



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire

## THESE de DOCTORAT en SCIENCES

Spécialité : Sciences biologiques

Intitulée

*Isolement et caractérisation des métabolites  
secondaires de trois (03) variétés de raisin de la région  
de MASCARA : effet antimicrobien et thérapeutique*

Présentée par : M<sup>r</sup> BENCHOHRA Mokhtar.

Devant le jury :

Président	HARIRI Ahmed (Pr)	Université de Mascara
Examinatrice	BOUSMAHA Leila (Pr)	Université de Sidi Bel-Abbès
Examinateur	MAGHERBI Ahmed (MCA)	Université de Relizane
Examinatrice	BELMIMOUN Asmaa (MCA)	Université de Mascara
Examinatrice	CHAHROUR Ouassila (MCA)	Université de Saida
Invitée	OULD YEROU Karima (MCA)	Université de Mascara
Directeur de thèse	MEDDAH Boumediene (Pr)	Université de Mascara

Année Universitaire : 2025 – 2026

## ***Remerciement***

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.*

*Aux joyaux de ma vie "mes parents" qui sont la source de ma réussite, je souhaite qu'ils trouvent à travers ce mémoire le faible témoignage de leurs efforts et sacrifices.*

*Je tiens à remercier, tout d'abord, mon directeur du mémoire Monsieur Meddah B., de m'avoir offert l'occasion de réaliser ce travail, pour son encadrement, ses encouragements, ses conseils, sa confiance, et pertinent le temps qu'il a consacré pour diriger cette étude.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Pr HARIRI Ahmed d'avoir accepté de présider cette thèse.*

*Je remercie également Madame Belmimoun Asmaa et Ould yerou Karima de l'Université Mustapha Stambouli de Mascara pour l'intérêt qu'elles ont portées à ce travail en acceptant de l'examiner.*

*Mes remerciements s'adressent pareillement à Monsieur Magherbi Ahmed de l'Université de Relizane, Madame Bousmaha Leila de l'Université de Sidi bel-abbès et Madame Chahrour Ouassila de l'Université de Saïda pour ses disponibilités d'avoir bien voulu accepter la charge d'examineurs.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à Mme Boukraa Djamila ; Mme Sid Elarbi Khadidja ; Mr Mendas Okba Ibnou Nafaa pour leurs encouragements très valeureux pour moi durant toute la période de déroulement de ce travail*

*J'exprime également ma reconnaissance à l'ensemble du personnel de laboratoire et de la bibliothèque de l'université de MASCARA.*

*J'adresse aussi mes remerciements à toute mes amis qui ont m'aider du proche ou de loin.*

-Liste des tableaux	I
-Liste des figures	II
-Liste des photos	III
-Introduction générale	01

## *Partie bibliographie*

### *Chapitre I : le raisin*

1.1. Définition du raisin	03
1.2. Historique	04
1.3. Histoire de la vigne en ALGERIE	05
1.4. Morphologie	06
1.5. Classification botanique	09
1.6. Utilisation du raisin	09
1.7. Composition et valeur nutritive	10
1.8. Les variétés Algériennes	12
1.9. Etude de quelques variétés cultivées dans la région de MASCARA	14
1.10. Les bienfaits du raisin	19

### *Chapitre II : les polyphénols*

1. Les polyphénols	21
1.1. Généralités	21
1.2. Classification	22
1.2.1. Les acides phénoliques	23
1.2.2. Les acides cinnamiques	24
1.2.3. Les coumarines	25
1.2.4. Les stilbènes	25
1.2.5. Les flavonoïdes	26
1.2.6. Les tanins	30
1.3. Intérêts des composés phénoliques dans le domaine agroalimentaire	33

### *Chapitre III : les activités biologiques étudiées*

1. Les activités biologiques étudiées	41
1.1. Activité antioxydante	41

1.1.1. Définition des radicaux libres	41
1.1.2. Les ROS (reactive oxygen species)	41
1.1.3. Le stress oxydant	42
1.1.4. Mécanismes physiologiques de l'inactivation des ERO	45
1.1.4. Les antioxydants	45
1.1.4.1. Les antioxydants synthétiques	45
1.1.4.2. Les antioxydants naturels	46
1.2. Activité antimicrobiennes et Souches ciblées	47
1.2.1. Généralités	47
1.2.2. Mécanisme d'action d'un Antibiotique	47
1.2.4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques	49
1.2.5. Les souches ciblées	51
 <i>Matériels et méthodes</i>	
1. Objectifs de l'étude	56
1.2 Lieu et période d'étude	56
2. Matériel et méthodes	56
2.1. Matériel végétal	56
2.2. Extraction des composés phénoliques	58
2.2.1. optimisation de l'extraction	58
2.2.1 Extraction des polyphénols	61
2.3. Analyse qualitative des extraits	61
2.3.1 Screening phytochimique	61
2.3.2 Analyse chromatographique sur couche minces(CCM)	61
2.4. Analyses quantitatives des extraits	62
2.4.1. Dosage des polyphénols par colorimétrie	62
2.4.2 Estimation quantitative des flavonoïdes	62
2.4.3. Estimation quantitative des tanins condensés	63
2.4.4. estimation des proanthocyanidine	63
2.5. Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH	64
2.6. Estimation de la capacité antioxydante totale CAT	65



## *Table des matières*

---

3. HPLC-DAD for phenolic profile determination	66
2.6. Analyses microbiologiques	66
2.6.1. Souches testées	67
2.6.4. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques	69
2.6.5. Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits en milieu solide	72
2.6.6. Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits en milieu liquide	73
2.6.7. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Bactéricide (CMB)	75
3. Analyse Statistique	76
<i>Résultats et discussion</i>	
1. Extractions	77
2. Analyses des composés phénoliques	
2. 1 Analyse qualitative des extraits	86
2. 2 Analyse quantitative des extraits du fruit <i>Vitis vinifera</i>	92
3. Evaluation de l'activité antioxydante	97
3.1. Effet scavenger du radical DPPH	97
3.2. Capacité antioxydante totale	100
4. Analyse chromatographique par HPLC	104
5. Evaluation de l'activité antimicrobienne	109
5.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode diffusion sur gélose	109
5.2 Résultats de l'étude de la cinétique de croissance microbienne	118
5.3 Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits en milieu liquide	134
6. Discussion générale des résultats de l'effet antimicrobien	137
-Conclusion générale	142
-références bibliographiques	144
-Annexes	167

## Listes des figures

<b>Figure 01</b> : Production de raisins en milliers de tonnes	<b>04</b>
<b>Figure 02</b> : Grappe de raisin, coupe transversale et représentation schématique d'une baie de raisin	<b>06</b>
<b>Figure 03</b> : Coupe d'une baie et organisation tissulaire	<b>07</b>
<b>Figure 04</b> : cycle végétatif annuel de la vigne	<b>08</b>
<b>Figure 05</b> : évolution des principaux métabolites primaires et secondaires par baie	<b>12</b>
<b>Figure 06</b> : production de la vigne en ALGERIE entre 2015-2019	<b>14</b>
<b>Figure 07</b> : Variété cinsault	<b>15</b>
<b>Figure 08</b> : Variété Muscat noir	<b>17</b>
<b>Figure 09</b> : Variété Grenache noir	<b>18</b>
<b>Figure 10</b> : Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique présents dans les raisins.	<b>24</b>
<b>Figure 11</b> : Structure chimique des acides coumariques	<b>25</b>
<b>Figure 12</b> : Structures chimiques des stilbènes	<b>26</b>
<b>Figure 13</b> : Squelette de base des flavonoïdes	<b>26</b>
<b>Figure 14</b> : Mécanisme de biosynthèse général des flavonoïdes	<b>28</b>
<b>Figure 15</b> : Structure de quelques anthocyanidine	<b>29</b>
<b>Figure 16</b> : Structure chimique des tanins condensés	<b>30</b>
<b>Figure 17</b> : Structure chimique des tanins hydrolysables	<b>31</b>
<b>Figure 18</b> : Voie métabolique des flavonoïdes dans la baie de raisin	<b>40</b>
<b>Figure 19</b> : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR	<b>43</b>
<b>Figure 20</b> : Principales cibles bactériennes des antibiotiques	<b>49</b>
<b>Figure 21</b> : Divers mécanismes de résistance aux antibiotiques utilisés par les bactéries.	<b>51</b>
<b>Figure 22</b> : Représentation des variétés utilisées dans le cadre de notre étude.	<b>57</b>
<b>Figure 23</b> : Protocole d'extraction des polyphénols par un solvant organique.	<b>60</b>
<b>Figure 24</b> : La réaction entre la vanilline et les tanins condensés	<b>63</b>
<b>Figure 25</b> : Forme libre et réduite du DPPH	<b>65</b>
<b>Figure 26</b> : principe de la méthode de diffusion par disque	<b>72</b>
<b>Figure 27</b> : Schéma représentatif de la méthode d'ensemencement pour la détermination de la CMB	<b>75</b>
<b>Figure 28</b> : Effet de ratio solide-liquide	<b>77</b>
<b>Figure 29</b> : Effet de solvant éthanol	<b>77</b>
<b>Figure 30</b> : Effet de solvant méthanol	<b>77</b>
<b>Figure 31</b> : Effet de solvant acétone	<b>78</b>
<b>Figure 32</b> : Effet de température	<b>78</b>
<b>Figure 33</b> : Effet de PH	<b>78</b>
<b>Figure 34</b> : Effet de temps d'extraction	<b>78</b>
<b>Figure 35</b> : Effet de ratio solide-liquide	<b>79</b>
<b>Figure 36</b> : Effet de solvant éthanol	<b>79</b>
<b>Figure 37</b> : Effet de solvant méthanol	<b>79</b>
<b>Figure 38</b> : Effet de solvant acétone	<b>80</b>
<b>Figure 39</b> : Effet de température	<b>80</b>
<b>Figure 40</b> : Effet de pH	<b>80</b>
<b>Figure 41</b> : Effet de temps d'extraction	<b>80</b>
<b>Figure 42</b> : Effet de ratio solide liquide	<b>81</b>

<b>Figure 43 :</b> Effet de solvant éthanol	<b>82</b>
<b>Figure 44 :</b> Effet de solvant méthanol	<b>82</b>
<b>Figure 45 :</b> Effet de solvant acétone	<b>82</b>
<b>Figure 46 :</b> Effet de température d'extraction	<b>82</b>
<b>Figure 47 :</b> Effet de temps de pH	<b>82</b>
<b>Figure 48 :</b> Effet de temps d'extraction	<b>83</b>
<b>Figure 49:</b> Résultat de l'analyse chromatographique de : l'acide gallique, l'acide tannique, variété grenache et le catéchol respectivement	<b>90</b>
<b>Figure 50 :</b> Résultat de l'analyse chromatographique de : variété cinsault, muscadine, grenache et quelques témoins respectivement par révélation chimique	<b>90</b>
<b>Figure 51 :</b> Résultat de l'analyse chromatographique de : variété cinsault, muscadine, grenache et quelques témoins respectivement par révélation optique UV	<b>91</b>
<b>Figure 52:</b> Résultat de l'analyse chromatographique de : variété cinsault et variété muscat respectivement (366nm et 254 nm)	<b>91</b>
<b>Figure 53 :</b> Teneur en métabolites secondaires pour la variété Cinsault.	<b>92</b>
<b>Figure 54 :</b> Teneur en métabolites secondaires pour la variété Muscadine.	<b>92</b>
<b>Figure 55 :</b> Teneur en métabolites secondaires pour la variété Grenache	<b>93</b>
<b>Figure 56 :</b> Graph de corrélation entre la teneur en polyphénols et la teneur en flavonoïdes.	<b>95</b>
<b>Figure 57 :</b> Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour la détermination de la capacité antioxydante totale.	<b>101</b>
<b>Figure 58 :</b> Capacité antioxydante des extraits de variété Cinsault	<b>101</b>
<b>Figure 59 :</b> Capacité antioxydante totale des extraits de variété Muscat	<b>102</b>
<b>Figure 60 :</b> Capacité antioxydante totale des extraits de variété Grenache.	<b>102</b>
<b>Figure 61 :</b> Capacité antioxydante totale des extraits de trois variétés de <i>Vitis vinifera</i> .	<b>103</b>
<b>Figure 62 :</b> Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pellicule de <i>Vitis vinifera</i> L.	<b>105</b>
<b>Figure 63 :</b> Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pépin de <i>Vitis vinifera</i> L.	<b>106</b>
<b>Figure 64 :</b> Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pulpe de <i>Vitis vinifera</i> L.	<b>107</b>
<b>Figure 65 :</b> Réalisation de l'antibiogramme des souches vis-vis des extraits en milieu solide.	<b>110</b>
<b>Figure 66:</b> Quelques résultats représentant le meilleur effet antimicrobien par la méthode de contact direct en milieu solide.	<b>112</b>
<b>Figure 67:</b> Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance microbienne des bactéries Gram -	<b>113</b>
<b>Figure 68:</b> Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance microbienne des bactéries Gram +	<b>116</b>
<b>Figure 69:</b> Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance microbienne des bactéries Gram +	<b>116</b>
<b>Figure 70:</b> Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance microbienne de <i>Candida albicans</i>	<b>118</b>
<b>Figure 71:</b> Effet de l'extrait de pellicule de la variété Cinsault sur la croissance des bactéries à Gram (-).	<b>119</b>
<b>Figure 72 :</b> Effet de l'extrait de peau de la variété Cinsault sur la croissance de bactéries à Gram(+),	<b>120</b>
<b>Figure 73:</b> Effet de l'extrait de pulpe de la variété Cinsault sur la croissance des germes les plus sensibles.	<b>122</b>

<b>Figure 74:</b> Effet de l'extrait de pépin de variété Cinsault sur la croissance des germes les plus sensibles	<b>123</b>
<b>Figure 75:</b> Effet de l'extrait de peau de variété Muscat sur la croissance des germes les plus sensibles	<b>125</b>
<b>Figure 76:</b> Effet de l'extrait de pulpe de variété Muscat sur la croissance des germes les plus sensibles	<b>126</b>
<b>Figure 77:</b> Effet de l'extrait de pépin de variété Muscat sur la croissance de <i>souches les plus sensibles</i>	<b>128</b>
<b>Figure 78:</b> Effet de l'extrait de peau de variété Grenache sur la croissance des souches Gram – et Gram +	<b>129</b>
<b>Figure 79 :</b> Effet de l'extrait de peau de variété Grenache sur la croissance de <i>Candida albicans</i>	<b>130</b>
<b>Figure 80:</b> Effet de l'extrait de pulpe de variété Grenache sur la croissance des bactéries à Gram(-) et Gram (+),	<b>131</b>
<b>Figure 81 :</b> Effet de l'extrait de pulpe de variété Grenache sur la croissance de <i>Candida albicans</i> .	<b>132</b>
<b>Figure 82 :</b> Effet de l'extrait de pépin de la variété Grenache sur la croissance des souches les plus sensibles	<b>133</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01 :</b> Classification botanique de <i>Vitis vinifera</i>	<b>09</b>
<b>Tableau 02 :</b> Composition et valeur nutritive du raisin	<b>11</b>
<b>Tableau 03 :</b> Variétés Algériennes de raisin	<b>13</b>
<b>Tableau 04 :</b> Squelette carbonique de quelques classes des polyphénols	<b>22</b>
<b>Tableau 05 :</b> Distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes	<b>28</b>
<b>Tableau 06 :</b> les différentes activités biologiques des polyphénols.	<b>35</b>
<b>Tableau 07 :</b> Distribution des composés phénoliques dans le raisin.	<b>39</b>
<b>Tableau 08 :</b> Principales affections liées à la production des EOR.	<b>44</b>
<b>Tableau 09 :</b> Différentes souches utilisées et leurs sources	<b>67</b>
<b>Tableau 10 :</b> Milieux de cultures usuels et sélectifs utilisés pour l'isolement.	<b>68</b>
<b>Tableau 11 :</b> Liste des Antibiotiques utilisés dans le cadre de notre étude	<b>70</b>
<b>Tableau 12 :</b> Ensemencement des microplaques (méthode de la microdilution)	<b>74</b>
<b>Tableau 13 :</b> résultats de l'optimisation de l'extraction des composés phénolique	<b>84</b>
<b>Tableau 14 :</b> Rendement, aspect et la couleur des extraits obtenus	<b>86</b>
<b>Tableau 15 :</b> Résultats screening phytochimique sur les extraits préparés.	<b>87</b>
<b>Tableau 16 :</b> Rapports frontaux(Rf) des spots issus des témoins	<b>89</b>
<b>Tableau 17 :</b> Rapports frontaux(Rf) des spots issus de la séparation des extraits	<b>89</b>
<b>Tableau 18:</b> Activité antiradicalaire des extraits de fruit de <i>Vitis vinifera</i> et de l'acide ascorbique.	<b>98</b>
<b>Tableau 19 :</b> Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pellicule de Cinsault.	<b>105</b>
<b>Tableau 20 :</b> Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pépin de Cinsault.	<b>106</b>
<b>Tableau 21 :</b> Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pulpe de Grenache.	<b>107</b>
<b>Tableau 22 :</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB), exprimées en µg/ml, des extraits les plus actifs vis-à-vis des bactéries Gram – testées.	<b>134</b>
<b>Tableau 23 :</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB), exprimées en µg/ml, des extraits les plus actifs vis-à-vis des bactéries Gram + testées.	<b>135</b>
<b>Tableau 24 :</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB), exprimées en µg/ml, des extraits les plus actifs vis-à-vis de la souche <i>Candida albicans</i> .	<b>137</b>

## Liste d'abréviation

- : négatif  
(%) : pourcentage  
\ : par  
+ : positif  
°C : Degré Celsius  
μg : Microgramme=10<sup>6</sup>gramme  
Ag: Acide gallique  
ARP : pouvoir anti-radicalaire  
At : Acide tannique  
ATCC : *American Type Culture Collection*  
BAW : butanol/ acide acétique / eau  
Cat : Catéchol  
Cin : variété Cinsault  
DMSO : Diméthyle sulfoxyde.  
DO : Densité optique  
DPPH : 1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil  
EAe: Extrait acétonique  
EAG : équivalent de l'acide gallique  
EEt: Extrait éthanolique  
EMe: Extrait méthanolique  
Fig : Figure  
Gre : variété Grenache  
h : heure  
IC<sub>50</sub> : Concentration inhibitrice médiane  
Log : logarithme décimal  
mg : milligramme  
ml : millilitre  
mn : minute  
Mus : variété Muscat  
N.D : Non déterminée  
nm : nanomètre=10<sup>-9</sup> mètre  
pH: potentiel hydrogène  
POR : potentiel d'oxydoréduction  
R : Rendement  
Rf : Rapport frontal  
ROS: Reactive Oxygen Species  
T : témoin  
Tab : Tableau  
TIAC : toxi-infection alimentaire collective  
ufc : unité formant colonie  
V : Volume

# INTRODUCTION

## ***Introduction générale***

« Le retour à la nature » est de plus en plus une demande et un choix raisonné de diverses populations, puisque les effets secondaires des produits chimiques de synthèse s'avèrent nocifs avec l'évolution des recherches scientifiques.

Selon l'O.M.S ;(2010) ,60% des maladies actuelles seraient dues aux médicaments synthétiques. Cela a entraîné une prise de conscience et un retour à la phytothérapie dont le succès s'explique avant tout par le niveau de maîtrise technique et scientifique atteint dans ce domaine.

Le terme "nutraceutique" a été inventé à partir des mots "nutrition" et "pharmaceutique" en 1989 par Stephen DeFelice, fondateur et président de la Foundation for Innovation in Medicine (FIM). Il a ainsi défini les nutraceutiques comme une partie d'un aliment offrant des avantages médicaux ou de santé, y compris le traitement et/ou la prévention d'une maladie

Les nutraceutiques peuvent être des nutriments isolés, des compléments alimentaires, des régimes spécifiques, des aliments de synthèse, des produits à base de plantes, des aliments transformés ou des boissons transformées. **(Stéphane Salmieri, 2023).**

En Algérie, depuis le début des années 80, nous assistons à une augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, surtout en milieu hospitalier, et à l'émergence de nouvelles résistances. Il s'agit d'un problème de santé publique extrêmement préoccupant, qui affecte également de nombreux pays, bien que les souches résistantes soient souvent différentes d'un pays à l'autre.

Plusieurs travaux dans l'industrie pharmaceutique montrent que, pour certaines maladies complexes, les produits naturels représentent toujours une source extrêmement précieuse pour la production de nouvelles entités chimiques, car ils représentent des structures privilégiées choisies par les mécanismes d'évolution sur une période de millions d'années **(Boldi A.M., 2004), (Koehn F. E et al, 2005)**

*Vitis vinifera* est l'espèce de vigne la plus cultivée dans le monde **(Tkacz et al, 2019)** avec une production mondiale de 78 millions tonnes de raisin en 2018 sur 7.4 millions d'hectares de terres dédiées à sa culture **(Anonyme, 2019)**



Ils sont composés d'une large gamme de composés phénoliques, notamment des anthocyanes, des esters tartriques d'hydroxycinnamiques, du flavonol, des flavan-3-ols et des acides organiques (**Guler A et al, 2016**)

La polarité des composés phénoliques varient considérablement, et il est difficile de développer une méthode unique pour une extraction optimale de tous les composés phénoliques. Par conséquent, l'optimisation de la procédure d'extraction est essentielle pour un dosage précis des composés phénoliques issus de différentes matrices alimentaires. Bien qu'il soit prouvé qu'environ 30 % des erreurs d'analyse quantitative proviennent des étapes de préparation des échantillons, l'optimisation de cette préparation est souvent négligée et mal documentée. (**Antolovich et al, 2000; Luthria, 2006**).

Pour toutes ces raisons, dans ce travail, nous avons discuté les différents moyens actuellement existants pour potentialiser l'extraction des métabolites secondaires, de point de vue quantitatif et qualitatif à partir des différentes parties de la baie de raisin de trois variétés cultivées dans la wilaya de MASCARA.

Notre travail sera réparti en deux parties :

Une partie relative à l'étude bibliographique du raisin, des polyphénols et des activités recherchées.

Une autre partie réservée à l'étude expérimentale subdivisée en deux chapitres : l'un présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail :

- optimisation des paramètres d'extraction pour chaque partie de baie de raisin
- dosage des différents métabolites secondaires
- évaluation des activités biologiques : antioxydants et antimicrobiennes

Identification des polyphénols par HPLC pour les extraits qui ont représenté une meilleure activité biologique.

Et le deuxième chapitre consacré à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

# PARTIE I

*Etude bibliographique*

# CHAPITRE I

*le raisin*

## 1. Le raisin

### 1.1. Définition

Le raisin se présente sous la forme de grappes composées de nombreux grains, qui sont sur le plan botanique des baies, de petite taille et de couleur claire, pour le raisin blanc (verdâtre, jaunâtre, jaune doré) ou plus foncée, pour le raisin rouge (rose ou noir-violet).

Il se consomme comme fruit, soit frais, le raisin de table, soit sec, le raisin sec qui est utilisé surtout en pâtisserie ou en cuisine. On consomme également du jus de raisin. Des baies, on extrait aussi l'huile de pépins de raisin (**Wan Y et al, 2008**).

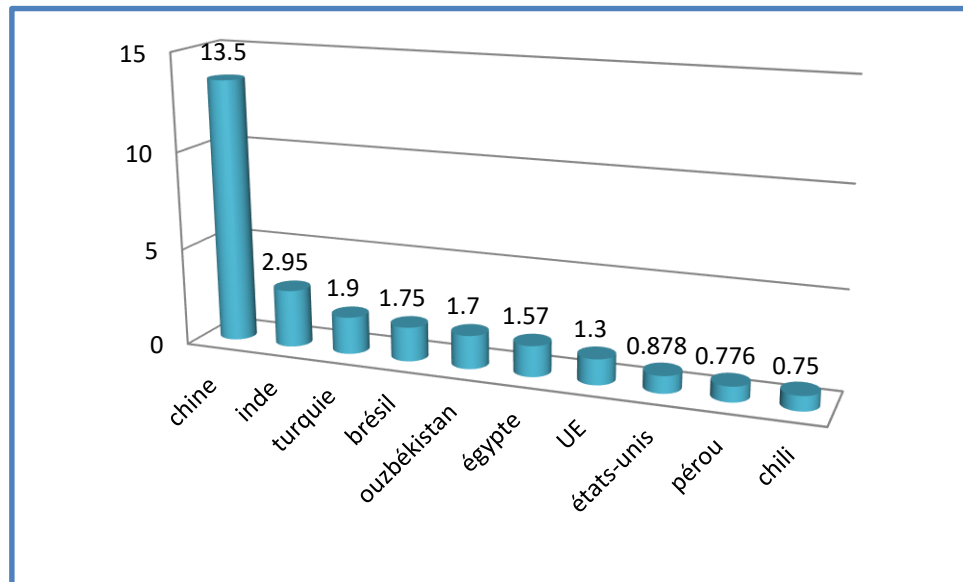
Une grappe de raisin est composée d'une rafle, une partie ligneuse ramifiée, sur laquelle se trouvent des baies de raisins. Elle est majoritairement composée d'eau, de fibres, de minéraux et de tanins. Le raisin est une baie charnue composée d'un péricarpe et de graines, les pépins. Le péricarpe comprend la pellicule (ou exocarpe) et la pulpe (mésocarpe comprenant l'endocarpe). (**Théo B, 2021**)

*Vitis* (vigne) est un genre de 60 espèces, parmi lesquelles *Vitis vinifera*, appartenant à la famille des Vitaceae (**Bordiga M, 2016**).

Aujourd'hui, il existe trois principales espèces de raisins: raisin de l'Europe (*Vitis vinifera*), raisin de Amérique du Nord (*Vitis labrusca* et *Vitis rotundifolia*) et le français hybrides(**En-Qin Xia, 2010**)

La production mondiale de raisin est estimée à 80,1 millions de tonnes en 2022, Cette production a connu une légère baisse de 3% par rapport à 2021. La Chine est le plus grand producteur 13.5 millions, suivie de l'Italie 7.7 millions et des États-Unis 6.2 million. (**FAO, 2023**)

En Algérie, la production de raisin était estimée à 627 000 tonnes en 2022, ce qui la place au deuxième rang des producteurs de raisin dans le monde arabe après l'Égypte. (**OECD World ,2023**)



**Figure 01 :** Production de raisins en milliers de tonnes (FAO, 2024).

## 1.2. Historique

Elle est née au Proche-Orient, berceau de l'agriculture et de l'écriture. Du bassin méditerranéen (vers 6 000 ans avant J.-C.), elle s'est étendue, au fur et à mesure des conquêtes romaines, à des régions plus septentrionales pour ensuite gagner les Amériques, l'Australie et une partie du continent africain et asiatique (**Jean-Pierre B, 2004**)

On a découvert des pépins vieux de cinquante millions d'années. On a retrouvé des vignes fossiles au Portugal notamment. Dans son arche, Noé n'avait pas seulement des animaux mais aussi des ceps de vigne, qui ont toujours été un symbole de joie de vivre. En Egypte, on a découvert des dessins dans les tombes qui montrent qu'on cultivait le raisin plus de deux mille ans avant Jésus-Christ. (**Jean-Pierre B, 2004**)

### 1.3. Histoire de la vigne en ALGERIE

La vigne est une plante spécifiquement méditerranéenne. Aussi, dès l'antiquité, l'Afrique du Nord produisait-elle déjà des vins qu'elle exportait dans les territoires bordant la Méditerranée. Cinq siècles avant l'ère chrétienne, dit-on, les vins de la colline de Byrsa à Carthage étaient déjà célèbres. On a trouvé, en Algérie, des traces certaines de cet ancien vignoble nord-africain, notamment dans les ruines de Cherchell et de Tipaza, où des mosaïques antiques représentent le déchaussage et le sarclage de la vigne, le foulage du raisin. Dans la période qui suit la chute de l'Empire Romain, la viticulture régresse progressivement au point de presque disparaître. **(OFALAC, 2003)**

A l'arrivée des Français en Algérie, en 1830, la vigne ne couvre plus que 2.000 ha. Les premiers colons, dont certains étaient originaires du Midi, plantent de la vigne. Mais, s'ils sont encouragés par les résultats obtenus grâce aux conditions extrêmement favorables du milieu en ce qui concerne la production du raisin, En 1861, plus de trente ans après l'entrée des Français à Alger, la vigne ne couvre encore que 6.500 ha **(Bouquet et al, 2008)**

C'est, en effet, à partir de 1870 seulement que le vignoble s'étend 30.500 hectares sont déjà plantés en 1881 ; 125.000 ha sont recensés en 1888. Et en fin 1952, la vigne couvre à nouveau près de 400.000 ha **(Bouquet et al, 2008)**

En outre des travaux de laboratoire exécutés à l'Institut Agricole d'Algérie, 38 champs expérimentaux et vignes-pilotes ont été créés au cours des trois dernières années.

