélé la présence de 5 dérivées volatiles : Formic acid ; 2-Butene, (Z) ; Cyclononasiloxane, octadecamet ; Resorcylic acid (TMS) Pentadecanoic acid, ethyl ester , ethyl pentadecanoate).

N°	Rt (min)	Nom de composant	M/Z
1	3.03	Formic acid	46
2	3.58	2-Butene, (Z)	56
3	9.55	Cyclononasiloxane, octadecamet	73
4	10.29	Pentadecanoic acid, ethyl ester (ethyl pentadecanoate)	73
5	10.98	Resorcylic acid (TMS)	73

### III.3.3.5. L'extrait aqueux

**Tableau 21:** CG-SM de l'extrait aqueux

L'analyse par CG-SM de l'extrait aqueux montre que les terpènes sont dominants dont l'acide formique qui est le composé majoritaire et l'acide resorcylique (tab.21).

N°	Rt(min)	Nom de composant	M/Z
1	3.06	Formic acid	46
2	3.59	Aminocyano acetic acid	56
4	7.80	Cycloheptasiloxane, Tetradecam	80
5	8.75	Resorcylic acid	73

(TMS)

6	9.58	Benzoic acid	370
---	------	--------------	-----

### III.3.3.6. Caractérisation de l'huile

**Tableau 22:** CG-SM de l'huile des pépins

A travers les résultats (tab.22), l'huile de cépage Ahmar Bouamar semble renfermer 8 composés volatils. Pour cette plante, les acides sont présents (l'acid formique ; l'acide propanoïque ; l'acid decanoïque et les triterpénoïde sont dominants : l'acide oléanolique. Qui est le majoritaire de cet extrait. Selon Braz *et al.*, (2020), l'acide oléanolique est le triterpène dominant des vignes noires, ce qui confirme nos résultats.

N°	Rt(min)	Nom de composant	M/Z
1	2.90	Formic acid	46
2	4.48	Hexanal	56
3	5.78	succinic acid	90
4	5.91	2-Propenoic acid, octyl ester	55
5	6.06	Octanal	56
6	8.50	Oléanolic acid	81
7	8.72	Benzeneacetic acid, ethyl ester	81
8	8.75	decanoic acid	81

### III.4. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour estimer l'activité antioxydante *in vitro*. Certaines d'entre elles reposent sur la capacité réductrice d'un composé comme étant un indicateur significatif de son potentiel antioxydant, d'autres reposent sur la mesure d'une molécule à piéger les composés radicalaires (**Javanmardi, 2003**). Les méthodes appliquées dans notre étude sont la méthode de piégeage du radical libre DPPH, la méthode de la réduction du fer FRAP et la méthode de décoloration du bêta-carotène.

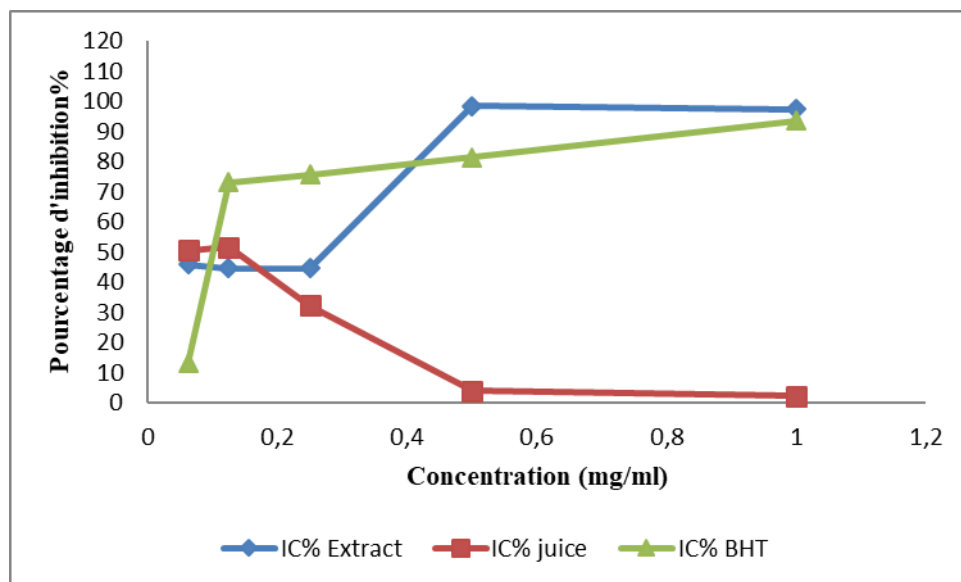
#### III.4.1. Piégeage du radical libre DPPH

La méthode DPPH a été choisie, en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité, mais aussi parce que les mesures de l'IC<sub>50</sub> exprimées en mg/ml sont comparables entre elles et non pas seulement à celle d'une référence.

##### III.4.1.1. Pouvoir antioxydant de l'extrait polyphénolique et le jus de la variété Ahmar Bouamar

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition (PI %) du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) pour l'extrait polyphénolique des feuilles et de jus des baies de cépage Ahmar Bouamar sont enregistrés dans la figure 29. Nous constatons que l'extrait polyphénolique des feuilles présente une activité de piégeage du radical libre DPPH plus importante que celle de jus, avec respectivement un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 98,5 % contre 51,59%. Les IC<sub>50</sub> sont de l'ordre de 0,14 ± 0,01 mg/ml pour l'EM et 0,03 ± 0,05mg/ml pour le jus. Il est à constater également que l'activité antiradicalaire du jus est supérieure à celle de l'EM des feuilles de la plante étudiée et du standards BHT (IC<sub>50</sub> = 0,077mg/ml ± 0,3 µg / ml). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Ojeil et al., (2010)** pour les cépages rouges Cabernet, Sauvignon et Syrah dans la région Békaa au Liban. Ces auteurs ont signalé un pourcentage de piégeage du radical libre supérieur à 70%. **Gonçalves et al., (2001)**, **Barros et al., (2007)** et **Saeed et al., (2012)** décrivent le mécanisme de cette réaction comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons, caractéristique

de l'action antioxydante des polyphénols. En effet ces auteurs ont signalé que l'activité antioxydante des matières végétales est bien corrélée avec la teneur en composés phénoliques.



**Figure 29.** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH de l'extrait polyphénolique et le jus

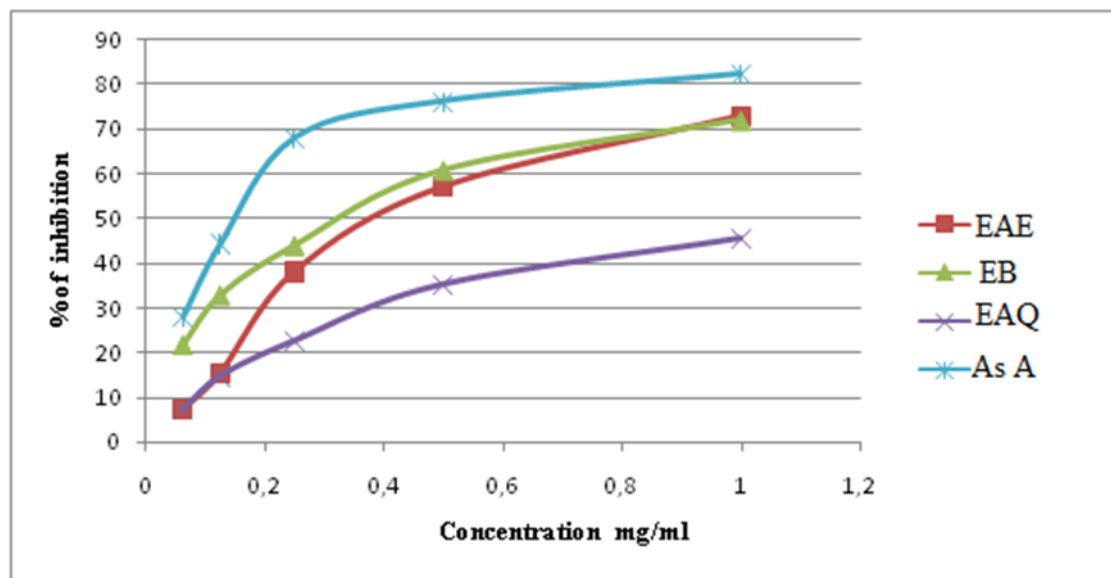
### III.4.1.2. Pouvoir antioxydant des flavonoïdes

Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH en présence des échantillons de raisin est représenté dans la Figure 30. Ce test nous a permis de déterminer la concentration inhibitrice piégeant 50 % du radical DPPH (IC50 %). Cette dernière est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydants requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. Les IC50 calculées des différents extraits de flavonoïdes sont résumés dans le tableau 23.

**Tableau 23.** Valeurs des IC50 notés pour les différentes fractions de l'extrait flavonoïdique.

Extraits	Acétate d'éthyle	Butanolique	Aqueuse	Acide ascorbique
IC50 (mg/ml)	11,06	11,20	27,19	4,72

*EAE : extrait d'acétate d'éthyle ; EB : extrait butanolique ; EAQ : extrait aqueux ; As A : acide ascorbique*



**Figure 30.** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les flavonoïdes

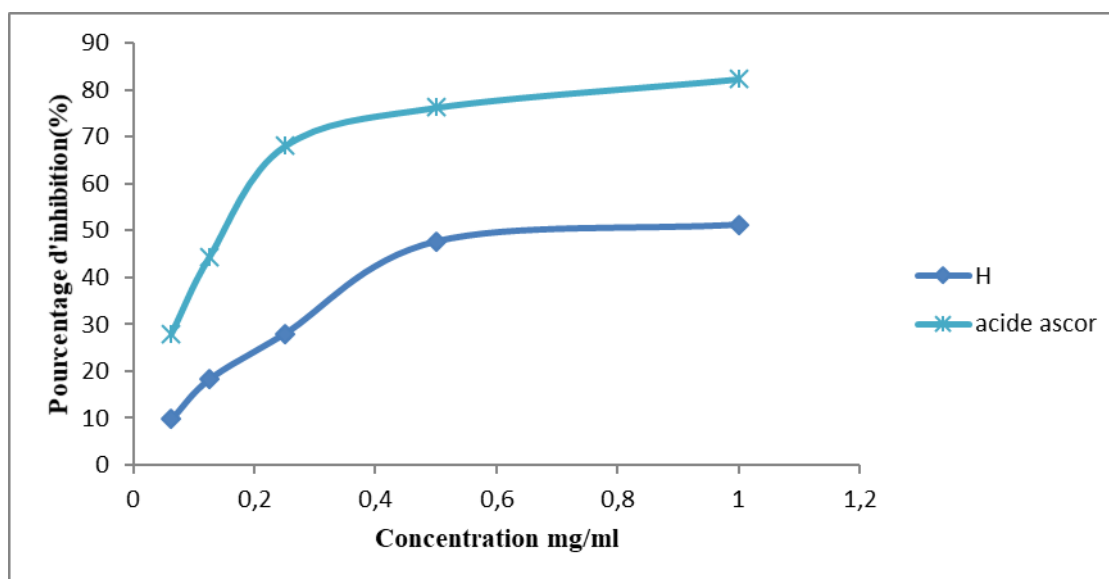
D'après les résultats, on remarque que les fractions butanolique et d'acétate d'éthyle sont des antiradicalaires puissantes, avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 70% et des IC50 respectives de  $11,06 \pm 0,1$  et  $11,20 \pm 0,4$  mg/ml. La différence des pourcentages d'inhibitions obtenu entre ces deux extraits et l'acide ascorbique est non significative ( $p > 0,05$ ). En tenant compte de ce paramètre, les capacités du radical sont classées dans l'ordre suivant : acide ascorbique > Extrait d'acétate d'éthyle > extrait butanolique > extrait aqueux. Il apparaît ainsi que les résultats obtenus lors de cette étude concordent avec ceux notés par **Jean-Dennis (2005)**, sur le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de la catéchine et de l'épicatéchine des LDL, soit 80%. La même constatation a été faite avec les observations d'**El Darra et al., (2012)** où le pourcentage d'inhibition de DPPH par les flavonoïdes et non flavonoïdes extraits de cépage Merlot était de 71%. Par ailleurs, **Katalinic et al., (2010)**, ont montré que l'extrait méthanolique de différentes variétés du raisin piègent 50% du radical DPPH à des concentrations comprises entre  $52,8 \pm 3,33$  mg/ml et  $291 \pm 4,51$  mg/ml. Il est connu que la réduction des molécules de DPPH est bien corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Vivas et al., 2003**). Selon **Balasundram et al., (2006)**, l'effet antiradicalaire des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libre, avec la

présence de la double liaison C2-C3. **Lee et Lee (2003)**, signalent que la méthode d'extraction affecte les capacités antioxydantes. Ceci peut expliquer en partie la différence des résultats. De par leur effet antioxydant puissant, les polyphénols trouvent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agroalimentaire et des consommateurs. Ils sont aussi impliqués dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant, telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires, l'ostéoporose ou les maladies inflammatoires (**Rock, 2003**).

#### III.4.1.3. Pouvoir antiradicalaire de l'huile des pépins

Selon les résultats présentés ci-dessous, on constate que l'huile des pépins inhibe le DPPH d'une manière croissante au fur et à mesure que la concentration augmente. Le pourcentage d'inhibition est égal à 82,3% supérieur à celui de l'antioxydant de référence, à une concentration égale à 0,17 mg/ml. Une étude menée par **Fernandes et al., (2012)** sur dix variétés portugaises a fait ressortir des pourcentages d'inhibition de DPPH par l'huile allant de 50,65% à 69,89%. Ces valeurs sont nettement inférieures à celles trouvées dans notre étude. **Belmiloud (2018)**, en testant l'huile de deux variétés algériennes issues de deux régions différentes, a obtenu par la même méthode (DPPH) une activité antioxydante comprise entre 61% et 71%. Nos résultats sont aussi supérieurs à ceux de **Fernandes et al., (2012)**, où le pourcentage maximal d'inhibition de radical DPPH par l'huile de dix variétés est de  $65,39 \pm 0,14\%$ .

Selon **Burns et al.,(2000)**, une activité antioxydante corrélée au contenu phénolique de vin a été obtenue et est associée à l'acide gallique et aux catéchines totales.

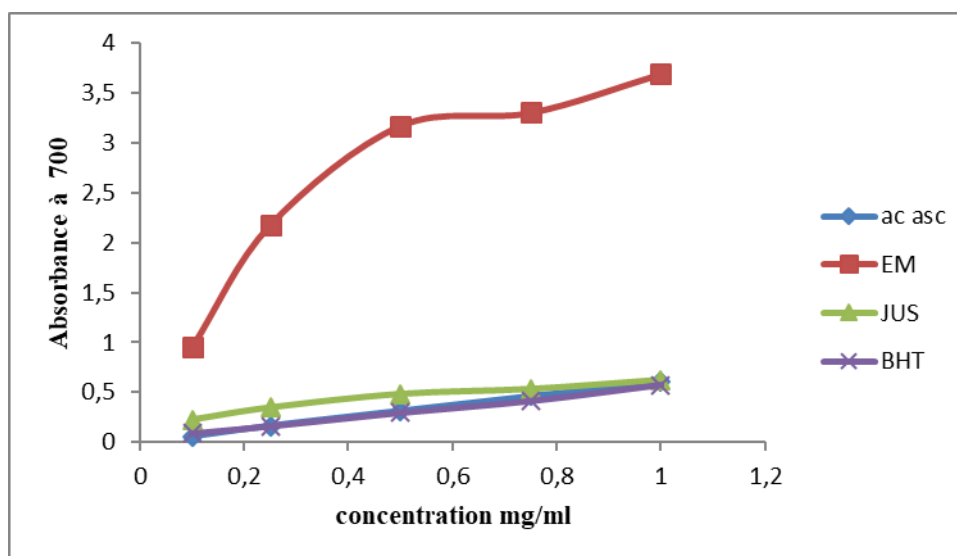


**Figure 31.** Pouvoir antiradicalaire de l'huile

### III.4.2. Méthode de réduction du fer (FRAP)

#### III.4.2.1. Pouvoir réducteur de l'extrait polyphénolique des feuilles et le jus

Dans notre travail, nous avons opté pour tester les différents extraits de la plante étudiée. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans la figure 32 nous a montré une proportionnalité entre la capacité de réduction et l'augmentation de la concentration des extraits. Nous remarquons aussi, que l'extrait des feuilles possède un pouvoir de réduction du fer plus important comparé à celui de jus. La densité optique relevée est même plus importante que celle des antioxydants de référence à savoir l'acide ascorbique (DO = 0,603) et le BHT (DO= 0,573).

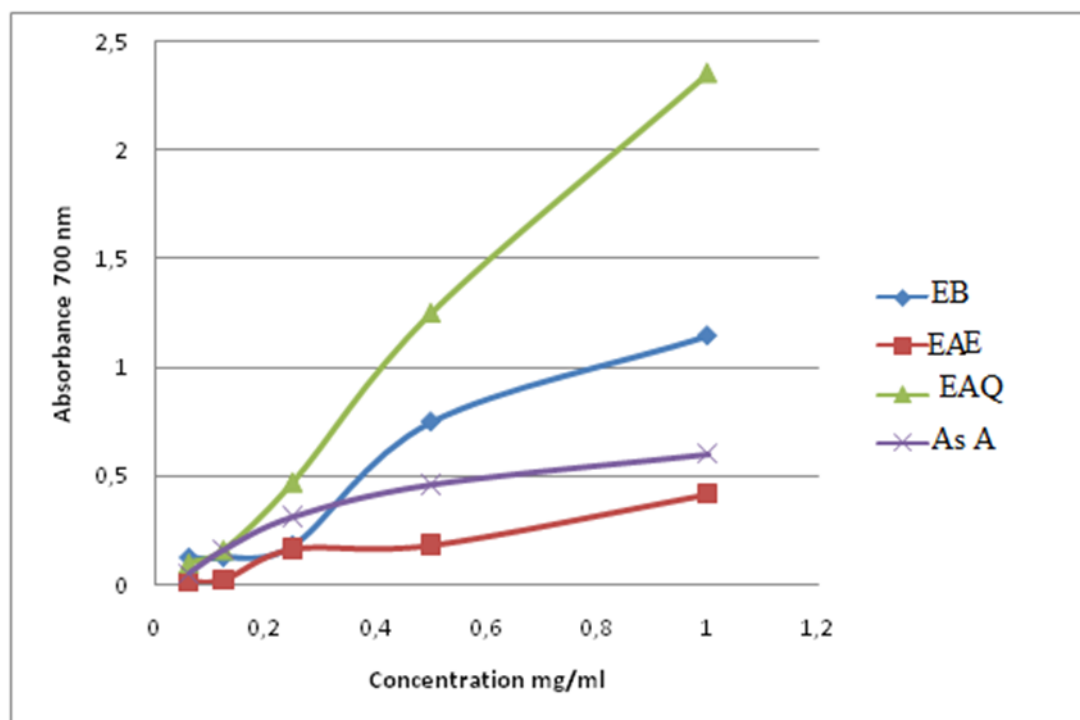


**Figure 32.** Activité de réduction ferrique de l'extrait polyphénolique des feuilles et de jus de la variété Ahmar Bouamar