Le secteur vitivinicole algérien offre d'ailleurs un potentiel de création de richesse importante comme le démontre le fait qu'en 1960 le vignoble et le vin supposait en Algérie 31% du produit brut agricole et 51% des exportations totales **(Bouquet et al, 2008)**

L'Algérie est considérée mondialement parmi les principaux pays à vocation viticole. Elle occupait, en 1980, la onzième position à l'échelle mondiale **(Ferradji A et al, 2008)**



**Figure 2 :** Grappe de raisin, coupe transversale et représentation schématique d'une baie de raisin (**Hélène carrié, 2013**)

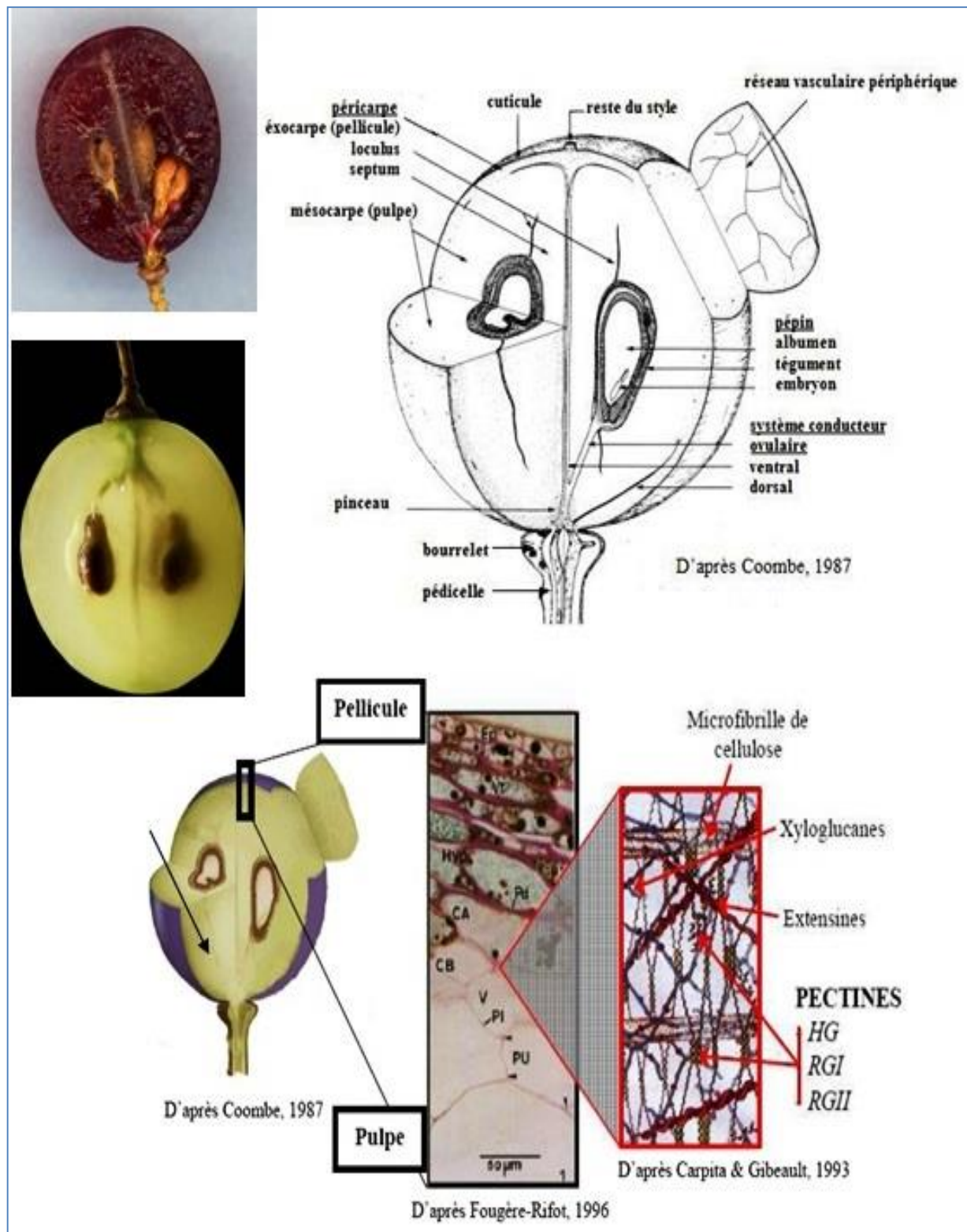
#### 1.4. Morphologie

Le raisin est une baie charnue constituée d'un péricarpe et de graines appelées pépins (**Figure 3**). Le péricarpe se compose d'un exocarpe appelé pellicule et d'un mésocarpe appelé pulpe. La pellicule comprend la cuticule formée de cires lipidiques, les cellules de l'épiderme (8 à 10 couches de cellules isodiamétriques de 6,5 à 10  $\mu\text{m}$  de largeur) et les cellules de l'hypoderme (10 à 12 couches de cellules de 100 à 250  $\mu\text{m}$  de largeur) (**Carbonneau et al, 2015**).

La pulpe est constituée de 25 à 30 couches de cellules, ces cellules s'agrandissent pour atteindre une taille de 400  $\mu\text{m}$  à la fin du stade de maturation (**Carbonneau A et al, 2007**).

A maturité, la pulpe représente 90 à 95% du poids du raisin, ses cellules possèdent des vacuoles représentant 99% de leur volume remplies majoritairement d'acides organiques et de sucres (**Diakou P. et Carde J.P, 2001**).

Le mésocarpe comprend aussi un endocarpe, une fine couche de cellules délimitant les loges carpellaires qui contiennent les pépins. Les pépins sont constitués d'un embryon et d'un albumen.



**Figure 03 : Coupe d'une baie de raisin et organisation tissulaire (Gibeaut, D. M, 1993 cité par Pauline R, 2019)**

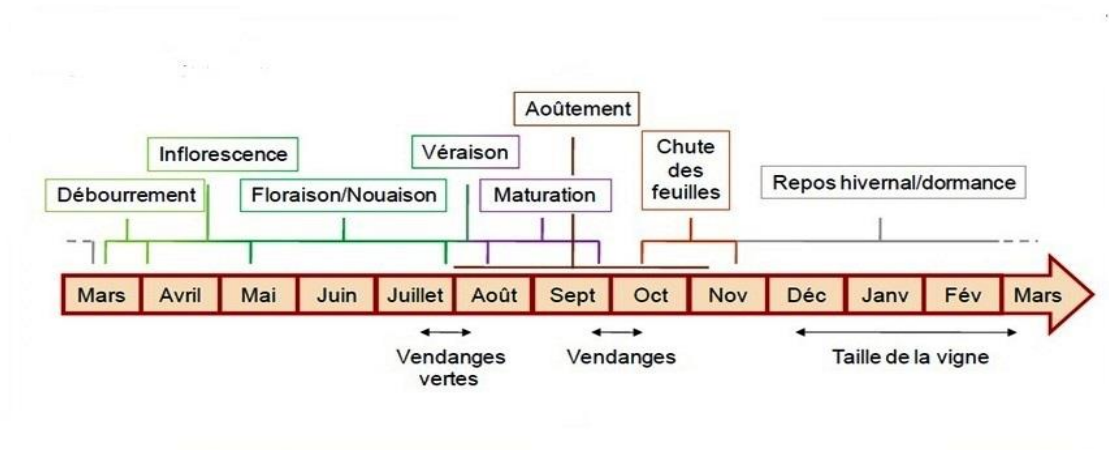


### 1.4.1 La baie de raisin

Le mûrissement de la baie de raisin se traduit par le ramollissement, le changement de couleur, l'accumulation de sucres associée à une diminution de l'acidité et la synthèse de composés aromatiques

La paroi joue plusieurs rôles importants positifs sur la baie :

- elle participe à la cohésion des cellules et confère donc les propriétés mécaniques de fermeté et de texture à la baie,
- elle représente une protection vis-à-vis de l'attaque d'agents pathogènes et est impliquée dans les phénomènes de résistance. (Marie-Agnès D, 2009)



**Figure N°04 : cycle végétatif annuel de la vigne (Hélène carrié, 2013)**

## 1.5. Classification botanique

**Tableau 01 :** Classification botanique de *Vitis vinifera* (USDA, 2002)

Règne	Plantae
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Rhamnales</i>
Famille	<i>Vitaceae</i>
Genre	<i>Vitis</i>
Espèce	<i>Vitis vinifera</i> L.
Sous-espèce	<i>Vitis vinifera</i> subsp.vinifera
Classification APG III	
Ordre	<i>Vitales</i>
Famille	<i>Vitaceae</i>

## 1.6. Utilisation du raisin

Le raisin est utilisé :

- comme fruit (fruit de table ou sous forme de raisin sec), pour l'alimentation et la santé ; 75 millions de quintaux de table et 8 millions de quintaux de raisins secs seraient consommés annuellement, soit presque l'équivalent de toute la production annuelle française de raisins.
- pour produire du vinaigre de vin.
- pour produire le pekmez, un sirop épais consommé en Turquie,

- pour produire de l'huile de pépins de raisin .
- pour produire du moût de raisin, du jus de raisin et des alcools. (INRA, 2008)

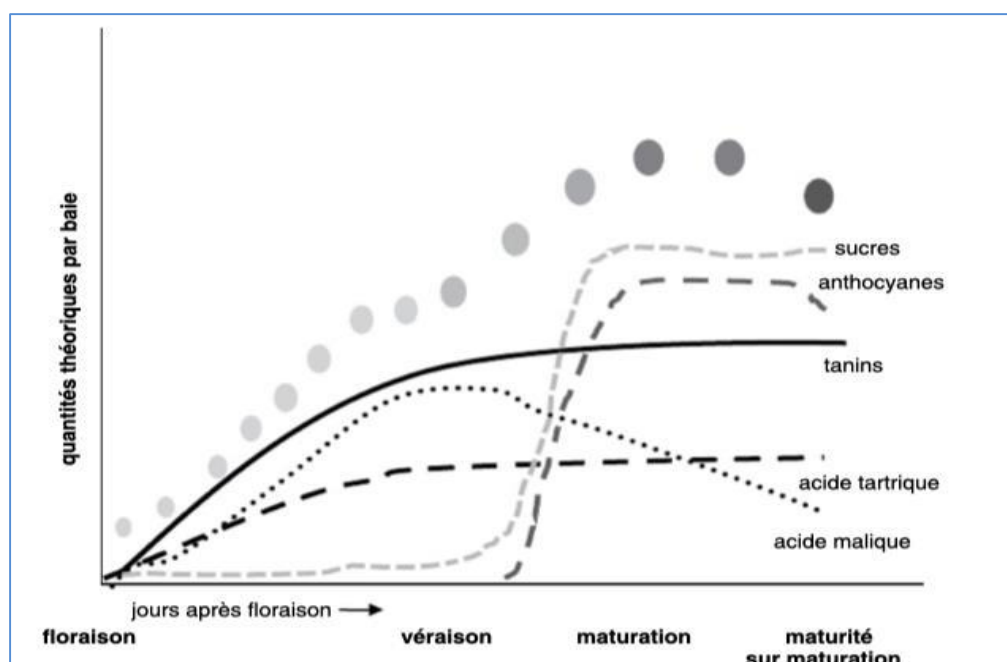
### **1.7. Composition et valeur nutritive**

Le raisin est un fruit qui contient divers éléments nutritifs, tels que vitamines, sels minéraux, glucides, fibres alimentaires et de composés phytochimiques. Les polyphénols sont les substances phytochimiques les plus importants dans le raisin, car ils possèdent de nombreuses activités biologiques et des avantages précieux à la santé (Shrikhande A.J. et al, 2000, Wada M. et al, 2007)

Le raisin est depuis longtemps réputé bon pour la santé, grâce à son contenu en vitamines A, C et B (dont la vitamine B1, B2, B6, B12, PP), en acides organiques (acide malique, acide tartrique que l'organisme métabolise facilement), en polyphénols (antioxydants de la familles des flavonoïdes et anthocyanes), en minéraux alcalinisant (potassium, et moindrement magnésium, manganèse et zinc) et en sucres facilement assimilables (fructose notamment).

**Tableau N°2: Composition et valeur nutritive du raisin (Afssa, 2010)**

Raisin cru (valeur nutritive pour 100g)			
<b>eau : 80,54 g</b>	cendres totales : 0,48g	fibres : 0,9 g	valeur énergétique : 69 kcal
<b>protéines: 0,72 g</b>	lipides: 0,16 g	glucides: 18,10 g	sucres simples: 15,48g
<i>oligo-éléments</i>			
<b>calcium : 10 mg</b>	fer : 0,36 mg	magnésium : 7 mg	phosphore : 20 mg
<b>potassium : 191 mg</b>	cuivre : 0,127 mg	sodium : 2 mg	zinc : 0,07 mg
<i>vitamines</i>			
<b>vitamine C : 10,8 mg</b>	vitamine B1 : 0,069mg	vitamine B2 : 0,070mg	vitamine B3 : 0,188mg
<b>vitamine B5 : 0,050 mg</b>	vitamine B6 : 0,086mg	vitamine B9 : 0 µg	vitamine B12 : 0,00µg
<b>vitamine A : 65 UI</b>	rétinol : 0 µg	vitamine E : 0,19 µg	vitamine K : 14,6 µg
<i>acides gras</i>			
<b>saturés : 0,054 g</b>	mono- insaturés : 0,007 g	polyinsaturés : 0,048g	cholestérol : 0 mg



**Figure N°05 :** Evolution des principaux métabolites primaires et secondaires par baie  
(Deloire, 2020)

### 1.8. Les variétés Algériennes

La viticulture algérienne se caractérise par la cultivation de diverses variétés de vigne, dont certaines sont spécifiques à la région et d'autres plus courantes à l'échelle internationale.

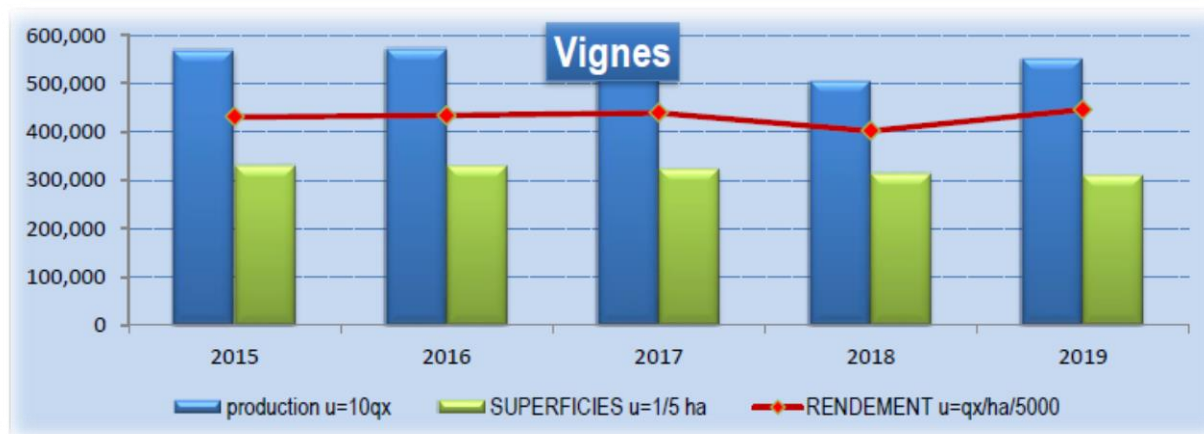
Les cépages blancs les plus courants sont la clairette pointue, le maccabeo, le grenache blanc et le furmint, tandis que pour les rouges, nous retrouvons le cinsault, le carignan, le grenache noir, le pinot noir, le grenache rose, la syrah, le morastel et l'alicante-bouschet. (Journal officiel Algérien, 2011)

Les variétés Algériennes de vigne ont été fixées par le journal officiel Algérien n°52 du 21 Septembre 2011

**Tableau N°3 : Variétés Algériennes de raisin (journal officiel Algérien, 2011)**

<b>Cépages de table</b>	
<i>1 - Adari</i> <i>2 – Ahmeur bouameur</i> <i>3 - Alphonse la vallee</i> <i>4 - Bezoul el khadem</i> <i>5 - Cardinal</i> <i>6 – Chaouch blanc</i> <i>7 - Chaouch rose</i> <i>8 - Chasselas</i> <i>9 - Dabouki</i> <i>10 - Dattier de Beyrouth</i> <i>11 - Gros noir des Beni Abbes</i> <i>12 - Guerbez = gros vert = saint jeannet</i> <i>13 - Italia</i> <i>14 - Madeleine du Sahel</i> <i>15 - Muscat d’Alexandrie</i> <i>16 - Muscat de Hambourg</i> <i>17 - Ohanes= UVA de almeria</i> <i>18 - Panse précoce = sicilien</i> <i>19 - Perle de ksaba</i> <i>20 - Perlette</i>	<i>21 -Reine des vignes</i> <i>22 - Servant blanc</i> <i>23 - Valensi = Mokrani = panse de</i> <i>Provence</i> <i>24 - Farana</i> <i>25 - Black pearl</i> <i>26 - Centennial</i> <i>27 - Argentina</i> <i>28 - King’s ruby</i> <i>29 - Aledo</i> <i>30 - Nerona</i> <i>31 - Bronx</i> <i>32 - Emerald</i> <i>33 - Christmas rose</i> <i>34 - Pasiga</i> <i>35 - Alvina</i> <i>36 - Dona Maria</i> <i>37 - Matilde</i> <i>38 - Datal</i> <i>39 - Danam</i>
<b>Cépage de cuve</b>	
<b>Raisins noirs ou roses</b>	<b>Raisins blancs</b>
<i>1 - Alicante bouschet</i> <i>2 - Aramon gris</i> <i>3 - Aramon noir</i> <i>4 - Cabernet franc</i> <i>5 - Cabernet sauvignon</i> <i>6 - Carignan</i> <i>7 - Cinsault</i> <i>8 - Grenache franc</i>	<i>1 - Chardonnay</i> <i>2 - Chenin Blanc</i> <i>3 - Clairette</i> <i>4 - Farana</i> <i>5 - Grenache blanc</i> <i>6 - Macabeu = Macabeo</i> <i>7 - Merseguerra = Listan = palomino</i> <i>8 - Muscat d’Alexandrie</i>

9 - Grenache rose	9 - Sauvignon
10 - Grenache velu	10 - Tizourine bouafrara = s. d'Algérie
11 - Merlot	11 - Ugni blanc = el maoui
12 - Morastel = gros matterou	12 - Valenci blanc
13 - Mourvedre = matterou fin	13 - Pinot Blanc
14 - Pinot noir	
15 - Syrah	
16 - Tipasi = toustrai = plant romain	
17 - Grenache gris	
18 - Grenache noir	




**Figure N° 06 : Production de la vigne en ALGERIE entre 2015-2019 (M.A.D.R, 2019).**

## 1.9. Etude de quelques variétés cultivées à la région de MASCARA

### 1.9.1 Cinsault

**Cinsaut** ou **Cinsault** (prononcé « San-ainsi ») est un rouge vin raisin, dans dont tolérance et la productivité de la chaleur le rendent important Le Languedoc-Roussillon et les anciennes colonies françaises de l'Algérie et du Maroc. Il est souvent mélangé avec des raisins comme Grenache et Carignane pour ajouter la douceur et le bouquet (**Robinson J, 1986**)

Petits grains de forme allongée, à la peau assez fine, au parfum musqué, on le récolte d'août à novembre (**Robinson J, 1986**)

	<b>Variété : Cinsault</b>	
	<b>Espèces :</b>	<i>Vitis vinifera</i>
	<b>En outre appelé :</b>	Cinsault, sao de Cinq, Ottavianello (plus)
	<b>Origine :</b>	La France
	<b>Régions notables:</b>	La France méridionale, Maroc, Algérie, Liban

**Figure 07 : Variété cinsault (Robinson J, 1986)**

Il a beaucoup de synonymes, dont peut-être le plus embrouillant est sa vente comme un raisin de table a appelé « Oeillade », bien qu'il soit différent de l'Oeillade « vrai » qui n'est plus cultivé. Dans L'Afrique du Sud, on l'a connu comme « ermitage », par conséquent nom de sa croix plus célèbre Pinotage (**Robinson J, 1986**)

Cinsault semble être une variété antique qui peut avoir provenu de l'Hérault, mais pourrait également avoir été apporté par des commerçants du méditerranéen oriental.

Cinsaut est populaire en Algérie pour sa résistance de sécheresse, et est employé pour faire de grands volumes du vin (**Robinson, J, 1986**)



Il est réputé pour sa polyvalence et sa capacité à s'adapter à différents climats, notamment les zones chaudes et ensoleillées.

➤ *Caractères ampélographiques*

- Bourgeonnement cotonneux blanc à bordure rouge.
- Feuilles adultes orbiculaires à 5 lobes, avec sinus pétiolaire presque fermé, des sinus latéraux profonds en V, des dents longues, un limbe involuté.
- Rameaux côtelés glabres avec de grandes vrilles. (Robinson, J, 1986)


**Utilisations :**

Le cinsault est principalement utilisé pour produire des vins rosés et rouges, mais il peut également être utilisé pour faire des vins de table. En Afrique du Sud, il est souvent assemblé avec le pinot noir pour donner naissance au pinotage. (Vidaud J. et al, 1993)

**1.9.2. Muscat rouge**

Variété ancienne, peau fine et de couleur rouge-violet sombre, gout muscat, maturité début septembre (Vidaud J. et al, 1993)

**Muscat** famille de raisins des espèces *Vitis vinifera* est largement développé pour vin, raisins secs et raisins de table. Leur couleur s'étend de blanc au noir proche. Le muscat a presque toujours un arôme floral doux prononcé. Des raisins de muscat sont cultivés autour du monde dedans La Roumanie, La Bulgarie, La Serbie, La France, Le Portugal, La Grèce, L'Espagne, L'Australie, La Californie, La Hongrie, Le Canada, L'Italie, La Turquie, et d'autres endroits. La largeur et le nombre de variétés de muscat suggèrent que ce soit peut-être la variété de raisin domestiquée la plus ancienne, et il y a des théories c'est la plupart des familles dans *Vitis vinifera* la famille de raisin sont descendues de la famille de muscat (Robinson J, 1986)

	<b>Variété : Muscat noir</b>	
	<b>Espèces :</b>	<i>Vitis vinifera</i>
	<b>Origine :</b>	La Grèce
	<b>Régions notables:</b>	La Roumanie, La Bulgarie, L'Algérie, La France, Le Portugal, La Grèce, L'Espagne, L'Australie, La Californie, La Turquie.


**Figure 08 : Variété Muscat noir (Vidaud J. et al, 1993)**

➤ **Caractères ampélographiques**

- Extrémité du jeune rameau duveteux blanc à liseré carminé.
- Jeunes feuilles aranéuses, très bronzées.
- Feuilles adultes, à 5 lobes, avec des sinus supérieurs profonds et très étroits, un sinus pétiolaire fermé à bords parallèles, des dents anguleuses, très étroites, en deux séries, un limbe glabre. (Vidaud J. et al, 1993)

### 1.9.3. Grenache

**Grenache** (prononcé *gren-cendre*) (dans Espagnol, **Garnacha**, dedans Catalan, **Garnatxa**) est probablement la variété la plus largement plantée du vin rouge raisin dans le monde. Il mûrit tard, a besoin ainsi des conditions chaudes et sèches comme ceux trouvés dedans L'Espagne et dans les sud de La France (Robinson J, 2006).

	<b>Variété : Grenache noir</b>	
	<b>Espèces :</b>	<i>Vitis vinifera</i>
	<b>Origine :</b>	L'Espagne
	<b>Régions notables:</b>	L'Espagne, La France, l'Italie

**Figure 9 : Variété Grenache noir (Robinson J, 2006)**

Grenache a pu avoir provenu de l'Espagne, probablement d'Aragon ou La Catalogne, Cependant, depuis lors, les Pyrénées ont délimité la France méridionale et le reste du bassin méditerranéen. La variété de raisin connue sous le nom de Cannonau, qui est supposée provenir de la Sardaigne, pourrait en réalité être originaire de cette île. Cela suggère qu'elle aurait été importée en Espagne lorsque la Sardaigne était sous domination aragonaise (**Robinson J., 2006**).

Grenache vient dans les versions de « noir », de « gris » et « blanches », plus un mutant avec un épiderme changé.

➤ **Caractères ampélographiques**

- Bourgeonnement légèrement cotonneux.
- Jeunes feuilles vertes brillantes.
- Rameaux herbacés verts et sarments aoûtés jaunes.
- Feuilles adultes avec des dents rectilignes, des nervures et le pétiole rouges, un limbe tourmenté lisse et face inférieure une villosité faible.
- Grappes moyennes à grosses et baies de taille moyenne et arrondies.

## **1.10. Les bienfaits du raisin**

### **1.10.1. Le raisin et la longévité**

Les bénéfices de la restriction calorique ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces animales mais de manière encore incomplète chez l'homme. On sait que le resvératrol (dérivé phénoliques), une substance contenue dans le raisin, exerce chez la levure, la drosophile et le ver de laboratoire les mêmes types d'effets que la restriction calorique. Des chercheurs de Boston ont réussi en 2006 à mettre ses effets en évidence chez des souris. Leurs résultats, publiés dans le journal *Nature*, montrent que les effets néfastes d'un régime hypercalorique sur la longévité et la santé des souris sont neutralisés par le resvératrol par rapport aux souris qui n'en reçoivent pas, celles qui prennent du resvératrol sont plus sensibles à l'insuline. Elles ont aussi un nombre plus important de mitochondries, un facteur de vitalité et de longévité (**Baur J.A., 2006**).

### **1.10.2. Le raisin et les maladies cardiovasculaires**

Des chercheurs de Madrid ont demandé à 15 personnes en bonne santé et à 26 personnes hémodialysées – plus à risque de maladie cardiaque – de boire tous les jours 100 ml de jus de raisin. Après 2 semaines, tous les volontaires présentaient une baisse du cholestérol LDL (« mauvais » cholestérol) et une augmentation du HDL (le « bon » cholestérol).

Chez les patients hémodialysés, le rapport « cholestérol total sur HDL », un marqueur des maladies cardiovasculaires, avait diminué de façon significative, suggérant une baisse du risque de maladie. Les scientifiques ont poursuivi leurs expériences sur les patients hémodialysés et recherché les concentrations de la protéine MCP-1, un marqueur de l'inflammation associé aux maladies cardiovasculaires. Après trois semaines de consommation de jus de raisin, ces protéines avaient diminué de 56 %. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que le jus de raisin aide les vaisseaux à se dilater en favorisant la libération de monoxyde d'azote (**Castilla P, 2006**).

### **1.10.3. Le raisin et le cancer**

Plusieurs études ont étudié les effets anticancéreux du raisin. En février 2006, des chercheurs ont montré sur des rats, que le jus avait un effet protecteur contre le développement de tumeur mammaire (**Jung K.J, 2006**).

La même année, deux autres études ont mis en évidence que les extraits de peau de raisin sont très efficaces pour inhiber la croissance de certaines cellules tumorales en culture (**Morre D.M, 2006**) ; et que les extraits de pépins diminuent la croissance et la multiplication des cellules cancéreuses et augmentent l'apoptose (**Kaur M, 2006**).

### **1.10.4. Le raisin et les radicaux libres**

Les flavonoïdes du raisin ont fait l'objet en 2003 d'une étude menée sur 67 adultes qui ont bu quotidiennement 480 ml de jus de raisin en plus de leur alimentation. Après 8 semaines, les volontaires présentaient une augmentation de leur capacité antioxydante plasmatique ainsi qu'une diminution des dommages exercés par les radicaux libres sur l'ADN (**Park Y.K, 2003**).

L'effet antioxydant du raisin a été confirmé par 2 autres études : la première, menée sur des rats, a montré que le resvératrol était efficace pour baisser le taux de radicaux toxiques (**Lu K.T, 2006**) ; la seconde, sur des cultures de cellules, que les polyphénols des pépins atténuaient leur stress oxydant (**Fujii H, 2006**).

# CHAPITR II

## *Les polyphénols*

## 1. Les polyphénols

### 1.1. Généralités

Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes, les stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité biologique (Ali N.A.A. *et al*, 2001, Li H.B. *et al*, 2007).

Le terme polyphénols est introduit en 1980. Il remplace le terme ancien de **Tanin végétal**. De la lignée des grandes familles de molécules largement présentes dans le règne végétal, on retrouve tout un panel de composés phénoliques allant de molécules simples (acides phénoliques) à des molécules complexes (Tanins) (Chou E.J. *et al*, 2001)

Ils sont présent dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits, graines et écorces) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (Boizot N., Charpentier J.P, 2006).

Les composés phénoliques sont des molécules biologiquement actives, ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, antiradicalaire et antimicrobiens (Zhang YJ, *et al*, 2015)

Les principales sources alimentaires des polyphénols sont : les fruits et légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols. (Holvoet, 2004)

Cependant, certains rapports ont également montré qu'à des concentrations plus élevées, l'effet des composés phénoliques sur la santé était négatif, certaines structures en particulier favorisant ces effets (Ugartondo, V *et al*, 2006).

De plus, certains composés phénoliques de haut poids moléculaire n'étaient pas absorbés. (Lu Y *et al*, 1998), (Wroblewski, K *et al*, 2001).

## 1.2. Classification

C'est une classe constituée d'environ 8000 composés. Ils peuvent être répartis selon, la complexité de leur squelette de base, le degré de modification de ce squelette et les liaisons possibles de ces composés avec d'autres molécules, (**Macheix et al, 2005**)

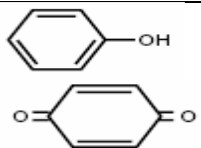
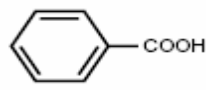
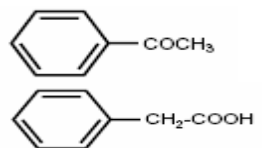
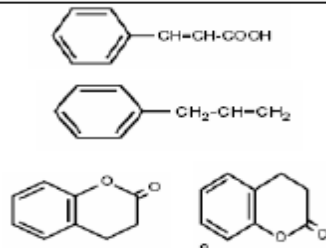
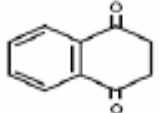
- les flavonoïdes : flavonols, flavanones, chalcones, et aurone
- Acides phénoliques : benzoïques, cinnamiques, coumariques et tannins hydrolysables.
- Stilbènes.
- Lignines

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton J, 1999**).

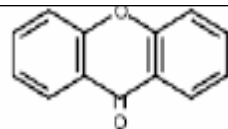
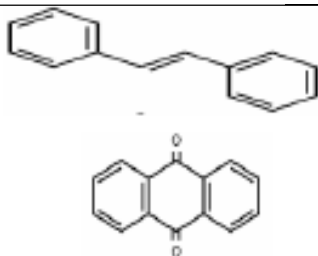
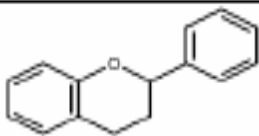
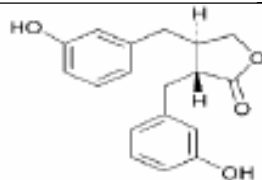
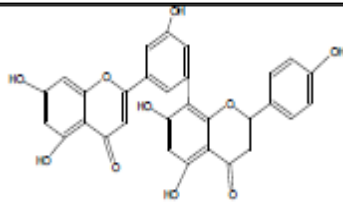
Le tableau N°4 montre les structures de base de quelques classes des polyphénols (**Robards K. et al, 1997**).

**Tableau 04 :** Squelette carbonique de quelques classes des polyphénols

(**Robards K. et al, 1997**)

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Structure de base
6	C <sub>6</sub>	Phénols simples benzoquinones	
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides phénoliques	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acétophénone, acides phénylacétique	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinnamique, phenylpropenes, coumarines, isocoumarines	
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones	



13	$C_6-C_1-C_6$	Xanthones	
14	$C_6-C_2-C_6$	Stilbenes anthrachinones	
15	$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides et isoflavonoides	
18	$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	
30	$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonoides	
n	$(C_6-C_3)_n$ $(C_6)_n$ $(C_6-C_3-C_6)_n$	Lignines Caticholmelagnines Tanins condensés	

### 1.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont contenus dans un certains nombre de plantes agricoles et médicinales. Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone (Psotová J. *et al*, 2005)

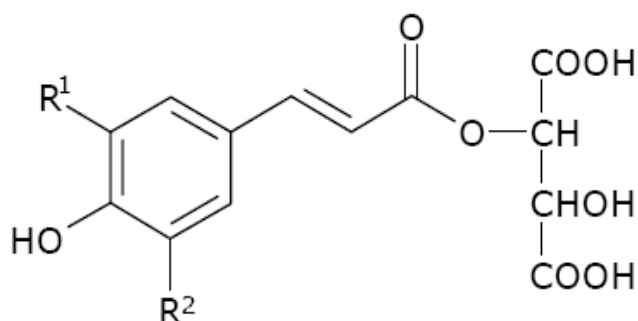
#### 1.2.1.1. Les acides benzoïques

Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, cyringiques, salicyliques, O-hydroxybenzoïques et gentisiques (Ribereau G.P, 1968)

### 1.2.1.2. Les acides cinnamiques

Ces acides possèdent une structure du type C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Nous retrouvons dans le raisin la forme trans de manière prépondérante tandis que la forme cis correspondrait à des artéfacts d'extraction. Et sont généralement combinés à des molécules organiques (**Macheix J J et al, 2005**)

Les acides cinnamiques sont étudiés pour ses diverses activités biologiques comme antioxydant, hépatoprotecteur, insectifuge, antidiabétique et anticholestérolémique (**Sharma P, 2011**)



Esters hydroxycinnamiques	R1	R2
Acide <i>t</i> -caféique	OH	H
Acide <i>p</i> -coumarique	H	H
Acide <i>t</i> -fertarique	OCH3	H
Acide <i>t</i> -sinapique	OCH3	OCH3

**Figure 10:** Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique présents dans les raisins.

### 1.2.1.3. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des acides phénoliques

Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prebiotiques, antioxydant, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est faible et considéré non toxique, le mieux caractérisé est l'acide caféique (**Psotová J. et al, 2003**). Cet acide et l'acide

férulique empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris, l'acide gallique inhibe la formation du cancer œsophagien chez les rats (**Hale A.L, 2003**).

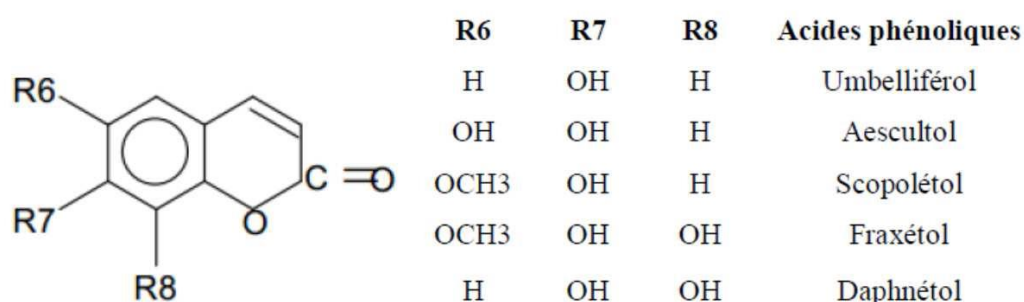
D'un point de vue médical, de nombreuses études ont suggéré que les polyphénols pourraient protéger contre les maladies dégénératives en raison de leur pouvoir antioxydant. (**Leifert et Abeywardena, 2008**)

### 1.2.3. Les coumarines

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de fève tonka (*Dipterix odorata* Wild., Fabaceae) d'où fut isolée en 1982 la coumarine. Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (**Ford R.A. et al, 2001**).

Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (**Hofman L., 2003**).

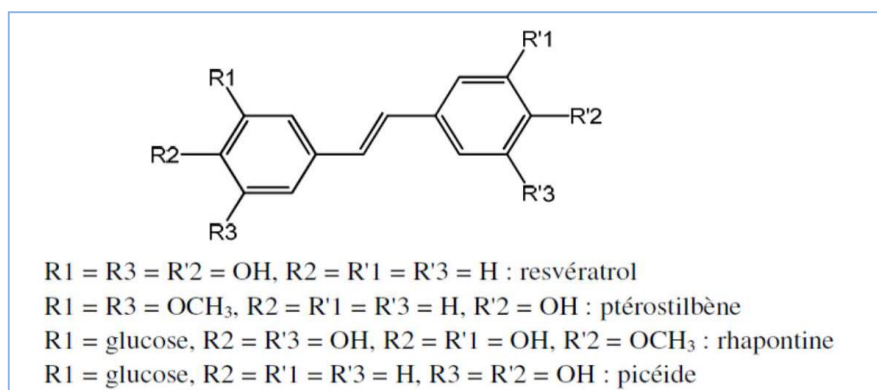
Les coumarines sont des molécules biologiquement actives, elles manifestent diverses activités : anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique (**Ojala T. et al, 2000, Chen C.N. et Khan I. et al, 2004**).



**Figure N° 11 : Structure chimique des acides coumariques (Macheix et al, 2005).**

### 1.2.4. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par un double liaison, formant un système conjugué. Les plus abondants dans le raisin sont le *trans*-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide, ainsi que les dimères : le resvératrol *trans*-déhydrodimère et l'*c*-viniférine (**Chanforan, 2010**)



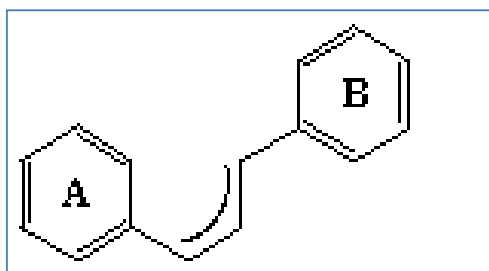
**Figure N° 12 : Structures chimiques des stilbènes (Chanforan, 2010).**

### 1.2.5. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) sont des substances généralement colorées répondues chez les végétaux ; on les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastides particuliers, les chromoplastes (**Guigniard J, 1996**).

Le terme flavonoïde désigne un vaste ensemble de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, on les retrouve dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes (**Macheix J J, 2005**).

Les flavonoïdes sont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en  $C_6$  (A et B), reliés par une chaîne en  $C_3$  (figure N°13) (**Bruneton J., 1999**).



**Figure 13 : Squelette de base des flavonoïdes (Dean F.M., 1963).**

### 1.2.3.1. Biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse des **flavonoïdes** (Figure 8) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone. Par l'action d'enzymes, cette chalcone de couleur jaune, est métabolisée en différentes classes de flavonoïdes: flavanone (10), aurone (9) (jaune), 2,3-dihydroflavonol ou flavanonol (12), flavone (11) (ivoire), anthocyanidine (15) (rouge-bleu), flavonol (13) (jaune), catéchine (14)... (**Heller W. et Forkmann G, 1993**)

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire. A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone (**Heller W. et Forkmann G, 1993**).

Ainsi, La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques: flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (**Medic Sanic M. et al, 2004**).

La biosynthèse des composés phénoliques dans les raisins de *Vitis vinifera* est sous contrôle génétique, et les différences entre les variétés de raisins sont parfois suffisamment significatives pour permettre d'utiliser la composition phénolique des raisins comme un outil pour l'authentification et la différenciation des cépages. (**Gomez-Alonso et al, 2007**), (**Mattivi et al, 2006**)

**Tableau 05 : Distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes**  
**(Heller W. et Forkmann G., 1993, Di carlo G. et al, 1999, Sampson L. et al, 2002)**

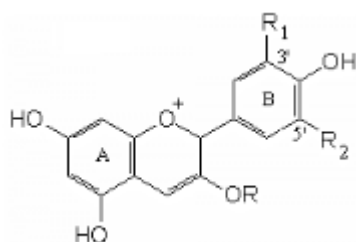
Famille	Molécules principales	Distribution
flavone	apigénine, lutéoline, chrysine	pomme, céleri, grains de céréale.(teneur = 5-100 mg/kg) herbes aromatiques (persil, romarin, thym), Petroselinum sativum, Apiumgraveolens...
flavanone	hespéritine, naringine, taxifoline)	citrus et agrumes (teneur = 250-6000 mg/kg eucalyptus globulus
flavonol	quercétine, myricétine et kaempférol	pomme, pamplemousse, radis, endive, brocoli, oignon, chou, laitue, vin, Sophora japonica, Stellaria media et Vitis vinifera
isoflavones	genisteine et daidzeine	légumineuses (soja, haricots noirs et pois chiches verts), pousses de luzerne et de trèfle et les graines de tournesol (teneur = 150-1500 mg/kg), Pueraria labata, stellaria media
flavan-3-ols,	(+)-catéchine (-)-epicatéchine, (-)-epigallocatechine et leurs esters de gallate	thé vert et noir, vin rouge (teneur = 5-250 mg/kg) Vitis vinifera
anthocyanes	cyanidine, pelargonidine	fruits et légumes rouges et violets (pommes, raisins, baies, kaki, cassis...) (100-4000 mg/kg)

### 1.2.3.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés (**Guignard J, 1996**)

Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange

Leur structure de base se caractérise par un noyau "flavon" glucosylé en position C<sub>3</sub> (**Buchanan et al, 2000**). 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 (figure 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

Si la forme est monoglucoside: R= glucose

**Figure 15** : Structure de quelques anthocyanidine (**Ribereau G.P., 1968**).

### Mécanisme de synthèse des anthocyanes :

Au sein de la cellule, les anthocyanes sont biosynthétisées au niveau de la face externe du réticulum endoplasmique (RE).

Dans la baie de raisin, les anthocyanes seraient transportées de leur site de biosynthèse au niveau de la face externe du réticulum endoplasmique (RE) jusqu'à leur site de stockage, la vacuole (**Camila GOMEZ, 2009**)

### 1.2.5.3. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes

Les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine sanitaire où on leur reconnaît des activités antivirales, antispasmodiques, antitumorales, antiagrégation plaquettaires, antiallergiques, hypocholestérolémiantes, antiinflammatoires, antihypertensives et antimicrobiennes (**Das H.C. et al, 1994, Yochum L. et al, 1999, Kim H.P. et al, 2004, Cushine T.P.T. et Lamb A.J. 2005, Kini F. et al, 2008**).

Certains flavonoïdes (notamment du soja) ont un effet préventif sur le cancer du sein, de la prostate et l'ostéoporose (**Besle J.M. et al, 2004**).

D'autres études suggèrent un rôle protecteur des flavonoïdes contre les maladies coronariennes, en empêchant le dépôt de graisses sur les parois des artères (**Zabri H. et al, 2008**).

Les flavonoïdes peuvent empêcher aussi le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez les animaux diabétiques (**Marfak A, 2003**).

Les flavonoïdes et en particulier la quercétine sont des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxyde particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique, ce qui est un élément important pour la protection des membranes cellulaires et qui complète les systèmes enzymatiques de défense cellulaire (**Milane H., 2004**)

#### **1.2.6. Les tanins**

Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (**Peronny S, 2005**)

On les trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, café, datte, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (**Hemingway R.W, 1992**).

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères)
- Les tanins hydrolysables, esters des acides phénols et de glucose.

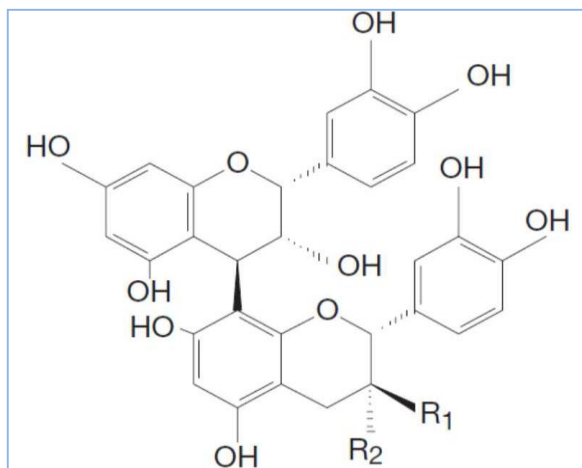
##### **1.2.6.1. Les tanins condensés (flavan-3-ols)**

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidine, sont largement répandus dans l'alimentation humaine (fruits, légume, thé, ...).

Les tanins jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits (**Haslam E, 1998**). Ce 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 (**Porter L.J. et al, 1986**). Ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides



minéraux dilués mais forment à l'ébullition des composés insolubles appelés phlobaphènes ou rouge de tanins (**Guignard J., 1996**).

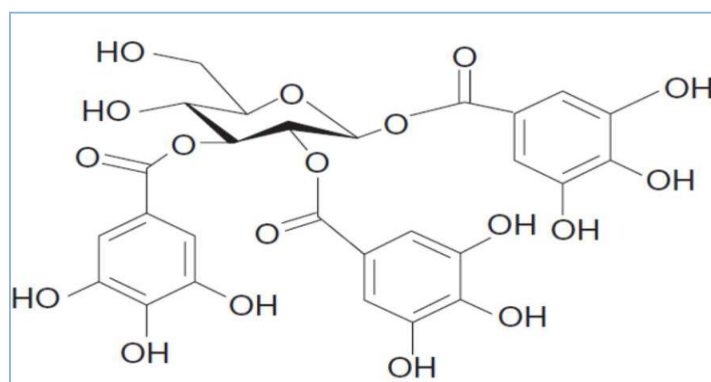


**Figure N°16 :** Structure chimique des tanins condensés (**Achat, 2013**).

#### 1.2.6.2. Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acide phénols, ou de dérivés d'acides phénols ; la molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides (**Brunton, 1999**).

Ils subissent une hydrolyse acide et basique et s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude (**Vermerris et Nicholson, 2006**).



**Figures N° 17:** Structures chimiques typiques des tanins hydrolysables (**Achat, 2013**).

### 1.2.6.3. Activité biologique et intérêt pharmacologiques des tanins

Les applications médicales des plantes à tanins découlent de leur affinité pour les protéines :

- Ils ont un effet antidiarrhéique, et par voie externe, ils imperméabilisent les couches superficielles de la peau, sont vasoconstricteurs et limitent la perte en fluides.
- Ces propriétés, ajoutées par ailleurs à leur effet antiseptique, en font des molécules intéressantes pour la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures, et les rendent utilisables dans le traitement des diarrhées infectieuses (**Okuda T. et al, 1983, Bruneton J., 1999**).
- Ils ont des grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénol. Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples (**Peronny S, 2005**).
- Plusieurs études montrent l'activité anti tumorale de plusieurs oligomères des tanins hydrolysables (**Chung K.t et Wei C-L., 2001**). Une étude sur la plante *Eugenia jambos* a suggéré que les tanins hydrolysables de cette plante induisent l'*apoptose* sur les cellules humaines leucémiques ce qui présente un autre mécanisme d'activité antioxydante des tanins (**Yang L.L. et al, 2000**).

## 1.3. Intérêts des composés phénoliques dans le domaine agroalimentaire

### 1.3.1. Les polyphénols et la qualité sensorielle des aliments

Généralement les polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur en polyphénols (**Lugasi A. et al, 2003**).

L'astringence est la capacité des tanins à former des complexes stables avec les protéines et les sucres qui leur confère leurs propriétés gustatives et leur astringence, car ils précipitent les protéines salivaires entraînant avec elles leur "cortège" de molécules d'eau qui lubrifiaient alors la muqueuse buccale et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche (**Bravo L, 1998, Verge S. et al, 1999**).

L'astringence est liée à la polymérisation des tanins puisque la diminution de l'astringence dans les fruits lors de leur maturation est due à une augmentation de la polymérisation des tanins (**Peronny S, 2005**).

### **1.3.2. Les polyphénols comme colorants alimentaires (additifs)**

Même si le consommateur se méfie de tout ce qui peut porter le terme de colorant, l'utilisation des colorants naturels progresse depuis plusieurs années.

Cette avancée est renforcée par la crainte inspirée par la toxicité potentielle de certains éléments synthétiques comme la tartrazine. Les polyphénols utilisés comme colorants sont essentiellement des préparations anthocyaniques. Elles ont l'avantage d'être solubles dans l'eau. En revanche, elles sont très sensibles au pH avec une teinte évoluant du rouge au violet.

Les principales utilisations sont les boissons, la confiserie, les produits laitiers. Classées sous le code E163.

### **1.3.3. Les polyphénols comme antioxydants, conservateurs (additifs)**

Les polyphénols constituent une grande classe d'antioxydants conservateurs naturels. La plupart des herbes et épices utilisées en cuisine ont été testées pour leur pouvoir antioxydant. Les molécules actives présentes dans ces végétaux sont essentiellement de nature phénolique (**Toursel P, 1997**).

## **2. Rôle et intérêt des composés phénoliques**

### **2.1. Chez les végétaux**

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...),

Dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), (**Fleuriet A et al, 2005**).

## 2.2. Chez les humains

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (**Fleuriet A et al, 2005**).

Spécifiquement, on attribue aux flavonoïdes des propriétés variées: veinotonique, antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, estrogénique et/ ou anti-estrogénique.

Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans le tableau N°06

Tableau N° 06 : les différentes activités biologiques des polyphénols.

Polyphénols	Activités biologiques	Auteurs
<b>Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)</b>	Antibactériennes, anti-ulcéreuses, antiparasitaires antifongiques, antioxydantes	(Sannomiya M et <i>al</i> , 2005) (Gurbuz I et <i>al</i> , 2009)
<b>Coumarines</b>	Protectrices vasculaires, anti- inflammatoires, anti parasites analgésiques et anti oedémateuses	(Ito C et <i>al</i> , 2005) (Smyth T et <i>al</i> , 2009)
<b>Flavonoïdes</b>	Antitumorales, antiparasitaires, vaso, dilatoires, antibactériennes, anti carcinogènes, anti-inflammatoires, analgésiques, hypotenseurs, antivirales, diurétiques, ostéogène, antioxydantes, anti- atherogéniques, antithrombotique, anti- allergique	(Wollgast J et <i>al</i> , 2000) (Hitara T et <i>al</i> , 2009), (Tripoli E et <i>al</i> , 2007) (Shon H Y et <i>al</i> , 2004)
<b>Anthocyanes</b>	Protectrices capillaro-veineux, anti oxydant	Bruneton J, 1993
<b>Proanthocyanidines</b>	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydantes, antitumorales, antifongiques et anti-inflammatoires	Masquelier J et <i>al</i> , 1979)
<b>Tannins galliques et catéchiques</b>	Antioxydantes	(Okamura H et <i>al</i> , 1993) (Kubata BK et <i>al</i> , 2005)
<b>Lignanes</b>	Anti-inflammatoires, analgésiques	(Kim J Y et al, 2009)
<b>Saponines</b>	Antitumorale, anticancérigène,...	(Nebeling L., 2002 )
<b>Phytostérols</b>	Agent de protection contre l'hormone dépendant du cancer de colons	(Nebeling L., 2002 )

### 3. Les composés phénoliques du raisin

Le raisin, fruit de la vigne, contient à sa maturité principalement de l'eau et des sucres (glucose, fructose, pectine et polysaccharides). Il possède aussi d'autres composés comme, des terpènes (citrol, geraniol...), des flavones, des anthocyanes (responsables de la couleur) et des tanins (**Attia F., 2007**).

Les composés phénoliques comprennent principalement les anthocyanes, les flavanols, les flavonols, les stilbènes (resvératrol) et des acides phénoliques (**Dopico-Garcia et al, 2008, Spacil Z. et al, 2008**).

Les anthocyanes sont des pigments, et existent principalement dans la peau du raisin. Les flavonoïdes sont largement distribués dans les raisins, en particulier dans les graines et les tiges, et principalement contiennent (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et procyanidines polymères. Les anthocyanes sont des composés phénoliques principaux dans les raisins rouges, tandis que flavan-3-ols sont plus abondants dans les cépages blancs. (**Chacona, M.R. et al, 2009, Cantos E. et al, 2002**).

Les **anthocyanes** et les **tanins** sont les polyphénols les plus abondants dans le raisin. Les anthocyanes sont les pigments rouges des raisins, localisés essentiellement dans la pellicule et exceptionnellement dans la pulpe.

Leur nomenclature est basée sur la distinction entre les composés non flavonoïdes et les flavonoïdes.

#### 3.1. Les composés non-flavonoïdes

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

##### 3.1.1. Les acides phénoliques

On distingue tout d'abord les dérivés de l'acide benzoïque, composés d'un squelette à sept carbones. Ils sont principalement représentés dans le raisin par l'acide gallique, qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine. D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide t-caféique, l'acide fertarique et l'acide t-sinapique (**Singleton V.L. et al, 1999**).

### 3.1.2. Les stilbènes

Les stilbènes les plus abondants dans le raisin sont le *trans*-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide, ainsi que les dimères : le resvératrol *trans*-déhydrodimère et l' $\epsilon$ -viniférine (**Lamuela-Raventos R. M, 1994**)

### 3.2. Les flavonoïdes

Dans le raisin, trois principaux types de flavonoïdes sont accumulés, les flavan-3-ols, les flavonols et les anthocyanes.

#### 3.2.1. Flavan 3-ols

Les flavan-3-ols sont présents dans le raisin sous forme de monomères et de structures polymérisées, appelées proanthocyanidines ou tannins condensés. Les structures de base des proanthocyanidines, sont les flavan-3-ols monomères stéréo-isomères, (+)-catéchine et (-)-épicatéchine (**Dixon R.A. et al, 2005**).

Au sein du raisin, les proanthocyanidines se différencient entre les différents tissus par leur degré de polymérisation et par la proportion des différentes sous-unités. Au sein des pépins, les sous-unités des proanthocyanidines sont la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine avec des degrés de polymérisation inférieurs à 10 et des taux de galloylation de 10 à 20% (**Prieur C. et al, 1994**)

Au niveau de la pellicule, ils sont composés majoritairement d'unités de (+)-catéchine, de (-)-épicatéchine et de (-)-épigallocatechine avec des degrés de polymérisation aux alentours de 30 et des taux de galloylation inférieurs à 5% (**Souquet J.M. et al, 1996**).

#### 3.2.2. Flavonols

Les flavonols sont des pigments jaunes qui s'accumulent dans les baies à maturité, notamment en réponse à l'exposition au rayonnement UV.

Dans les cépages rouges, on détecte majoritairement la quercétine (44%), la myricétine (37%) et en plus faible quantité le kaempférol, la laricitine, l'isorhamnetine et la syringétine (**Mattivi F. et al, 2006**)

Dans les cépages blancs, on trouve principalement de la quercétine (81%) et du kaempférol (17%) et en plus faible quantité l'isorhamnetine (**Mattivi F. et al, 2006**)

### 3.2.3 Anthocyanes

Harborne et Williams (2001) ont rapporté 18 structures d'anthocyanidines, Chez le raisin de *V. vinifera*, seulement cinq anthocyanidines (delphinidine, cyanidine, péonidine, pétunidine et malvidine) sont présentes. Ces molécules instables sont ensuite glycosylées en position 3 pour former des anthocyanes (**Baldi, A et al, 1995**).

Contrairement à d'autres espèces qui présentent des teneurs importantes en anthocyanes diglycosylées 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, A et al, 1995**).

### 3.3. Localisation et compartimentation des flavonoïdes dans la baie

La graine de raisin (*Vitis vinifera*) a été considérée comme une source très importante de composées phénoliques, essentiellement les monomères de catéchine et épicatechine, acide gallique et les polymères et les oligomères des procyanidines. Quant aux anthocyanes, elles sont localisées exclusivement dans la pellicule des cépages rouges. Dans le cas des cépages dits "teinturiers" (**Kennedy J.A et al, 2001**).

Dans le raisin, les différents flavonoïdes ont une localisation spatio-temporelle différente. Les flavan 3-ols sont accumulés principalement dans le pépin et la pellicule (**Kennedy J.A. et al, 2001**), et en très faible quantité dans la pulpe (**Verries C. et al, 2008**). Les flavonols sont uniquement présents dans la pellicule (**Downey M.O. et al, 2003**).



**Tableau N° 07 :** Distribution des composés phénoliques dans le raisin.

Resource	Composées Phénoliques	Références
<b>Pepin</b>	acide gallique, (+)-catechin, epicatechin, dimeric procyanidin, proanthocyanidins	Pastrana-Bonilla E. <i>et al</i> , 2003. Hernandez-Jimenez A. <i>et al</i> , 2009 Huang X.M. <i>et al</i> , 2005
<b>Peau</b>	Proanthocyanidins, acide ellagic, myricetin, quercetin, kaempferol, trans-resvératrol	Pastrana-Bonilla E. <i>et al</i> , 2003 Hernandez-Jimenez A. <i>et al</i> , 2009
<b>Feuille</b>	myricetin, acide ellagic, kaempferol, quercetin, acide gallique	Pastrana-Bonilla E. <i>et al</i> , 2003
<b>Tige</b>	rutin, quercetin 3-O-glucuronide, trans-resvératrol, astilbin	Makris D.P. <i>et al</i> , 2008
<b>Raisin</b>	acide hydroxycinnamique, hydroxymethylfurfural	Karadeniz F. <i>et al</i> , 2000

### 3.4. Biosynthèse des flavonoïdes chez la baie de raisin

Chez la vigne, la voie métabolique des flavonoïdes a été décrite pour la première fois par Sparvoli et *al*, 1994.

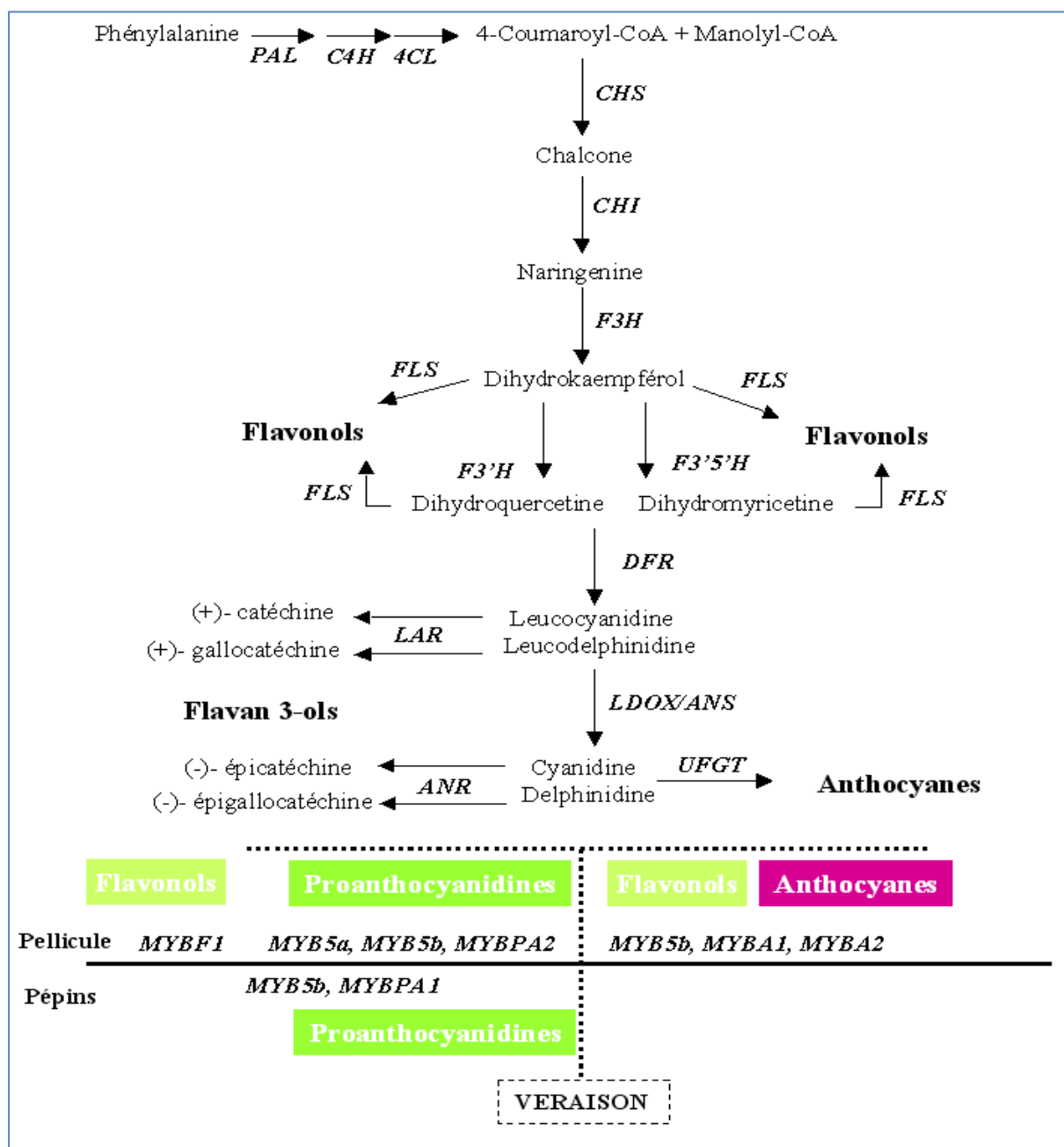


Figure N°18 : Voie métabolique des flavonoïdes dans la baie de raisin (Sparvoli et *al*, 1994)

# CHAPITRE III

*Les Activités Biologiques Étudiées*

## 1. Les activités biologiques étudiées

### 1.1. Activité antioxydante

Une molécule considère comme antioxydant « toute substance qui, présente en faible concentration par rapport à un substrat oxydable, retarde significativement ou inhibe l'oxydation de ce substrat » (**Antolovich, M et al, 2002**)

Le monde végétal contient des concentrations élevées de nombreux antioxydants redox-actifs tels-que les polyphénols, les caroténoïdes, les tocophérols, l'acide ascorbique et les enzymes ayant une activité antioxydante, qui combattent les dommages oxydatifs dangereux des composants des cellules végétales (**Pisoschi et al, 2009**).