#### III.4.2.2. Pouvoir réducteur des extraits flavonoïdiques des feuilles

Les concentrations des extraits flavonoïques des feuilles et des pépins sont déterminées à partir d'une courbe étalon de exprimées en mg/ml (hydroxytoluène butyl). Les résultats relevés, d'après la courbe étalon de l'acide ascorbique, sont 0,072 mg EAAs/g pour l'extrait butanolique et 0,073 mg E AAs /g pour l'extrait d'acétate d'éthyle. Le potentiel antioxydant des différentes fractions est représenté dans la figure 33. Le potentiel antioxydant des différentes fractions augmente au fur et à mesure que la concentration en extrait s'élève. Ces résultats confirment ceux trouvés par **Benmezziane (2015)** pour les extraits méthanolique du Gros noir et du Muscat noir exprimé en quantité d'antioxydants équivalents en acide ascorbique (EAA), soit respectivement  $16,58 \pm 0,07\text{mg}$  et  $11,85 \pm 0,36\text{mg}$ . **Barros et al., (2007)**, ont rapporté que les propriétés réductrices sont généralement associées à la présence de réductones, qui exercent une action antioxydante en donnant un atome d'hydrogène, déstabilisant ainsi la chaîne des radicaux libres. En conséquence, les cépages avec un pouvoir réducteur élevé peuvent renfermer des quantités plus élevées en réductones, qui pourraient réagir avec les radicaux libres pour stabiliser et bloquer les réactions radicalaires en chaînes. Ce pouvoir réducteur élevé des polyphénols est signalé par plusieurs auteurs. En effet, **Saeed et al., (2012)** et **Gonçalves et al., (2001)**, ont révélés que l'activité antioxydante des matières végétales est bien corrélée avec la teneur en composés phénoliques. La capacité des

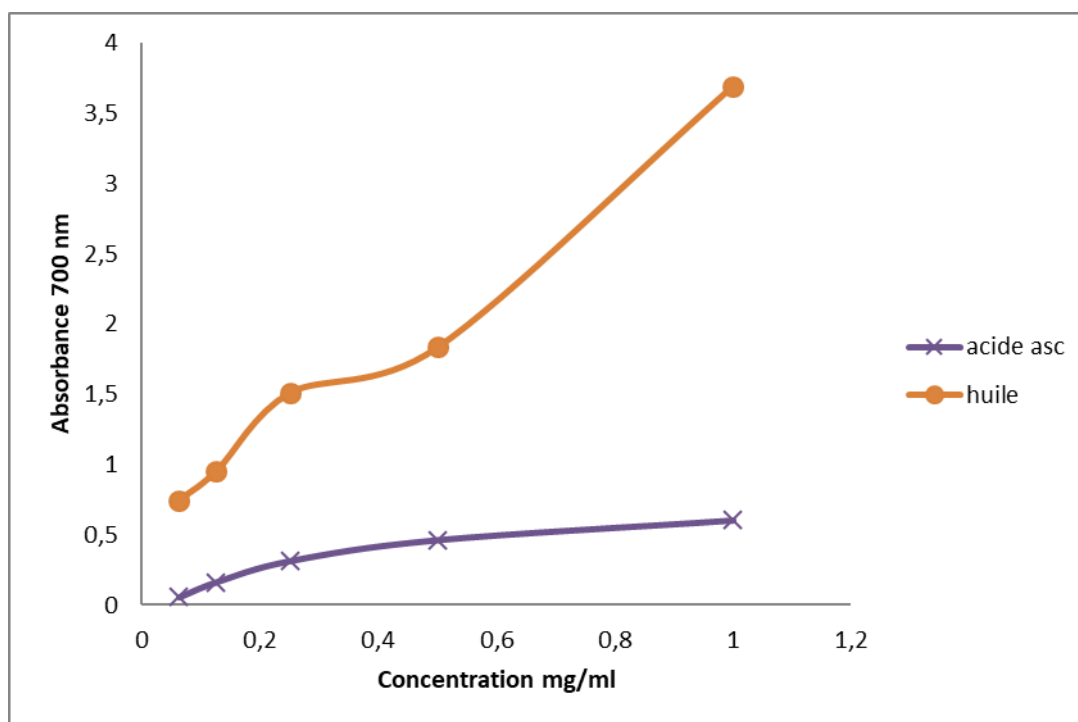
flavonoïdes à réduire le fer a été décrite par **Keevil *et al.*, (2000)**. En effet, ces auteurs ont signalé que ces métabolites secondaires jouent un rôle important dans la diminution du risque de thrombose coronaire et d'infarctus du myocarde en exerçant un effet inhibiteur plaquettaire.



**Figure 33.** Activité de réduction ferrique des fractions de l'extrait flavonoïdique de la variété Ahmar Bouamar

#### III.4.2.3. Pouvoir réducteur de l'huile des pépins

Les valeurs du pouvoir réducteur du fer obtenus ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats sont représentés dans la figure 34.



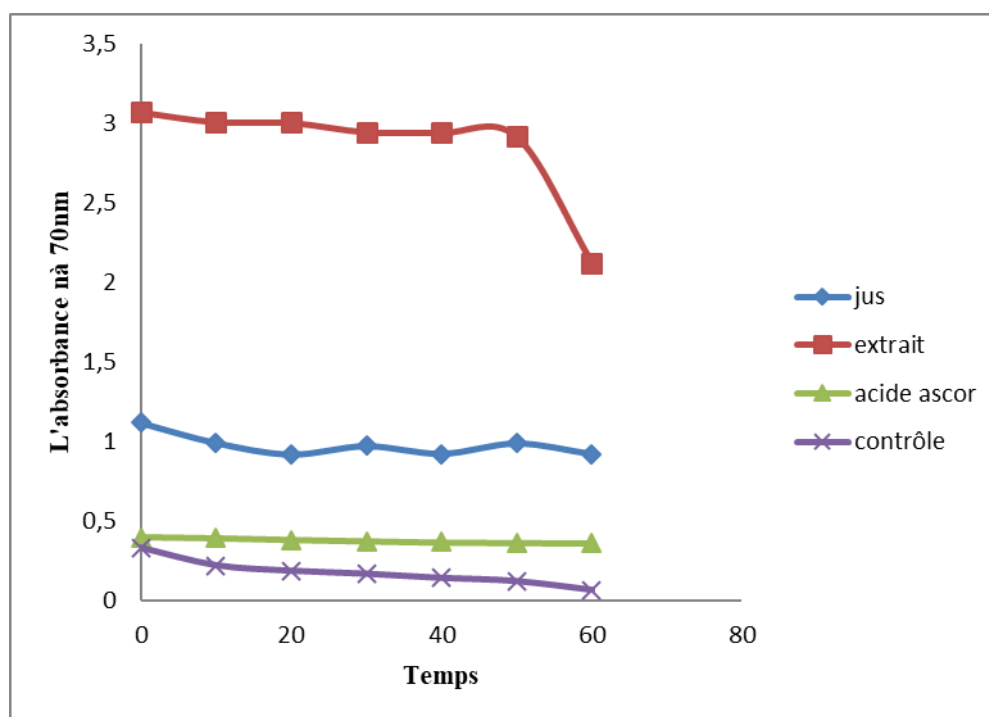
**Figure 34.** Activité de réduction ferrique de l'huile des pépins

D'après les graphes de la figure 34, nous constatons que la capacité de l'huile à réduire le fer est très hautement significative ( $p \geq 0,05$ ). En plus d'avoir un effet « scavenger » direct, c'est-à-dire piègeur de radicaux libres, l'épicatchine-3-O-gallate qui est un procyanidine estérifié identifié dans les pépins, peut agir de manière indirecte, soit en stimulant les mécanismes antioxydants endogènes, soit en inhibant les systèmes enzymatiques qui aboutissent à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, comme chélateurs de certains métaux catalyseurs de réactions oxydatives, par exemple le fer et le cuivre. D'après **Cheng et al., (2018)**, un agent antioxydant est un agent plus réducteur que les molécules qu'il peut protéger, et il cédera un électron plus facilement à l'agent oxydant afin de le stabiliser. Ce qui explique clairement les résultats obtenus.

### III.4.3. Méthode de décoloration du $\beta$ -carotène

#### III.4.3.1. Les extraits polyphénoliques

Le taux de dégradation ou de décoloration du  $\beta$ -carotène reflète la capacité antioxydante de nos extraits. Les cinétiques du blanchissement du  $\beta$ -carotène des extraits de la variété Ahmar Bouamar et de l'acide ascorbique enregistrées après 1 heure sont représentées dans la figure 35.

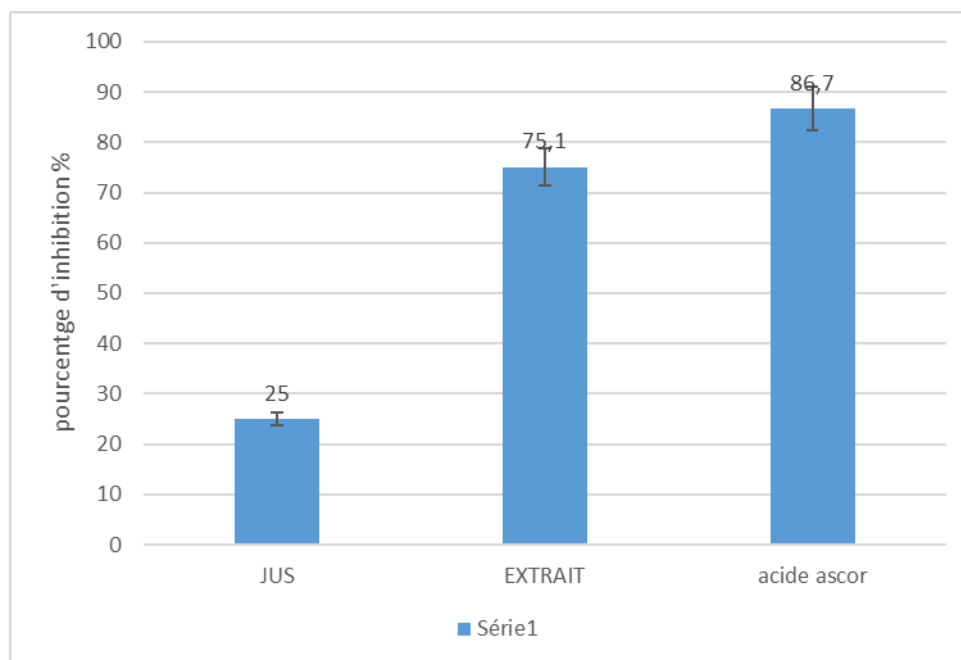


**Figure 35.** Cinétique de la décoloration du  $\beta$ -carotène induite par les extraits polyphénoliques de la variété Ahmar Bouamar, l'acide ascorbique et le contrôle négatif.

On remarque clairement que le jus et l'extrait des feuilles exercent un effet protecteur puissant vis-à-vis de la décoloration de la  $\beta$ -carotène par rapport à l'antioxydant de référence (l'acide ascorbique). D'après **Kubola et Siriamornpun (2008)**, la diminution de la coloration correspond à une diminution de l'absorbance suivie spectrophotométriquement. Les effets thérapeutiques des anthocyanidines sont principalement dus à l'activité antioxydante contre les radicaux libres.

La delphinidine et la delphinidine - 3 - glucoside sont de puissants inhibiteurs de la lipoperoxydation et suppresseur de l'ion superoxyde (**Kammerer et al., 2004**). L'histogramme

suivant présente le pourcentage d'inhibition de la décoloration du  $\beta$ -carotène induit par le jus, l'extrait de feuilles et l'acide ascorbique pris comme standards à la même concentration.



**Figure 36.** Pourcentage d'inhibition de la décoloration de la  $\beta$ -carotène.

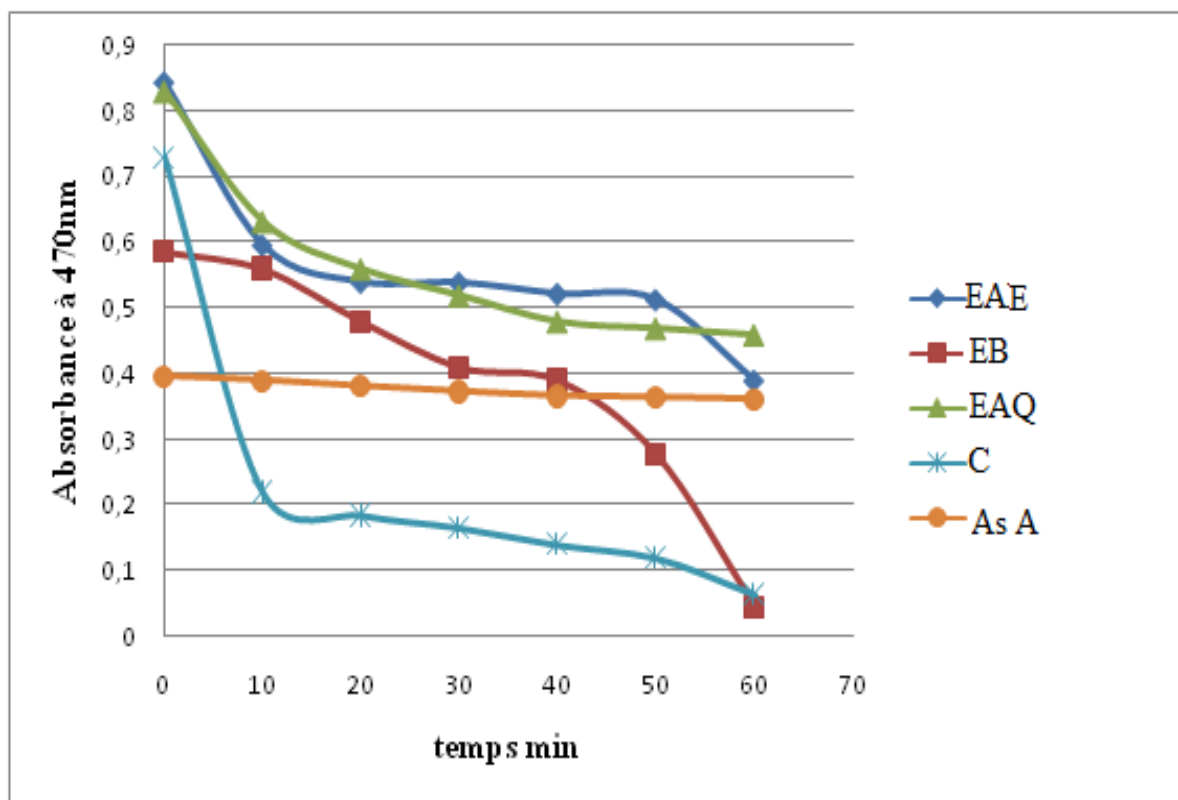
Il ressort des résultats que l'extrait des feuilles (75,1 %) inhibe la décoloration du  $\beta$ -carotène plus que le jus (25%). La capacité d'inhibition est comme suivie : acide ascorbique > extrait des feuilles > jus.

#### III.4.3.2. Le pouvoir réducteur des flavonoïdes

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des flavonoïdes, un suivi de la réaction de l'oxydation du  $\beta$ -carotène en présence des extraits et ou des témoins (négatif et positif), a été effectué en mesurant l'intensité de la couleur de  $\beta$ -carotène à une longueur d'onde de 470 nm. Les résultats sont présentés par la figure 37. Il est à signaler que l'absorbance du mélange diminue vers une valeur plus basse, mais reste moins rapide par rapport à celle de la solution témoin (-) et l'extrait butanolique, suivi par la fraction d'acétate d'éthyle. L'activité antioxydante obtenue par ce test est étroitement corrélée avec la teneur élevée en procyanidine monomères (flavan-3-ols) dans les extraits. En effet, **Cao *et al.*, (1997)**, ont rapportés que les flavan-3-ols étaient dotés de cette activité antioxydante substantielle. De plus, les résultats obtenus lors de cette étude peuvent être expliqués par la richesse de l'extrait butanolique et de celui d'acétate d'éthyle en antioxydants apolaires. La faible activité rencontrée avec l'extrait

aqueux est probablement due à la présence en taux élevé des antioxydants polaires. Ce fait a été signalé par **Frankel et Meyer (2000)**. Selon ces auteurs, les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes, du fait qu'ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

Dans une étude récente, **Parker et al., (2007)** en étudiant la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols des raisins (frais, secs ou golden) de la variété Thompson seedless par un suivi de l'effet de leur consommation pendant quatre semaines chez 15 sujets humains sains, ont remarqué que la capacité d'absorbance du radical oxygène (Orac) est significativement positive après deux semaines de consommation de raisins (250 g/jour) et trois semaines pour les raisins secs ou Golden (50 g/jour). De même, l'oxydation du sérum (temps de latence) est significativement améliorée pour la consommation des raisins Golden après quatre semaines. Ces mêmes auteurs, ont montré aussi que le vin rouge contient naturellement des polyphénols susceptibles de limiter l'oxydation des lipoprotéines.

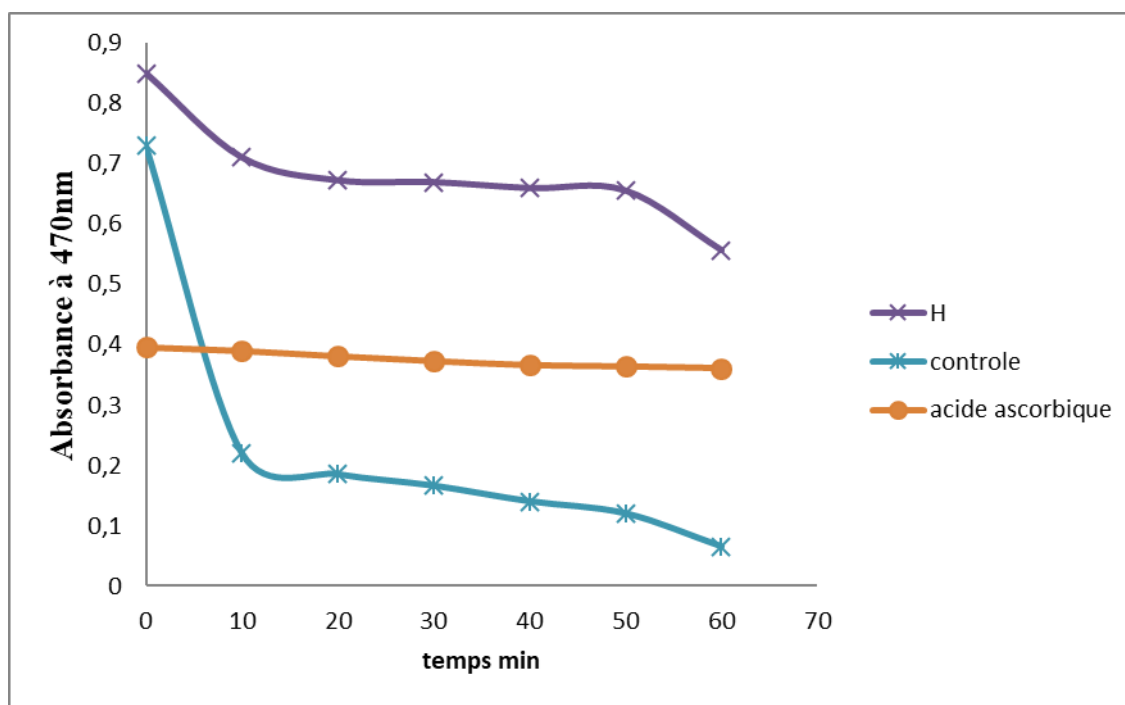


**Figure 37.** Cinétique de la décoloration du  $\beta$ -carotène induite par les différentes fractions de l'extrait flavonoïque

#### III.4.3.3. Pouvoir réducteur de l'huile des pépins

Le taux de dégradation ou de décoloration du  $\beta$ -carotène dépend de la capacité antioxydante de nos extraits. En présence des hydro-péroxydes de l'acide linoléique, la molécule de  $\beta$ -carotène subit une décoloration rapide en l'absence d'antioxydants. La diminution de la coloration en présence des antioxydants est mesurée par un spectrophotomètre. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 38. Ou on remarque que l'huile des pépins exerce un effet puissant vis-à-vis de la décoloration du  $\beta$ -carotène avec un pourcentage de 55.79%.

Selon **Maier *et al.*, (2009)**, une activité antioxydante corrélée au contenu phénolique de vin rouge, associée à l'acide gallique et aux catéchines totales, a été obtenue.



**Figure 38.** Cinétique de la décoloration du  $\beta$ -carotène induite par l'huile des pépins

#### IV. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des différents extraits de la variété Ahmar Bouamar par la méthode de diffusion sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons et levures.

##### IV.1. Tests de sensibilité aux antibiotiques (L'antibiogramme)

Les souches de bactéries à Gram + et à Gram - (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques standards testés : Ciprofloxacine, Fosfomycine, Tétracycline, Tobramycine, Piperacilline et Gentamicine et, amoxicilline + Ac. clavulanique (AMC), norfloxacine (NO), imipénème (IPM), céfotaxime (CTX), céfoxitine (FOX), acide nalidixique (NA), ciprofloxacine (CIP), fosfomycine (FOS), gentamicine (G), colistine (CS), ticarcilline (TIC), aztréonam (ATM), pipéracilline (PIP), érythromycine (E), chloramphénicol (C), rifampicine (RA), vancomycine, (VA), pristnamycine (PT), acide fusidique (FA), kanamycine (K), benzylpénicilline (P), oxacilline (OX), Acide Clavulanique, (Sigma-aldrich).

Par ailleurs, *Pseudomonas aeruginosa* (bactérie à Gram -) est sensible à Ciprofloxacine, Fosfomycine, Tétracycline, Tobramycine, Piperacilline, Gentamicine et Tétracycline, elle s'est montrée en revanche résistante au Rifampine.

Concernant *Staphylococcus aureus*, il est à noter que cette bactérie Gram + soit relativement sensible au FOX<sub>42</sub>, P<sub>10</sub>, CN<sub>120</sub>, CN<sub>10</sub>, IF, OFX<sub>5</sub>, TE<sub>30</sub>, C<sub>30</sub> et FOX, et plus ou moins résistante au SXT<sub>25</sub>, OFX<sub>5</sub> et OX<sub>1</sub>.

Enfin, *E-coli* s'est montrée sensible à la plupart des antibiotique testés (CTX<sub>30</sub>, AML<sub>25</sub>, TIC<sub>75</sub>, KZ<sub>30</sub>, NA<sub>30</sub>, CN<sub>10</sub>, OFX<sub>5</sub>, F<sub>30</sub>G, SXT<sub>25</sub>, C<sub>30</sub> et FOX<sub>30</sub>) avec une zone d'inhibition comprise entre 30 et 46mm.

Les résultats de l'antibiogramme appliqué aux différentes souches microbiennes isolées sont présentés dans les tableaux suivants.

**Tableau 24.** Résistance et sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

Antibiotique	FOT	CIT	RIF	CIP	CN <sub>10</sub>	TOB <sub>10</sub>	PRL <sub>75</sub>	TIC <sub>75</sub>
<b>Zone d'inhibition (mm)</b>	30	17	0	32	20	24	21	25

**Tableau 25.** Résistance et sensibilité de *Staphylococcus aueus* aux antibiotiques

Antibiotique	C <sub>30</sub>	RIF	FOT <sub>200</sub>	TE <sub>30</sub>	SXT <sub>25</sub>	FOX <sub>42</sub>	P <sub>10</sub>	FOX <sub>5</sub>	OX <sub>1</sub>	C N <sub>120</sub>	C N <sub>10</sub>	FOX <sub>5</sub>
<b>Zone d'inhibition En mm</b>	15	25	14	18	12	32	32	9	9	25	21	18

**Tableau 26.** Résistance et sensibilité d'*E.coli* aux antibiotiques

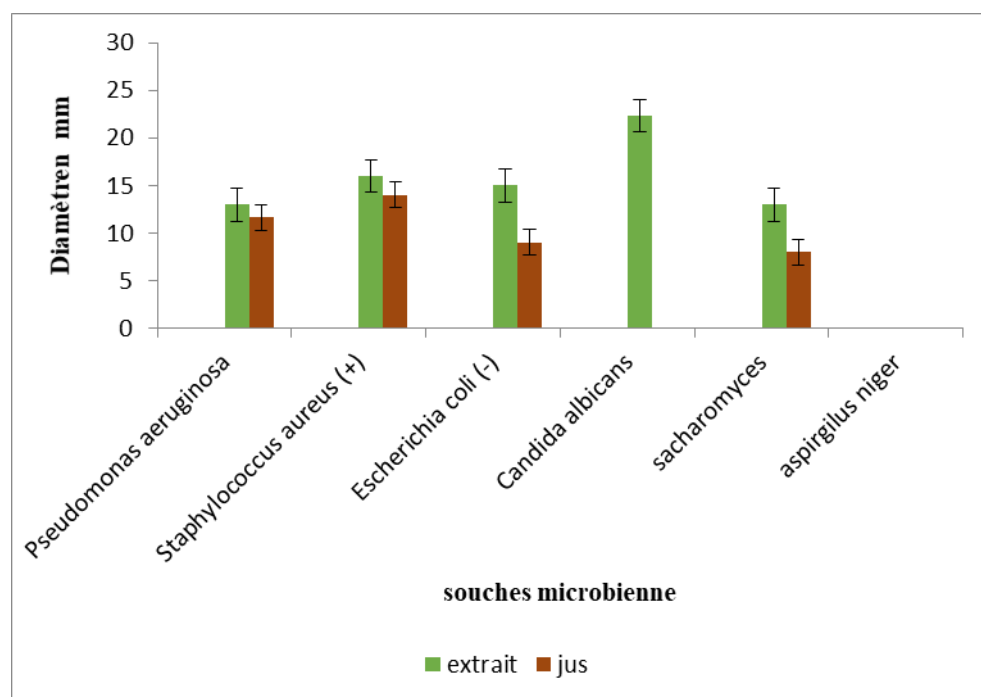
Antibiotique	AMC <sub>3</sub>	CTX <sub>30</sub>	AM <sub>25</sub>	TIC <sub>7</sub>	KZ <sub>30</sub>	NA <sub>30</sub>	CN	FOX <sub>5</sub>	F <sub>30</sub> G	SXT <sub>25</sub>	C <sub>30</sub>	CT <sub>50</sub>	FOX30
<b>Zone d'inhibition (mm)</b>	27	35	28	32	32	31	30	46	30	30	30	21	32

#### IV.2. Pouvoir antimicrobien des extraits des feuilles, graines et du jus

L'étude du pouvoir antimicrobien des différents extraits bruts de la variété Ahmar Bouamar est évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

##### IV.2.1. Effet antimicrobien des polyphénols des feuilles et du jus

Le test antimicrobien a fait ressortir un effet inhibiteur sur la croissance des germes plus au moins important selon la nature de la souche testée (Fig. 39).



**Figure 39.** Zone d'inhibition (mm) de la croissance des souches microbiennes sur milieu Mueller-Hinton et Sabouraud

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Erreur standard. Test de Student: \*  $p < 0,05$

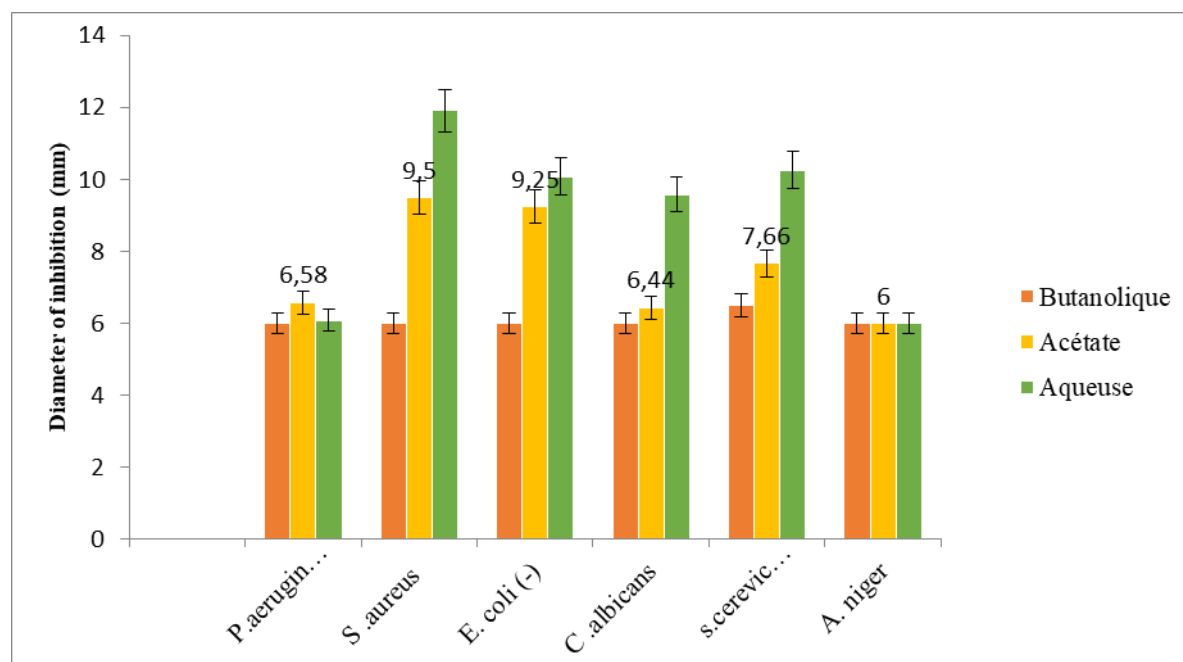
L'action des composés phénoliques de l'extrait des feuilles de la variété Ahmar Bouamar semble avoir exercé un effet inhibiteur sur la majorité de souches étudiées. Le diamètre de la zone d'inhibition varié de  $13 \pm 0,12$  mm à  $22,33 \pm 2,05$  mm. Par ailleurs, la souche bactérienne la plus sensible aux composés phénoliques du jus est *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de  $14 \pm 0,45$  mm. Cependant, aucun effet n'a été manifesté sur la levure et le champignon.

**Amara et al., (2016)**, ont signalés que l'extrait flavonoïdique de la vigne sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*) n'avait aucune action inhibitrice sur *Candida albicans*. Une autre étude menée par **Selka et al., (2016)** sur les extraits méthanoliques des feuilles de *Vitis vinifera* L. provenant des régions de Tlemcen, Aflou et Sidi Bel Abbes, a montré une activité antibactérienne intéressante vis-a-vis d'*E. coli*, *Proteus mirabilis* et *Bacillus cereus*. Ces auteurs n'ont observé aucun effet sur *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. Cette différence est due à la richesse des extraits en composés phénoliques dotés d'une activité antibactérienne.

Enfin, il a été démontré que le resvératrol diminue la biosynthèse de l'ergostérol, principal stérol composant la membrane fongique de *Candida albicans*. Il permet de renforcer l'action d'un antifongique systémique indiqué dans le traitement des candidoses, le fluconazole (Triflucan®) (**Sun et al., 2005**).

#### IV.2.2. Effet antimicrobien des extraits flavonoïdiques (phénols totaux)

Les résultats de l'étude de l'effet antimicrobien des flavonoïdes sont notés sur le tableau suivant :



**Figure 40.** Zones d'inhibition (mm) de la croissance des souches microbiennes vis-à-vis des fractions de l'extrait flavonoïdique.

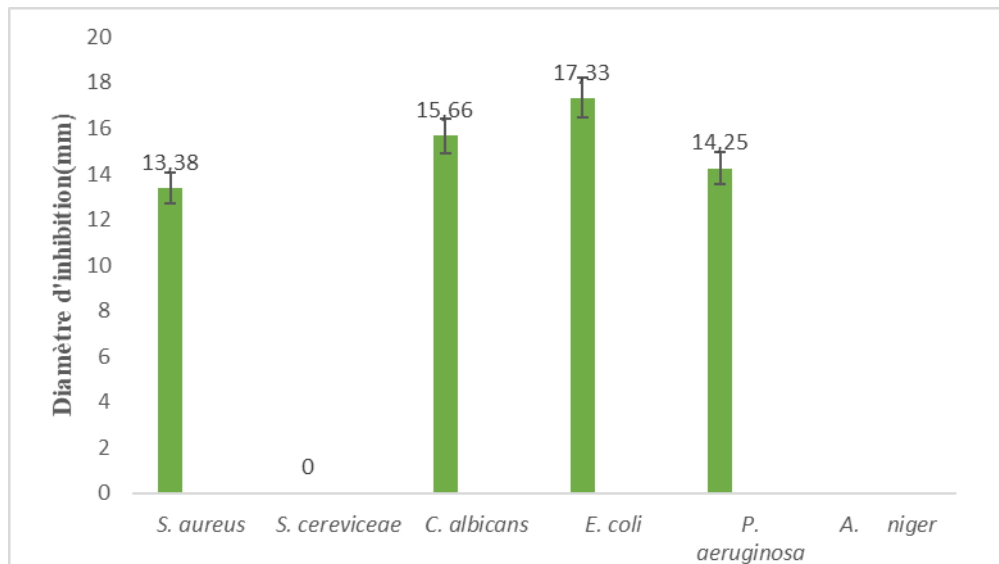
Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Erreur standard. Test de Student: \*  $p < 0,05$

Il est à signaler à travers ce test, que les différentes fractions de l'extrait flavonoïque n'exercent aucun effet sur la majorité des souches testées. Les germes sensibles sont les bactéries *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition maximal de  $11,91 \pm 0,331$  mm (extrait aqueux).

**Gabastan (2018)**, affirme que les stilbènes tétramères (vitisine A, vitisine B), les dimères tels que la viniférine, ampélopsine A, ou bien le monomère resvératrol sont les composés les plus toxiques contre le mildiou. De plus, certaines études (**Amara et al., 2016**) ont révélé une action inhibitrice des flavonoïdes de la vigne possède sur les bactéries à gram négatif, notamment *Helicobacter pylori* et *Chlamydia pneumoniae*.

#### IV.2.3. Effet antimicrobien de l'huile

D'après la figure 41, il a été remarqué que l'huile des pépins agit sur toutes les souches bactériennes testées. Le pouvoir inhibiteur diffère d'une souche à l'autre. L'huile testée est modérément inhibitrice sur *S. aureus* ( $13,38 \pm 0,14$  mm), *P. aeruginosa* ( $14,25 \pm 0,455$  mm) et *C. albicans* ( $15,66 \pm 0,178$  mm), et fortement inhibitrice sur *E. coli* ( $17,33 \pm 0,556$  mm). Cependant, aucun effet n'a été enregistré sur *S. cerevisiae* et *A. niger* (Fig. 41). Dans les travaux de **Jayaprakasha et al., (2003)**, portant sur l'évaluation de l'effet antibactérien des extraits phénoliques de pépins de raisins, ont fait ressortir un pouvoir inhibiteur important. Ces auteurs ont noté que les bactéries Gram + (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* et *Bacillus subtilis*) sont complètement inhibées à des concentrations de 850-1000 ppm, tandis que les bactéries Gram  $^-$  (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) étaient inhibées pour des teneurs de 1250-1500 ppm. Selon **Dhaouadi et al., (2010)**, les différentes classes de polyphénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique (**Bala et al., 2008**). En outre, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation conduit à une augmentation de la toxicité. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques. **Garavaglia et al., (2016)**, ont observé une importante induction de dommages oxydatifs sur la membrane bactérienne, en particulier celle d'*E. coli*.



**Figure 41.** Zone d'inhibition (mm) de la croissance des souches microbiennes testées vis-à-vis de l'huile des pépins

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Erreur standard. Test de Student: \*  $p < 0,05$



## Conclusion et perspectives

---

De nos jours, il y a une volonté générale de se tourner vers une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires. Plusieurs études ont démontré l'importance des composés polyphénoliques de raisin comme une source d'anti oxydation et de chélation de radicaux libres, ces derniers étant à l'origine de plusieurs maladies cardiovasculaires et du développement de plusieurs cancers. Ce regain d'intérêt visant la recherche des variétés de raisin riches en ces composées, nous a poussé à s'intéresser à valoriser les vertus de la variété algérienne locale « Ahmar Bouamar ».

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux et le dosage des flavonoïdes par la méthode d'AlCl<sub>3</sub> dans les différents extraits de la plante a révélé la présence des polyphénols en quantités importantes. Les teneurs en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique sont  $334,18 \pm 2,306$  mg EAG/ g MS pour les feuilles et  $98,9 \pm 3,23$  mg EAG/ g MS pour le jus des fruits. Quant aux flavonoïdes, les teneurs obtenus sont de l'ordre de  $19,73 \pm 0,11$  MEQ/gMs (acétate d'éthyle), de  $24,38 \pm 0,05$  MEQ/gMs (butanolique), et de  $26,41 \pm 0,24$  MEQ/gMs pour l'extrait aqueux (EAQ).

Par ailleurs, il ressort du screening phytochimique que la poudre des feuilles et du jus des baies de la variété Ahmar Bouamar sont riches en flavonoïdes, tanins condensés, anthocyanes, stéroïdes et saponines.

L'analyse chromatographique des polyphénols, flavonoïdes, anthocyanes et huiles a fait ressortir plusieurs composés : 12 polyphénols, 5 anthocyanes et 6 flavonoïdes.

Le potentiel antiradicalaire des extraits a été déterminé *in vitro* par la méthode de DPPH, de réduction de fer et celle de décoloration de la bêta carotène. Les résultats obtenus révèlent une importante activité, relativement similaire à celui du produit standard, l'acide ascorbique. Concernant l'effet antibactérien, l'analyse a fait ressortir un pouvoir antibactérien modéré des extraits de Ahmar Bouamar sur les germes testés. Cependant, *A. niger* a manifesté une résistance totale vis à vis de ces extraits.

Il ressort de cette étude que la variété Ahmar Bouamar est une source importante en possibilités thérapeutiques. Néanmoins, Ce travail reste préliminaire et peu indicatif sur le mécanisme réel par lequel agissent les métabolites étudiés. Par conséquent, la purification et l'identification de ces composés actifs ayant une activité antioxydante et antibactérienne restent fortement recommandée afin d'approfondir d'une manière plus spécifique les différentes actions révélées.

Enfin, les résultats obtenus dans cette étude doivent être répétées et élargis avec d'autres activités biologiques *in vitro et in vivo* afin de confirmer l'impact médicinal des extraits de la

## Conclusion et perspectives

---

variété Ahmar Bouamar et pourquoi pas sa valorisation en tant que cépage autochtone (locale) à double fin.