#### 1.1.1. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont connus dans la chimie depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle. Ils ont été initialement utilisés pour décrire des composés intermédiaires en chimie organique et inorganique (**Rochette et al, 2013**).

Ce sont des molécules ou fragment de molécules très réactives, puisqu'ils contiennent des électrons non appariés dans leur orbite extérieure (**Penna et al, 2009**), ils cherchent donc à atteindre un état stable en s'appropriant les électrons des molécules proches qui à leur tour deviennent instables (**Capasso, 2013**).

Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour des radicaux libres et initient ainsi une chaîne de réaction (**Lev et al, 2007**). Un radical libre est le plus souvent instable ayant une durée de vie très courte (de l'ordre d'une micro à une nanoseconde).

#### 1.1.2. Les ROS (reactive oxygen species)

Parmi ensemble des espèces radicalaires pouvant de se former dans les cellules, on distingue un groupe limité de radicaux ayant une importance particulière en physiologie, que l'on qualifie primaires, proviennent directement de l'oxygène. Les autres types sont, quant à eux, considérés comme secondaires [Radical peroxy ( $\text{ROO}\cdot$ ), Radical alkoxy ( $\text{RO}\cdot$ )], se forment par

réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli G.P, 1997).

- **L'anion-radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )** est issu de la réaction de l'oxygène avec un électron, fréquemment au niveau de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale, ou encore lors de l'action des leucocytes engagés dans la défense contre les bactéries et les virus.
- **Le peroxyde d'Hydrogène ( $H_2O_2$ )**, provient d'une réaction entre deux anions superoxyde qui met fin au processus radicalaire. Il s'agit d'un oxydant beaucoup moins puissant.
- **Le radical hydroxyle( $HO^{\bullet}$ )**, le produit de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec les ions métalliques comme le fer. Avec une demi- vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus instable et le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène.
- **L'oxyde nitrique ( $NO^{\bullet}$ )**, produit par la NO synthétase, est un vasodilatateur physiologique et joue aussi un rôle de messenger inter neuronal. Il peut avoir un rôle néfaste.
- **L'oxygène singulet ( $^1O_2$ )** est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte, de la dégénérescence musculaire liée à l'âge et de certains cancers de la peau.
- **L'anion hypochlorite ( $ClO^-$ )** est produit à partir du peroxyde d'hydrogène par la myéloperoxydase (MPO). Il n'est présent que lors d'infections.
- **Le peroxynitrite ( $ONOO^-$ )** est issu de la réaction entre ( $O_2^{\bullet-}$ ) et ( $NO^{\bullet}$ ).très néfaste pour les protéines et les gènes, il est impliqué dans l'athérosclérose' la polyarthrite rhumatoïde (Hennebelle T, 2006).

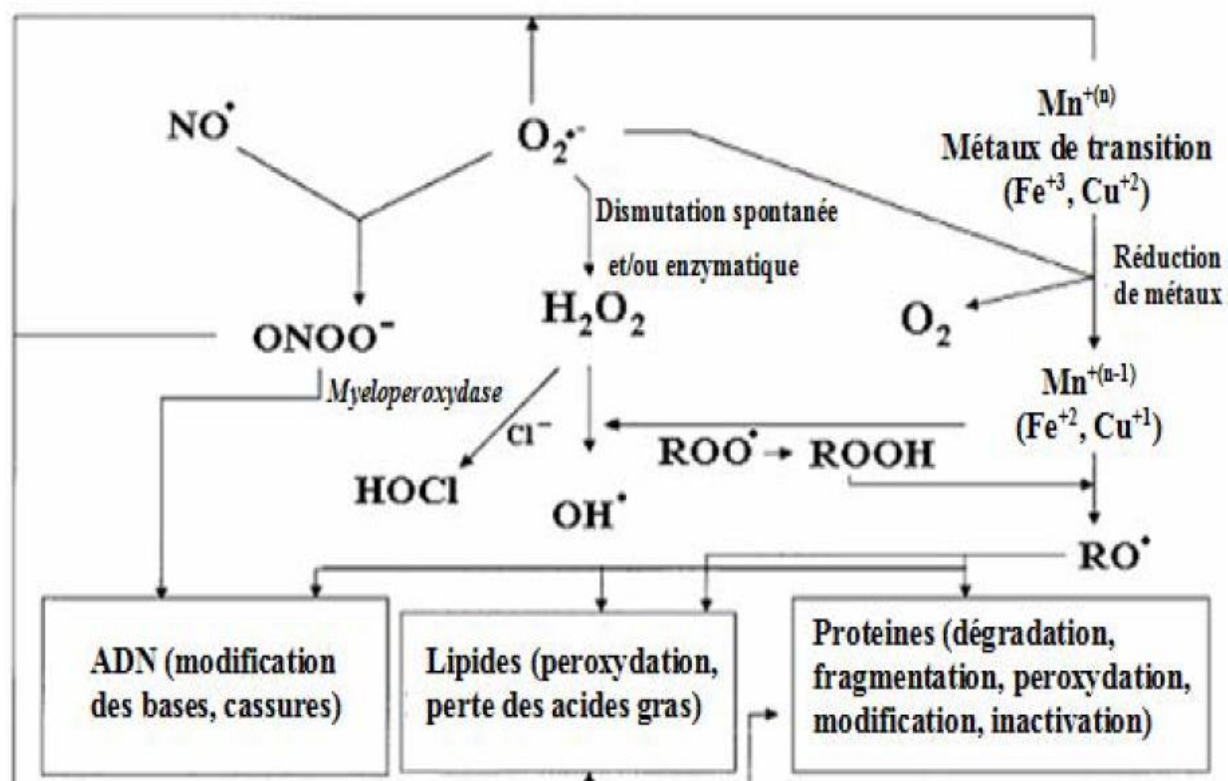
### 1.1.3. Le stress oxydant

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la production des radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (EOR). Leur élimination par des mécanismes protecteurs appelés antioxydants. Ce déséquilibre endommage les biomolécules importantes des cellules, avec un impact potentiel sur l'organisme entier (Durackova, 2010).

### 1.1.3.1. Les conséquences du stress oxydant

Le paradoxe des radicaux libres en biologie réside dans le fait qu'ils sont à la fois des espèces hautement dangereuses, capable de contribuer à de nombreuses maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie (Dal-Ros S, 2009).

Elles participent au fonctionnement de plusieurs enzymes, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction des cellules tumorales par apoptose, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certaines structures nerveuses et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes. Cependant, la production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Dal-Ros S. 2009).



**Figure N°19 :** Les cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR

(Kohen, R. et Nyska, A, 2002).

### 1.1.3.2. Implications pathologiques des EOR

En raison de leur forte réactivité, les EOR interagissent avec de nombreux substrats biologiques provoquant ainsi une perturbation de l'homéostasie cellulaire. Lorsque les systèmes de régulation de l'oxygène et de ses dérivés ne fonctionnent plus correctement, il en résulte des phénomènes de stress oxydant. Le rôle de ce dernier soit comme facteur déclenchant, soit comme élément aggravant au cours de l'évolution de nombreuses pathologies, est aujourd'hui largement établi. (Favier A., 2003).

De nombreuses études, qu'elles soient épidémiologiques ou cliniques, montrent que le stress oxydant pourrait intervenir dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines distinctes (Pincemail J. *et al*, 2002) allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (Tableau N°08). Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Sorg O., 2004, Valko M. *et al*, 2007).

**Tableau N°08:** Principales affections liées à la production des EOR.

Pathologies	Références
Lésions de reperfusion post-ischémique	Zweier J.L. et Talukder M.A.H., 2006
Maladies auto-immunes	Halliwell B. et Whiteman M. 2004
Arthrite rhumatoïde	Ahsan H. <i>et al</i> , 2003
Maladies inflammatoires	Densiov E.T. et Afanas'ev I.B., 2005
Athérosclérose	Harrison D. <i>et al</i> , 2003
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	Sorg O., 2004
Emphysème	Lechuer-Michel M.P. <i>et al</i> , 2001
Diabète sucré	Pal Yu B., 1994
Certains cancers	Valko M. <i>et al</i> , 2007
Anémie drépanocytaire	Martinez-Cayuela M., 1995

### 1.1.4. Mécanismes physiologiques de l'inactivation des ERO

L'organisme est capable, dans certaines mesures, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense développés au cours de l'évolution (Hennebelle T, 2006).

- Les métaux capables de catalyser la formation du radical hydroxyle tels que le fer et le cuivre, sont physiologiquement séquestrés et transportés par des protéines comme la transferrine et l'albumine qui agissent en tant d'antioxydants primaires
- Certaines enzymes ont également un rôle de détoxification des ERO. Le superoxydedismutase (SOD) convertit le radical anion-superoxyde en peroxyde d'hydrogène, moins toxique. Ce dernier est secondairement soit dismuté en oxygène et eau grâce à la catalase, soit transformé en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion (GSH), catalysée par la glutathion peroxydase (GPX). Le glutathion oxydé est atoxique et peut en outre, être réduit par la glutathion réductase, qui a pour coenzyme le NADPH (nicotineamide adénosine dinucleotide phosphate sous sa forme réduite) (Lechuer-Michel M.P. *et al*, 2001).

#### 1.1.4. Les antioxydants

Toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat est appelée antioxydant (Halliwell B, 1999).

D'après (Halliwell B, 1996) les mécanismes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ROS.
- L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS.

Les antioxydants sont d'origine synthétique ou alimentaire.

##### 1.1.4.1. Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques sont généralement préparés en laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques sont généralement soit des additifs alimentaires (exp : Butylhydroxytoluène (BHT), Butylhydroxyanisole (BHA)) soit des médicaments.



L'utilisation d'antioxydants naturels dans l'industrie agro-alimentaire est une technique complètement nouvelle. Depuis 1980, les antioxydants naturels sont apparus comme alternative aux antioxydants Synthétiques, et ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs. (**Calvin A., 2001**).

Actuellement, plusieurs agents thérapeutiques notamment les antihypertensifs, les bêta bloquants, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes.

On cite les exemples :

- Le Probucol agit comme un antioxydant en supprimant l'oxydation des lipoprotéines de basse densité.
- La N-acétylcystéine agirait de manière significative dans la régénération d'un antioxydant connu: le glutathion (**Calvin A, 2001**).

#### **1.1.4.2. Les antioxydants naturels**

De nombreuses molécules aux propriétés antioxydantes ont été isolées du monde végétal parmi lesquelles le resvératrol (présent dans le raisin), les polyphénols du Ginkgo, l'épicatéchine du thé vert, du vin rouge, l'hydroxytyrosol de l'huile d'olive (**Hennebelle T. et al, 2006**).

Les fruits et les légumes composants notre alimentation sont généralement riches en antioxydants naturels tels que :

- **La vitamine E** (tocophérol) est uniquement synthétisée dans les plantes. Et comme l'organisme humain ne peut pas le produire, elle doit être apportée par l'alimentation. On la retrouve notamment dans les huiles végétales, les pépins, le germe et les grains de blé.. Il prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes (**Aouissa I.W.R, 2002**).
- **Le  $\beta$ - carotène** possède, outre l'activité provitaminique A, la capacité de capter l'oxygène singulet. Il est présent dans les légumes verts, les épinards, les carottes, la papaye et d'autres fruits jaunes.
- **La vitamine C** (acide ascorbique) est un nutriment essentiel, ce qui signifie que les êtres humains sont incapables de la synthétiser, et qu'elle doit donc être obtenue à partir de l'alimentation. Les principales sources de vitamine C sont les fruits (en particulier les baies) et les légumes feuilles.
- **Les composés phénoliques** ; Ils ont été décrits au chapitre II.

## **1.2. Activité antimicrobiennes et Souches ciblées**

### **1.2.1. Généralités**

Les antibiotiques (du grec *anti* : contre et *bios* : la vie) sont des substances élaborées par des micro-organismes ou des substances synthétiques qui sont bactériostatiques ou bactéricides à dose faible (**Fauchère J.L et Avril J.L, 2002**).

Comme tout agent chimio thérapeutique quatre (4) propriétés caractérisent les antibiotiques (**Regnault J.P. et Decaine V., 1992**) Ce sont :

- **Leur toxicité sélective** : ils doivent tuer ou inhiber le germe pathogène en portant le moins possible de préjudice à l'hôte.
- **Leur site d'action.**
- **Leur spectre d'action**
- **Leur innocuité pour l'hôte.**

### **1.2.2. Mécanisme d'action d'un Antibiotique**

Pour atteindre leur cible au sein de la cellule, les antibiotiques doivent traverser des systèmes dédiés aux transports de substances nutritifs (porines).

#### **1.2.2.1. Inhibition de la synthèse du peptidoglycane**

La synthèse du peptidoglycane se fait en trois étapes : une étape cytoplasmique, une étape membranaire et une étape pariétale.

A titre d'exemple, les B-lactames inhibent l'étape finale de la synthèse du peptidoglycane des bactéries. Leurs action se fait en ciblant des enzymes spécifiques impliquées dans le processus (« Penicillin-Binding Proteins » ou PBP), localisées à la face externe de la membrane cytoplasmique (**Mainil J., 2006**).

#### **1.2.2.2. Désorganisation des systèmes membranaires**

L'exemple type est celui des polymyxines. Ces antibiotiques agissent à la manière de détergents cationiques sur les bicouches lipidiques des membranes biologiques.

Interagissant avec la partie anionique du lipide A (endotoxine) de la membrane externe des bactéries Gram-, les polymyxines sont transférées jusqu'à hauteur de la membrane cytoplasmique et en perturbent les fonctions de perméabilité. Leur action est bactéricide (**Mainil J, 2006**).

#### **1.2.2.3. Inhibition de la synthèse protéique**

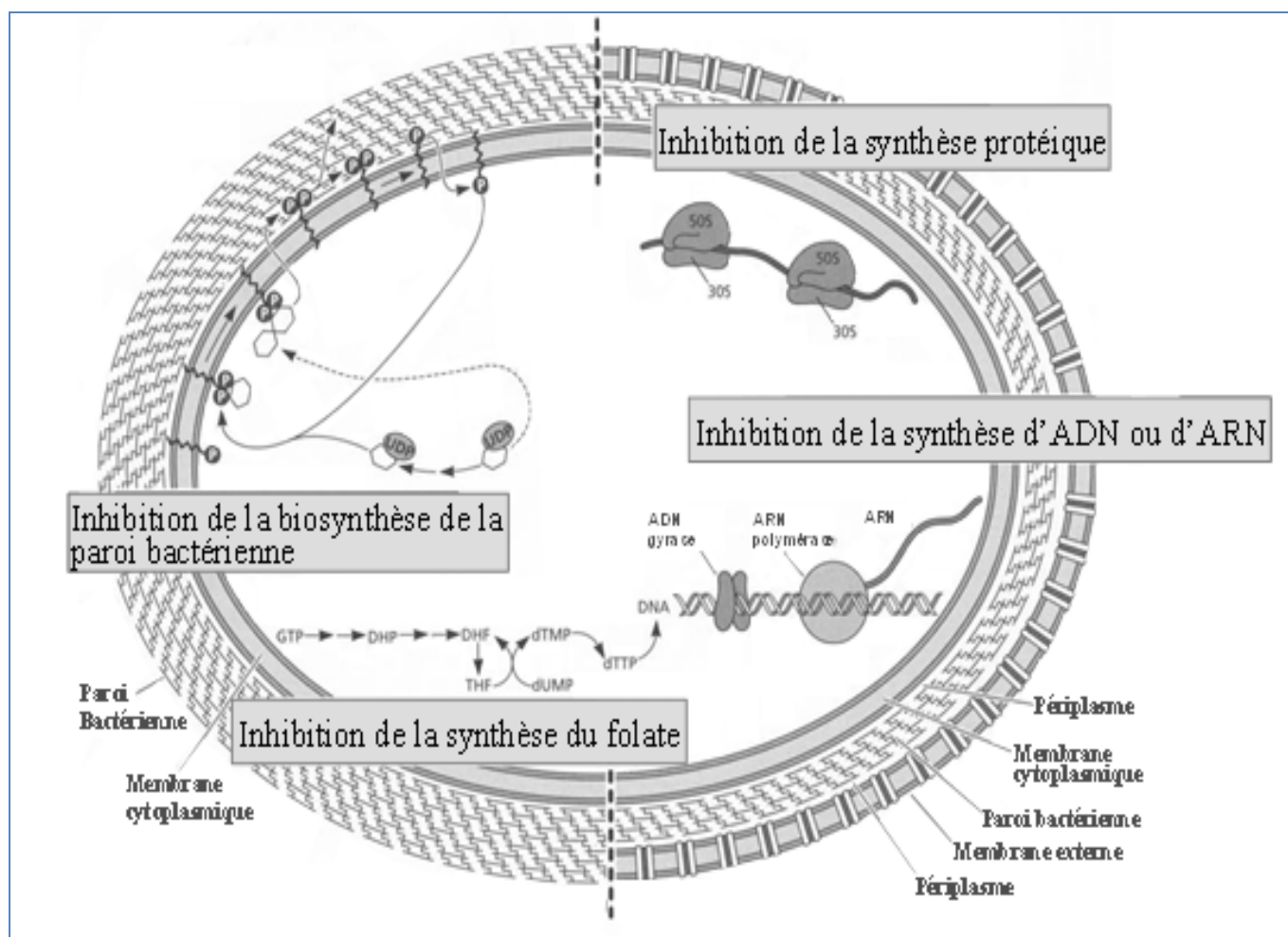
- Le chloramphénicol se fixe à l'ARNr 23S sur la sous unité 50S du ribosome inhibant ainsi la peptidyl-transférase avec un effet bactériostatique, ce qui provoque un arrêt de l'élongation des chaînes polypeptidiques (effet similaire pour les macrolides) (**Schorderet M. et al, 1992**).
- Les aminosides se fixent quant à eux à la sous unité 30S des ribosomes et perturbent ainsi la lecture des ARNm. La bactérie synthétise alors des protéines anormales non fonctionnelles.

#### **1.2.2.4. Perturbation de la synthèse des acides nucléiques**

Il existe 3 mécanismes d'inhibition de la synthèse des acides nucléiques (**Prescott L.M. et al, 1999**):

- **L'inhibition compétitive des enzymes** de la biosynthèse de l'acide tétrahydrofolique, précurseur des bases puriques et pyrimidiques.
- **L'inhibition de la transcription de l'ADN** par fixation sur la sous unité *RpOB* de l'ARN polymérase ADN-dépendante.
- **Inhibition des topo-isomérase II**, enzymes constituant le surenroulement de l'ADN nécessaire à la réplication de l'acide nucléique.

Il convient de noter que, parmi les antibiotiques, environ 20% ciblent la synthèse des acides nucléiques, 50% agissent sur la synthèse de protéine, 10% inhibent la production de peptidoglycane et 20% perturbent divers fonctions métaboliques (**Prescott L.M. et al, 1999**).



**Figure N°20 : Principales cibles bactériennes des antibiotiques (Walsh C, 2003)**

### 1.2.3. La résistance aux antibiotiques

L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la propagation des agents pathogènes avait suscité l'espoir d'éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Cependant, l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques a rapidement tempéré cet optimisme. (Guinoiseau, 2010).

Cette situation a poussé les scientifiques à la recherche de nouvelles substances antimicrobiennes provenant de diverses sources, comme les plantes médicinales, qui sont des bonnes sources de nouveaux agents antimicrobiens (Chaouch, 2014).

La définition de la résistance bactérienne varie selon l'aborde d'un point de vue clinique ou bacteriologique. Une bactérie est dites résistante à un antibiotique lorsque la concentration de ce dernier au site d'infection est insuffisantes pour inhiber sa multiplication ou la la tuer. Cette approche souligne que la resistance aux antibiotiques ne relève pas uniquement de la microbiologie, mais integre également des considerations pharmacodynamiques, pharmacodynamiques, pharmacocinétiques et cliniques. (Schwarz S. et Chaslus-Dancla E, 2001).

#### **1.2.3.1 Résistance bactérienne naturelle**

Elle résulte soit de l'absence de cible pour l'antibiotique, conséquence des differences dans la structure de la paroi bactérienne, soit d'une faible affinité de la cible pour l'antibiotique, ou encore de l'impérmeabilité de la paroi à ce dernier. (Schwarz S., Chaslus-Dancla E, 2001).

#### **1.2.3.2 Résistance bactérienne acquise**

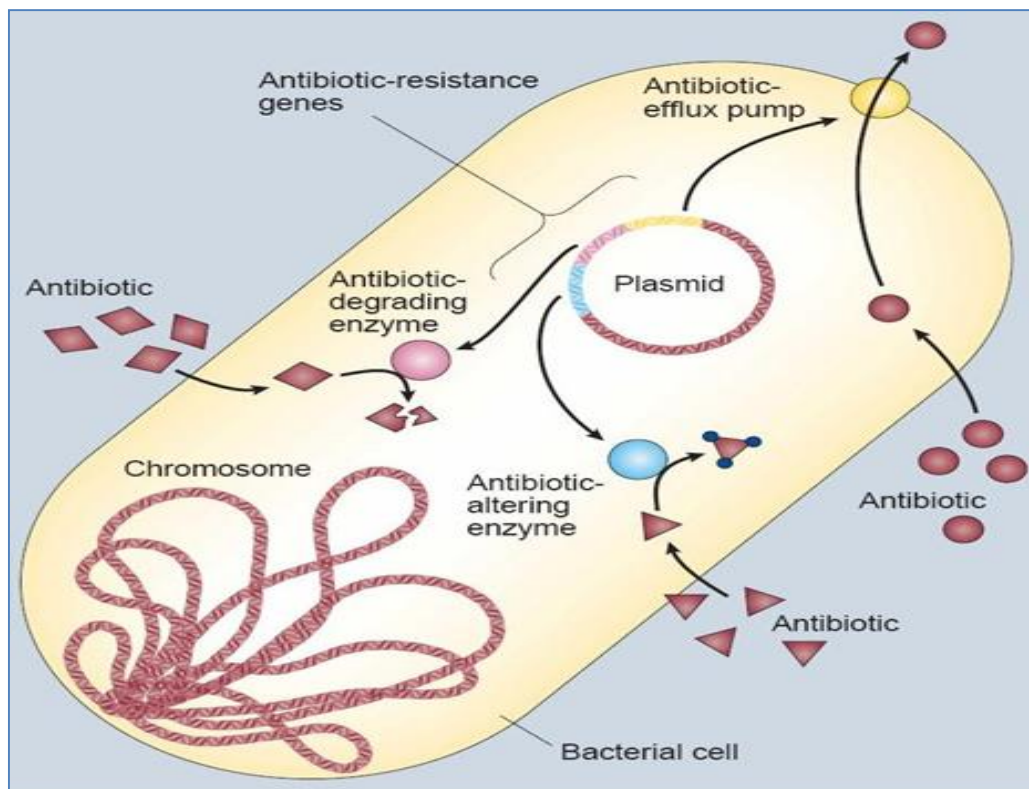
Le terme de résistance acquise s'applique au processus rendant résistante une population bactérienne initialement sensible. Cette résistance peut concerner un ou plusieurs antibiotiques et s'exprime suite à la pression de sélection induite par un contact avec un antibiotique (Schwarz S., Chaslus-Dancla E, 2001).

#### **1.2.4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques**

Cette résistance est le fruit de la remarquable adaptabilité des bactéries, qui ont su développer différents mécanismes afin de contrer les effets nocifs des antibiotiques (Levy S.B., Marshall B, 2004). Ces mécanismes bactériens, illustrés à la Figure 21, s'attaquent aux antibiotiques par différents moyens :

1. Expulsion de l'antibiotique hors de la cellule via des pompes à reflux. L'antibiotique est ainsi éjecté plus rapidement qu'il ne peut diffuser à l'intérieur de la cellule, empêchant ainsi d'atteindre une concentration intracellulaire suffisante pour exercer son effet.
2. Modification chimique de l'antibiotique afin de le rendre inoffensif. Le cas classique est l'inactivation des  $\beta$ -lactamines par hydrolyse de leur anneau  $\beta$ -lactame grâce à la production de  $\beta$ -lactamases.
3. Modification de la cible de l'antibiotique de manière à ce qu'elle conserve sa fonction physiologique tout en etant protégée ou rendue insensible à l'action de l'antibiotique.

#### 4. Diminution de la perméabilité membranaire par réduction du nombre des porines.



**Figure N°21 :** Divers mécanismes de résistance aux antibiotiques utilisés par les bactéries.  
(Levy S.B., Marshall B., 2004).

### 1.2.5. Les souches ciblées

#### 1.2.5.1. Les entérobactéries

Le nom d'entérobactéries a été attribué à ces bactéries car elles vivent dans le tube digestif de l'homme et des animaux, de manière commensale ou pathogène selon les espèces.

Cependant, ce caractère écologique n'est pas exclusif aux entérobactéries, certaines pouvant se développer en grande quantité dans l'environnement (sols et eaux) et participer aux grands cycles de dégradation des matières organiques. (Drame B. 2001)

**A. *Escherichia coli***

Hôte normal de l'intestin et des animaux, c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif. La présence de colibacilles ou espèces voisines dans l'eau est un témoin de contamination fécale. **(Drame B, 2001)**

**B. *Klebsiella pneumoniae***

L'habitat de *Klebsiella pneumoniae* colonise principalement le tractus digestif et les voies respiratoires supérieurs. Ce germe est surtout isolé en milieu hospitalier, son portage étant fortement favorisé chez les patients hospitalisés de longue durée ou sous traitements antibiotiques prolongés. Il peut également être présent en dehors des hôpitaux, notamment chez les patients diabétiques, très affaiblis ou atteints de maladies respiratoires chroniques.

*Klebsiella pneumoniae* est également retrouvé dans des infections urinaires suite au passage de la flore fécale aux voies urinaires.

Sur gélose: Les colonies de type mucoïde ont un aspect caractéristique ; elles sont volumineuses (4 mm de diamètre), bombées, brillantes, opaques et souvent confluentes. **(François D et al, 2007)**

**C. *Enterobacter cloacae***

Présent dans l'environnement, les *Enterobacter* sont également des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. Ce sont des pathogènes opportunistes responsables, en milieu hospitalier surtout, d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses.

Ce sont des entérobactéries mobiles, capsulées ou non. Sur gélose, les colonies sont brillantes, opaques, souvent d'aspect assez gras. **(François D et al, 2007)**

**D. *Salmonella enterica***

Les recherches en taxonomie, en particulier par hybridation de l'ADN, ont montré que le genre *Salmonella* ne comprend qu'une seule espèce, *Salmonella enterica*. Cette espèce comprend 7 sous-espèces différenciées par leurs biotypes. Les sous-espèces sont subdivisées en près de 2 000 sérovars sur la base de leurs antigènes O, H et de capsule. Les sérovars étaient auparavant considérés comme des espèces distinctes. **(Richardson M, Elliman D, 2001)**



➤ **Pouvoir pathogène naturel**

**A-Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes :** Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes sont provoquées par quatre sérovars de *Salmonella*, *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* et *S. Paratyphi C*. Les *Salmonella* sont ingérées avec une boisson ou un aliment contaminé. La dose infectante serait de l'ordre de  $10^5$  bactéries. Elles traversent sans la léser la paroi intestinale et gagnent les ganglions mésentériques satellites où elles vont se multiplier. Une partie des *Salmonella* se lysent et libèrent leur endotoxine. (Richardson M, Elliman D, 2001)

**B-Gastro-entérites à *Salmonella* :** Les *Salmonella* dites « mineures » (*Salmonella typhimurium*, *enteritidis*, *dublin* etc...), ubiquitaires, sont ingérées avec une boisson ou un aliment contaminé ou après contamination fécale-orale, souvent par les mains sales. Il peut s'ensuivre des infections purement digestives, les gastro-entérites. Celles-ci se traduisent par de la diarrhée, des vomissements et de la fièvre. Leur évolution est en général bénigne.

**C-Toxi-infections alimentaires collectives à *Salmonella* :** La consommation simultanée par plusieurs personnes d'un aliment massivement contaminé par des *Salmonella* mineures entraîne un tableau de gastro-entérite, qui, simulant un véritable empoisonnement, est appelé toxi-infection alimentaire collective (TIAC). La période d'incubation est de 10 à 18 heures. Les troubles durent en général 2 à 5 jours.

**1.2.5.2. Les bacilles à gram négatif non fermentaires.**

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont des bactéries aérobies strictes qui se développent habituellement sur milieu ordinaire et qui sont caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation. (Denis F., et al., 1998).

➤ ***Pseudomonas aeruginosa***

C'est l'espèce la plus représentative de genre *Pseudomonas* en raison de sa fréquence et sa présence dans de nombreuses niches écologiques (eaux, végétaux, sols). C'est un petit bacille fin, à Gram négatif, mobile grâce à une ciliature de type polaire monotriche en « vol de moucheron », oxydase positive.

La culture de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose au sang TSA, MH est caractérisée par une odeur aromatique et la production de pigments (pyocyanine, pyoverdine). Sur le milieu



Kligler-Hajna, on observe le brunissement de la pente et l'aspect métallisé de la culture (**Denis F., et al, 1998**).

### **1.2.5.3. Les cocci à Gram positif**

Les cocci Gram positif jouent un rôle majeur en pathologie humaine, tant que par leur fréquence que par la gravité des infections qu'ils provoquent. Ce sont des espèces bactériennes constituées par des cellules de forme arrondie (cocci ou coques) immobiles, à Gram positif, aérobies anaérobies facultatives, dont l'importance médicale est très grande.

Nous distinguons :

- Les Staphylocoques appartenant au genre *Staphylococcus*
- Les Streptocoques appartenant au genre *Streptococcus*
- Les Entérocoques

#### **A. *Staphylococcus aureus***

*S.aureus* possède un métabolisme aérobien prédominant et anaérobie facultatif. Il est catalase positive à la différence des bactéries du genre *Streptococcus* qui n'ont pas de métabolisme aérobien. Il est toutefois capable de fermenter le glucose (métabolisme anaérobie) à la différence des microcoques.