## Références bibliographiques

---

1. Adams D.O., 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 249-256 p.
2. Addicott F.T.H.R., Carns J.L., Lyox O. E.Smith and J.L.Mc Means, 1964; On the physiology of abscisins. In: *Régulateurs de la croissance végétale*; C.N.R.S. Paris.687-703pp.
3. Afifi, M., El-Kereamy, A., Legrand, V., Chervin, C., Monje, M.C., Nepveu, F., and Roustan, J.P. (2003). Control of anthocyanin biosynthesis pathway gene expression by eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, in grape cell tissue cultures. *J. Plant Physiol.* 160, 971-975 P.
4. Aigrin P., 2003 ; Note de conjoncture mondiale. *Bul. OIV* , 867-868 P.
5. Alfenito, M.R., Souer, E., Goodman, C.D., Buell, R., Mol, J., Koes, R., and Walbot, V. (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathion *S* transferases. *Plant Cell* **10**, 1135-1149 P.
6. Amara N. et Melouk F.Z. (2016). Activité Antimicrobienne des Extraits des Feuilles de la Vigne Sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*). *Algerian Journal of Natural Products*, 4(3) :358 –366p.
7. Amaral J. D., 2000; *O grande livro do vinho*. 2 edição. Circulo de leitores. Lisboa.439p.
8. Ammouche Y., Cherfioui T., 2008 ; Contribution à l'étude phénologique de 41 cépages autochtones de la collection ampélographique de l'ITAFV de Benchicao (Médéa). Thèse d'ing. en Sci. Agro. UMMTO. 84-87-92P.
9. Anderson, D. (2005) A primer oils processing technology. dans: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Eds Shahidi, F., John Wiley & Sons, volume. 51-56 p.
10. Baboni, T. Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. *Chimie*. Université Pascal Paoli, 2006. Français. 56, 72p.
11. Baderschneider B. and Winterhalter P. (2000). Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2681-2686p.
12. Baggiolini, 1952. In Reynier, 2000. *Manuel du viticulteur*. 5ème Edition. J.L. Bailliere, Paris.
13. Baggiolini M, 1952. Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue Romande d'Agricultures et d'Arboriculture* 8, 4-6 p.
14. Baborun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin M., Cazin C. and Pinkas M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts

## Références bibliographiques

---

- from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089p.
15. Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H., Buchbauer, G. (2008) Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 108, 1122-1132 p.
16. Bala A.E.A., Kollman A., Ducrot P.-H., Majira A., Kerhoas L., Leroux P., Delorme R. and Einhorn J. (2000). Cis cviniferin: A new antifungal resveratrol dehydrodimer from *Cyphostemma crotalariodes* roots. *J. Phytopathology*, 148: 29-32p.
17. Balasundram, N., Sundram, K., et Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203p.
18. Baldi a., Romani A., Mulinacci N. (1995). HPLC/MS application to anthocyanidins of *Vitis vinifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2104 p.
19. Bansal, P., Paul, P., Mudgal, J., Nayak, PG., Pannakal, ST., Priyadarsini, KI., Unnikrishnan, MK. (2012). "Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice." *Experimental and Toxicologic Pathology* 64: 651- 658p.
20. Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira ICFR and Baptista P. (2007). Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*., 103: 413-419p.
21. Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R. and Rome, S. 1998 - Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil* 203 (1): 27–36 p.
22. Belmiloud S. (2018). Effet antimicrobien de l'huile de pépins de raisin sur certaines bactéries pathogènes. Mémoire de master. Univ Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. Algérie : 61-62 p.
23. M., Belchior A. P., Spranger M. I., Bourzeix, M. (1992). Oligomeric procyanidins of three grapevine varieties and wines from Portugal. *sciences des Aliments* 12, 223-371P.
24. Blouin J, Guimberteau G, 2000. Maturation et Maturité des Raisins. Bordeaux, France
25. Benmeziane, F. 2015. Effet de la nature du sol sur la teneur en antioxydants de quelques variétés de raisin de la région d'El-Tarf. Thèse de doctorat, pp 80-98.
26. Boukharta M., Girardin M., Metche M. (1988). Procyandines galloylées du sarment de la vigne (*Vitis vinifera*): séparation et identification par chromatographie liquide à haute

## Références bibliographiques

---

- performance et chromatographie en phase gazeuse. *Journal of Chromatography* 455, 406-9 p.
27. Bourzeix, M., Escudier, J. L., Mourgues, J. (1998) Produits de diversification. dans: *Oenologie : Fondements Scientifiques et Technologiques*. Eds Flanzy, C., Tec&Doc, Paris, France, pp 1144-1174p.
28. Baustita O., Fernandez F. Lopez R. and Gomes P. (2007). The effects oenologique practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine color and their dependence on grope characteristic. *Journal of food composition and analysis*, 20: 546-552 p.
29. Bouzrara, H. (2001) Amélioration du pressage de produits végétaux par champ électrique pulsé. Cas de la betterave à sucre Thèse de doctorat, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, 178 p.
30. Bozin B., Mimica-Dukic N., Bogavac M., Suvajdzic L., Simin N., Samojlik I. and Couladis M. (2008). Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* Scheele Essential oils. *Molecules*, 13 : 2058-2068p.
31. Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie-Plantes médicinales* (3è éd). Paris: Techniques et documentations. 1120p.
32. Bruneton J. (2008). *Acides phénols. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris, 1118p
33. Burns J, Peter T, Gardner, O'Neil J, et al. (2000) Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines *J Agric Food Chem* 48: 220-30p.
34. Cabanis, J. C., Cabanis, M. T., Cheynier, V., Teissedre, P. L. (1998) Caractérisation de la matière première et des produits élaborés. Dans: *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques*. Eds Flanzy, C., Lavoisier, Tec & Doc, Paris, pp 291-336p.
35. Cadot Y., Caillé S., Samson A., Barbeau G. & Cheynier V., 2012. Sensory representation of typicality of Cabernet franc wines related to phenolic composition: impact of ripening stage and maceration time. *Analytica Chimica Acta*, 723, 91- 99p.
36. Cadot, Y., Chevalier, M. & Barbeau, G. (2011). Evolution of the localisation and composition of phenolics in grape skin between veraison and maturity in relation to water availability and some climatic conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 91, 1963–1976p.
37. Cao G., Sofic E. and Prior R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*, 22(5): 749-760p.

## Références bibliographiques

---

38. Champagnol F., 1984. Elément de physiologie de la vigne et de la viticulture générale.
39. Carmona MJ, Chaïb J, Martinez-Zapater JM, Thomas MR (2008) A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of Experimental Botany* 59:2579-2596 p
40. Celiktas, OY., Hames Kocabas, E E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek T. et Baser, K H C.(2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Ed. Food Chem*,100 (2),553-559 p.
41. Cheng, Z. et al. (2018). Chemometric analysis of the volatile compounds generated by *Aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes and dried vine fruits. *Toxins* 10, 71 p.
42. Cheynier V, Duenas-Paton M, Salas E, Maury C, Souquet JM, Sarni-Manchado P, Fulcrand H(2006) Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 298-305p.
43. Cheynier, 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 la vinification. *Analisis*, 25(3), M14-M21.
44. Chira, K., Suh, J.-H., Saucier, C., and Teissedre, P.-L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* 6, 75-82. 32 p.
45. Chira, K. (2009). Structures moléculaire et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet-Sauvignon, Merlot) du Bordelais. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 2, France.
46. Coombe B.G. and M.G. McCarthy, 2000.; Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of grape and wine research* 6: 131-135 p.
47. Czank C, Cassidy A, Zhang Q, Morrison DJ, Preston T, Kroon PA, et al. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a (13)C-tracer study. *Am J Clin Nutr.* mai 2013;97(5):995-1003P.
48. Crozier A, (2003). Classification and biosynthesis of secondary plant products: An overview. In: Goldberg G (ed) *Plants: Diet and Health*. British Nutrition Foundation, Chapman Hall, Londres, . 27-48 P.
49. Cushnie T.T. and Lamb A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial*, 26(5): 343-356 p.
50. Dani, C., Oliboni, L.S., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M. & Henriques, J.A.P. 2007. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured

with organically- or conventionally- produced grapes. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2574–2580p.

51. Du, B., He, B.J., Shi, P.B., Li, F.Y., Li, J. & Zhu, F.M. (2012). Phenolic content and antioxidant activity of wine grapes and table grapes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(17), 3381-3387p.

52. Dunford, N. T. (2004) Utilization of supercritical fluid technology for oil and oilseed processing. dans: *Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing*. Eds Dunford N.T. and Dunford H. B., AOCS Publishing, Champain, Illinois, USA, 100-116p.

53. Dijkstra, A., Segers, J. (2007) Production and refining of oils and fats. dans: *The Lipid Handbook with CD-ROM, Third Edition*. Eds Harwood, J. L., Gunstone, F.D., Dijkstra, A.D., CRC Press, pp 143-262p.

54. Dhaouadi, K., Raboudi, F., Estevan, C., Barrajon, E., Vilanova, E., Hamdaoui, M. et Fattouch, S. (2010). Cell viability effects and antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian date syrup (Rub El Tamer) polyphenolic extracts. *J. Agric Food Chem*, Vol. (59), 402- 406p.

55. El Darra N., Tannous J., Bou Mouncef P., Palge J., Yaghi J., Vorobiev E., Louka N. and Maroun R.G. (2012). A comparative study on antiradical and antimicrobial properties of red grapes extracts obtained from different *Vitis vinifera* varieties. *Food and Nutrition Sciences*, 3: 1420-1432p.

56. EL -haci (2012). Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales endémique de l'Algérie : *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., *Anabasis aretioides* Moq. & Coss. et *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. Thèse de doctorat de Tlemcen. 211 p

57. Escribo-Bailon M. T., Guerra M. T., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C. (1995). Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 200, 221-4p.

58. Favier A. (2003). Le stress oxydant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques*. 12p.

59. Favier A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales de Biologie Clinique*, 64(6) : 390-396 P.

60. Fang, J.-G. et al. (2002). Antioxidant effects of resveratrol and its analogues against the free radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 8, 4191–4198 p.

## Références bibliographiques

---

61. Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., et Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379p.
62. Flanzy, C. 1998. Œnologie fondements scientifiques et technologiques. Ed. TEC & DOC, 1311 p.
63. Ferhi S., Santaniello S., Zerizer S., Cruciani S., Fadda A., Sanna D., Dore A., Marioli M. and D'hallewin G. (2016). Total Phenols from Grape Leaves Counteract Cell Proliferation and Modulate Apoptosis Related Gene Expression in MCF-7 and HepG2 Human Cancer Cell Lines. *Molecules*, 24 (612): 2-15p .
64. Fernandez P, Hilker M. 2007. Host plant location by Chrysomelidae. *Basic and Applied Ecology*. 8(2):97–116p.
65. Fernandes L., Casal S., Cruz R, José Alberto Pereira AJ., Ramalhosa E., 2012. Seed Oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International*. Portugal .50 (2013) 161-166p.
66. Frankel E., Kanner J., German J. B., Parks E., Kinsella J. E. (1993). Inhibition of oxidation of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 341, 454-457p.
67. Frankel E.N. and Meyer AS. (2000). The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.*, 80(13): 19-25 p.
68. Gabaston J. (2018). Stilbènes de la vigne et d'essences forestières (pin, épicéa) : Etude hytochimique et recherche d'activités anti-oomycète et insecticide. *Biologie végétale*. Université de Bordeaux, 2018. Français.121-153p.
69. Garavaglia, M. M. Markoski, A. Oliveira, et A. Marcadenti. (2016) .Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health, *Nutr. Metab. Insights*, vol. 9, 59-64p.
70. Galet., P., 1998. Précis de viticulture. 7 eme ed. Déhan. Montpellier. 561p.
71. Garcia-Jares, C., Vazquez, A. Lamas, PJ., Pajaro, M., Alvarez-Casas, M., Lores, M (2015). Antioxidant White Grape Seed Phenolics: Pressurized Liquid Extracts from Different Varieties. *Natinal library of medicine* .Antioxidants 2015, 4(4), 737-749 p.
72. Gros, C. (2005) Extraction aqueuse et athermique de l'huile de lin assistée par décharges électriques de haute tension. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, 244p.

## Références bibliographiques

---

73. Guebailia H. (2007). Polyphénols des sarments et des rafles de la Vigne (*Vitis vinifera* L.) et du vin, purification, dosage et activités biologiques. Thèse de Doctorat en chimie, Univ d'Annaba, Algérie, 123-141p.
74. Guerrero F.G., Liazid A., Palma M., Puertas B., González-Barrio R., Gillzquierdo A., García Barroso C. and Cantos-Villar E. (2009). Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, 112: 949- 955p.
75. Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4): 162-169p.
76. Ghouila Z., Laurent S., Henoumont C., Vander Elst L., Muller R.N. and Baaliouamer A. (2016). Rich extract on total polyphenols and antioxidant activity obtained by conventional and non-conventional methods from Ahmer Bouamer grape seed. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 8(3) : 692-711p.
77. Gandhi, A. P., Joshi, K. C., Jha, K., Parihar, V. S., Srivastav, D. C., Raghunadh, P., Kawalkar, J., Jain, S. K., Tripathi, R. N. (2003) Studies on alternative solvents for the extraction of oil – I soybean. *International Journal of Food Science & Technology*, 38, 369-375 p.
78. Gonçalves, J. L. S., Leitão, S. G., Delle Monache, F., Miranda, M. M. F. S., Santos, M. G. M., Romanos, M. T. V., et Wigg, M. D. (2001). In vitro antiviral effect of flavonoidrich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine*, 8(6), 477-480 p.
79. Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Zoecklein, B., Zhou, K. 2009. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes, *LWT. Food Science and Technology*, 42: 1269-1274p.
80. Huglin P. et Scheider T., 1998. *Biologie et écologie de la vigne*. Ed. payot. Lausanne. 370 p.
81. Halliwell, A., Gutteridge, JMC. (1990). "The antioxidant of human extracellular fluids." *Archives of biochemistry and biophysics* 280: 1-8 p.
82. Hemingway R. W., McGraw G. W. (1983). Kinetics of acid-catalysed cleavage of procyanidins. *Journal of Wood. Chemistry and Technology* 3(4), 421-35 p.
83. Icardo da silva j.m., Darmon n., Fernandez Y., Mitjavila S.; Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds; *J.Agric. Food Chem.*, 1991, 39, 1549-1552 p.

## Références bibliographiques

---

- 84.I.N.R.A., 2007. Botanique de la vigne : Position taxonomique, Présentation de la biodiversité des Vitacées et de *Vitis vinefera*. Réalisation G.L.L, équipe communication I.N.R.A.Montpellier.6p.
85. Iserin P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. London, ypoly Edith Ybert, Tatiana Delasalle- Feat, 335p.
- 86.Jayaprakasha GK, Selvi Tamil, Sakariah KK (2003) Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res Intern* 36: 117-22.
- 87.Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., et Vivanco, J. M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food chemistry*, 83(4), 547-550 p.
- 88.Jourdes M. (2003). Réactivité, synthèse, couleur et activité biologique d'ellagitannins cglycosidiques et flavano-ellagitannins. Thèse de doctorat en chimie organique. Université bordeaux. École doctorale des sciences chimiques.29 p.
89. Jakobek L., Seruga M., Medvidovic-Kosanovic M. et Novak I. (2007). Antioxidant Activity and Polyphenols of Aronia in Comparison to other Berry Species. *Agriculturae Conspectus Scientifi cus*. 72 : 301-306p.
90. Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W., Fong H.H., Farnsworth N.R., Kinghorn, A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218-220 p .
- 91.Jean-Denis J.B. (2005). Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk. And Curt.). Thèse de Doctorat, Univ. de Neuchâtel, 284p.
- 92.Johnson, L. (2002) Recovery, refining, converting, and stabilizing edible fats and oils. dans: *Food Lipids*. Eds Akoh, C., Min, D., Marcel Dekker, New York, USA 206-241p.
93. Kammerer D., Achim C., Reinhold C. and Andreas S. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4360- 4367p.
- 94.Kappel, C. D. (2010). Biologie intégrative du métabolisme de la baie de raisin. Thèse de doctorat, Université de Vector Segalen Bordeaux. 177p
- 95.Katalinic V., Mozina S.S., Generalic I., Skoza D., Ljubenkov I. and Klančnik A. (2010). Phenolic Profile, Antioxidant Capacity, and Antimicrobial Activity of Leaf

## Références bibliographiques

---

- Extracts from Six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties*, 16 (1): 45-60 p.
96. Kawabata J., Ichikawa S., Kurihara H. et Mizutani J. (1989). Kobophenol A, a unique tetrastilbene from *Carex kobomugi* Ohwi (Cyperaceae). *Tetrahedron Letters*, 30(29): 3785-3788 p.
97. Konstantinos Giannoukos<sup>1</sup>, Stamatios Giannoukos<sup>2\*</sup>, Christina Lagogianni<sup>3</sup>, Dimitrios I. Tsitsigiannis<sup>3</sup> & Stephen Taylor<sup>1,4</sup>p.
98. Kayser O. (1997). "Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. *Planta Med.*, 63(6): 508-10p.
99. Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD (2000). Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr* 130: 53-61p.
100. Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L., 2000. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55, 77-85p.
101. Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L., 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 53, 268–274p.
102. Kemper, T. G. (2005) Oil extraction. dans: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Edible Oil and Fat Products: Processing Technologies*. Eds Shahidi, F., John Wiley & Sons, Inc., 5, 57-98 p.
103. Kimura Y. et Okuda H. (2000). Effects of naturally occurring stilbene glycosides from medicinal plants and wine, on Tumor growth and Lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing Mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52: 1287-1295p.
104. Kimura Y. (2005). New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants. *In Vivo*, 19(1): 37 -60 p.
105. Kubola, J., Siriamornpun, S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf stem and fruit fraction extracts in vitro, *Food Chemistry*, 2008, Vol. 110; 881-890p.
106. Langcake, P. (1981). Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin,  $\alpha$ -viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* 18, 213–226 p.
107. Lacaille-Dubois M.-A., Wagner H. (1996). Importance pharmacologique des dérivés phénoliques. *Acta Botanica Gallica* 143(6), 555-62 p.
100. Lairon D., Amiot M.J. (1999). Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Curr Opin Lipidol*, 10 p.

## Références bibliographiques

---

- 108.Langcake P. and Pryce R.J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.*, 9: 77-86 p.
- 109.Langcake P. and Pryce R.-J. (1977). A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, 33: 151-152 p.
- 110.Latif, S. (2009) Analytical investigation to compare the enzyme-assisted extraction of vegetable oils with conventional methods. PhD, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan, 190 p.
- 111.Lebon G, Wojnarowicz G, Holzappel B, Fontaine F, Vaillant-Gaveau N, Clément C (2008) Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J Ex Bot* 59(10): 2565-2578p.
112. Lee O-H. and Lee B-Y. (2003). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101(10): 3p
113. Li W.W., Ding L.S., Li B.G. and Chen Y.Z. (1996). Oligostibenes from *Vitis heyneana*. *Phytochemistry*, 42: 163-165p.
- 114.Macheix, J.J., A., Fleuriet, A. et Jay -Allemand, C. (2005). Nature et diversité des composés phénoliques des végétaux. In : Les composés phénoliques des végétaux. Ed : Technique et documentation. Lavoisier. 10-15p.
115. Maier T., Schieber A., Kammerer D.R. and Carle R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 112: 551-559 p.
- 116.Makris D.M., Boskou G. et Andrikopoulos N.K. (2006). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-product employing water/ethanol mixtures. *Bioresources Technology*.
117. Matthäus, B. (2012) Oil technology dans: Technological Innovations in Major World Oil Crops, volume 2. Eds Gupta, S. K., Springer, New York, USA, 23-92 p.
118. Maugé, C. (2010). Biosynthèse des Flavan-3-ols chez *Vitis vinifera*: structure, mécanisme catalytique et première approche cinétique de la leucoanthocyanidine réductase. Thèse de doctorat en sciences de la vie et de la santé, Université de Bordeaux. 270p
- 119.Mebarki A.,(2010 ).La région du Maghreb face à la rareté de l'eau. L'exemple du défi algérien : mobilisation et gestion durable des ressources. ICID+18 2nd International

## Références bibliographiques

---

- Conference « Climate, Sustainability and Development in semi-arid regions» August 16-20, 2010, Fortaleza - Ceará, Brazil.
120. Moreira, M.R.; Ponce, A.G.; Delvalle, C.E.; Roura, S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen. (2005) pp. 565-570 p.
121. Morin, O. (1992) Sources et monographies des principaux corps gras. Dans: Manuel des Corps Gras. Eds Karleskind, A., Tec&Doc, Paris, France, Tome 1, pp 116-316 p.
122. Mullins M.G., Bouquet A., Williams L.E., 1992. Biology of grapevine: Cambridge University Press.
123. Muniglia L., G., M., Piffaut, B., Ricochon, G. (2009) Procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huile et de protéines à partir de matière végétale. Brevet français FR 09 57274.
124. Núñez, V., Monagas, M., Gomez-Cordovés, M.C., and Bartolomé, B. (2004). Vitis vinifera L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. Postharvest Biol. Technol. 31, 69-79.
125. Ojeil, A. N. El-Darra, Y. El-Hajj, P.M. Bou, T.J. Rizk, R.G. Maroun, Lebanese Science J., 2010: 11- 2p .
126. Orallo F. (2006). Comparative Studies of the Antioxidant Effects of Cis- and Trans-Resveratrol., Curr. Med. Chem., 13, 87-98 p.
127. Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, 44(6), 307-315p.
128. pantelic, M., Dabic, D., Davidovic, S., Todic, S (2016). Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia. Food Chemistry 211(15 November 2016):243-252 p.
129. Parker TL, Wang XH, Pazmino J, Engeseth NJ (2007) Antioxidant capacity and phenolic content of grapes, sun-dried raisins, and golden raisins and their effect on ex vivo serum antioxidant capacity. J Agric Food Chem 55: 8472-77 p
130. Pham-Huy LA., He H & Pham-Huy C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health, International Journal of Biomedical Science, 4 : 89-96 p.
131. Piver B., Berthou F., Dreano Y. and Lucas D. (2003). Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by c-viniferin, the dimer of resveratrol : comparison with resveratrol and Polyphenols from alcoholised beverages. Life Sci., 73: 1199- 1213p
132. Privat C., Telo JP. and Bernardes-Genisson V. (1976). Antioxidant properties of transepsilon- viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and no aqueous media. J. Agric. Food Chem., 50: 1213- 1217p.

## Références bibliographiques

---

133. Prieur C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M (1994) . Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 36(3), 781-4p.
134. Plumb G. W., De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C. (1998). Antioxidant properties of catechins and procyanidins: effect of polymerization, gallylation and glycosylation. *Free Radical Research* 29, 351-8 p..
135. Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 1-11 p.
136. Raaman N. (2006). *Phytochemical techniques*. Ed. Publishing Agency, New Delhi, 306p.
137. Rombaut, N (2013). Etude comparative de trois procédés d'extraction d'huile : aspects qualitatifs et quantitatifs : application aux graines de lin et aux pépins de raisin. Thèse de doctorat, Université de Technologie Compiègne, France. 158.207 p.
138. Ribereau-Gayon P., (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. .210p
139. Remy S. (1999). *Les tannins du vin rouge : caractérisation de structures natives et dérivées*. Thèse de l'INRA (Montpellier).
140. Revilla, E., Garcia-Beneytez, E., Cabello, F., Martin-Ortega, G. & Ryan, JM. (2001). Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, 915, 53–60 p.
141. Rock E. (2003). *Stress oxydant, micronutriments et sante*. Université d'été de Nutrition Clermont-Ferrand, 35-38p.
142. Reynier, A. (2007). *Manuel de viticulture*. Paris : Edit, Tec. doc. 532 p
143. Saeed, N., Khan, M. R., et Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 221p.
144. Selka, M.A., Chenafa, A., Achouri, M.Y., Aoued, L., Tareb, S., Nourredine, M.A., Toumi, H. *Activité, antimicrobienne et antioxydante des feuilles de Vitis vinifera* L. *Phytothérapie* DOI 10 (2016) 1-7 p.
145. Sultanbawa M., Surendrakumar S., Wazeer M. I. M. (1981). Novel resveratrol tetramer, Vaticaffinol, from *Vatica affinis* Thw. (Dipterocarpaceae). *Journal of the American Society Chemical Communications*, 1204-6 p.
146. Souquet J. M., Cheynier V., Brossaud F., Moutounet M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 43(2), 509-12 p.

## Références bibliographiques

---

147. S. Sun, Y. Gao, X. Ling, et H. Lou. (janv. 2005). The combination effects of phenolic compounds and fluconazole on the formation of ergosterol in *Candida albicans* determined by high- performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, vol. 336, n =1, 39-45p.
148. Sun, T.; Powers, J.R.; Tang, J. Evaluation of the antioxidant activity of bioccoli and their juices. *Food chem*, 105, (2007) . 101-106p.
149. Tanaka T., Inuma M., Murata H. (1998). Stilbene derivatives in the stem of *Parthenocissus quinquefolia* , *Phytochemistry*, Volume 48, 1045-1049 p.
150. Teissedre P. L., Frankel E. N., Waterhouse A. L. (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidant from grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70, 55-61p .
151. Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A., 2005; Activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey." *Food Chemistry* 90: 685-689 p.
152. Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, HA., and Sokmen, A. (2005). "In vitro antioxidantof methanolextracts of five allium species from Turkey." *food chemistry*, 92-89 A 35 p.
153. This P., Cuisset C., et Boursiquot J.R., 1997. Development of stable RAPD Markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48,(4), 492-501 p.
154. Ulrich S., Wolter F. and Stein M. (2005). Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 452-461 p.
155. Vigor C. ; Crauste C. ; Vercauteren J., « Vin blanc et santé. Un vin qui n'a pas « à rougir » de sa couleur ». *ibmm université montpellier*, 2013 : 210-213p.
- 156.147. Villa P., 2005 ; *La culture de la vigne*. Ed Vecchi S.A. Montmartre. 75002 Paris. 151p.
157. Vivas, N., Vivas De Gaulejac, N., & Nonier, M.F.(2003). Estimation and quantification of wine phenolic compounds. *Bulletin De L'O.I.V.*, 16, 282 – 303 p.
158. Waffo-Téguo P., Lee D., Cuendet M., Mérillon J. M., Pezzuto J. M. and Kinghorn A. D. (2001). Two new stilbene dimer glycosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *J. Nat. Prod.*, 64: 136-138p.
159. Waterhouse A. L., Lamuela-Raventos R. M. (1994). the occurrence of piceid, a stilbene glycoside in grape berries *Phytochemistry*, 37, 571-573 p.

## Références bibliographiques

---

160. Waterhouse A.L. and Teissedre P.L. (1997). Levels of phenolics in California varietal wines, in ACS Symposium, Series 661, Wine, Nutrition and Therapeutic Benefits. Edited by Tom. Watkins, 12-23 p.
161. Wan, P. J., Hron, R. J., Dowd, M., Kuk, S., Conkerton, E. J. (1995) Isohexane as an alternative hydrocarbon solvent. *Oil Mill Gaz*, 100, 28-32 p
162. Wang, L., & Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Techno.*, 17, 300-312. differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, 915, 53–60 p.
163. Winkler A.J., 1974. *Viticultura*. Compañía Editorial Continental, S.A., Mexico. 792p.
164. Berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* 105, 319-330 p.
165. Williams, M. A. (2005) Recovery of oils and fats from oilseeds and fatty materials. dans: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products : Processing Technologies*. Eds Shahidi, F., John Wiley & Sons, Inc., 99-189p.
166. Willems, P. (2007) Gas assisted mechanical expression of oilseeds. PhD, University of Twente, Twente, Netherlands, 104 p.
167. Xu C., Zhang Y., Wang J. and Lu J. (2010). Extraction, distribution and characterization of phenolic compounds and oil in grape seeds. *Food Chemistry*, 122: 688-694 p.
168. Yang J., Martinson T.E. and Liu R.H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116: 332-339 p.
169. Zhang, F., Rhee, K. C., Koseoglu, S. S. (2002) Isopropyl alcohol extraction of cottonseed collets: efficiency and performance. *Journal of Food Lipids*, 9, 147-160 p.
170. Zhu, L., Zhang, Y. & Lu, J. (2012). phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3492-3510 P.

## Annexe 1 :

### Composition du milieu Mueller-Hinton :

Extrait de viande de bœuf : 2.0g.

Peptone de caséine : 17.5g.

Amidon de maïs : 1.5g.

Agar : 17.0g.

pH : 7.4.

### Composition du milieu Sabouraud :

Peptone : 10,0 g.

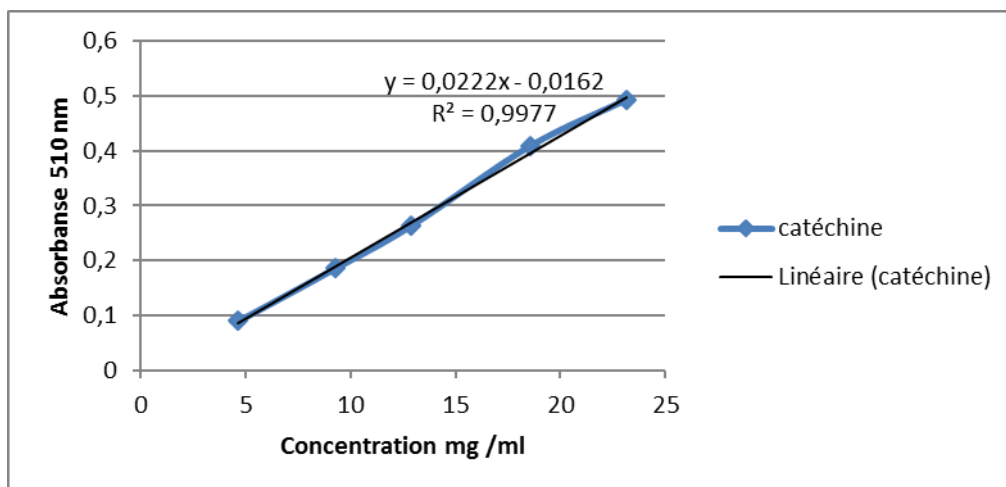
Glucose massé : 20,0 g.

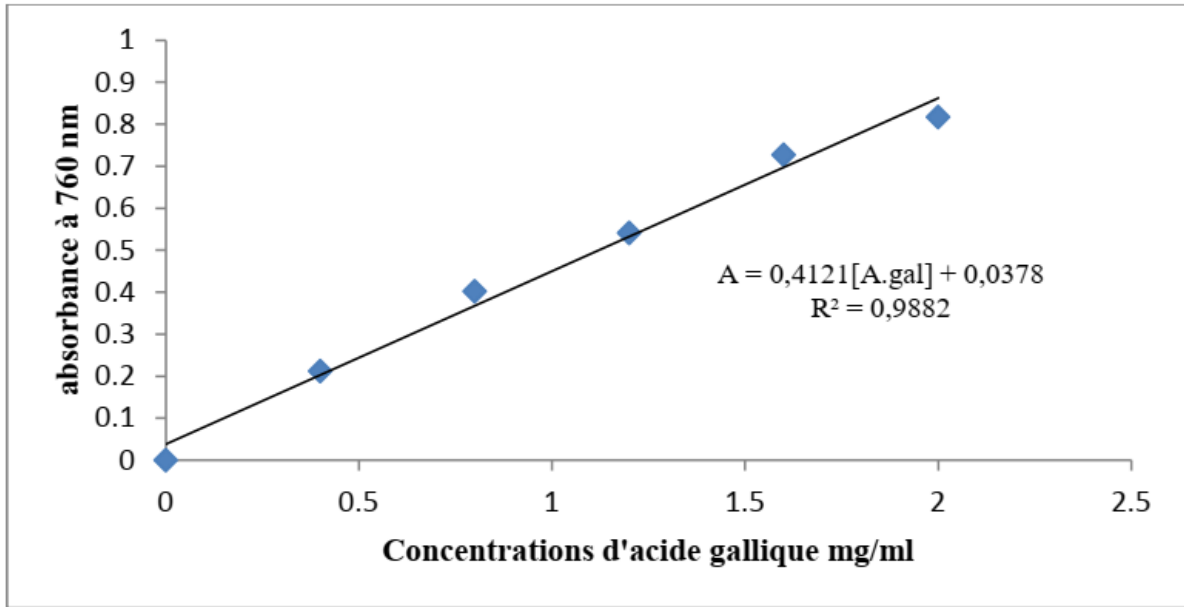
Agar : 15,0 g.

pH = 6,0.

## Annexe 2 :

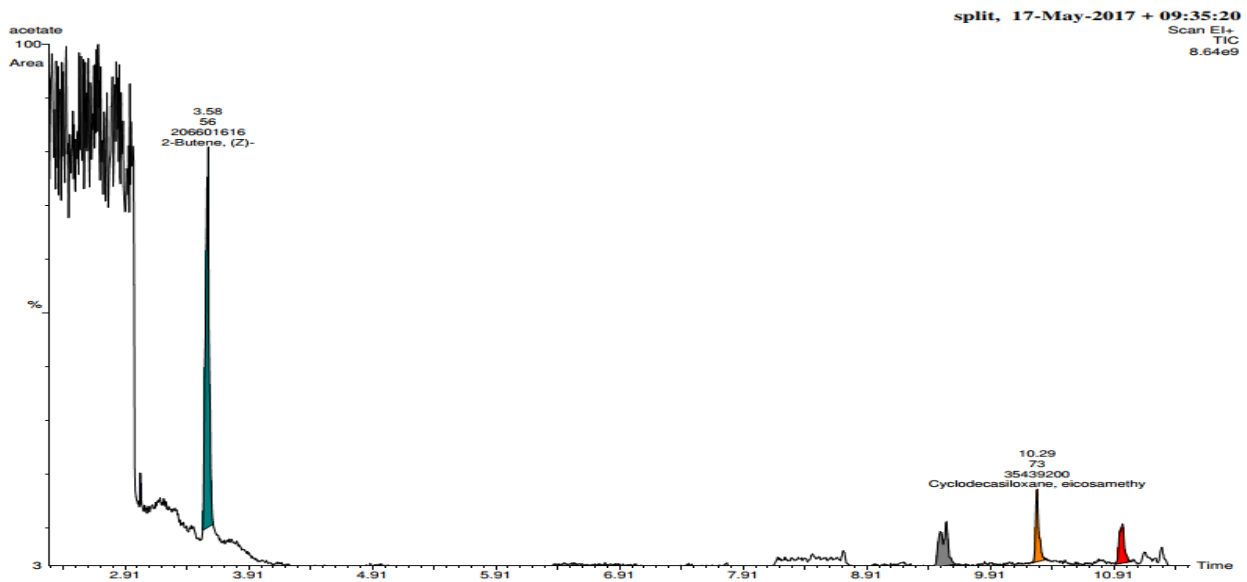
**Figure 1.** Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes



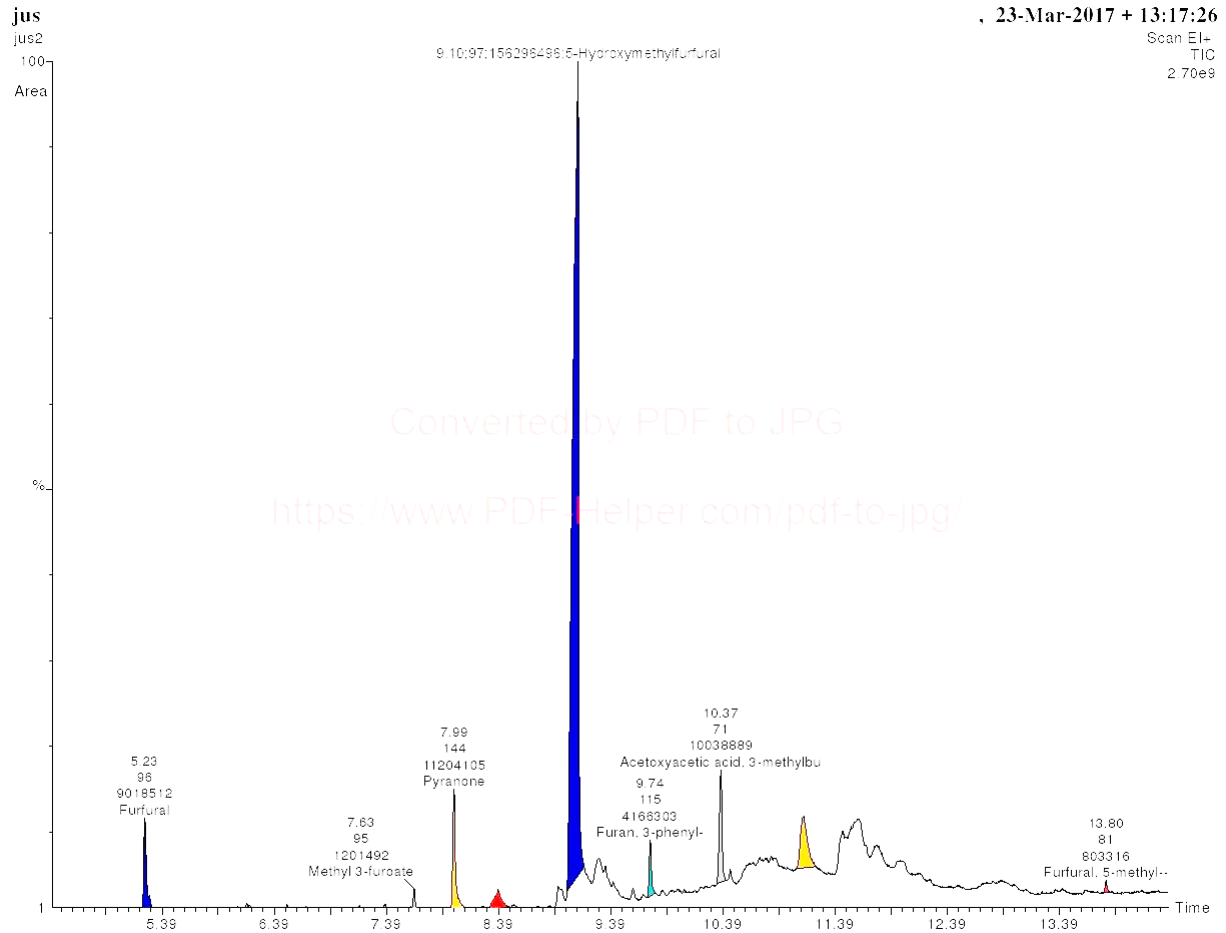


**Figure 3:** courbe étalon d'acide gallique

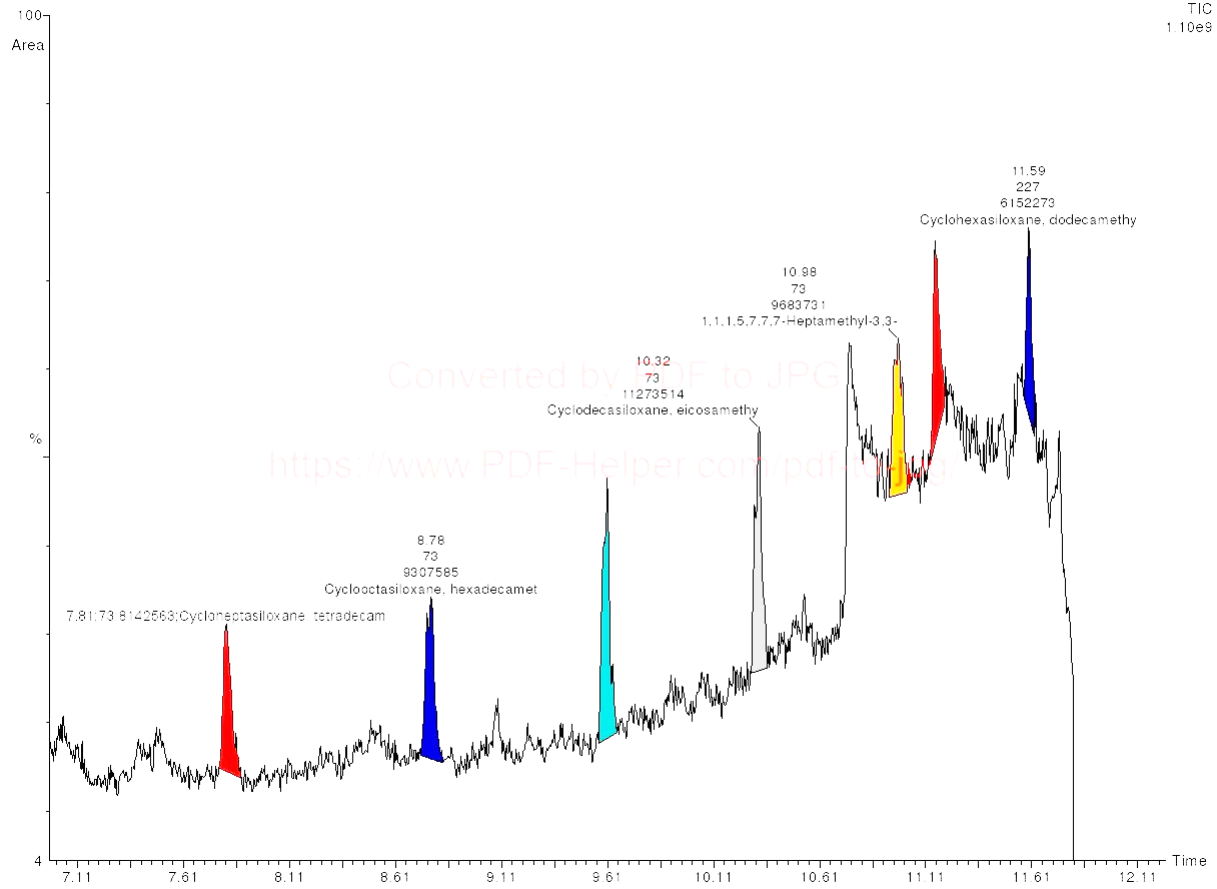
Annexes 3: Les chromatogrammes GC- MSdes extraits et fractions de la variété Ahmar Bouemar