*S.aureus* élabore des protéines diffusibles dotées soit d'activité toxique, soit d'activité seulement enzymatique. (**Lee NE et al, 2005**)

#### **B. *Enterococcus faecalis***

*Enterococcus faecalis* est une bactérie commensale à Gram positif, habitant le tube digestif des humains et d'autres mammifères. Comme d'autres espèces du genre *Enterococcus*, *E. faecalis* peut causer des infections mortelles chez l'homme, particulièrement dans un environnement hospitalier : le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité (**Ryan K.J. and Ray C.G, 2004**)

*E. faecalis* peut causer des endocardites, ainsi que des infections de la vessie, de la prostate ou de l'épididyme. Les infections du système nerveux sont plus rares (**Ryan K.J. et Ray C.G, 2004**).

#### 1.2.5.4. Les bacilles à gram positif

➤ *Bacillus subtilis*

Une bactérie catalase-positif qu'on trouve généralement dans le sol, mais c'est en particulier une espèce ubiquitaire. Elle est mobile grâce à une ciliature pétriche (un dispositif de flagelle qui recouvre l'ensemble des cotés de la surface d'une bactérie). Elle est aérobic stricte, sa température optimale est de 40 degrés (espèce mésophile) et son type trophique est chimiohétérotrophe. Enfin, son temps de génération est d'environ 26 minutes (**Euzéby J.P, 2009**).

#### 1.2.5.5. Les levures

*Candida albicans*, un champignon asexué, est la levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. Elle est responsable d'infections fongiques (candidiase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique. Les candidoses sont une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du sida, les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse. Les candidoses orale et œsophagienne sont fréquentes chez le patient atteint du sida. Lorsque *Candida* s'infiltré dans le flux sanguin, l'infection devient systémique et on parle alors de candidémie (**Bennet R.J. and Johnson A.D, 2005**).

*C. albicans* est un organisme vivant à l'état naturel sur la peau, dans la bouche et le tube digestif de l'être humain. la culture en boîte de pétri *C. albicans* donne des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanche ou crème (*albicans* signifie « blanchâtre »). (**Bennet R.J. et Johnson A.D, 2005**).

Il existe plusieurs techniques qui permettent d'identifier *C. albicans* en laboratoire comme par exemple :

- le test de germination positif, en effet *C. albicans* formera un hyphe sans constriction lorsque placé dans du plasma de lapin à 37 degrés Celsius.
- Le test de chlamydospore sera positif sur milieu RAT dû à la présence de tween.
- Test de l'uréase négatif sur milieu Christensen.
- Colonie blanche crème, luisant et crémeuse sur gélose sang ou sabouraud. (**Bennet R.J. et Johnson A.D, 2005**).

# PARTIE II

*Etude Expérimentale*

# Matériels et Méthodes

## 1. Objectifs de l'étude

La présente étude a porté sur la recherche des biomolécules « les polyphénols » et sur l'évaluation *in-vitro* de l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits organiques, préparés à partir de trois variétés de fruit *Vitis vinifera*.

Pour cela nous avons fixé les objectifs suivants :

- Optimisation des méthodes d'extraction des métabolites secondaires pour les différentes parties de baie de raisin selon les paramètres suivants : température, type de solvant, ratio et PH de solvant de l'extraction.
- Extraction et analyse quantitative du contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins de différentes parties du fruit *Vitis vinifera*.
- Analyse qualitative des différents extraits organiques du fruit *Vitis vinifera*, en utilisant la CCM.
- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits préparés.
- Etude de l'activité antimicrobienne des extraits par la méthode de diffusion en milieu solide et détermination de la CMI et CMB des souches étudiées par microdilution

### 1.2. Lieu et période d'étude

Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire de la faculté de la science de la nature et de la vie, université de Mascara, sur une période d'étude : elle s'étend, du 01/01 /2015 au 15/07/2018.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel végétal

Trois variétés de raisin noir (*Vitis vinifera*) "Cinsault ", "Grenache " et "Muscat" ont été utilisées dans notre étude. Elles ont été récoltées dans la région au Sud-est de wilaya de MASCARA et plus exactement à GHRISS, précisément dans la région d'Oulad lakhdar au mois de septembre 2015.

Les trois variétés ont été récoltées puis stockées à l'obscurité au réfrigérateur dans un emballage alimentaire.



*Variété Cinsault*



*Variété Muscat noir*



Variété Grenache

**Figure 22:** Représentation des variétés utilisées dans le cadre de notre étude. (Photo personnel)

### 2.1.1 Séparation des trois parties de baie de raisin:

La plupart des extractions réalisées dans le cadre des études ont débuté avec des raisins entiers, cueillis à la main dans un lieu précis, la peau intacte. La peau et la chair sont ensuite retirées à la main, ce qui permet de séparer les pépins (Saucier C *et al*, 2001) (Peng Z *et al*, 2001).

Une fois séchés, les pépins sont prêts pour l'extraction et peuvent être conservés dans des conditions de congélation standard jusqu'à leur utilisation.

Les peaux des raisins ont été retirées à l'aide d'un scalpel, séparées de la pulpe, écrasées manuellement au mortier et pesées (poids moyen :  $8,29 \pm 1,51$  g). Les pulpes et les pépins ont été éliminés. (Ivana Novak *et al*, 2008)

## 2.2. Extraction des composés phénoliques

L'objectif de cette extraction est de libérer les polyphénols présents dans des structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion. Extraction liquide-liquide est généralement utilisée pour l'extraction des composés phénoliques du raisin, Le solvant d'extraction est souvent l'éthanol, le méthanol, l'acétone ou de l'acide formique et l'eau dans des rapports différents (En-Qin Xia *et al*, 2010).

Dans notre étude l'extraction des polyphénols de trois partie du fruit de raisin; pellicule, pulpe et pépin a été réalisée en utilisant trois solvants ; l'éthanol, le méthanol et l'acétone.

### 2.2.1. Optimisation de l'extraction

#### A. Sélection de ratio solide-liquide

Des rapports solide-liquide de 1:30 ; 1:40, 1:60, 1:90, 1:120 ont été étudiés afin d'étudier la quantité de solvant nécessaire pour maximiser le rendement de l'extraction des composés phénoliques.

Les échantillons ont été extraits sous agitation pendant 24 h avec une solution aqueuse d'acétone à 70 % contenant 2 % d'acide chlorhydrique (pH 5,5) dans les différents rapports solide-liquide choisis (température ambiante). Le milieu d'extraction a été filtré sous vide, les solides ont été éliminés et le filtrat a été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température inférieure à 35 °C, puis lyophilisé pour obtenir une poudre. (Predescu *et al*, 2016)

### **B. Évaluation des effets des solvants**

En utilisant le meilleur rapport solide-liquide déterminé lors de l'expérience précédente, l'efficacité d'extraction avec différentes proportions d'acétone, d'éthanol, de méthanol et d'eau a été étudiée afin de déterminer la combinaison de solvants permettant d'obtenir des rendements d'extraction plus élevés avec un pourcentage plus faible de solvants organiques.

60, 70, 80, 90 et 100 % de chaque solvant organique dans l'eau ont été utilisés avec un pH, une température et un rapport et température fixes

Le meilleur rapport solide-liquide et le meilleur mélange de solvants pour obtenir la concentration maximale en composés phénoliques ont été déterminés sur la base des résultats obtenus lors des expériences précédentes. **(Predescu et al, 2016)**

### **C. Évaluation des effets de température**

Différentes températures : 4, 10, 22, 37 et 45 °C ont été utilisées pour chaque extraction. **(Librán 2013),**

### **D. pH optimisation**

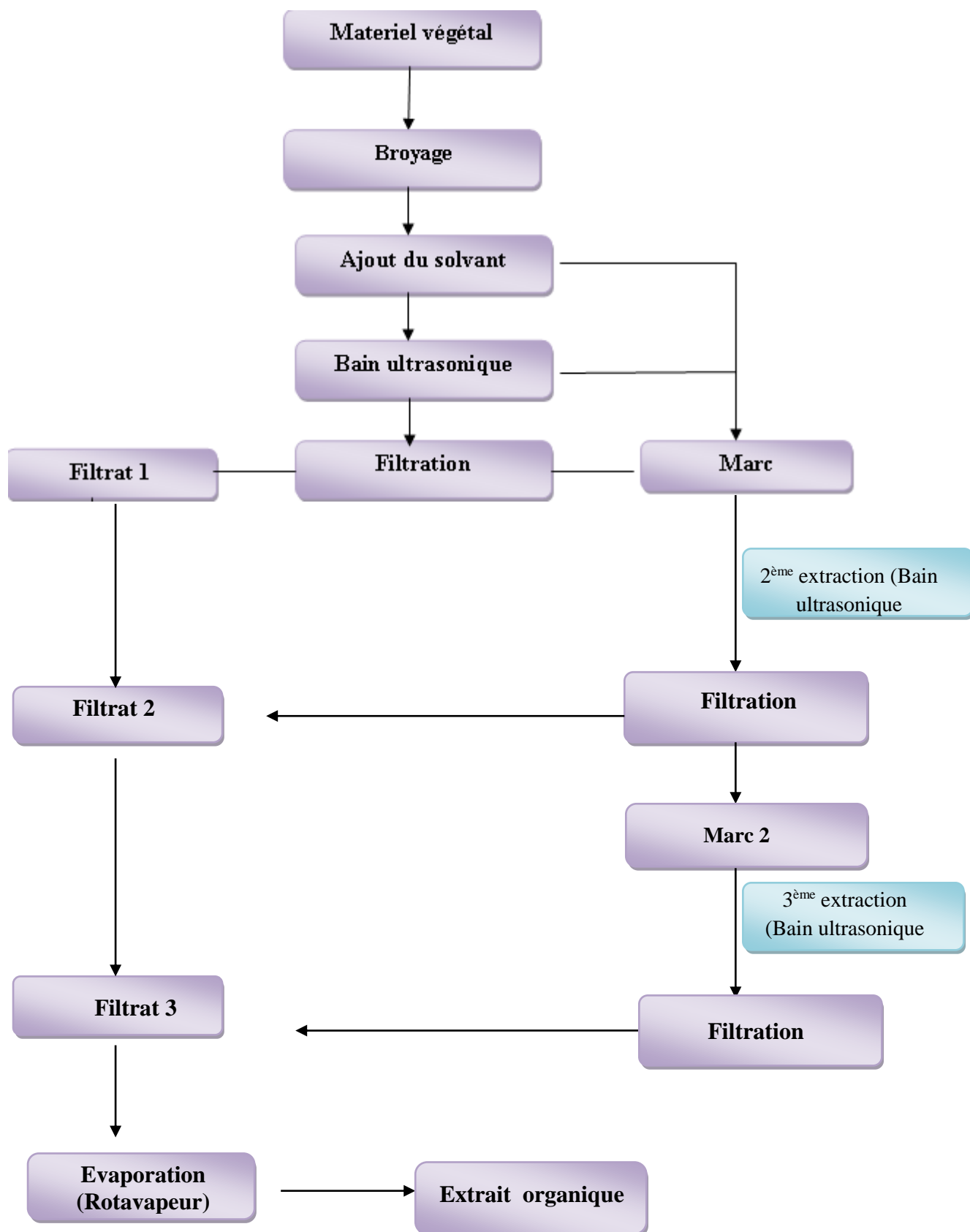
En fixant les paramètres étudiés, les niveaux d'acidité du solvant d'extraction choisis sont : 3, 5, 5, 7 et 8. **(Predescu et al, 2016)**

### **E. Effet du temps d'extraction**

Selon Nada Cujic et al, 2016 avec modification

En fixant le ratio d'extraction (1/60), la température (20 °C), le type de solvant (méthanol 70 %) et le pH (5,5), les déterminations quantitatives sont effectuées à différents moments selon les points suivants : Les échantillons ont été prélevés à 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min et 240 min.





**Figure N° 23 :** Protocole d'extraction des polyphénols par un solvant organique.

Le rendement d'extraction a été calculé selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Masse d'extrait obtenue}}{\text{Masse de l'échantillon analysé}} \times 100$$

## 2.3. Analyse qualitative des extraits

### 2.3.1 Screening phytochimique

Un test phytochimique qualitatif visant à détecter la présence d'alcaloïdes, de tanins, de saponines, de flavonoïdes, de glycosides cardiaques, de stérols, de glycosides d'anthroquinone, en utilisant des procédures standard (**kumar AR et al, 2007**) (**edeoga HO et al, 2005**)

Les résultats sont classés en :

- Réaction franchement positive ++
- Réaction positive +
- Réaction louche +/-
- Réaction négative 0

### 2.3.2 Analyse chromatographique sur couche minces(CCM)

Pour une caractérisation partielle des extraits, on utilise la chromatographie sur couche mince, cette technique de séparation basée sur l'utilisation d'une phase mobile (solvant ou plusieurs solvants) le long d'une phase stationnaire (gel de silice), dont la séparation dépend des phénomènes d'adsorption et de partage.

L'analyse des extraits a été réalisée sur des plaques de gel de silice, selon la méthode de **Diallo et al, 2004** avec quelques modifications, les quatre extraits ont été dissous dans leur solvant d'origine.

L'analyse des extraits (polaires) est effectuée par un système de séparation BAW (butanol/acide acétique/eau) avec des proportions (60/15/35).

5 µl de chaque extrait (10mg/ml) et de standard (2mg/ml), sont déposés et les plaques sont ensuite introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par la vapeur de la phase mobile. Après migration, les plaques sont séchées, puis visualisées par 3 systèmes de révélation :

- Révélation physique sous UV à 254nm.
- Révélation physique sous UV à 366nm.
- Révélation chimique par une solution de vanilline sulfurique (**Juma et Majinda, 2004**).

Les rapports frontaux (RF) des spots issus de la séparation sont calculés (le rapport frontal est le rapport entre la distance parcourue par la tache et celle du solvant) et comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification de différents extraits.

## 2.4. Analyses quantitatives des extraits

### 2.4.1. Dosage des polyphénols par colorimétrie

La méthode décrite par **Končić et al, 2010**, légèrement modifiée par l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu, a été utilisée pour déterminer la teneur en composés phénoliques totaux des extraits étudiés. Un volume de 0,5 mL d'extrait (1 mg/mL) a été mélangé à 2,5 mL de Folin-Ciocalteu à 10 % et 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 % p/v). Le mélange obtenu a été agité au vortex pendant 15 secondes et incubé à 40 °C pendant 30 minutes pour le développement de la couleur. L'absorbance des composés phénoliques totaux a été mesurée à 765 nm en utilisant un spectromètre Hewlett Packard en lumière UV/visible.

### 2.4.2. Estimation quantitative des flavonoïdes : (méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium)

250 µL de chaque extrait (1 mg/mL) ont été mélangés à 1 mL d'eau distillée, puis à 75 µL de solution de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub> à 5 % (p/p)). Après 6 minutes d'incubation, 75 µL de solution de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub> à 10 %) ont été ajoutés, puis laissés au repos pendant 6 minutes, suivis de 1 mL de solution d'hydroxyde de sodium (NaOH à 4 %). De l'eau a été ajouté immédiatement pour porter le volume final à 2,5 mL, puis le mélange a été soigneusement mélangé et laissé au repos pendant 15 minutes supplémentaires à température ambiante. L'absorbance du mélange rosâtre a été mesurée à 510 nm par rapport à un blanc

réactif contenant de l'eau au lieu de l'échantillon (**Zhishen J et al, 1999**). Le catéchol a été utilisé comme composé étalon pour la quantification des flavonoïdes totaux. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalent catéchol par gramme de poids sec d'extraits (mg CE/g). La teneur totale en composés flavonoïdes de l'extrait végétal a été calculée selon la formule suivante :

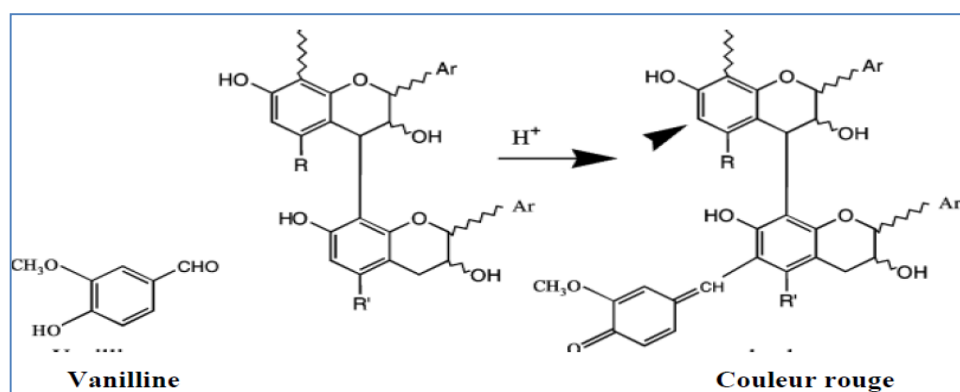
$$\text{TFC} = \text{CE} \cdot \text{V/m}.$$

Où CE est l'équivalence en catéchol (mg/mL) ou la concentration de la solution de catéchine établie à partir de la courbe d'étalonnage ; V est le volume d'extrait (mL) et m est le poids (g) de l'extrait végétal pur (**Parthasarathy S et al, 2009**). Les données ont été enregistrées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type pour trois répétitions.

#### 2.4.3. Estimation quantitative des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés dans les extraits est effectué selon la méthode de **Broadhurst et Jones 1978**, modifiée par **Heimler et al, 2006**.

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500nm (**Schofield et al ,2001**) (**Figure 13**).



**Figure N°24 :** La réaction entre la vanilline est les tanins condensés (**Schofield et al, 2001**).

Pour 400µl de chaque échantillon ou standard, on ajoute 3ml d'une solution de vanilline (4% dans le méthanol), et 1,5 ml d'acide hydrochlorique concentré. Le mélange est incubé durant 15 min et l'absorbance est lue à 500nm.

Les concentrations des tanins condensés sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la catéchine (0-300µg/ml), et sont exprimées en microgramme d'équivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg E CT/mg).

#### 2.4.4. Détermination des Anthocyanidines

Le dosage des anthocyanes a été effectué par la méthode du différentiel de pH (Giusti et Wrolstad, 2001)

Deux solutions ont été préparées, l'une à pH = 1 par un tampon comprenant du chlorure de potassium (0,03 M) et la seconde à un pH = 4,5 à base d'acétate de sodium (0,4 M).

Un volume de 2 mL de chaque solution tampon est mélangé avec 1 mL de chaque extrait (dilué dans le méthanol). Les solutions sont ensuite incubées pendant 15 min l'obscurité puis l'absorbance est mesurée deux longueurs d'ondes, 510 nm et 700 nm, contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance est calculée par la formule ci-dessous

$$A_{\text{Anth}} = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1} * (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4.5} * 22.27$$

La concentration des anthocyanes est exprimée en mg/L et est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Anth}]_{\text{mg/L}} = (\text{Abs} * \text{M} * \text{FD} * 1000) / \epsilon L$$

**Avec**

**Abs**: absorbance de l'échantillon

**M**: la masse moléculaire (g/mol)=449.2g/mol. De cyanidine 3-glucoside.

**FD** : facteur de dilution

**$\epsilon$**  : coefficient d'extinction molaire (26900 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

**L** : longueur de trajet (cm)

La teneur est exprimée en milligramme d'équivalent de cyanidine 3-glucoside par gramme de matière végétale sèche (mg d'EC3G/g).

#### 2.5. Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH

Découvert en 1922, le DPPH est un radical libre stable ayant au centre de sa molécule deux atomes d'azote. Il peut être inhibé par transfert d'atome d'hydrogène, par transfert d'électrons ou par perte séquentielle du proton transfert d'électron. En milieu aqueux le

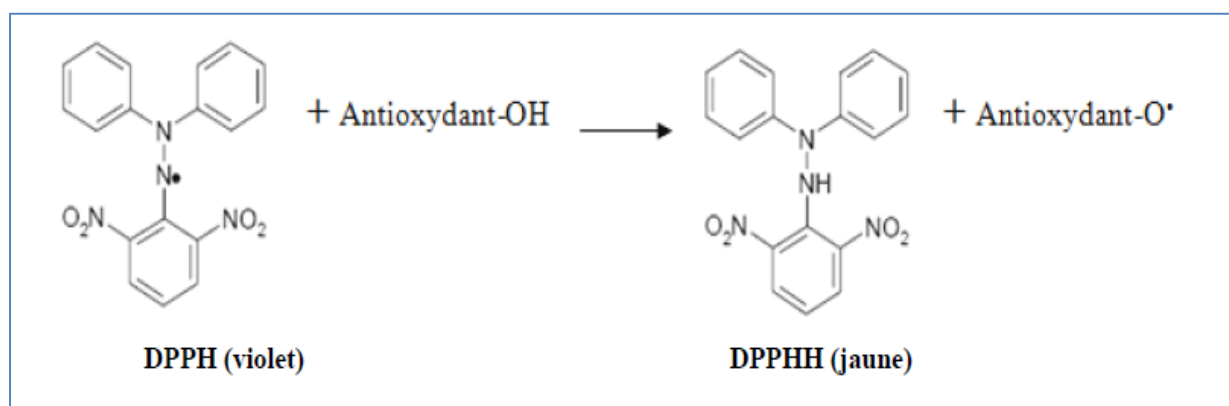
premier de ces trois mécanismes est prédominant. En revanche, en milieu non-aqueux les deux derniers mécanismes sont plus importants ce qui peut être expliqué par la capacité des solvants organiques à former des liaisons d'hydrogène fortes avec les antioxydants (**Boudier A et al, 2012**).

Cinquante microlitres de différentes concentrations d'extraits dans du méthanol ont été ajoutés à 5 ml d'une solution méthanoïque de DPPH à 0,04 %. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée par rapport à un blanc à 517 nm.

L'inhibition du radical libre DPPH, en pourcentage (1 %), a été calculée comme suit :

$$I\% = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}/A_{\text{blank}}) * 100;$$

Où  $A_{\text{blank}}$  l'absorbance de contrôle (contenant tous les réactifs sauf le composé à tester, et A échantillon correspond à l'absorbance du composé à tester. La concentration d'extrait inhibant 50 % (CI50) a été calculée à partir du graphique représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait. Les tests ont été réalisés en triplicata. (**Burits M et Bucar F, 2000**)



**Figure N°25:** Forme libre et réduite du DPPH (**Brand-Williams et al, 1995**).

## 2.6. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits de la plante étudiée est évaluée par la méthode de phospho-molybdène selon la procédure décrite par **Prieto et al, 1999**.

Ce test est basé sur la réduction du molybdène  $\text{Mo}^{6+}$  en molybdène  $\text{Mo}^{5+}$  par l'extrait de la plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate  $\text{Mo}^{5+}$  de couleur verte.

### **Protocole**

Un volume de 0.3 ml de l'extrait est mélangé avec 3 ml de solution de réactif (acide sulfurique 0.6 M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les tubes sont incubés au bain-marie à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml de méthanol, incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

L'acide ascorbique a été utilisé comme étalon à différentes concentrations. La teneur en capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS). L'expérience a été répétée en triple. (Matthäus B, 2002)

### **2.7. Détermination de profil phénolique par HPLC-DAD**

L'identification de contenue en métabolites secondaires de nos extrait a été effectuer au niveau de laboratoire de recherche scientifique de la faculté de biologie de l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem au mois de septembre 2018.

Les extraits ont été analysés par HPLC sur un système HPLC Agilent 1200 (États-Unis) équipé d'un détecteur à barrette de diodes. La colonne Hichrom C18 (4,6 mm x 250 mm, granulométrie de 5 microns). La température de la colonne était de 40 °C, permettant le passage d'un volume d'injection de 10 µl. Le système de solvants était un gradient eau-acide formique (0,5 %) (A) et méthanol (B). Le gradient utilisé était le suivant : 95 % (A) au départ, puis 60 % (A) en 30 min, puis 60 % (A) en 15 min, à un débit de 1,0 ml/min. (Louli V et al, 2004)

### **2.8. Analyses microbiologiques**

D'après la littérature, les composés phénoliques sont doués d'un effet inhibiteur sur la croissance microbienne. (Ali N.A.A. et al, 2001, Li H.B. et al, 2007)

À partir de là, les extraits de raisin ont été testé en présence de différentes souches bactériennes pathogènes, pour mettre en évidence et évaluer cette propriété.

### 2.8.1. Souches testées

**Tableau 09 :** Différentes souches utilisées et leurs sources.

Souches	Source
<b>Gram –</b>	
<i>Salmonella enterica</i> sub sp. <i>Heidelberg</i> . ATCC 8326	*laboratoire de microbiologie FSNV Mascara
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	*laboratoire d’analyses médicales de l’hôpital Dr Yessad Khaled de Mascara. (isolée à partir des urines humaines)
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	*laboratoire de microbiologie FSNV Mascara
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	*laboratoire de microbiologie FSNV Mascara
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	*laboratoire de microbiologie FSNV Mascara
<b>Gram +</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	*Institut pasteur d’Alger
<i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC 29212	*Institut pasteur d’Alger
<i>Bacillus subtilis</i> sub sp. <i>Spizizenii</i> ATCC 6633	*Institut pasteur d’Alger
<b>levure</b>	
<i>Candida albicans</i>	*laboratoire d’analyses médicales de l’hôpital Dr Yessad Khaled de Mascara. (isolée à partir de la cavité buccale)

### 2.8.2. Repiquage et Isolement des souches microbiennes

Les souches ont été conservées à -70°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de bouillon nutritif à 12% du glycérol.

Avant les tests, les souches conservées ont subi une série de repiquage pour s’assurer de leur pureté, nous avons adopté la méthode des quadrants.



**Tableau N° 10 :** Milieux de cultures usuels et sélectifs utilisés pour l'isolement.

Souches	Milieu sélectif et usuel ensemencés
<i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC 29212	Gélose au sang, gélose nutritif (annexe)
<i>Bacillus subtilis</i> sub sp. <i>Spizizenii</i> ATCC 6633	MRS, gélose nutritif(annexe)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Gélose Chapman, gélose nutritif (annexe)
<i>Salmonella enterica</i> sub sp. <i>heidelberg</i> ATCC 8326	GéloseS. S., EMB, Hecktoen, gélose nutritif. (annexe)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	EMB , BCP, Hecktoen, gélose nutritif(annexe)
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud+actidone, Sabouraud +chlorophenicol (annexe)

### 2.8.3. Confirmation de l'identification des souches étudiées.

#### ➤ **Identification des souches Gram –**

Les colonies isolées sur les milieux sélectifs E.M.B et Hécktoen ont été réensemencées sur gélose ordinaire, puis identifié par la galerie Api 20Ede *BioMérieux* (voir l'annexe)

#### ➤ **Identification de *Staphylococcus aureus* ATCC25923**

Les colonies isolées sur le milieu sélectif Chapman ont été réensemencées sur gélose ordinaire, puis identifié par la galerie Api Staph *BioMérieux* (voir l'annexe)

#### ➤ **Identification de *Bacillus subtilis* sub sp. *Spizizenii* ATCC 6633**

Les colonies de *Bacillus subtilis* sur gélose nutritif ont des formes irrégulières translucide de couleur blanc crème et une surface brillante et d'une consistance gluante. (Sonenshein et al, 2001)

L'identification peut être faite par la galerie Api 20Ede *BioMérieux* (voir l'annexe)

➤ **Identification d'*Entérocooccus faecalis* ATCC 29212**

Les colonies sont légèrement opalescentes de plus ou moins 1,5 mm sur gélose (**Furuno JP et al, 2004**)

Puis identifié par la galerie Api 20Ede BioMérieux (voir l'annexe)

➤ **Identification de *Candida albicans***

Après isolement sur milieu Sabouraud+actidone, Sabouraud +chlorophenicol, colonies blanches, crémeuses, lisses le test de filamentation permet la confirmation de *Candida albicans*. La souche a été ensemencée dans un tube contenant du sérum humain. La production de filament après une incubation à 37°C pendant 3 heures nous permet de confirmer la présence de *Candida albicans*.

L'observation des tubes germinatifs a été faite au microscope à l'objectif x 40.

Un autre test est nécessaire pour confirmer la souche C albicans, test de chlamydosporulation (milieu PCB) (annexe).

La chlamydosporulation se fait sur milieu PCB (Pomme de terre, Carotte, Bile), en semi - aérobiose, après ensemencement et incubation à 28 °C pendant 24 à 48 heures.

Si après examen au microscope, on voit du pseudo-mycélium seul, il s'agit d'une espèce non *albicans* du genre *Candida*.

Si on observe une pseudofilamentation et des chlamydospores, il s'agit de l'espèce *Candida albicans*. (**Cardinale V, 2001**)

#### **2.8.4. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques**

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (**Burnichon et texier, 2003**)

Le choix des antibiotiques a été fait en fonction de la disponibilité ;

**Tableau N°11:** Liste des Antibiotiques utilisés dans le cadre de notre étude.  
(AARN, 2008)

Famille	Antibiotique	Charge	Sigle
Macrolides	Erythromycine	15 UI	E
Aminosides	gentamicine	15 µg	Gen
B- lactamines	Amoxicilline	25 µg	AMX

Dans le cadre de cette étude nous avons utilisé la méthode par diffusion.

### Principe

Les méthodes par diffusion ou antibiogramme standard, sont les plus utilisées par les laboratoires cliniques (**Joffin J-N et Leyral, 2001**). Elles consistent à déposer des disques de papier buvard imprégnés de concentration déterminée d'antibiotiques à la surface d'un milieu gélosé, lequel aura été préalablement ensemencé de manière uniforme avec une culture pure du germe à tester. Dès l'application des disques, l'antibiotique diffuse à partir du disque de manière uniforme dans la gélose.

Après incubation à 37°C, durant 18 à 24 heures, les disques s'entourent ou non de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture.

#### ➤ *Technique* (AARN, 2008).

- **Milieu :** Nous avons utilisé le milieu de Mueller-Hinton (annexe) coulé dans une boîte de Pétri de façon uniforme et jusqu' à une épaisseur de 4 mm. Les géloses sont séchées avant l'emploi.
- **Inoculum**
  - A partir d'une culture pure de 18H sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
  - Bien décharger l'anse dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland lue à 625 nm.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.
  
- **Ensemencement :**
  - Ensemencer aseptiquement à la pipette 1 ml de l'inoculum sur la boîte de pétri contenant le milieu gélosé Mueller Hinton (annexe).
  - Etaler la suspension microbienne sur la surface gélosée, en tournant la boîte attentivement.
  - Laisser sécher près du bec bunsen 5 min.
  - Eliminer l'excès de liquide dans l'eau de javel.
  
- **Application des disques d'antibiotiques**
  - Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, centre à centre.
  - Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologique stériles pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé.
  
- **Incubation :** 18 à 24 heures à 37°C.
  
- **Lecture**
  - Mesurer avec précision, les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.
  - Aux regards des concentrations et des diamètres critiques sont considérées comme :
    - Sensibles (S), les souches pour lesquelles le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur ou égal au diamètre critique D=6mm.
    - Résistantes (R), les souches vis-à-vis desquelles le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur au diamètre critique d=3mm.

- De sensibilité intermédiaire (I), les souches vis-à-vis desquelles le diamètre de la zone d'inhibition correspondant est compris entre les deux diamètres critiques. (Pouce et al, 2003)

### 2.8.5. Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits en milieu solide

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (Mueller et Hinton pour les bactéries et pour les levures).

Elle consiste à déposer un disque stérile, qui porte un volume précis d'extrait, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer.

Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'extrait, est ainsi déterminé. (Hayes et Markovic, 2002)

### Préparation des différentes concentrations des extraits

Des dilutions successives dans le DMSO, de progression arithmétique à raison de 2 ont permis de préparer une gamme de dilution (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32) à partir des extraits et fractions (200 mg/ml) de la peau, pulpe et des graines de chaque variétés. (Deepti Rathee et al, 2012)

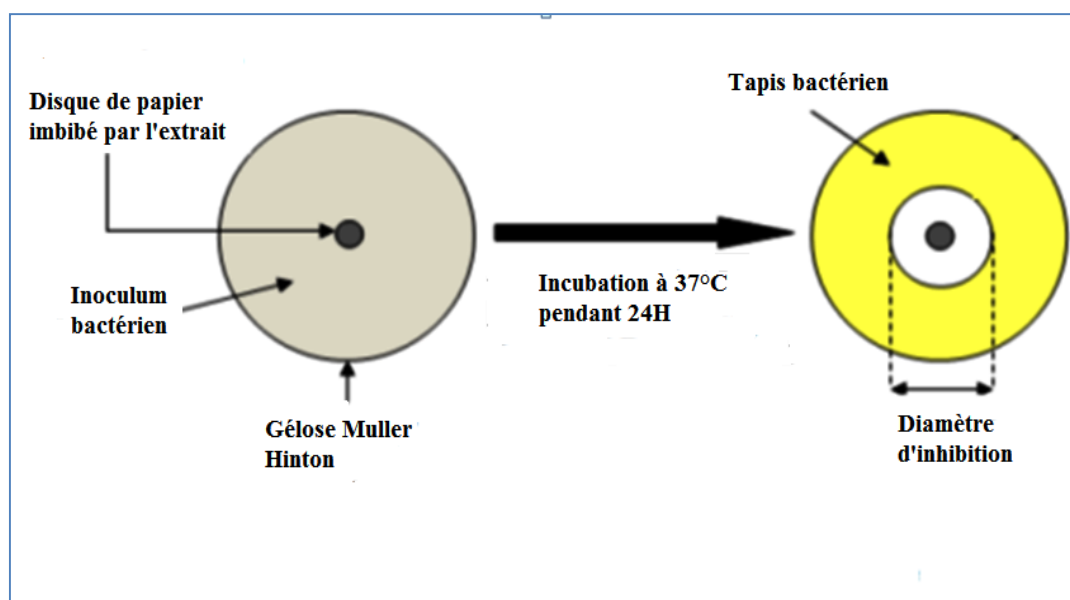


Figure N°26 : principe de la méthode de diffusion par disque

## 2.8.6. Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits en milieu liquide

### 2.8.6.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

#### Principe

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Ici sa détermination s'est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance des germes étudiés.

La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de croissance.

La détermination de la CMI a été déterminé sur microplaque stérile (15min sous U.V) et s'accompagne d'un repiquage des puits présentant une absence de croissance afin de mettre en évidence un effet soit bactériostatique soit bactéricide de l'extrait testé. L'effet bactériostatique correspond à une inhibition de la croissance cellulaire et l'effet bactéricide correspond à une mortalité cellulaire.

➤ **Technique (Elof J. N. 1998, Shanmugapriya P. *et al*, 2012)**

- **Préparation de la gamme de concentration des extraits**

La gamme de concentrations de l'extrait phénoliques a été préparée par la méthode de la microdilution selon une progression géométrique de raison de (02) pour chaque extrait (Tableau 10).

- **Préparation de l'inoculum**

Pour chacune des souches un inoculum a été réalisé à partir de quelques colonies dispersées dans du bouillon nutritif régénéré de manière à obtenir une densité équivalente à 1McFarland (inoculum bactérien optiquement invisible soit  $2 \times 10^8$  UFC/ml). 20µL de chaque souche est diluée dans 5ml du bouillon Mueller-Hinton.

- **Ensemencement (tableau 12)**

L'ensemencement des microplaques se fait comme il est montré dans le tableau 10, le premier rangé de la microplaque est réservé pour le blanc où on met le milieu de culture et l'extrait. Le deuxième rangé est pour le témoin positif où on met le milieu de culture et la souche microbienne et dans les autres rangés on met le milieu de culture, la souche microbienne et l'extrait à des concentrations décroissantes

### • Lecture

La microplaque est déposée sur un miroir et la lecture des résultats s'est faite à la lumière du jour et à l'œil nu. La limpidité du milieu implique l'effet antimicrobien de l'extrait testé tandis que la présence d'un trouble indique son inefficacité (signe de croissance bactérienne). La CMI correspond donc à la plus faible concentration d'extrait à laquelle on n'observe pas de croissance visible.

**Tableau N°12** : Ensemencement des microplaques (méthode de la microdilution).

N° : des puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Bouillon Mueller Hinton (BMH) (μL) :	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
solution d'extrait (μL):	50	0	50	-	-	-	-	-	-	-	-	
Redistribuer du tube précédent (μL) :	-	-	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Inoculum (μL) :	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
facteur de dilution			1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Concentration finale de polyphénols dans l'extrait V1 peau	250	0	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.97	0.48
Concentration finale de polyphénols dans l'extrait V1 pulpe	125	0	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.97	0.48	0.24
Concentration finale de polyphénols dans l'extrait V1 pepin	125	0	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.97	0.48	0.24
Concentration finale de polyphénols dans l'extrait V2 peau	62.5	0	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.97	0.48	0.24	0.12
Concentration finale de polyphénols dans V2 pulpe	62.5	0	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.97	0.48	0.24	0.12
Concentration finale de polyphénols dans l'extrait V2 pepin	62.5	0	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.97	0.48	0.24	0.12
Concentration finale de polyphénols dans l'extrait V3 peau	125	0	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.97	0.48	0.24
Concentration finale de polyphénols dans l'extrait V3 pulpe	125	0	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.97	0.48	0.24
Concentration finale de polyphénols dans l'extrait V3 pepin	250	0	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.97	0.48

### ➤ Expression des résultats

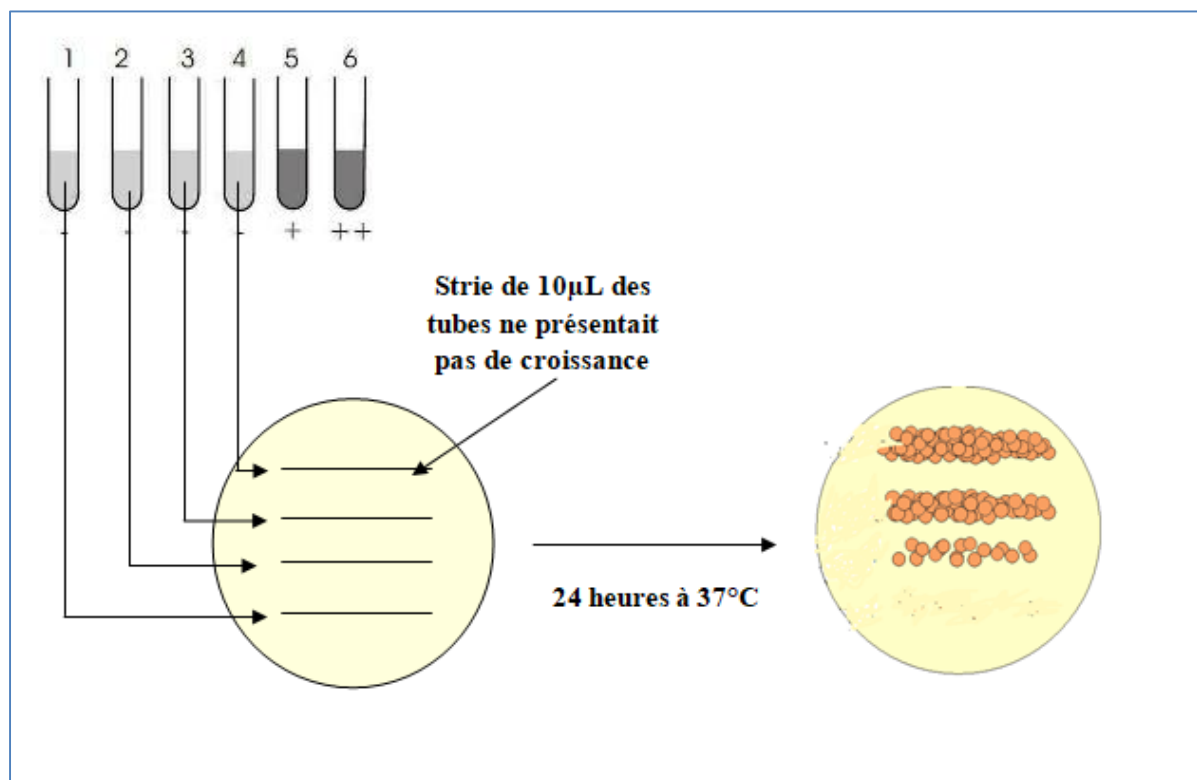
Pour l'évaluation de l'effet antimicrobien en milieu liquide en fonction de temps on a effectué cinq lectures ( $t_1=0mn$ ,  $t_2=90mn$ ,  $t_3=240mn$ ,  $t_4=320mn$ ,  $t_5=1320mn$ ), L'analyse des résultats a permis de tracer les courbes de sensibilité des germes aux différents extraits préparés en fonction de temps.

#### 2.8.7. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

Une fois la CMI déterminée, l'effet bactériostatique ou bactéricide de l'extrait phénolique est recherché, on a utilisé la méthode de **Spencer A.L.R., Spencer JFT (2004)**

Un prélèvement à l'anse calibrée de 10  $\mu L$  a été réalisé dans chacune des cupules ne présentant aucune culture visible. Chaque prélèvement a été déposé en strie sur gélose nutritif. Les boîtes ensemencées ont été incubée 24 heures à 37°C.

En fin le rapport CMB/CMI est calculé, il permet de savoir si une substance est bactéricide (si  $CMB/CMI < 4$ ) ou Bactériostatique (Si  $CMB/CMI \geq 4$ ) (**Spencer A.L.R., Spencer J.F.T., 2004.**



**Figure N°27 :** schéma représentatif de la méthode d'ensemencement pour la détermination de la CMB



### 3. Analyse Statistique

Différentes méthodes statistiques appropriées sont utilisées afin de dégager les significations des paramètres étudiés. Les données recueillies ont été saisies sur office 2007 et Excel. Toutes les expériences ont été faites en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec sa déviation standard (moyenne  $\pm$  SD et n=3). La recherche d'une corrélation entre la densité optique et la concentration des étalons et des échantillons, à fait appel au test de corrélation ou de régression linéaire simple STATVIEW v5.0. Un résultat est considéré comme significatif lorsque  $p < 0,05$ .

# Résultats Et Discussion

Ce chapitre présente tous les résultats obtenus au cours des expériences effectuées ainsi que leurs interprétations et discussion.

## 1. Extractions

Le choix un solvant très efficace pour nos échantillons, et sous des conditions de température, PH et la durée pour une extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique (Turkmen N. et al, 2007), nous avons effectués une optimisation de ces paramètres pour les trois parties de baie de raisin : pellicule, pépin et pulpe. Des trois variétés de l'espèce *Vitis vinifera*. : Cinsault, Muscadine et Grenache.

### 1-1. Résultat d'optimisation d'extraction pour la variété Cinsault

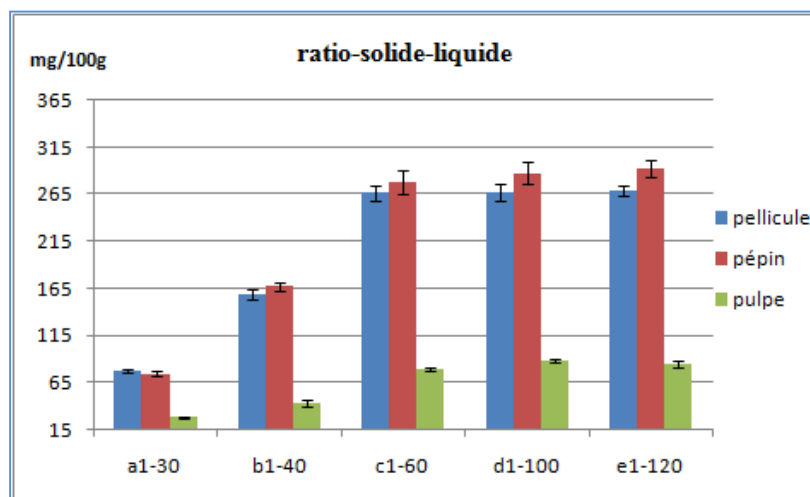


Figure N°28 : Effet de ratio solide-liquide

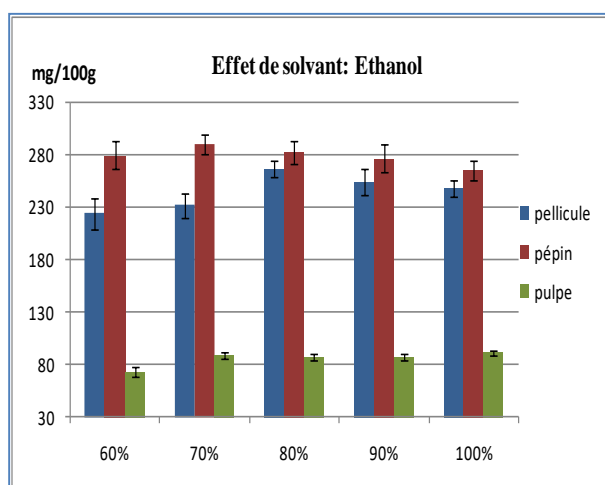


Figure N°29 : Effet de solvant éthanol

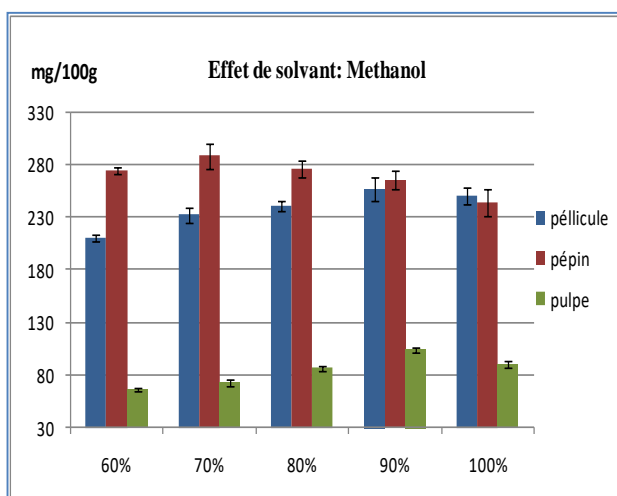


Figure N°30 : Effet de solvant méthanol

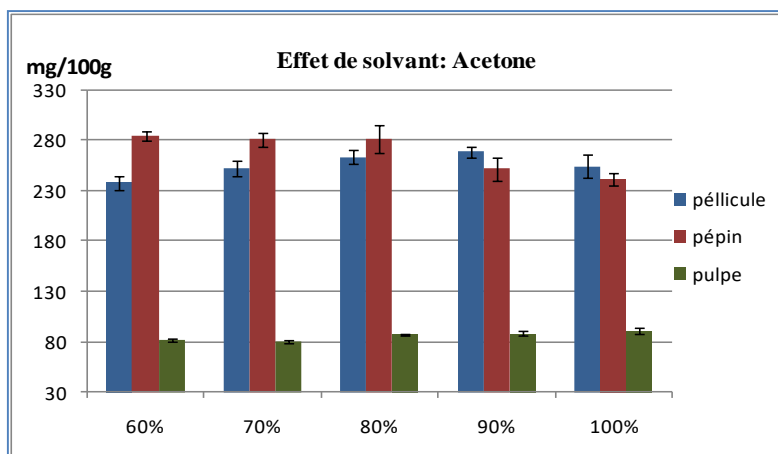


Figure N°31 : Effet de solvant Acétone

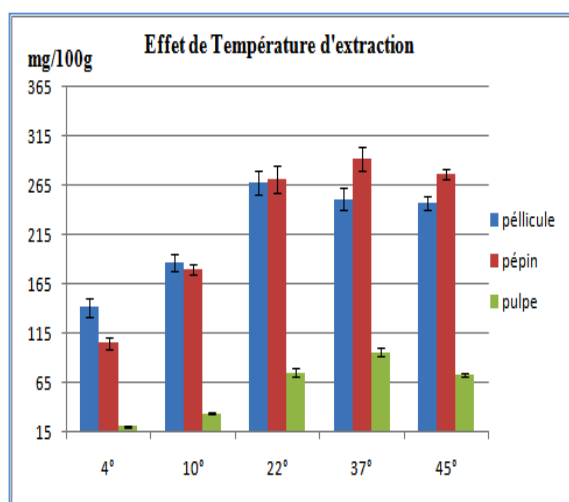


Figure N°32 : Effet de température

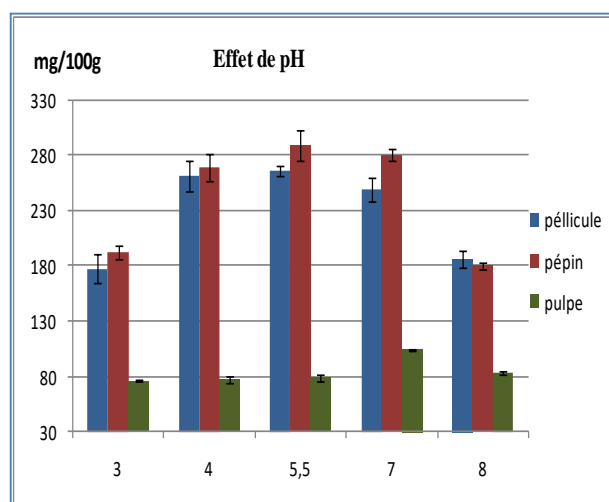


Figure N°33: Effet de PH

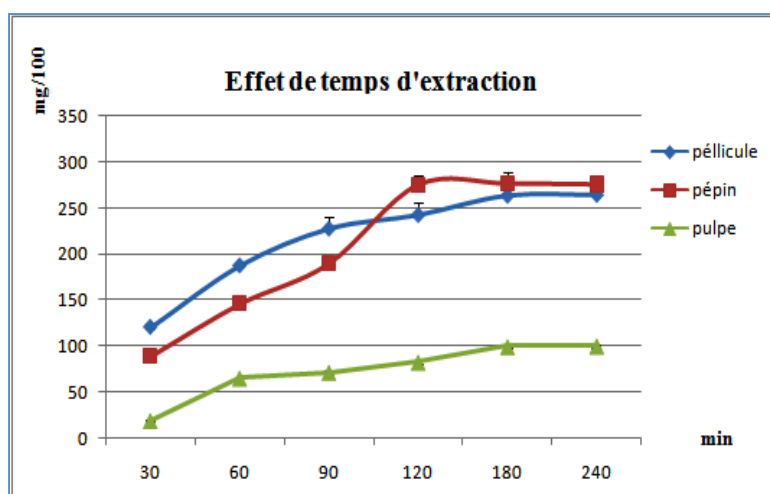


Figure N°34 : Effet de temps d'extraction

Selon les résultats obtenus d'optimisation de l'extraction des polyphénols pour la variété cinsault cultivée dans la wilaya de MASCARA, les concentrations les plus élevées pour la pellicule, pépin et pulpe son:  $266.59 \pm 8.53$ ,  $277.66 \pm 12.52$  et  $104.34 \pm 2.39$  mg/100g respectivement.

Le pourcentage de l'eau dans le solvant organique d'extraction joue un rôle très important pour augmenter la solubilité des métabolites comme les polyphénols. Selon **John Shi et al, 2003**, les polyphénols sont des composants polaires (possession de plusieurs groupement -OH) d'où il faut augmenter la polarité par l'addition de l'eau pour les solubiliser.

### 1-2. Résultat d'optimisation d'extraction pour la variété Muscadine

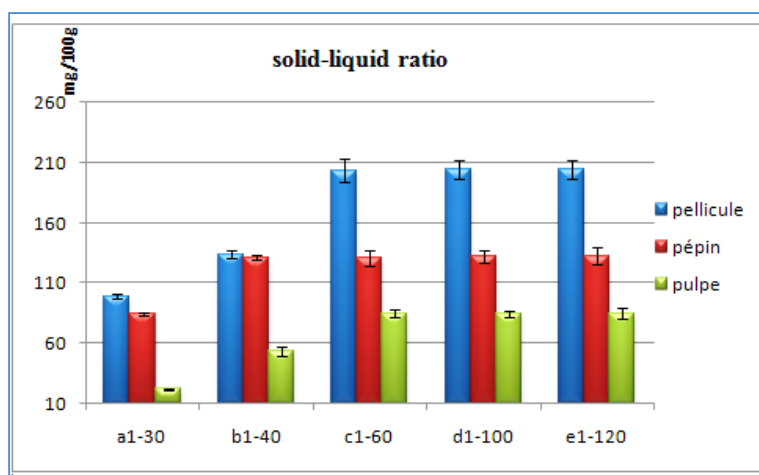


Figure N°35 : Effet de ratio solide-liquide

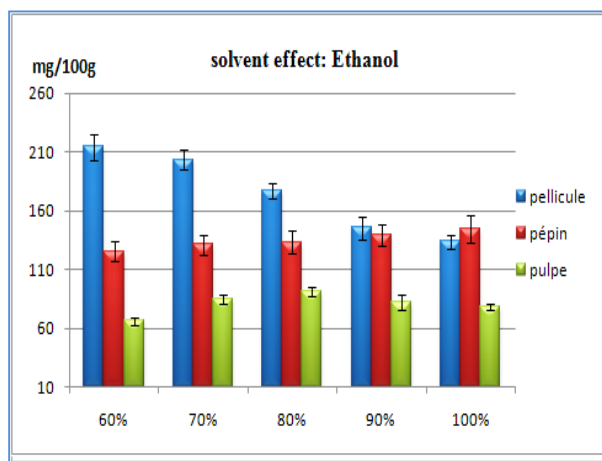


Figure N°36 : Effet de solvant éthanol

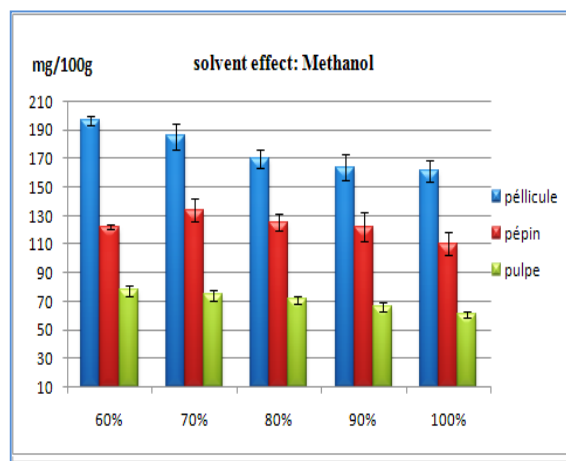


Figure N°37: Effet de solvant méthanol

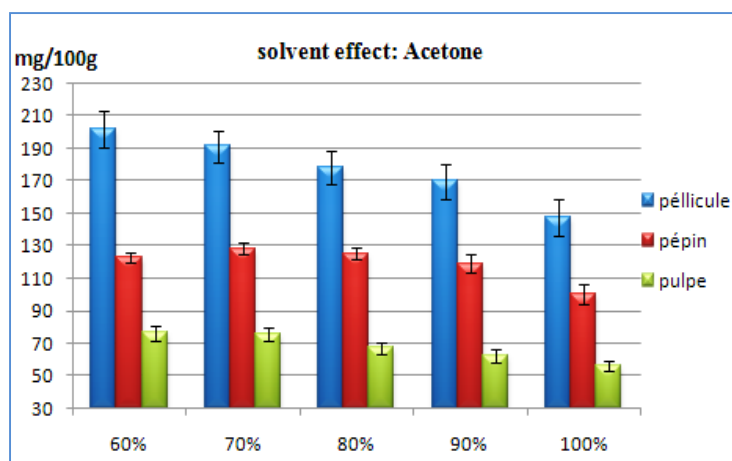


Figure N°38 : Effet de solvant acétone

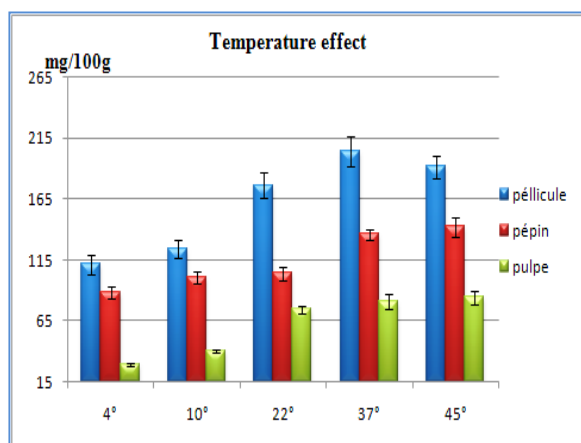


Figure N°39 : Effet de température

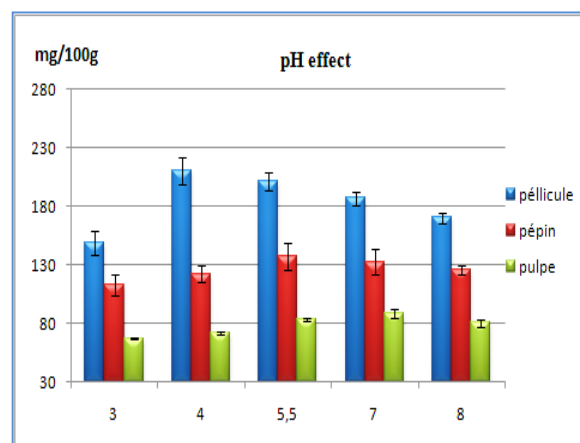


Figure N°40 : Effet de PH

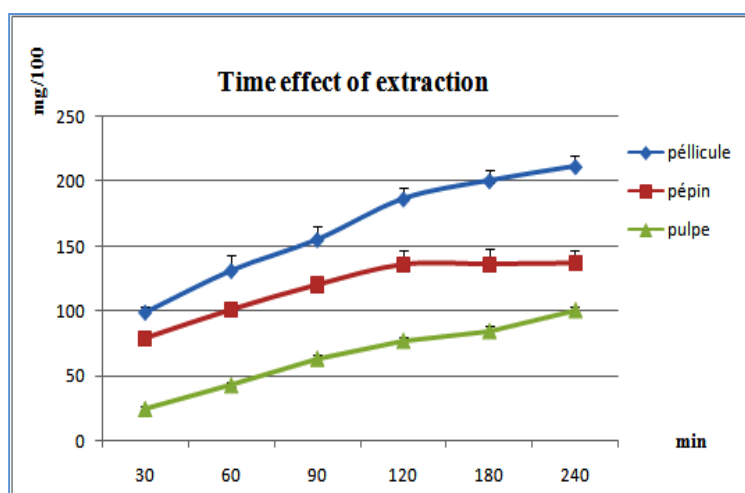


Figure N°41 : Effet de temps d'extraction

La variété muscadine mascarienne représente des concentrations en polyphénols totaux légèrement inférieure que la variété cinsault : Peau :  $203.66 \pm 12.35$ , Pépín :  $144.49 \pm 12.07$  et Pulpe :  $91.68 \pm 4.11$  mg/100g

La teneur totale en composés phénoliques des extraits a augmenté progressivement avec l'augmentation de la température (4, 10, 22, 37 et 45°C), probablement en raison de l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques à des températures plus élevées.

Selon **Christele Bastian, 2006**, une augmentation de la température favorise une augmentation de la solubilité. Par conséquent, la solubilité de l'eau dans les solvants organiques augmente également, ce qui implique une meilleure imprégnation de la matrice pour l'extraction. De plus, travailler à des températures plus élevées diminue la viscosité, augmente le coefficient de diffusion et affaiblit les interactions entre les analytes et la matrice, ce qui signifie que l'analyse passe plus rapidement en solution. Par conséquent, la vitesse d'extraction est également augmentée.