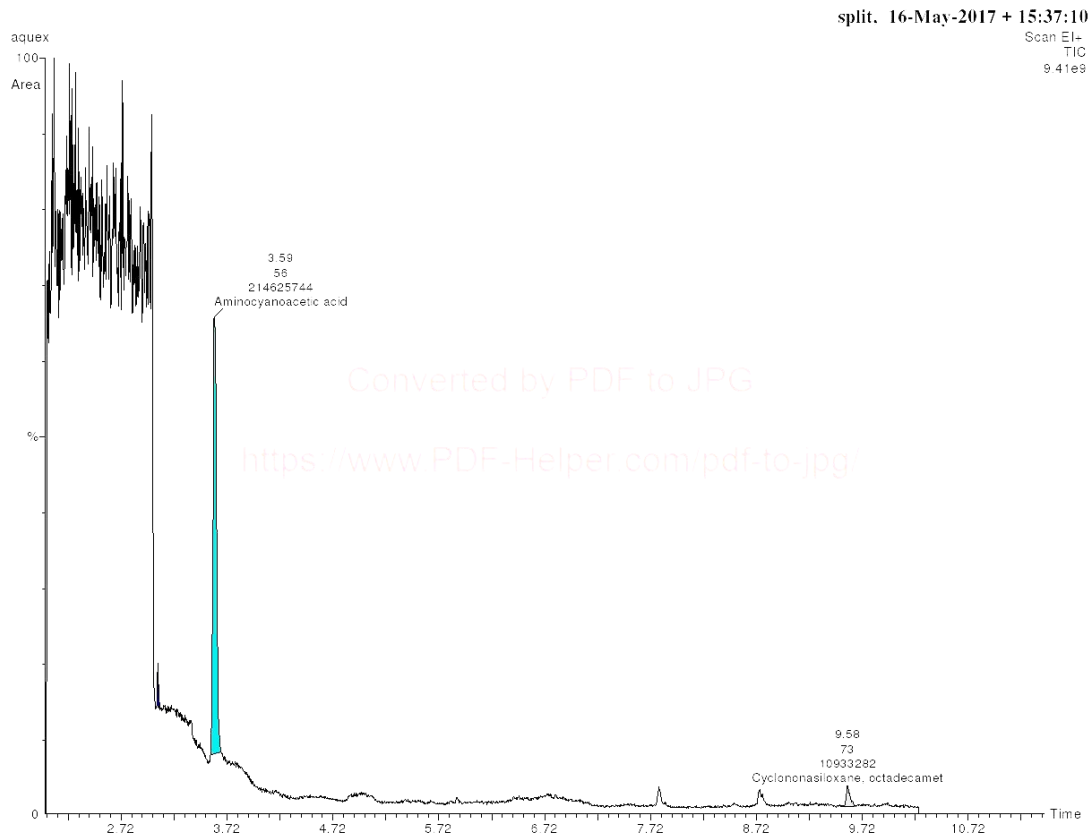
**Figure 1.** GCMS chromatogramme de la fraction AD



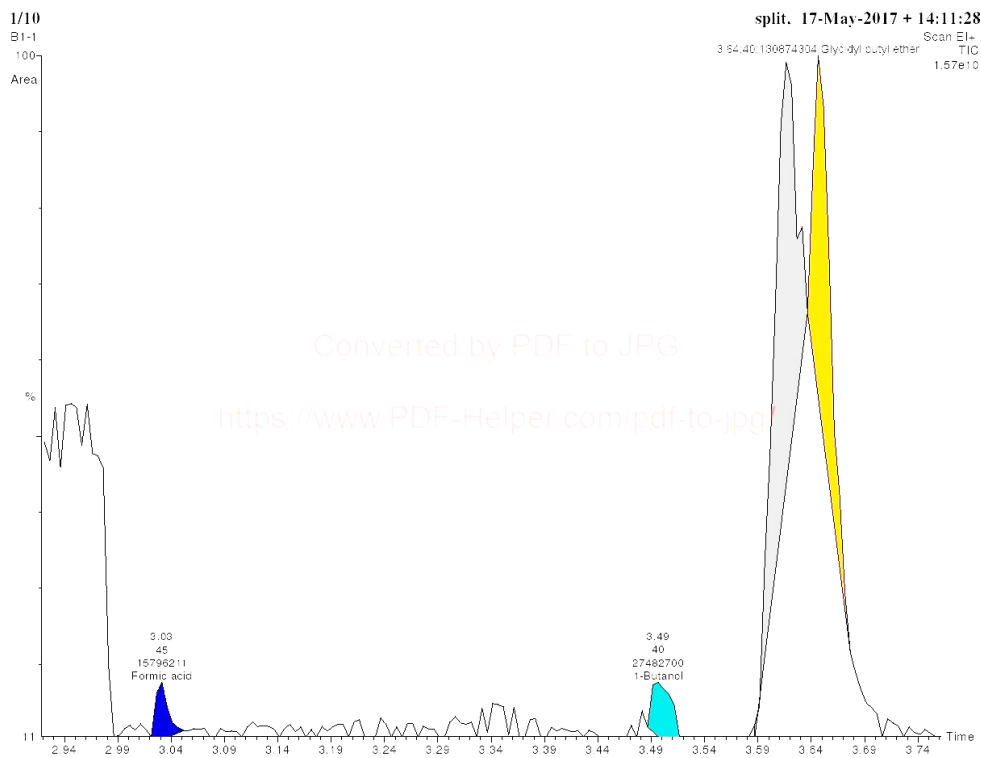
**Figure 2. GCMS chromatogramme de jus**



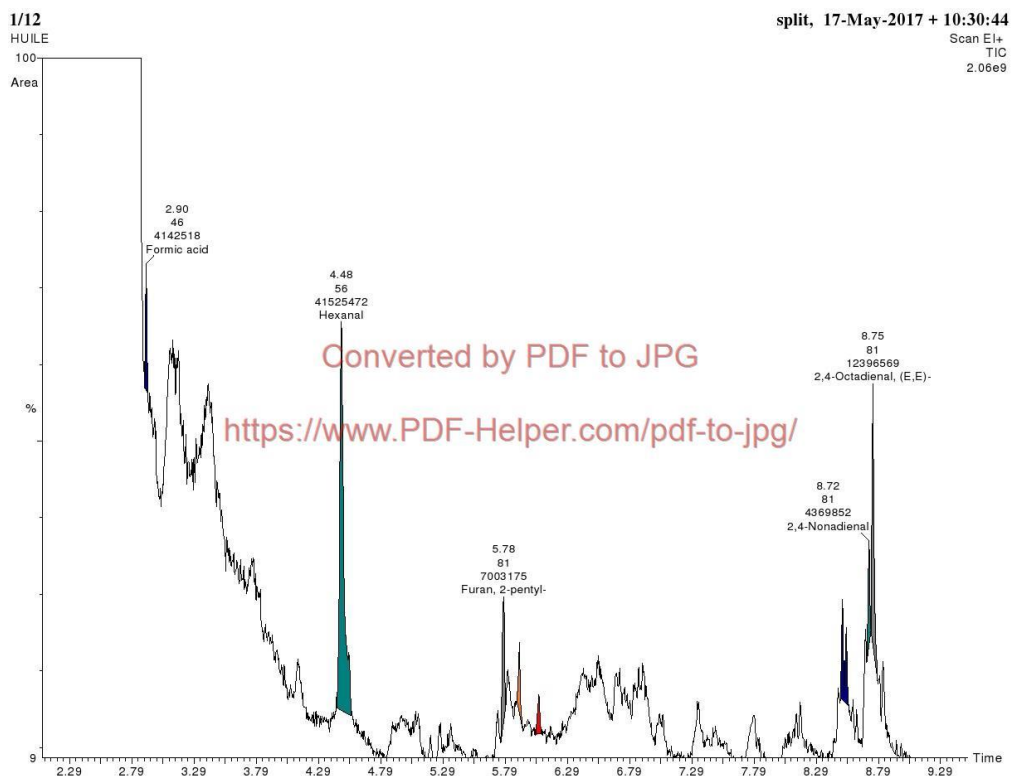
**Figure 3.**GCMS chromatogramme de l'extrait méthanolique des feuilles



**Figure 4.** GCMS chromatogramme de l'extrait aqueux



**Figure 5.** GCMS chromatogramme de la fraction butanolique



**Figure 6.** GCMS chromatogramme de l'huile des pépins

#### Annexe 4

**Tableau 1 :** la moyenne des absorbance des trois essais en fonction des concentrations des fraction flavonoïdique et l'huile à 515 nm

concentration mg /ml	huile	acétate	Butanolique	Aqueuse	Acide Ascorbique
0,0625	9,79	7,58	21,91	7,4	28,01
0,125	18,27	15,7	33,01	14,8	44,31
0,25	28,01	38,26	44,1	22,7	68,01
0,5	47,6	57,15	60,89	35,3	76,23
1	51,16	72,9	72,08	45,6	82,31

**Tableau 2** : la moyenne des absorbance des rois essais des extraits (l'huile , phase acétate d'éthyle , phase butanolique et phase aqueuse ) par la méthode FRAP à 700nm

concentration mg/ml	butanolique	acétate	aqueuse	acid ascor	huile
0,0625	0,121	0,01233333	0,099	0,055	0,74733333
0,125	0,122	0,02166667	0,16	0,162	0,95233333
0,25	0,177666667	0,163	0,47266667	0,314	1,511
0,5	0,749	0,18033333	1,253	0,463	1,835
1	1,14666667	0,416	2,35733333	0,603	3,695

**Tableau 3** : la moyenne des trois essais d'absorbance du  $\beta$ -carotène à 470 nm en présence des fractions flavonoidiques ,l'huile, l'acide ascorbique et le contrôle négatif.

	temps	Acétate	Butanolique	Aqueuse	Huile	contrôle	acide ascor
t0	0	0,844	0,586	0,83	0,85	0,73	0,396
t 10 min	10	0,596	0,56	0,632	0,71	0,22	0,39
t 20 min	20	0,54	0,48	0,56	0,672	0,185	0,381
t 30 min	30	0,539	0,41	0,52	0,669	0,166	0,373
t 40 min	40	0,522	0,39	0,48	0,659	0,14	0,366
t 50 min	50	0,513	0,277	0,47	0,655	0,12	0,364
t 60 min	60	0,39	0,045	0,46	0,556	0,065	0,361

## **RAPPORT SCIENTIFIQUE**

### **PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

Dans le cadre de la préparation de cette thèse de doctorat, une partie des résultats de ce travail a fait l'objet de deux publications scientifiques internationales et a été présentée sous forme de communications affichées dans différents congrès nationaux et internationaux.

### **PUBLICATIONS INTERNATIONALES**

1. **AGOUAZI Ounissa<sup>1,2\*</sup>**, BOUCHENAK Ouahiba<sup>3</sup>, YAHIAOUI Karima<sup>4</sup> et ARAB Karim

« Criblage phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des flavonoïdes de la vigne rouge de la variété ahmar bouamar »

**Revue Agrobiologia** (2019) 9(1): 1223-1233

2. **AGOUAZI Ounissa<sup>1,2\*</sup>**, Bouchenak Ouahiba<sup>2</sup>, Yahiaoui Karima<sup>2</sup>, Ziriri Djamel<sup>3</sup>, Khan Ferial<sup>3</sup>, Arab Karim<sup>2</sup>

“Phytochemical Study and Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts of the Red Vine”

- **COMMUNICATIONS INTERNATIONALES**

**Ounissa AGOUAZI.**, Ouahiba BOUCHENAK., Karim ARAB

« **Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des flavoïdes de la vigne rouge** »

Communication affichée au séminaire international sur les plantes Médicinales (SIPM-2018) 17-18 janvier 2018 à l'Université d'El-Oued.

- **COMMUNICATION NATIONALES**

**AGOUAZI Ounissa., ARAB Karim., Zeriri Djamel., KHENE Ferial**

**« Polyphénols de la vigne rouge (Vitis Vinifera.L) extraction, dosage et activités biologiques »**

Communication affichée au 1<sup>ère</sup> Journée National sur « Cancer, Environnement et Alimentation », organisée le 04 Février 2019 à l'Université Mhammad Bougara Boumedes.

## CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES FLAVONOÏDES DE LA VIGNE ROUGE DE LA VARIÉTÉ AHMAR BOUAMAR

AGOUAZI Ounissa<sup>1,2\*</sup>, BOUCHENAK Ouahiba<sup>3</sup>, YAHIAOUI Karima<sup>4</sup> et ARAB Karim<sup>2\*</sup>

1. Laboratoires des Ressources Naturelles : Viticulture/Arboriculture, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 15000, Algérie.

2. Laboratoire Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques, Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, 35000, Algérie.

3. Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, 35000, Algérie.

4. Laboratoire de Technologie Alimentaire, Faculté des Sciences de l'Ingénieur, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, 35000, Algérie.

Reçu le 22/05/2019, Révisé le 27/06/2019, Accepté le 29/06/2019

### Résumé

**Description du sujet :** L'étude vise à valoriser le pouvoir antioxydant des flavonoïdes d'un cépage algérien local.

**Objectifs.** Le présent travail rentre dans le cadre d'un projet de recherche sur la valorisation et la conservation de la variété Ahmar Bouamar, de la région de Benchécao (wilaya de Médéa)

**Méthodes :** Les extraits obtenus sont dosés puis caractérisés par une analyse chromatographique liquide à haute performance. L'évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* a été réalisée par des méthodes colorimétriques, à savoir le test de 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), de réduction de fer et celui de décoloration de la bêta-carotène.

**Résultats :** Les molécules bioactives identifiées dans les différentes fractions flavonoïdiques sont la catéchine et l'épicatéchine,  $\alpha$  viniférinol, cis et trans-picéide. Pour une concentration de 1mg/ml, l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique ont présenté le pouvoir anti-radicalaire le plus élevé avec respectivement des valeurs de 72,9  $\pm$  0,45 % et 72,08  $\pm$  0,78 %, proches de celui du control positif utilisé : l'acide ascorbique (95,45  $\pm$  1,47%) ( $p < 0,01$ ). Concernant le test de réduction de fer, l'extrait aqueux et butanolique ont présenté un pouvoir réducteur élevé supérieur à celui exercé par l'antioxydant de référence l'acide ascorbique. Pour ce qui est du test de décoloration de la bêta-carotène, les flavonoïdes et l'acide ascorbique ont inhibé de façon très significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique/ $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif représentant 100% de la peroxydation ( $p < 0,01$ ).

**Conclusion :** Il ressort ainsi que les extraits phénoliques de la vigne rouge peuvent être valorisés dans l'industrie pharmaceutique, afin de pouvoir traiter les pathologies liées aux stress oxydatif.

**Mots clés:** *Vitis vinifera* L., cépage local, flavonoïdes, HPLC, activité antioxydante.

### PHYTOCHEMICAL SCREENING AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLAVONOIDS IN THE RED VINE OF THE AHMAR BOUAMAR VARIETY Abstract

**Description of the subject:** This study aims to promote the antioxidant power of flavonoids of a local Algerian grape variety.

**Objective:** The present work is part of a research project on the valorization and conservation of Ahmar Bouamar variety, from the region of Benchécao (Médéa).

**Methods:** The extracts obtained are assayed and then characterized by a high performance liquid chromatographic analysis. The evaluation of the *in vitro* antioxidant capacity was carried out by colorimetric methods, namely the test of 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), reduction of iron and that of discoloration of beta-carotene.

**Results:** The bioactive molecules identified in the different flavonoid fractions are catechin and epicatechin,  $\alpha$  viniferinol, cis and trans-piceid. At a concentration of 1 mg / ml, the ethyl acetate extract and the butanolic extract had the highest anti-radical content with values of 72.9  $\pm$  0.45% and 72.08  $\pm$  0.78%, close to that of the positive control used: ascorbic acid (95.45  $\pm$  1.47%) ( $p < 0.01$ ). Concerning the iron reduction test, the aqueous and butanolic extract showed a high reducing power superior to that exerted by the reference antioxidant ascorbic acid. With regard to the beta-carotene discoloration test, the flavonoids and ascorbic acid significantly inhibited the coupled oxidation of linoleic acid /  $\beta$ -carotene compared to the negative control representing 100% of the peroxidation ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** It thus appears that the phenolic extracts of the red vine can be valorized in the pharmaceutical industry, in order to be able to treat pathologies related to oxidative stress.

**Keywords :** *Vitis vinifera* L., local varietal, flavonoids, HPLC, antioxidant activity.

\* Auteur correspondant: AGOUAZI Ounissa , E-mail: ounissal@hotmail.fr

## INTRODUCTION

En Algérie, le cépage Ahmar Bouamar est une variété de raisin de table par excellence très recherchée. Une étude ethnobotanique de cette plante a fait ressortir un usage particulier de ses feuilles comme antalgique, vu sa richesse en métabolites secondaires en particulier les flavonoïdes. Chez la plante, ils sont impliqués dans des fonctions essentielles telles que la pigmentation, la reproduction, la croissance et la protection contre les pathogènes. Ces métabolites sont donc à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme humain et méritent l'intérêt croissant que la recherche leur porte. Les travaux réalisés en Algérie se résume à l'activité antimicrobienne des extraits flavonoïdique et tanniques des feuilles de la vigne sauvage [1], ceux traitant l'activité antiradicalaire de différents extraits de pépins de la vigne rouge [2] et l'étude de [3] portant sur l'effet des extraits de feuilles de la vigne sur les maladies cardiovasculaires. Pour cela, nous nous sommes intéressés dans ce travail à mieux valoriser les cépages autochtones algériens, afin de les préserver et d'assurer un développement durable.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

A maturité optimale, le prélèvement des échantillons (grappes et feuilles) est réalisé au mois de novembre 2016 dans la région de Benchécao de la wilaya de Médéa. Les feuilles sont séchées à l'abri de la lumière pendant 15 jours puis broyées et tamisées pour récupérer la poudre qui servira pour les différentes analyses.