### 1-3. Résultat d'optimisation d'extraction pour la variété Grenache

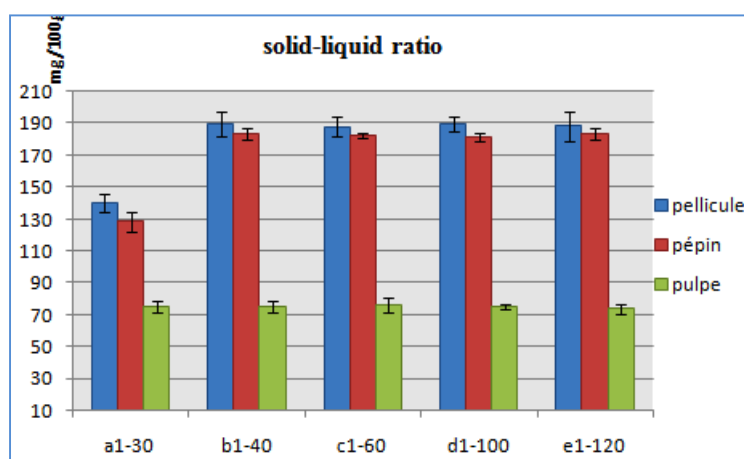


Figure N°42 : Effet de ratio solide-liquide

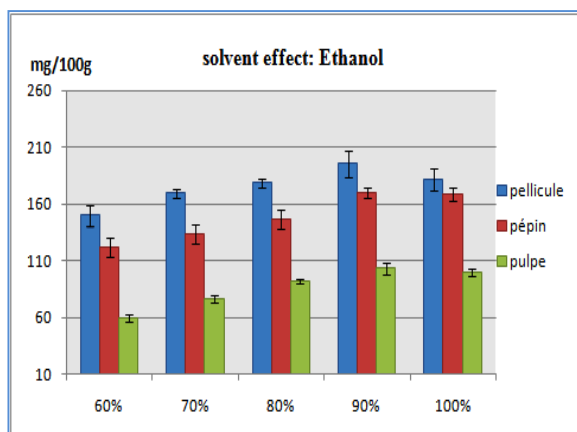


Figure N°43 : Effet de solvant éthanol

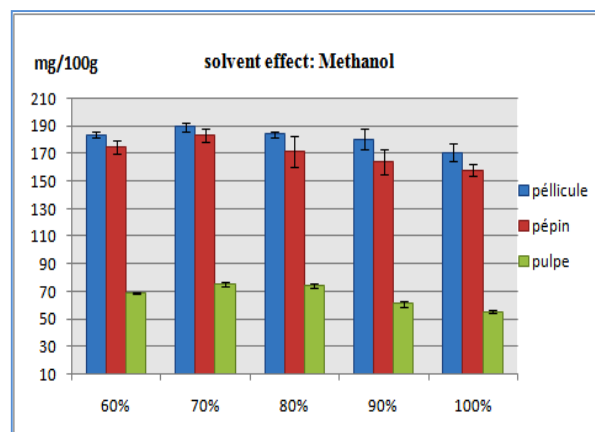


Figure N°44 : Effet de solvant méthanol

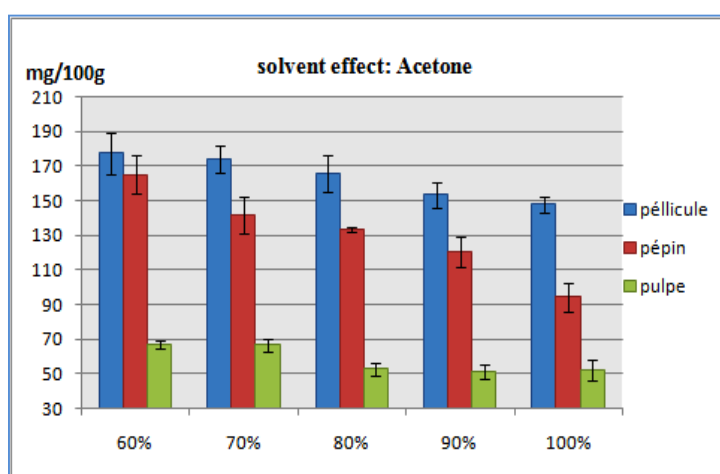


Figure N°45 : Effet de solvant acétone

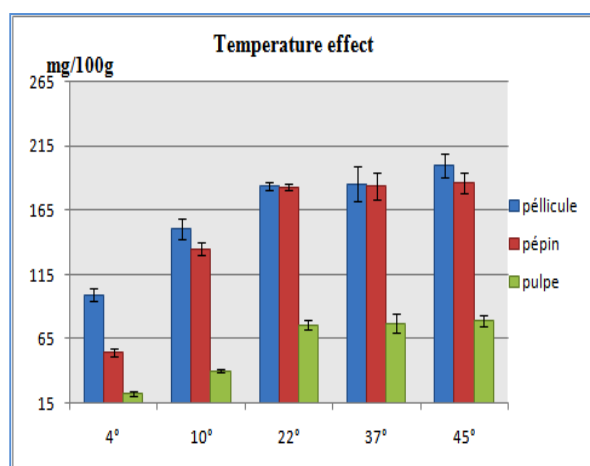


Figure N°46 : Effet de température d'extraction

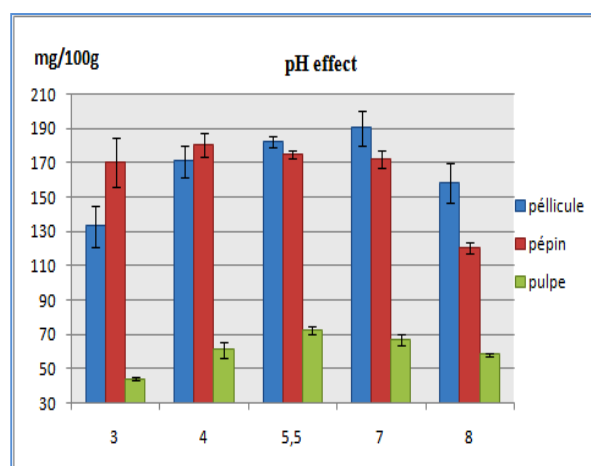


Figure N°47 : Effet de PH d'extraction



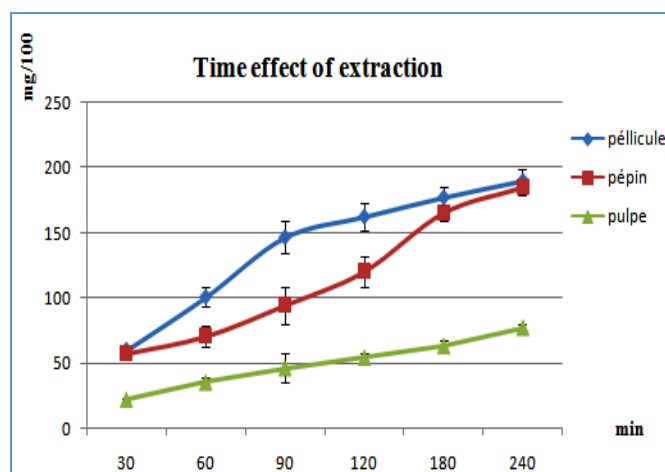


Figure N°48 : Effet de temps d'extraction

Le dosage des polyphénols totaux de la pellicule, pépin et pulpe de la variété Grenache cultivée dans la région de Mascara ont montrés les concentrations suivantes :  $200.26 \pm 9.33$ ,  $186.19 \pm 7.67$  et  $103.16 \pm 5.11$  mg/100g respectivement.

Un solvant contenant une faible quantité d'acide donne un rendement élevé, et l'acide chlorhydrique a été utilisé pour la présente étude.

Les polyphénols, principalement les anthocyanes, sont très sensibles au pH de l'extraction en raison de leurs multiples groupes OH. Selon Türker et *al*, 2006, certains pigments anthocyanes présentent une stabilité irréversible en pH basique.

De plus, le maintien d'un pH bas pendant le stockage peut améliorer la stabilité des échantillons (Amendola, D et *al*, 2010).

Les conditions optimales d'extraction des polyphénols totaux pour les différentes parties des variétés de raisin étudiées, et après interprétation des résultats obtenus par des outils statistiques nécessaires, sont présentées dans le tableau N°13

**Tableau N°13** : résultats de l'optimisation de l'extraction des composés phénolique

Variété	Partie	Ratio	Solvant %	Température (°C)	PH	Temps (min)
<b>Cinsault</b>	<b>Pellicule</b>	1-60	Acétone 90%	22	5.5	+240
	<b>Pépin</b>	1-100	Ethanol 70%	37	5.5	180
	<b>Pulpe</b>	1-100	Méthanol 90%	37	7	+240
<b>Muscadine</b>	<b>Pellicule</b>	1-60	Ethanol 60%	37	4	+240
	<b>Pépin</b>	1-40	Ethanol 100%	45	5.5	120
	<b>Pulpe</b>	1-60	Ethanol 80%	45	7	+240
<b>Grenache</b>	<b>Pellicule</b>	1-40	Ethanol 90%	45	7	+240
	<b>Pépin</b>	1-40	Méthanol 70%	45	4	+240
	<b>Pulpe</b>	1-30	Ethanol 90%	45	5.5	240

### 1.3.1. Effet de ratio :

Nos résultats sont en concordance avec ceux des pépins de raisin pour Bucic-Kojic, A.; et *al*, 2007, Galili, S et *al*, 2014 et Lisard Iglesias-Carres et *al*, 2018. Avec des ratios des entre 10 à 80ml pour 1g.

Nous remarquons une stabilité de concentration après la valeur optimale ou une augmentation non significative. Ce phénomène peut être expliqué par l'épuisement total la matrice végétale par le ratio appliqué.

### 1.3.2. Effet de solvant

Quelques travaux dans le même contexte ont montrés des résultats proche que les notre comme Lisard Iglesias-Carres et *al*, 2018, Yang, L.; et *al*, 2009 et Cacace, J.E .pour des pourcentages entre 40-100% avec l'eau.

L'ajout d'eau aux solvants d'extraction organiques favorise le gonflement des particules de fruits, augmentant ainsi la surface de contact entre le solvant et les particules. Cela facilite la pénétration du solvant dans les particules de fruits, ce qui améliore le taux d'extraction des composés phénoliques. (Li, W et *al*, 2012) (Mukho padhyay, S et *al*, 2006)

### 1.3.3. Effet de Température

Les concentrations en polyphénols sont fortement influencées par la température d'extraction : 4-45°C. de 22.68±2.07 à 276.35±5.69 mg/100g.

Une augmentation de la température favorise un accroissement de la solubilité. Donc la solubilité de l'eau dans les solvants organiques augmente aussi ce qui implique une meilleure imprégnation de la matrice pour l'extraction. De plus, le travail à températures plus élevées diminue la viscosité, augmente le coefficient de diffusion et affaiblit les interactions entre les analytes et la matrice, c'est-à-dire que l'analyte passe plus rapidement en solution. Par conséquent la vitesse d'extraction en est aussi augmentée.

Hors 50°C, quelques types de polyphénols comme les anthocyanes subissent une dégradation réversible avec une perte des activités biologiques antioxydants et antimicrobien. Cette dégradation devient irréversible hors 80 °C. Ces transformations sont largement enregistrés chez plusieurs chercheurs dont nous citons : Cacace, J.E.; et *al.* 2003, Prasad, K.N.; et *al.* 2011 et Yang, L.; et *al.* 2009.

Cependant, d'autres études ont signalé une augmentation de concentration en polyphénols du raisin à des températures de 85°C pour Karacabey, E.; et *al.* 2010.

L'effet observé de la température peut s'expliquer par une augmentation de la température modifiant les propriétés du solvant, affaiblissant les interactions des polyphénols avec les composés cellulaires et compromettant l'intégrité de la paroi cellulaire, conduisant à une augmentation du transfert des polyphénols vers le solvant. **(Yang, L et al, 2009) (Tabaraki, R et al, 2011).**

#### **1.3.4. Effet de temps d'extraction**

Des temps d'extraction plus longs ont généralement entraîné une augmentation des rendements en polyphénols ; des effets similaires ont été observés pour Yilmaz et al, qui ont rapporté un temps d'extraction de 80 à 100 minutes pour obtenir les valeurs maximales de TAC et de TPC. **(Yilmaz, F.M et al, 2015)**

Armendola et al, 2010 ont rapporté un temps d'extraction de 120 min pour obtenir le rendement le plus élevé en polyphénols à partir du marc de raisin.

La nécessité d'un temps d'extraction aussi long pourrait être due à la forte teneur en polyphénols du raisin ou à la matrice alimentaire elle-même. En effet, on sait que les polyphénols sont liés à certains composants de la matrice alimentaire. **(Sant Anna, V et al, 2012)**

### 1.3.5. Effet de PH

Le pH optimal pour l'extraction des polyphénols a montré un effet important sur les composés phénoliques totaux. Les polyphénols, principalement les anthocyanes, sont très sensibles au pH de l'extraction en raison de leurs multiples groupes OH. Selon Türker et *al*, 2006, certains pigments anthocyanes présentent une instabilité irréversible en pH basique. De plus, le maintien d'un pH bas pendant le stockage peut améliorer la stabilité des échantillons (Amendola, D et *al*, 2010).

## 2. Analyses des composés phénolique

Les conditions optimales obtenues dans la première partie dans ce travail ont été adoptées dans tout le reste de la partie expérimentale.

La détermination des taux de rendement des différentes extractions effectuées nous a permis de rapporter les résultats de dosage au poids frais de trois parties du fruit de raisin. Ces rendements sont exprimés en pourcentage de la matière fraîche.

### 2.1. Le rendement de l'extraction

La comparaison des rendements des trois variétés est donnée dans le tableau N°14

**Tableau N°14 :** Rendement, aspect et la couleur des extraits obtenus. (Moyenne $\pm$  $\delta$ D)

partie	Cinsault	Muscadine	Grenache	Aspect	Couleur
peau	14.33 $\pm$ 1,14	12,51 $\pm$ 1,09	10,71 $\pm$ 0,37	Pâteux	Rouge clair
pulpe	21.46 $\pm$ 1,84	22,69 $\pm$ 0,57	16,77 $\pm$ 0,24	Pâteux	Marron
pépin	7.51 $\pm$ 0,32	6,05 $\pm$ 0,47	8,47 $\pm$ 0,47	Huileux	Marron foncé

Il est important de signaler que le solvant d'extraction emporte des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Djeridane A. et *al*, 2006).

## 2. 2. Analyse qualitative des extraits

### 2.2.1. Screening phytochimique

Ces tests ont été effectués pour mettre en évidence la présence de certains groupements chimiques qui peuvent être responsables des activités biologiques étudiées.

Selon leur intensité les réactions qui se produisent sont classées de : négative(0) jusqu'à franchement positive (++). Les résultats sont reportés dans le tableau 15.

**Tableau 15 :** Résultats de screening phytochimique sur les extraits préparés.

Variété métabolites	Cin.			Mus.			Gre.		
	peau	pulpe	pépin	peau	pulpe	pépin	peau	pulpe	pépin
Flavonoïdes	+++	+	++	++	+	++	+++	+	++
Tanins catechiques	+	+	++	+	+/-	++	+	+	+
Tanins galliques	+	+	+	++	+	+/-	+	+	+/-
Coumarines	+	++	-	+	+	-	+	+	-
Stérols	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Polyphénols	+++	++	++	+++	++	+++	+++	++	++
Saponines	++		+	+		+	+		+
anthocyanidines	+++	+	+	+++	+	Traces	++	+	+
Alcaloïdes	-	-	+	-	Traces	+	-	-	Traces
Terpenoides	+	+	Traces	+	+	-	+	+	Traces

**Cin.** : variété Cinsault. **Mus.**: variété Muscat. **Gre.** : Variété Grenache.

Toutes les parties étudiées sont soumises à une analyse phytochimique qui permet la détermination qualitative des principes actifs qui confèrent la saveur, la couleur et d'autres caractéristiques telles que les activités biologiques.

Selon leur intensité, les réactions qui se produisent sont classées de : négative (-) à nettement positive (++), les résultats de l'analyse quantitative sont représentés dans le tableau N°15. Dans les extraits de peau : Les métabolites secondaires ont été trouvés comme étant du polyphénol (+++), des tannins catéchine (+). Flavonoïdes (+++), terpénoïdes (+), anthocyanidines (+++) dans la partie cutanée, coumarines (+) et saponines (++). tandis que dans les graines: les métabolites

secondaires trouvés : alcaloïde (+), polyphénol (++), tannins catechiques (++), flavonoïds (++), Anthocyanidines (+) et saponines (+).

En effet, la teneur phénolique d'une espèce végétale dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (Falleh H. et al, 2008 ; Podsedek A, 2007).

### 2.2.2. Analyse chromatographique sur couche mince

Pour avoir les empreintes phénoliques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant une phase mobile moyennement polaire. Sous lumière UV à 365 nm Les différentes taches de produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées.

Les standards utilisés sont ; L'acide gallique (Ag), l'acide tannique (At) et la catéchol (Cat).

Après l'utilisation de plusieurs systèmes de migration. On a conclu que le système (BAW) : butanol/ acide acétique / eau (60 :15 :35) a donnée une meilleure séparation pour tous les extraits.

Par calcul des rapports frontaux des extraits de peau, de pulpe et de pépin des trois variétés et leur comparaison avec ceux des témoins (**Tableau 16**) les composés suivants ont été identifiés :

- Acide gallique dans l'extrait de peau et de pulpe des variétés *Cinsault* et *Muscat*.
- Acide tannique dans l'extrait de pellicule et de pulpe de la variété *Cinsault* et de pulpe seulement de la variété *muscat*.
- La catéchol dans l'extrait de pépin des variétés *Cinsault* et *muscat*.

**Tableau N°16:** Rapports frontaux(Rf) des spots issus des témoins

	Ag	At	Cat
<b>Rf</b>	<b>0.89±0,03</b>	<b>0.17±0,02</b>	<b>0.60±0,02</b>

**Ag** : acide gallique. **At** : acide tannique. **Cat** : catéchol.

**Tableau 17 :** Rapports frontaux(Rf) des spots issus de la séparation des extraits

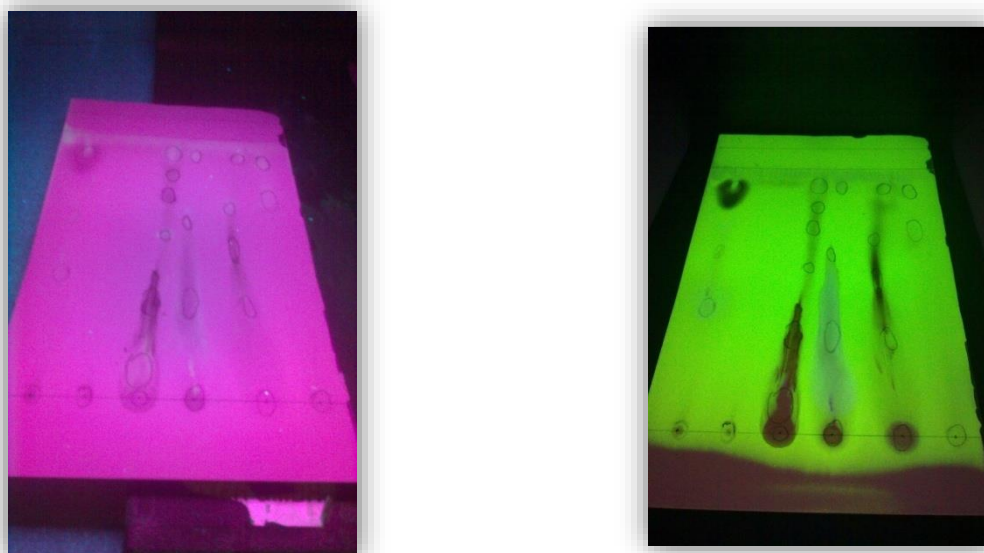
Variété		Spot	Rf	Variété		Spot	Rf	Variété		Spot	Rf
<b>Cin.</b>	peau	Spot1	0.17	<b>Mus.</b>	peau	Spot1	0.12	<b>Gre.</b>	peau	Spot1	0.11
		Spot2	0.53			Spot2	0.52			Spot2	0.28
		Spot3	0.89			Spot3	0.89			Spot3	0.54
		Spot4	/			Spot4	/			Spot4	0.71
	pulpe	Spot1	0.17		pulpe	Spot1	0.18			Spot5	0.80
		Spot2	0.58			Spot2	0.55			Spot6	0.92
		Spot3	0.88			Spot3	0.89		pulpe	Spot1	0.28
		Spot4	/			Spot4	/			Spot2	0.58
	pépin	Spot1	0.081		pépin	Spot1	0.11			Spot3	0.91
		Spot2	0.29			Spot2	0.38		pépin	Spot1	0.28
		Spot3	0.61			Spot3	0.62			Spot2	0.50
		Spot4	0.86			Spot4	0.86			Spot3	0.66
										Spot4	0.90

**Cin.** : variété Cinsault. **Mus.**: variété Muscat. **Gre** : variété Grenache.

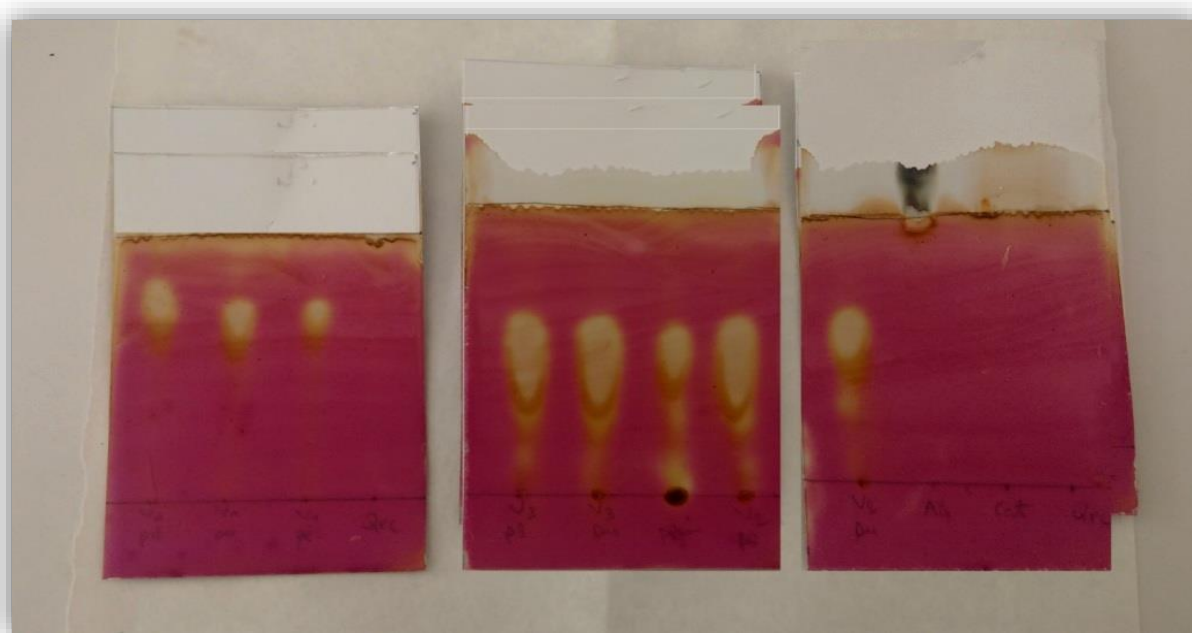
Les plaques obtenues présentent une bonne migration (figure 49, 50, 51 et 52) par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des composés phénolique, les spots sont bien distincts et montrent une richesse considérable des variétés étudiées en substances flavonoïques. Partant de leurs fluorescences et Rf, les échantillons sont riches en flavones en 1<sup>er</sup> lieu qui correspondent aux tâches violettes et brunes.

Les Rf différents sont dus à la polarité des composés vis-à-vis du système solvant de migration, et la phase stationnaire. Celle-ci s'installe suite à une différence au niveau du squelette moléculaire, dont les molécules méthylées ont un Rf plus élevé que celles glycosylées.

Ces résultats confirment la richesse de ces trois extraits en substances polaires. Ces derniers restent tout de même préliminaires et nécessitent d'autres études approfondies.

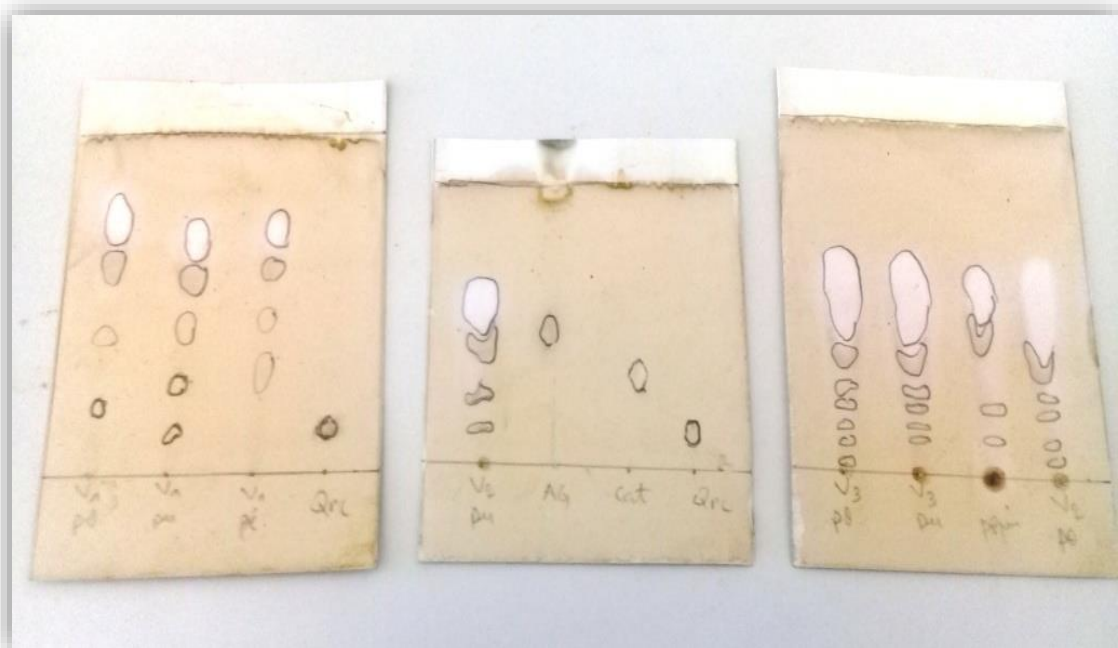


**Figure N° 49:** Résultat de l'analyse chromatographique de : l'acide gallique, l'acide tannique, variété grenache et le catéchol respectivement (366nm et 254 nm)

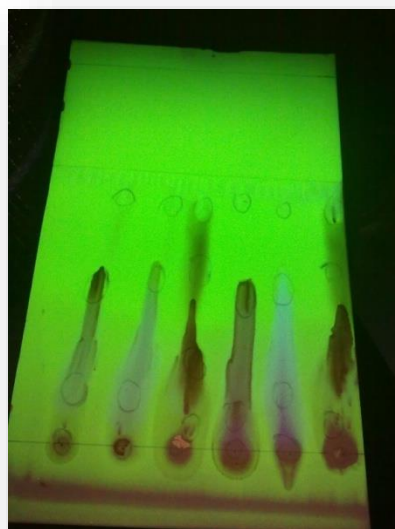


**Figure N° 50 :** Résultat de l'analyse chromatographique de : variété cinsault, muscadine, grenache et quelques témoins respectivement par révélation chimique





**Figure N° 51 :** Résultat de l'analyse chromatographique de : variété cinsault, muscadine, grenache et quelques témoins respectivement par révélation optique UV



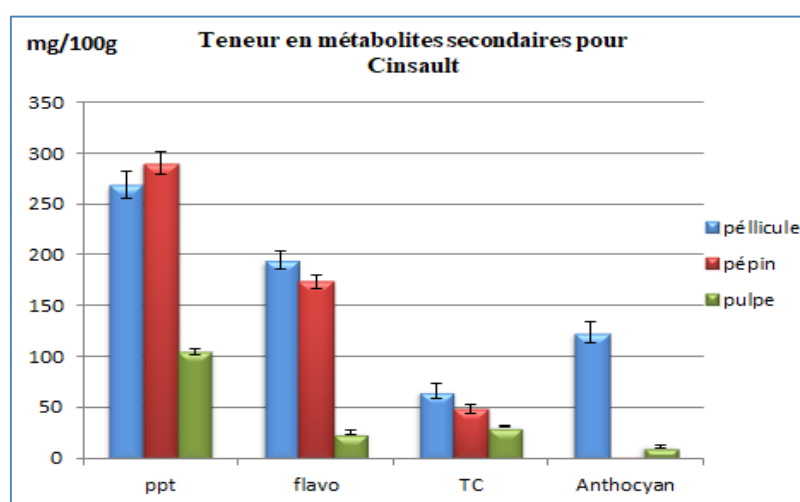
**Figure N° 52:** Résultat de l'analyse chromatographique de : variété cinsault et variété muscat respectivement (366nm et 254 nm)

### 2.3. Analyse quantitative des métabolites secondaires du fruit *Vitis vinifera*

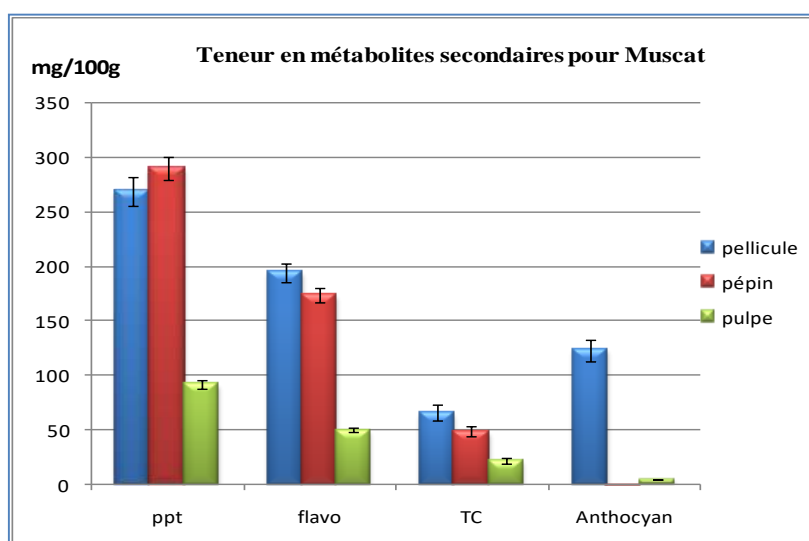
La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique et exprimée en milligrammes d'équivalent en acide gallique par 100 gramme de raisin.

Le contenu phénolique total de parties peau, pulpe et pépin des trois variétés étudiées de *Vitis vinifera* est représenté dans la figure N°53, 54 et 55.