### 2. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques réalisés sur la variété Ahmer Bouamar, permettent de rechercher les substances bioactives (métabolites primaires ou secondaires) synthétisées par cette plante. Ils sont effectués soit sur la poudre, soit sur l'infusé à 10 %. Les méthodes de caractérisation utilisées dérivent de celles décrites par Harborne *et al.* [4] et Raaman *et al.* [5]. Les métabolites recherchés sont les tanins totaux, tanins galliques, mucilage, leuco-anthocyanes, saponosides, anthocyanes, caroténoïdes, amidon, glucosides, protéines, sucres réducteurs, flavonoïdes, sénosides, quinones libres, alcaloïdes et lipides.

### 3. Préparation des extraits flavonoïdique

L'extraction des flavonoïdes est faite selon la méthode décrite par Markham [6]. Ainsi, 30g de poudre végétale sont macérés dans du méthanol 85% (10% W/v) pendant 72 heures. Une fois filtré et évaporé à basse pression (Rota Vapor, Buchi 461) à 55°C, la phase aqueuse est confrontée à plusieurs solvants notamment l'éther de pétrole (v/v), l'éther diéthylique (v/v), l'acétate d'éthyle (v/v) et le butanol (v/v). La phase aqueuse finale renfermant les flavonoïdes est évaporée à 55°C, puis quantifiée. Pour le dosage des flavonoïdes contenus dans l'extrait, la méthode adoptée est celle de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) citée par Bahorun *et al.* [7]. Pour ce test, un mélange composé d'1ml de l'extrait flavonoïdique et d'1 ml de solution de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 2% est incubé à température ambiante pendant 30 min, puis l'absorbance est mesurée à 420 nm. La concentration des flavonoïdes est exprimée en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g).

### 4. Caractérisation des flavonoïdes par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Afin d'identifier les flavonoïdes synthétisés par la vigne rouge, nous avons utilisé une colonne de type Ascentis C18 HPLC (250 mm × 4,6 mm, 5 ml, 5 microns). La première phase mobile (A) est composée d'eau, de méthanol et d'acide acétique (89/10/1). La deuxième phase mobile (B) est un mélange d'eau, de méthanol et d'acide acétique (9/90/1). La détection des composés a été réalisée à 254 nm, en utilisant un détecteur uv/visible de type WATERS 2996 (PDA). L'identification et la quantification des flavonoïdes contenu dans 20 µl d'extrait est faite par comparaison au temps de rétention, et des surfaces des étalons utilisés. Les analyses ont été répétées 3 fois.

### 5. Détermination des activités biologiques

#### 5.1. Effet scavenger du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl)

L'évaluation de l'effet antioxydant par le test de DPPH est faite en se référant à la méthode décrite par Bozin *et al.* [8]. Le test consiste à mélanger 975µl de la solution méthanolique de DPPH (Sigma Chemical Co., Etats-Unis) (0,0024g/l) à 25µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (de 0,06 à 1mg/ml).

A titre comparatif un test négatif est réalisé avec 25µl de méthanol et 975µl de la solution méthanolique de DPPH. Après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurés à 517 nm. Parallèlement, un contrôle positif est préparé par un antioxydant standard, l'acide ascorbique, tout en mesurant l'absorbance dans les mêmes conditions que les échantillons. Le test est répété trois fois pour chaque concentration, et le pouvoir d'inhibition est exprimé en % en appliquant la formule suivante :  $I\% = (1 - \text{Abs contrôle} - \text{Abs test} / \text{Abs contrôle}) \times 100$ . Où : **Abs contrôle** : absorbance moyenne du radical seul ; **Abs test** : absorbance du radical libre en présence d'antioxydant après trente minutes de contact ; **I%** : pourcentage d'inhibition.

### 5.2. Réduction de fer (test FRAP)

Pour ce test, nous avons adopté la technique d'Oyaizu [9]. L'essai consiste à mélanger 1ml des différentes concentrations des extraits de la vigne rouge (0,1 à 1mg/ml) avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain Marie à 50°C pendant 20 min. La réaction est arrêtée en rajoutant 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% au mélange. Après avoir centrifugés les tubes à 3000 rpm pendant 10 minutes, 2,5ml du surnageant sont mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution de chlorure ferrique à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700 nm contre un blanc. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

### 5.3. Test de blanchissement par la $\beta$ carotène

La méthode utilisée est celle adoptée par Sun *et al.* [10]. L'émulsion de l'antioxydant est préparée en faisant dissoudre 2 mg de  $\beta$  carotène (Fluka, Allemagne) dans 10 ml de chloroforme, puis 1 ml de cette solution est mélangé

avec 20 mg d'acide linoléique purifié (Sigma Chemical Co., Etats-Unis) et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme a été éliminé en utilisant un bain Marie et le résidu obtenu est repris par 50 millilitres de peroxyde d'hydrogène. Un volume de 200 µl d'extrait brut méthanolique ou d'antioxydant de référence (acide ascorbique) à une concentration de 2,5 mg/ml sont ajoutés à 5 ml de l'émulsion. Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, comprenant 5 millilitres de l'émulsion de  $\beta$ -carotène et 200µl de méthanol. Le mélange est bien agité et la lecture de l'absorbance à 470 nm se fait immédiatement à  $t_0$  contre un blanc qui contient l'émulsion sans la  $\beta$ -carotène. Les tubes sont mis dans un bain Marie à 50°C et la lecture de l'absorbance est faite toutes les 10 minutes durant 60 minutes. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la décoloration du  $\beta$ -carotène en employant la formule suivante : % d'inhibition =  $[1 - (A - A_t - A^\circ - A^\circ t)]$ . Où :  $A^\circ$  : absorbance de l'échantillon à  $t_0$  ;  $A_t$  : absorbance de l'échantillon après incubation de 60 minutes ;  $A^\circ$  : absorbance du contrôle négatif à  $t_0$  ;  $A^\circ t$  : absorbance du contrôle négatif après incubation de 60 minutes.

### 6. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été statistiquement analysés à l'aide du test de Student. Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  Erreur Standards à la Moyenne. Le seuil de signification a été fixé à  $p < 0,05$ .

## RÉSULTATS

### 1. Screening phytochimique

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des feuilles de la variété Ahmar Bouamer a donné les résultats représentés dans le tableau 1. Il est à constater que la plante étudiée contient des polyphénols, représentés principalement par des flavonoïdes, des tanins condensés, des anthocyanes, des stéroïdes et des saponines.

Tableau 1 : résultats de screening phytochimique

Métabolites	Observation	Métabolites	Observation
Tanins totaux	+++	Mucilage	+++
Leuco-anthocyanes	+++	Saponosides	+++
Anthocyanes	+++	Caroténoïdes	++
Amidon	-	Tanins galliques	+
Glucosides	+	Protéines	+
Sucres réducteurs	+	Flavonoïdes	+++
Sénosides	-	Quinones libres	-
Alcaloïdes	-	Lipides	-

(-) : absence de substance ; (+) : faible présence de substance ; (++) : moyenne présence de substance ; (+++) : forte présence de substance.

**2. Caractérisation des composés bioactifs par HPLC**

Les composés ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et leurs spectres UV-vis par comparaison avec des chromatogrammes de références dans les

mêmes conditions opératoires. Les profils des flavonols des différentes fractions de l'extrait flavonoïdique du cépage étudiés sont représentés dans les figures 1, 2 et 3.

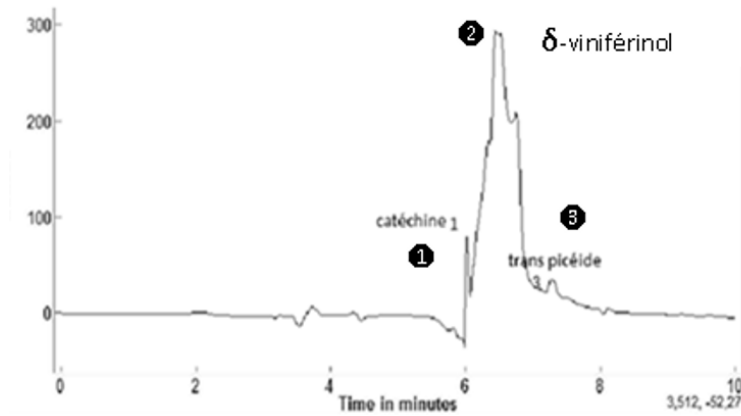


Figure 1 : chromatogramme d'identification des composés de la fraction butanolique  
1 : catéchine ; 2 : α-viniférinol ; 3 : trans-picéide.

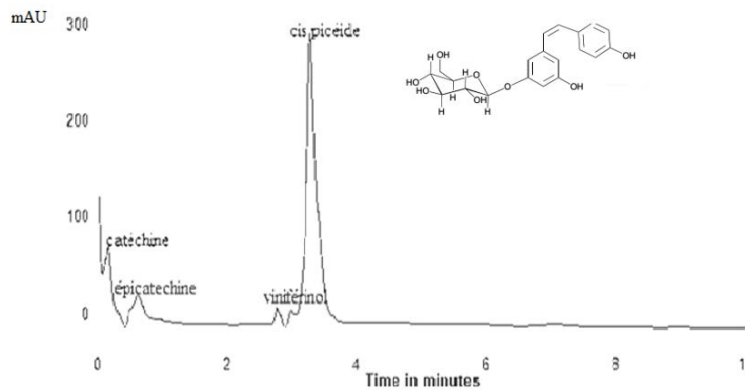


Figure 2 : chromatogramme d'identification des composés de la fraction acétate d'éthyle  
1 : catéchine ; 2 : épicatéchine ; 3 : δ-viniférinol ; 4 : cis-picéide

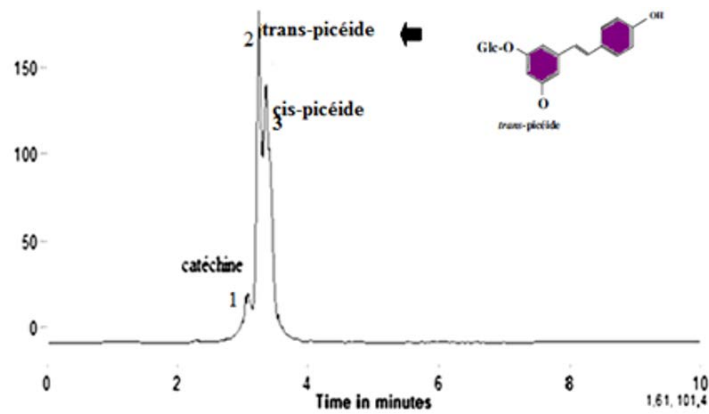


Figure 3 : chromatogramme d'identification des composés de l'extrait aqueux  
 1 : Catéchine ; 2 : Trans-picéide ; 3 : Cis-picéide

Les résultats de l'analyse chromatographique ont révélé la présence de cinq flavonols glucosylés: catéchine, épicatechine, cis-picéide, trans-picéide et le δ-viniférinol, dont la teneur varie significativement d'une fraction à une autre.

**3. Evaluation de l'activité antioxydante in vitro**

L'activité antioxydante *in vitro* peut être estimée par différentes méthodes. Les trois méthodes appliquées dans le présent travail sont : la méthode de piégeage du radical libre DPPH, la méthode de la réduction du fer FRAP, et celle de la décoloration de β carotène.

**3.1. Piégeage du radical libre DPPH**

La méthode DPPH a été choisie, en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité. Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH en présence des échantillons de raisin est représenté dans la Figure 4. On remarque que les fractions butanolique et celles de l'acétate d'éthyle sont des antiradicalaires puissants, avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 70% et des IC 50 respectives de 11,06± 0,1 et 17,19± 0,4 mg/ml. La différence des pourcentages d'inhibitions obtenu entre ces deux extraits et l'acide ascorbique est non significative (p>0,05). En tenant compte de ce paramètre, les capacités du radical sont classées dans l'ordre suivant : acide ascorbique > Extrait d'acétate d'éthyle > extrait butanolique> extrait aqueux.

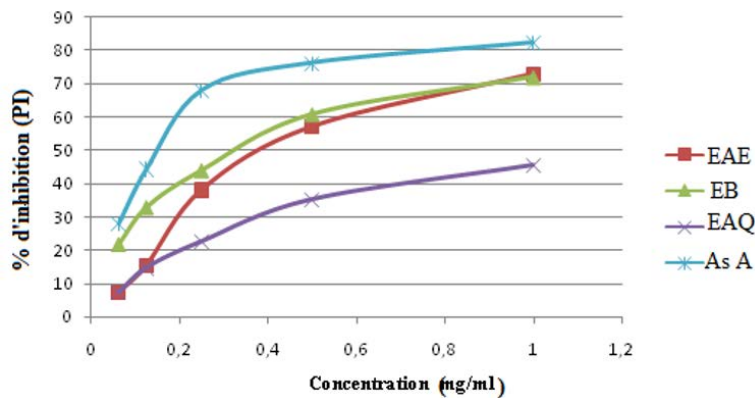


Figure 4. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH  
 EAE : extrait d'acétate d'éthyle ; EB : extrait butanolique ; EAQ : extrait aqueux ; As A : acide ascorbique

**3.2. Méthode de la réduction du fer FRAP**

Les concentrations des extraits des feuilles sont déterminées à partir d'une courbe étalon de BHT exprimée en mg/ml (hydroxytoluènebutyl). Les résultats relevés, d'après la courbe étalon de BHT,

sont 0,072 mg EBHT/g pour l'extrait butanolique et 0,073 mg EBHT/g pour l'extrait d'acétate d'éthyle. Le potentiel antioxydant des différentes fractions est représenté dans la figure 5.

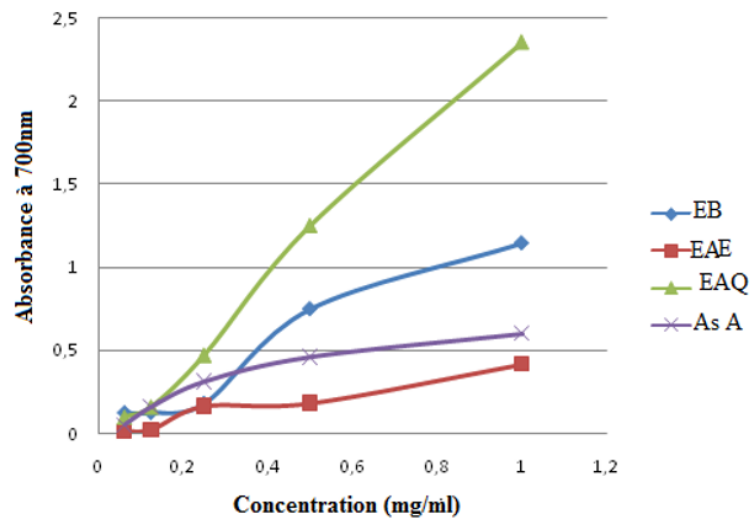


Figure 5 : pouvoirs réducteurs des extraits de feuilles

### 3.3. Méthode de décoloration du $\beta$ -carotène

Le taux de dégradation ou de décoloration du  $\beta$ -carotène reflète la capacité antioxydante de nos extraits. Les cinétiques du blanchissement du  $\beta$ -carotène des différentes fractions de l'extrait flavonoïdique de la variété Ahmar Bouamar et de l'acide ascorbique sont représentées dans la figure 6.

On constate que la fraction butanolique inhibent d'une manière significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif et l'acide ascorbique, sans négliger que les autres fractions présentent une bonne activité vis-à-vis de la décoloration de la  $\beta$ -carotène. Ces résultats sont bien corrélés avec la teneur élevée en procyanidine monomères (flavan-3-ols) dans ces extraits.

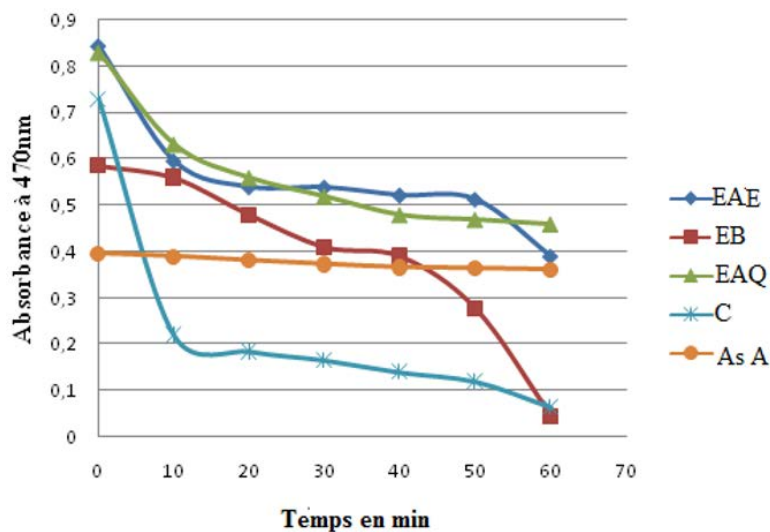


Figure 6 : cinétique de la décoloration du  $\beta$ -carotène induite par les fractions de l'extrait flavonoïdique de la variété Ahmar Bouamar, l'acide ascorbique et le contrôle négatif après 1 heure.

EAE : extrait d'acétate d'éthyle ; EB : extrait butanolique ; EAQ : extrait aqueux ;  
As A : acide ascorbique ; C : contrôle négatif

## DISCUSSION

### 1. Screening phytochimique

Il est à constater que la plante étudiée est riche en métabolites secondaires dotés de plusieurs activités biologiques. Cette dernière a été signalée par Kappel [11].

Les résultats de la présente étude sont en accord avec ceux trouvés par Amara et Melouk [1] ayant travaillé sur l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles de la vigne sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*). En effet, ces auteurs signalent la présence des tannins galliques, flavonoïdes,

saponosides et alcaloïdes et l'absence des tannins catéchiques, anthocyanes, leucoanthocyanes, quinones, sénosides et coumarines. Il est à signaler que la présence ou l'absence d'un métabolite secondaire n'est que le résultat de l'influence des conditions abiotiques sur le développement de la plante. Selon Reynier [12] et Baustita *et al.* [13], l'exposition d'une variété de vigne à des environnements différents a influencé la production des métabolites secondaires tant en quantité qu'en qualité. Cette étude a également montré l'existence d'une réelle biodiversité moléculaire, qui confère à la vigne rouge des vertus médicinales importantes à valorisées. Parmi les métabolites secondaires mis en évidence, les flavonoïdes avec de nombreuses vertus médicinales : antioxydantes [14], anti-inflammatoires, inhibiteurs d'enzymes, antiallergiques, antiulcérogènes, et effets protecteurs vasculaires [15], et antimicrobiens [16]. Les tanins avec leurs propriétés anti diarrhétiques, antibactériennes et antifongiques [17]. Les anthocyanes sont des puissants antioxydants [14].

## 2. Rendement d'extraction

Le rendement important en flavonoïdes noté lors de cette étude est dû probablement à la méthode d'extraction utilisée : macération dans le méthanol et dans l'acétate d'éthyle. En effet, Sun *et al.* [18] et Turkmen *et al.* [19], ont montré que ces solvants permettent la dissolution et la précipitation d'un taux élevé de composés phénoliques, ce qui justifie leur choix dans les extractions. La richesse des cépages rouges en composés phénoliques, particulièrement en flavonoïdes, a été confirmée par plusieurs auteurs. Amara et Melouk [1] ont travaillé sur les feuilles de la vigne sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*) récoltés pendant la période de floraison à El Kharoub dans la région de Mefteh (Blida) ont noté un rendement en flavonoïdes de 16,76%. Ces résultats sont proches de ceux trouvés par Yang *et al.* [20], et ceux de Guerrero *et al.* [21], ayant montré pour cinq variétés de raisin rouge cultivées en Andalousie des teneurs en flavonoïdes comprises entre 221 et 538 mg/kg de baies. Dans une autre étude rapportée par Waterhouse et Teissedre [22],

il a été démontré que les vins rouges californiens contenaient entre 1850 et 2200 mg/l de composés phénoliques totaux. Makris *et al.* [23], ont trouvé des teneurs en flavonoïdes variant entre 9,9mg EQ/100g MS et 57,15 mg EQ/100g MS, selon le solvant d'extraction utilisé. Enfin, Lehn [24], mentionne un taux de flavonoïdes de 4% au niveau des feuilles de la vigne rouge. Cette grande différence serait due aux facteurs climatiques qui influent sur le taux des métabolites secondaires des végétaux.

## 3. Caractérisation des métabolites secondaires par HPLC

L'analyse quantitative par HPLC des flavonoïdes a identifiée cinq composés. Ces flavonoïdes ont été détectés par Jean-Denis [25] dans l'extrait méthanolique de deux variétés de raisin (Chasselas et Solaris). La catéchine et l'épicatéchine ont été aussi identifiés dans les pépins issus de marc de raisins [26, 27, 28]. Une autre recherche réalisée par Amira-Guebailia [29], a apporté un nombre plus important de molécules autre que celle détectée lors de notre étude concernant l'extrait phénoliques des sarments et des rafles de la vigne (*Vitis vinifera* L.). En plus de catéchine, épicatéchine, cis-picéide, trans-picéide et le  $\delta$ -viniférinol, l'extrait renferme le pallidol, le picéide et l'astilbin, le (+) – hopéaphénol, (-) Trans  $\varepsilon$ -viniferin, la trans scirpusin A et le nepalensinol B. La structure chimique de ces composés a été déterminée en utilisant les méthodes spectroscopiques classiques RMN du proton : trans resvératrol ( $C_{14}H_{12}O_3$ ), trans picéide, trans picéatannol ( $C_{14}H_{12}O_4$ ), Picéide ( $C_{20}H_{22}O_8$ ). Il est à signaler que le picéide, glucoside du resvératrol a été trouvé dans les suspensions cellulaires de vigne par Waffo-Teguo *et al.* [30]. Concernant les activités biologiques du picéide, il a été décrit comme anti-inflammatoire [31], anticancéreux [32], et pourraient être liés à l'inhibition de la synthèse d'ADN dans les 50 cellules cancéreuses et à l'inhibition de l'angiogénèse des lignées HUVECs [33].  $\delta$ -viniférine ( $C_{28}H_{22}O_6$ ) est pour la première fois été isolé de *Vitis vinifera* en 1977 par Langcake et Pryce [34]. Il a ensuite à nouveau été isolé de la vigne par Li *et al.* [35]. Ce stilbène dimérique est produit par les processus d'oxydation du resveratrol. La viniférine est aussi produite par la vigne en réponse à l'attaque fongique [36].

La viniférine a non seulement une meilleure activité antifongique mais également de meilleurs pouvoirs antioxydants que le resveratrol [37 et 38]. Selon Piver *et al.* [39], la trans- $\epsilon$ -viniférine a montré des effets inhibiteurs des enzymes des cytochromes P450 humains impliquées dans la bioactivation de nombreux carcinogènes. La trans- $\epsilon$ -viniférine, possède une activité antioxydante [40] et anti-hépatotoxique [41].

#### 4. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

##### 4.1. Piégeage du radical libre DPPH

Il apparaît que les résultats obtenus lors de cette étude concordent avec ceux notés par Jean-Dennis [25] sur le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de la catéchine et de l'épicatéchine des LDL, soit 80%. La même constatation a été faite avec les observations d'El Darra *et al.* [42] où le pourcentage d'inhibition de DPPH par les flavonoïdes et non flavonoïdes extraits de cépage Merlot était de 71%. Par ailleurs, Katalinic *et al.* [43], ont montré que l'extrait méthanolique de différentes variétés du raisin piègent 50% du radical DPPH\* à des concentrations comprises entre 52,8 $\pm$ 3,33 mg/ml et 291 $\pm$ 4,51mg/ml. Il est connu que la réduction des molécules de DPPH est bien corrélée avec la teneur en composés phénoliques [44]. Selon Balasundram *et al.* [45], l'effet antiradicalaire des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libre, avec la présence de la double liaison C2-C3. Lee et Lee [46], signalent que la méthode d'extraction affecte les capacités antioxydantes. Ceci peut expliquer en partie la différence des résultats. De par leur effet antioxydant puissant, les polyphénols trouvent depuis une dizaine d'années un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Ils sont aussi impliqués dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant, telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires, l'ostéoporose ou les maladies inflammatoires [47].

##### 4.2. Réduction du fer FRAP

Le potentiel antioxydant des différentes fractions augmente au fur et à mesure que la concentration en extrait s'élève. Ces résultats confirment ceux trouvés par Derradji-Benmeziane [48] pour les extraits méthanolique du gros noir et du muscat noir,

exprimé en quantité d'antioxydants équivalents en acide ascorbique (EAA), soit respectivement 16,58 $\pm$ 0,07 mg de 11,85 $\pm$ 0,36mg. Barros *et al.* [44], ont rapporté que les propriétés réductrices sont généralement associées à la présence de réductones, qui exercent une action antioxydante en en donnant un atome d'hydrogène, déstabilisant ainsi la chaîne des radicaux libres. En conséquence, les cépages avec un pouvoir réducteur élevé peuvent renfermer des quantités plus élevées de réductones, qui pourraient réagir avec les radicaux libres pour stabiliser et bloquer les réactions radicalaires en chaînes. Ce pouvoir réducteur élevé des polyphénols est signalé par plusieurs auteurs. En effet, Saeed *et al.* [49] et Gonçalves *et al.* [50], ont révélés que l'activité antioxydante des matières végétales est bien corrélée avec la teneur en composés phénoliques.

##### 4.3. Décoloration du $\beta$ -carotène

L'activité antioxydante obtenue par le test de décoloration du  $\beta$  carotène est étroitement corrélée avec la teneur élevée en procyanidine monomères (flavan-3-ols) dans les extraits. En effet, Cao *et al.* [51], ont rapportés que les flavan-3-ols présentent une activité antioxydante substantielle. De plus, les résultats obtenus lors de cette étude peuvent être expliqués par la richesse de l'extrait butanolique et de celui d'acétate d'éthyle en antioxydants apolaires. La faible activité rencontrée avec l'extrait aqueux est probablement due à la présence en taux élevé des antioxydants polaires. Ce fait a été signalé par Frankel et Meyer [52]. Selon ces auteurs, les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes, du fait qu'ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides. Ces mêmes auteurs, ont montré que le vin rouge contient naturellement des polyphénols susceptibles de limiter l'oxydation des lipoprotéines.

## CONCLUSION

De par son pouvoir antioxydant, la variété algérienne «Ahmar Bouamar» peut être valorisée pour renforcer l'organisme dans le cas de situation de stress oxydatif.

Il est donc impératif de répéter l'ensemble de ces résultats sur plusieurs saisons afin de confirmer les qualités réelles de ce cépage autochtone et lui garantir la place qui lui revient sur le marché mondial des raisins.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Amara N. et Melouk F.Z. (2016).** Activité Antimicrobienne des Extraits des Feuilles de la Vigne Sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*). *Algerian Journal of Natural Products*, 4(3) : 358 – 366.
- [2]. **Ghouila Z., Laurent S., Henoumont C., Vander Elst L., Muller R.N. and Baalouamer A. (2016).** Rich extract on total polyphenols and antioxidant activity obtained by conventional and non-conventional methods from Ahmer Bouamer grape seed. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 8(3) : 692-711.
- [3]. **Ferhi S., Santaniello S., Zerizer S., Cruciani S., Fadda A., Sanna D., Dore A., Marioli M. and D'hallewin G. (2016).** Total Phenols from Grape Leaves Counteract Cell Proliferation and Modulate Apoptosis-Related Gene Expression in MCF-7 and HepG2 Human Cancer Cell Lines. *Molecules*, 24 (612) : 2-15.
- [4]. **Harborne A.J. (1998).** *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis.* springer science & business media.
- [5]. **Raaman N. (2006).** *Phytochemical techniques.* Ed. Publishing Agency, New Delhi, 306p.
- [6]. **Markham K.R. (1982).** Techniques of flavonoids identification. *Academic Press (London): chap 1 and 2, 1-113.*
- [7]. **Bahorun T., Grinier B., Troitin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin M., Cazin C. and Pinkas M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089
- [8]. **Bozin B., Mimica-Dukic N., Bogavac M., Suvajdzic L., Simin N., Samojlik I. and Couladis M. (2008).** Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* Scheele Essential oils. *Molecules*, 13 : 2058-2068
- [9]. **Oyaizu M. (1986).** Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
- [10]. **Sun J., Blaskovich M.A., Jove R., Livingston S.K., Coppola D. and Sebti S.M. (2005).** Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene*, 24: 3236-3245.
- [11]. **Kappel C. D. (2010).** Biologie intégrative du métabolisme de la baie de raisin. Thèse de doctorat, Université de Vector Segalen Bordeaux, 177p.
- [12]. **Reynier A. (1991).** *Manuel de viticulture.* Ed. Lavoisier, Paris, 360p.
- [13]. **Baustita O., Fernandez F. Lopez R. and Gomes P. (2007).** The effects oenologique practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine color and their dependence on grope characteristic. *Journal of food composition and analysis*, 20: 546-552.
- [14]. **Iserin P. (2001).** *Encyclopédie des plantes médicinales.* London, ypogly Edith Ybert, Tatiana Delasalle- Feat, 335p.
- [15]. **Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4) : 162-169.
- [16]. **Cushnie T.T. and Lamb A.J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5): 343-356.
- [17]. **Bruneton J. (2008).** *Acides phénols. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales.* Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris, 1118p.
- [18]. **Sun T., Powers J.R. and Tang J. (2007).** Evaluation of the antioxidant activity of broccoli and their juices. *Food chem.*, 105: 101-106.
- [19]. **Turkmen N., Velioooglu Y., Sari F. and Polat G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12: 484-496.
- [20]. **Yang J., Martinson T.E. and Liu R.H. (2009).** Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116: 332-339.
- [21]. **Guerrero F.G., Liazid A., Palma M., Puertas B., González-Barrio R., Gil-Izquierdo A., García Barroso C. and Cantos-Villar E. (2009).** Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, 112: 949-955.
- [22]. **Waterhouse A.L. and Teissedre P.L. (1997).** Levels of phenolics in California varietal wines, in ACS Symposium, Series 661, Wine, Nutrition and Therapeutic Benefits. Edited by Tom. Watkins, 12-23.
- [23]. **Makris D.P., Boskou G. and Andrikopoulos N.K. (2006).** Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*, 98: 2963-2967.
- [24]. **Lehn F. (2010).** Le syndrome métabolique : quand le surpoids devient pathologie. *Journal of food*, 20: 204-207.

- [25]. **Jean-Denis J.B. (2005)**. Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.). Thèse de Doctorat, Univ. de Neuchâtel, 284 p.
- [26]. **Kammerer D., Achim C., Reinhold C. and Andreas S. (2004)**. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52: 4360-4367.
- [27]. **Maier T., Schieber A., Kammerer D.R. and Carle R. (2009)**. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 112: 551-559.
- [28]. **Xu C., Zhang Y., Wang J. and Lu J. (2010)**. Extraction, distribution and characterization of phenolic compounds and oil in grapeseeds. *Food Chemistry*, 122: 688-694.
- [29]. **Amira-Guebailia H. (2007)**. Polyphénols des sarments et des rafles de la Vigne (*Vitis vinifera* L.) et du vin, purification, dosage et activités biologiques. Thèse de Doctorat en chimie, Univ. d'Annaba, Algérie, 123p.
- [30]. **Waffo-Téguo P., Lee D., Cuendet M., Mérillon J. M., Pezzuto J. M. and Kinghorn A. D. (2001)**. Two new stilbene dimer glycosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *J. Nat. Prod.*, 64: 136-138.
- [31]. **Kimura Y. et Okuda H. (2000)**. Effects of naturally occurring stilbene glycosides from medicinal plants and wine, on Tumor growth and Lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing Mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52: 1287-1295.
- [32]. **Ulrich S., Wolter F. and Stein M. (2005)**. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 452-461.
- [33]. **Kimura Y. (2005)**. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants. *In Vivo*, 19(1): 37-60.
- [34]. **Langcake P. and Pryce R.-J. (1977)**. A new class of phytolalexins from grapevines. *Experientia*, 33: 151-152.
- [35]. **Li W.W., Ding L.S., Li B.G. and Chen Y.Z. (1996)**. Oligostilbenes from *Vitis heyneana*. *Phytochemistry*, 42: 163-165.
- [36]. **Langcake P. (1981)**. Disease resistance of *Vitis* spp.v and the production of stress metabolites resveratrol, c-viniferin, f-viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology*, 9: 77-86.
- [37]. **Baderschneider B. and Winterhalter P. (2000)**. Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2681-2686.
- [38]. **Bala A.E.A., Kollman A., Ducrot P.-H., Majira A., Kerhoas L., Leroux P., Delorme R. and Einhorn J. (2000)**. Cis c-viniferin: A new antifungal resveratrol dehydrodimer from *Cyphostemma crotalariodes* roots. *J. Phytopathology*, 148: 29-32.
- [39]. **Piver B., Berthou F., Dreano Y. and Lucas D. (2003)**. Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by c-viniferin, the dimer of resveratrol :comparison with resveratrol and Polyphenols from alcoholised beverages. *Life Sci.*, 73: 1199-1213.
- [40]. **Privat C., Telo JP. and Bernardes-Genisson V. (1976)**. Antioxidant properties of trans-epsilon- viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and no aqueous media. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 1213-1217.
- [41]. **Langcake P. and Pryce R.J. (1976)**. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.*, 9: 77-86.
- [42]. **El Darra N., Tannous J., Bou Mouncef P., Palge J., Yaghi J., Vorobiev E., Louka N. and Maroun R.G. (2012)**. A comparative study on antiradical and antimicrobial properties of red grapes extracts obtained from different *Vitis vinifera* varieties. *Food and Nutrition Sciences*, 3: 1420-1432.
- [43]. **Katalinic V., Mozina S.S., Generalic I., Skoza D., Ljubenkovic I. and Klancnik A. (2010)**. Phenolic Profile, Antioxidant Capacity, and Antimicrobial Activity of Leaf Extracts from Six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties*, 16 (1): 45-60.
- [44]. **Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira ICFR and Baptista P. (2007)**. Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 103: 413-419.
- [45]. **Balasudram N., Sundram K. and Summan S. (2006)**. Phenolic compounds in plants and agri- industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 9: 191-120.
- [46]. **Lee O-H. and Lee B-Y. (2003)**. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101(10): 3751-3754.

- [47]. **Rock E. (2003).** Stress oxydant, micronutriments et sante. Université d'été de Nutrition Clermont-Ferrand, 35-38.
- [48]. **Derradji-Benmeziane F., Djamai R. and Cadot Y. (2014).** Antioxidant capacity, total phenolic, carotenoid, and vitamin c contents of five table grape varieties from Algeria and their correlations. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 48: 153-162.
- [49]. **Saeed N., Khan M.R. and Shabbir M. (2012).** Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *Complementary and Alternative Medicine*, 12: 221-233.
- [50]. **Gonçalves S., Gomes D., Costa P. and Romano A. (2013).** The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 43: 465- 471.
- [51]. **Cao G., Sofic E. and Prior R.L. (1997).** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*, 22(5): 749-760.
- [52]. **Frankel E.N. and Meyer AS. (2000).** The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.*, 80(13): 19-25.

## Abstract

Among the fruits richest in antioxidants is the grape (*Vitis vinifera*). It is widely consumed as such or used in the industrial production of juice and jam. The objective of this work is to valorize a local Algerian grape variety Ahmar Bouamar, from the region of Benchécao (wilaya of Médéa), as a source of antioxidants. Phytochemical tests have made it possible to detect the different families of chemical compounds existing in the leaves and juice, in particular polyphenols and flavonoids. The polyphenols and flavonoids were obtained by extraction methods using specific solvents with different polarity for each extract, and the seed oil by Soxlet. The extracts obtained are determined and characterized respectively by a high performance liquid chromatographic analysis and by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The evaluation of the antioxidant power in vitro by colorimetric methods, namely the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), iron reduction and beta-carotene decolorization tests, showed a high antioxidant power compared to that of ascorbic acid and BHA. However, the best effect was obtained with the polyphenolic juice extract with an IC50 of 0.03 mg/ml. The antimicrobial effect varies according to the nature of the strain and the extract tested. However, methanolic leaf extract and seed oil showed a significant inhibitory effect on the majority of the strains tested. In conclusion, the present study demonstrated the importance of the Ahmar Bouamar grape variety, confirmed the safety of the variety and provided measurable biological evidence of its antioxidant and antimicrobial power.

Key words: *Vitis Vinifera*, local grape variety, polyphenols, flavonoids, HPLC, GCMS, antioxidant activity, antimicrobial activity.

## ملخص

من بين أغنى ثمار مضادات الأكسدة العنب (*Vitis vinifera*). هذه الفاكهة تستهلك على نطاق واسع على هذا النحو أو تستخدم في الإنتاج الصناعي للعصير والمربى.

كان أحد أهداف هذا العمل هو تقييم العنب كمصدر لمضادات الأكسدة من خلال الترويج لمجموعة متنوعة من العنب الجزائري الأحمر بومار ، من منطقة بنشيكو (ولاية المدية).

مكّنت الاختبارات الكيميائية النباتية من اكتشاف العائلات المختلفة للمركبات الكيميائية الموجودة في الأوراق والعصير ، ولا سيما البوليفينول والفلافونويدات.

أجريت مقتطفات من المستخلصات الخام ، وهي البوليفينول والفلافونويدات ، بواسطة طرق استخراج باستخدام مذيبات محددة ذات قطبية مختلفة لكل مستخلص. تم استخراج زيت البذور مع Soxlet. يتم الحصول على جرعات المستخلصات التي تم الحصول عليها ومن ثم تتميز بتحليل كروماتوجرافي سائل عالي الأداء وبكروماتوجرافيا غازية مقترنة بقياس الطيف الكتلي.

تقييم قدرة مضادات الأكسدة في المختبر بطرق اللونية ، وهي اختبار 2،2 - ثنائي الفينيل - 1 - بيكريل - هيدرازيل (DPPH) ، والحد من الحديد وتغير لون بيتاكاروتين. وقد أظهرت أن المقتطفات لديها قوة مضادة للأكسدة عالية بالمقارنة مع حمض الأسكوربيك و BHA. ومع ذلك ، أعطى استخراج عصير البوليفينول المزيد من النشاط مع IC50 من 0.03 ملغ / مل.

يختلف التأثير المضاد للميكروبات اعتماداً على طبيعة السلالة والمستخلص الذي تم اختباره. ومع ذلك ، أظهر المستخلص الميثانولي من الأوراق وزيت البذور تأثيراً مثبطاً كبيراً على غالبية السلالات التي تم اختبارها.

في الختام ، مكّنت الدراسة الحالية من إظهار أهمية مجموعة العنب الأحمر بومار ، لتأكيد سلامة الصنف ، وتوفير دليل بيولوجي قابل للقياس على قوته المضادة للأكسدة ومضادات الميكروبات.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضادات الأكسدة GCMS ، HPLC ، أنواع العنب المحلية ، البوليفينول ، الفلافونويد ، *Vitis Vinifera* ، نشاط مضادات الميكروبات ،