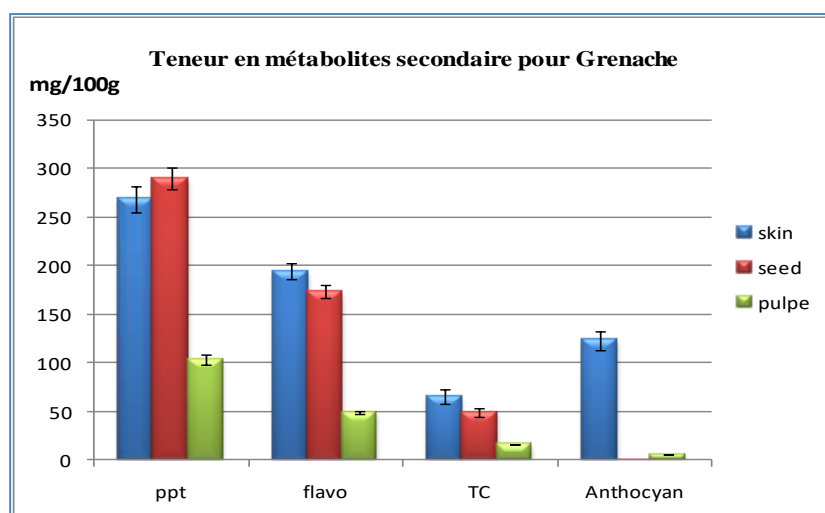
Nous remarquons que les extraits de la peau et de pépin de la variété Cinsault représentent les teneurs les plus élevées en polyphénols, ces résultats confirment la grande richesse de cette variété en métabolites secondaires



**Figure N°53 :** Teneur en métabolites secondaires pour la variété Cinsault. (moyenne $\pm$  $\delta$ D)



**Figure N°54 :** Teneur en métabolites secondaires pour la variété Muscadine. (moyenne $\pm$  $\delta$ D)



**Figure N°55 :** Teneur en métabolites secondaires pour la variété Grenache. (moyenne $\pm$  $\delta$ D)

Les figures 53, 54 et 55. représentent les concentrations en métabolites secondaires dans les différentes parties de la baies de raisin des variétés Cinsault, Muscadine et Grenache respectivement.

### 2.3. 1 Dosage spectrométrique des polyphénols totaux

Nous constatons que la forte concentration en ppt est enregistrée est dans le pépin de la variété de Cinsault :  $290.03 \pm 11.03$  mg/100g EAG. Tandis que la plus faible est celle de la pulpe de la variété de Muscadine :  $91.68 \pm 4.11$  mg /100g EAG. Ces résultats concorde avec celui de Alison Ann Liu, 2009 indiquent une teneur de polyphénols totaux dans la péricarpe de variété muscat 253mg/100g pépin, 192.3 mg/100gdans les pépins et 25.77 mg/100g (fw) dans la pulpe.

Nous remarquons une différence importante entre les teneurs des différentes variétés étudiés, ce qui implique que le facteur génétique a une grande influence sur la biosynthèse des métabolites secondaires.

Cette différence de teneurs en métabolites secondaire entre les parties des différentes variétés est également observée dans les travaux de Baydar, N. G et al , 2004, et Georgé, S et al, 2005, avec des teneurs varient de 627,98 - 667,87 mg d'EAG/g. et MS de pépin, ce qui est équivalent de 250.8-266.91 mg/100g EAG.

En revanche, on constate que la teneur des polyphénols est presque similaire dans les extraits de pulpe des trois variétés étudiées : de  $91.68 \pm 4.11$  à  $104.34 \pm 2.39$  mg/100g EAG.

Contrairement à nos résultats, ceux de Joseph C et *al*, 2008, indiquent un taux de polyphénols totaux plus important dans l'extrait de pépin (645.5 mg GAE/100gde la matière sèche).

Selon la littérature scientifique, les concentrations métabolites secondaires dépendent d'un certain nombre de facteurs: le stade de maturation, le sol, les conditions climatiques, la culture de la vigne et le traitement auquel elle est soumise (**Bautista-Ortín et al, 2007**).

Toutefois, les résultats du dosage des composées phénoliques totaux peuvent ne pas indiquer les teneurs exacts des extraits en ces composés, puisque ; malgré sa grande sensibilité, la méthode de Folin Ciocalteu peu avoir des problèmes d'interférences, du fait qu'elle n'est pas spécifique aux polyphénols. En effet le réactif de Folin Ciocalteu réagit avec les acides aminés aromatiques des protéines (tyrosine et tryptophane), les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose et l'acide ascorbique (**Boizot N et Charpentier J.P, 2006**).

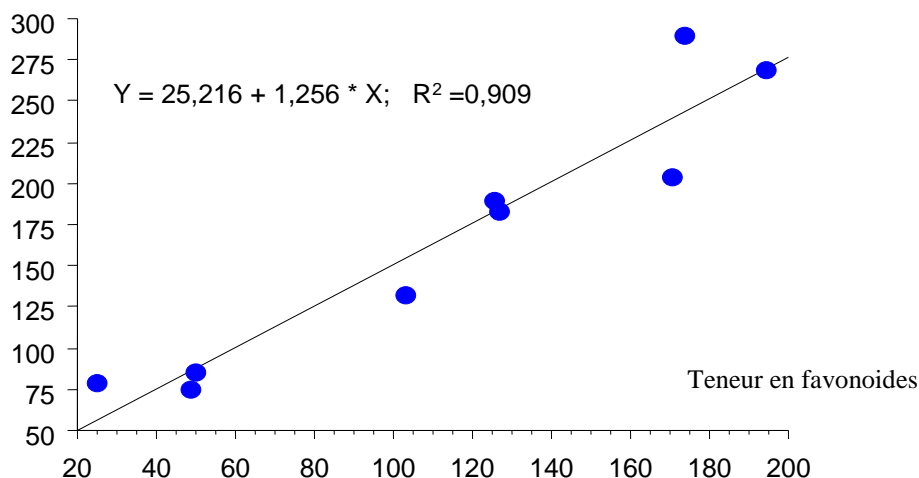
### 2.3. 2 Dosages spectrométriques des flavonoïdes

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux a été réalisée par la méthode du trichlorure d'aluminium (**Huang D.J et al, 2004**),

La quercitrine a été utilisée comme standard. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent de quercitrine par 100 gramme de matière fraîche.

Il a été observé que la richesse en flavonoïdes correspond toujours à celle des polyphénols totaux dans les parties pellicules et pépin :  $194.55 \pm 8.56 \text{ mg/100g EQ}$  et  $173.47 \pm 6.37 \text{ mg/100g EQ}$ , contrairement avec les pulpes, (figure 49).

Teneur en polyphénols



**Figure N°56 :** Graph de corrélation entre la teneur en polyphénols et la teneur en flavonoïdes.

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation linéaire significative ( $r^2=0,90$ ,  $p \leq 0.0001$ ) entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques. Ceci est logique étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols de raisin.

Dans le cas des pulpes, la non proportionnalité peut être expliquée par l'hétérogénéité de degré de solubilité des flavonoïdes dans l'extraction et le dosage, et de leurs différences de structure. (El-Sayed et al, 2013) ; (Bojilov et al, 2014).

### 2.3.3 Dosage spectrophotométrique des tanins condensés

La méthode de Broadhurst et Jones, 1978 a été utilisée pour quantifier les tanins dans nos extraits. Elle est basée sur la réaction spécifique des tannins dépolymérisés par un acide fort de se lier la vanilline, l'intensité de couleur rouge est proportionnelle avec la concentration de ces métabolites. La catéchine a été utilisée comme standard. (Seigler D.S et al, 1986 ; Atefeibu E.S.I, 2003)

Le dosage des tanins condensés montrent la haute teneur de ces molécules dans la partie peau de la variété Cinsault avec une teneur de  $65.75 \pm 1,87 \text{ mg/100g}$ , tandis que la portion la plus faible avec une teneur de  $7.97 \pm 0,44 \text{ mg/100g}$  se trouve dans la partie pépin de la variété Muscat.

Ces résultats confirment d'autres travaux déjà réalisés qui confirment la présence des tanins dans les extraits de raisin. Selon ces études, deux types proanthocyanidin sont présents dans le raisin suivant la nature de l'anthocyanidine libérée en milieu acide, à chaud. D'une part, les procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine), qui libèrent de la cyanidine, et d'autre part, les prodelphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine), qui libèrent de la delphinidine.

Dans les tanins de pépins, seules les unités procyanidines sont présentes (alors que les tanins de pellicules contiennent des unités procyanidines et prodelphinidines (**Prieur C et al, 1994, Souquet J.M et al, 1996 ; Souquet J.M et al, 2000**)).

### 2.3.4 Dosage spectrophotométrique des anthocyanidines

Les anthocyanes sont les pigments rouges des raisins. Ils sont présents dans les raisins rouges mais absents des raisins blancs (**Cadet A, 2005**)

Les résultats des analyses quantitatives des anthocyanidines indiquent que ces molécules sont les constituants majoritaires des composés phénoliques des fractions de la pellicule :  $123.51 \pm 9.82 \text{ mg/100g}$  dans la peau de variété Cinsault, avec presque une absence totale dans les autres parties de baie de raisin :  $0.07 \pm 0.01 \text{ mg/100g}$  et  $11.54 \pm 1.38 \text{ mg/100g}$  dans les pépins et pulpes respectivement.

Des travaux similaires confirment nos résultats : Cacace, J.E et al, 2003, Karacabey, E et al, 2010 et Lisard I.C, et al, 2018. avec des concentrations de 127.21 à 151.36 mg/100g dans la pellicule.

À cet égard, pour extraire les pigments anthocyaniques de la pellicule, l'impact du pH sur la stabilité des pigments était significatif, les flavonoïdes colorés sont plus stables dans des environnements plus acides (**Türker, N et al, 2006**)

### 3. Evaluation de l'activité antioxydante

Le monde végétal a largement été exploré pour ses capacités antiradicalaires à raison de leurs contenu en composés phénoliques y sont fortement répandus et sont donc à ce titre sources potentielles d'antioxydants.

Dans ce travail, les capacités antioxydantes ont été évaluées de manière *in vitro*, deux méthodes ont été développées, impliquant le mélange des molécules oxydantes, tels que les radicaux libres ou les complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux. (Prior et al, 2005).

#### 3.1. Effet scavenger du radical DPPH

Les résultats de ce test peuvent être exprimés en tant que : pourcentage de l'activité antiradicalaire ou en pourcentage de DPPH restant ou peuvent également être exprimés en utilisant le paramètre  $IC_{50}$ , qui est défini comme la concentration du substrat qui cause une perte de 50% de l'activité de DPPH (Markowicz Bastos D.H. et al, 2007).

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en  $IC_{50}$  (tableau 18), ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs (Vinson J.A. et al, 2005) pour présenter leurs résultats, (couleur jaune). Ces concentrations sont déterminés graphiquement des deux tests séparés, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonné l'activité antioxydante en pourcentage. La valeur de chaque  $IC_{50}$  exprime la concentration de l'extrait exigée pour réduire 50% de DPPH en solution. Un autre paramètre exprime la puissance antiradicalaire a été calculée à partir du premier paramètre noté : "ARP" (pouvoir antiradicalaire, égale à  $1/IC_{50}$ ). Les valeurs ARP de tous les extraits sont significatives. Plus ces valeurs ne tendent pas et s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente.

**Tableau N°18:** Activité antiradicalaire des extraits de fruit de *Vitis vinifera* et de l'acide ascorbique. **Cin.** : variété Cinsault. **Mus.**: variété Muscat. **Gre.** : variété Grenache.

Extrait ou témoin		IC <sub>50</sub> (µg/ml)	ARP (1/IC <sub>50</sub> )
<b>Témoin</b>	<i>Acide ascorbique</i>	32.725±0.112	30.557
<b>Cinsault</b>	<i>pellicule</i>	374.118±22.320	2.672
	<i>pulpe</i>	320.615.±7.514	3.119
	<i>pépin</i>	117.455±11.124	8.513
<b>Muscadine</b>	<i>pellicule</i>	162.571±6.023	6.151
	<i>pulpe</i>	570.963±3.417	1.751
	<i>pépin</i>	158.352±3.944	6,756
<b>Grenache</b>	<i>pellicule</i>	245.538±0.378	4.072
	<i>pulpe</i>	520.602±21.338	1.920
	<i>pépin</i>	188.483±14.017	5.305

À des fins comparatives on a utilisé l'acide ascorbique comme antioxydant standard, il a montré une activité antiradicalaire intéressante avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 32.725±0.112µg/ml et une APR de l'ordre de 30.557. En comparaison avec l'acide ascorbique tous les extraits testés s'avèrent moins actifs à cause de son pouvoir réducteur très élevé, principalement due à leurs propriétés redox, qui peuvent jouer un rôle important dans l'absorption et la neutralisation des radicaux libres. De l'autre côté, les extraits bruts testés contiennent beaucoup d'impureté autre que les composés phénoliques.

Les extraits de pépin révèlent des activités les plus élevées avec un APR de 8,513 pour la variété Cinsault et 6.756 pour Muscadine.

L'extrait de pellicule de muscadine et grenache à montrer aussi des fortes activités antiradicalaires 6.51 et 4.042 respectivement, qui peuvent être attribué à la richesse de cette partie de baie de raisin en polyphénols totaux notamment les anthocyanidines.

En revanche l'extrait de la pellicule de variété Cinsault adonné-contrairement aux données bibliographiques- un faible pouvoir antioxydant par rapport aux autres extraits de cette partie : 2,672. Cela peut être expliqué par le stade de récolte, qui peut durer plusieurs semaines,



influençant l'état structural des composés phénolique notamment les plus thermosensibles : les anthocyanidines.

Les tests de corrélation linéaire révélé une forte proportionnalité entre les teneurs en polyphénols et l'effet antioxydants des extraits des trois variétés Cinsault ( $r^2=0,95$ ), Muscat ( $r^2=0,91$ ) et Grenache ( $r^2=0,67$ ).

Globalement, une corrélation plus ou moins moyenne a été révélée entre les teneurs en flavonoïdes et l'activité antioxydante ( $r^2=0,81$  pour la variété Cinsault,  $r^2=0,65$  pour la variété muscat et  $r^2=0,57$  pour la variété Grenache).

Ces résultats sont en parfait accord avec l'étude faite par Radovanović A. et *al*, 2009, qui a démontré que les échantillons les plus riches en composés phénoliques totaux sont ceux présentant les meilleurs pouvoirs antiradicalaires et ce suite à une plus grande variété et une meilleure richesse en composés obtenus au sein des extraits.

Selon Maataoui, 2006 la capacité antioxydante des fruits de couleur pourpre semblent être plus élevée que celle des fruits de couleur jaune – orange.

Certains auteurs ont pu déterminer les relations entre les structures des flavonoïdes et leurs capacités de piéger les radicaux libres, ils ont démontré que l'activité des flavonoïdes à capter ces radicaux dépend essentiellement de leur structure (**Javanovic et al, 1994**)

Dans le but d'identifier les sites potentiels au sein des flavonoïdes qui sont responsables sur l'effet scavenger vis-à-vis du radical DPPH, plusieurs travaux ont étudié la cinétique et le mécanisme réactionnel des flavonoïdes avec ce radical stable.

Amic et ses collaborateurs, 2003 ont mis en évidence la relation structure fonction de 29 flavonoïdes (flavones, flavonols et flavanones) et leurs capacités de piéger le DPPH. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements 3',4'-dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C.

A titre d'exemple, l'activité de la quercétine est deux fois plus élevée que celle de la catéchine (**Rice Evans, 1996**)

D'un autre côté, la fraction phénolique n'incorpore pas tous les antioxydants et les interactions synergiques entre les antioxydants dans un extrait car l'activité antioxydante ne

dépend pas seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants (Falleh et al, 2008).

En conclusion, les résultats que nous avons obtenus confirment l'effet antioxydant des extraits phénoliques des différentes parties des trois variétés de *Vitis vinifera*. Ce qui est en accord avec les constatations de différents chercheurs ayant étudié le pouvoir réducteur de ce fruit (En-Qin Xia, et al, 2010)

Les composés phénoliques présentent la capacité d'inhiber les radicaux libres due à leur aptitude à céder des atomes d'hydrogène ou à complexer les cations métalliques. Cette capacité est strictement dépendante de leur structure.

Les flavonoïdes sont encore plus efficaces dans le processus d'inhibition des molécules oxydantes.

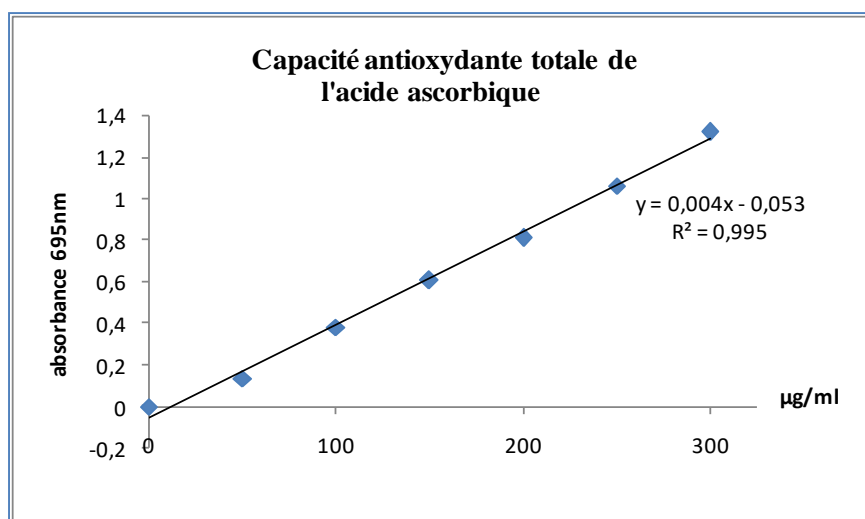
Conformément aux explications de Balasundram et de ses collaborateurs, 2006:

1. -le degré d'hydroxylation et la position des groupements hydroxyles reliés au noyau B conduit à une meilleure activité antioxydante due à l'augmentation de la stabilité du radical aroxyyle par la délocalisation électronique ou due au fait que ce noyau complexe les métaux ;
2. -les anthocyanidines ayant des groupements hydroxyles dans les positions 3', 4' et 5' ont une activité antioxydante plus importante ;
3. -une double liaison entre les atomes de carbone 2 et 3 conjuguée avec le groupement 4-oxo du noyau C ou en combinaison d'un hydroxyle dans la position 3 du même noyau entraînent une augmentation de l'activité anti radicalaire ;
4. -la substitution des groupements hydroxyles de noyau B par des groupements méthoxyles altère le potentiel redox de flavonoïdes ce qui affecte négativement leur activité antioxydante.

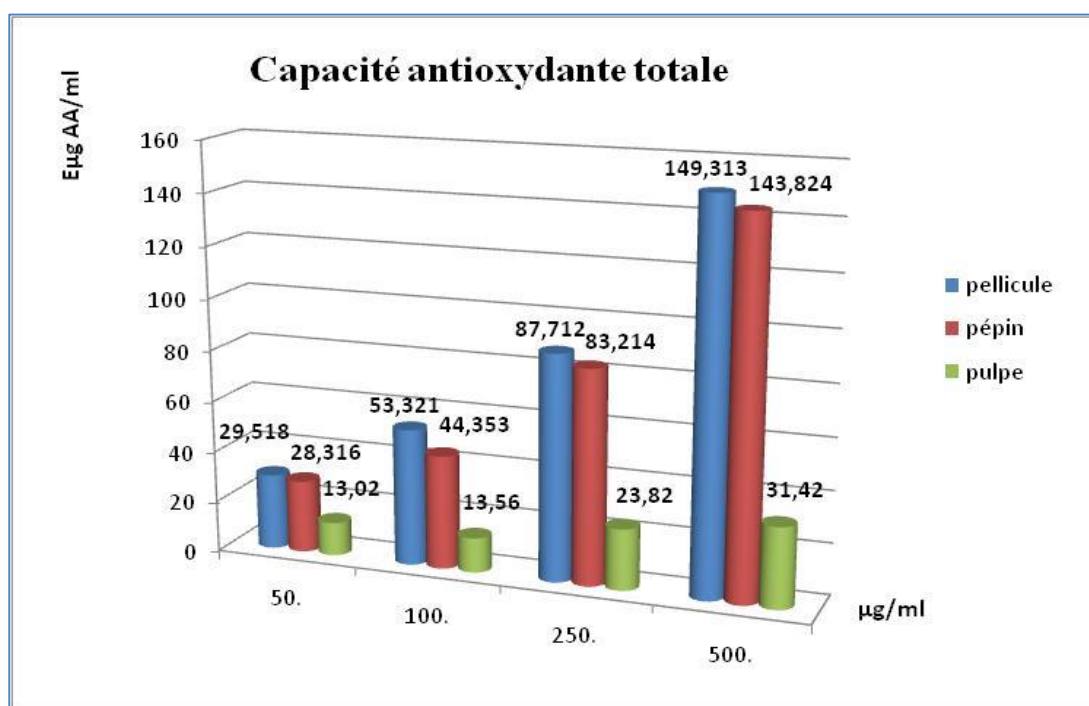
### 3.2. Capacité antioxydante totale

Le principe de la méthode de CAT est basé sur la réduction de la molybdate d'ammonium ( $\text{Mo}^{6+}$ ) en ( $\text{Mo}^{5+}$ ), Il implique la réduction d'un oxydant qui entraîne un changement de couleur. (Agbo et al, 2015)

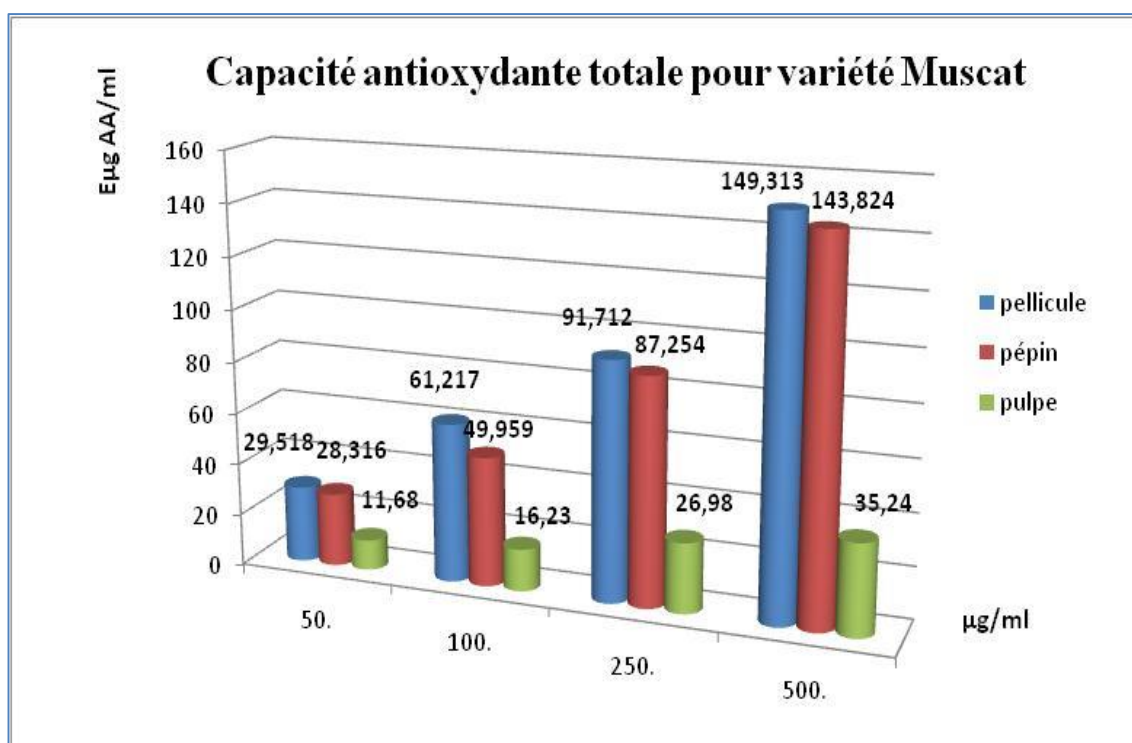
La capacité antioxydante totale des différents extraits est calculée à partir de la courbe d'étalonnage, établie en utilisant l'acide ascorbique comme antioxydant de référence. (Figure N°57)



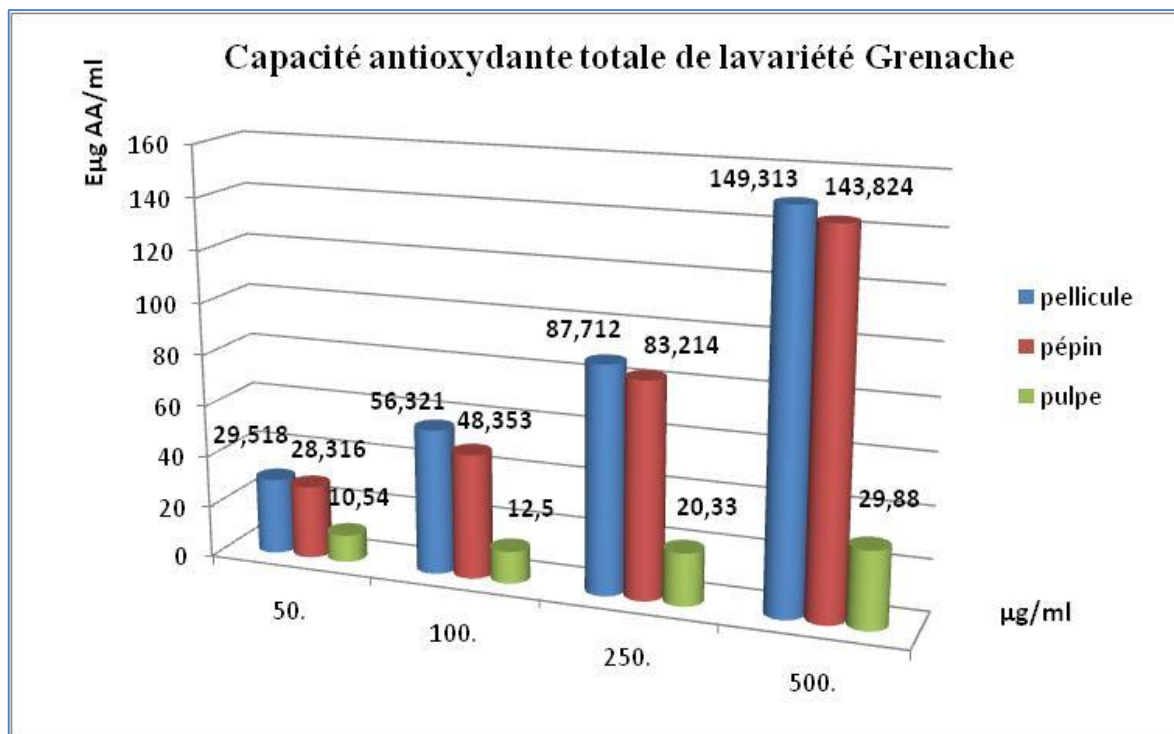
**Figure N°57 :** Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour la détermination de la capacité antioxydante totale.



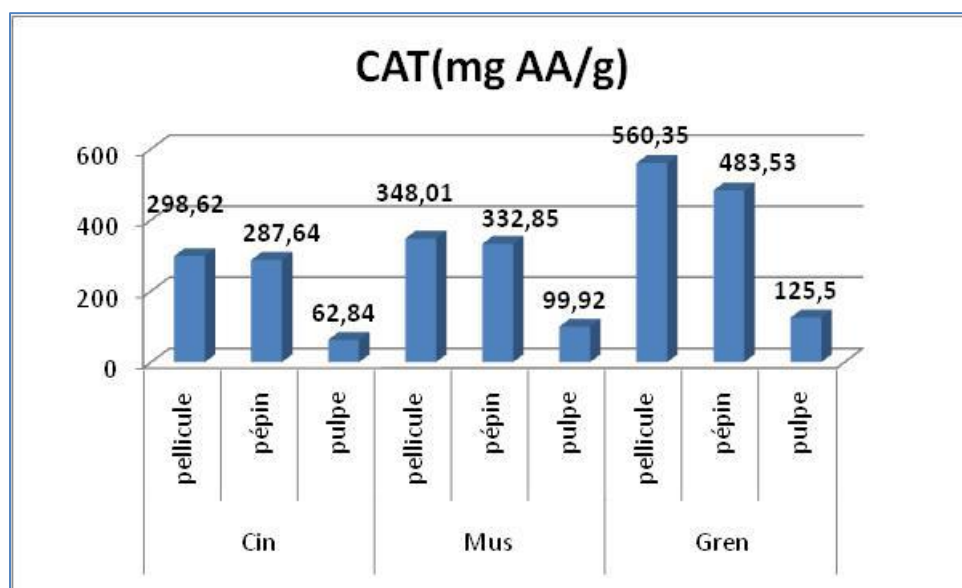
**Figure N°58 :** Capacité antioxydante des extraits de variété Cinsault



**Figure N°59 :** Capacité antioxydante totale des extraits de variété Muscat



**Figure N°60 :** Capacité antioxydante totale des extraits de variété Grenache.



**Figure N°61 :** Capacité antioxydante totale des extraits de trois variétés de *Vitis vinifera*.

Nos résultats montrent que les extraits de pellicule et pépin représentent l'activité la plus élevée, en particulier pour la variété Grenache :  $560,35 \pm 12,28$  mg AAsc/g et  $483,53 \pm 13,41$  mg AAsc/g.

Ce résultat est en accord avec ceux de Farhan LO et al, 2018 :  $551 \pm 10,2$  mg AAsc/g pour les pépins de muscat et  $330,4 \pm 1,22$  mg AAsc/g pour la pellicule de Red Globe.

En outre, les extraits de la pulpe ne sont pas les plus antioxydants :  $62,84 \pm 3,51$  mg AAsc/g pour l'extrait pulpe de Cinsault et  $99,92 \pm 2,27$  mg AAsc/g pour ce de Muscadine.

Ces fortes activités (CAT) peuvent être attribuées aux teneurs des composés phénoliques importantes dans ces fractions. En effet, des études antérieures ont confirmé que la capacité antioxydante est liée à la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes, connus pour inhiber les radicaux libres (Aliyu et al, 2011; Agbo et al, 2015). L'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés redox, qui peuvent jouer un rôle important dans l'absorption et la neutralisation des radicaux libres.

Nous pouvons constater qu'il n'y a pas une corrélation linéaire entre la capacité oxydante et les concentrations en polyphénols totaux ( $R^2=0,61$ ), cela peut confirmer que le profil flavonoïque qualitative est le responsable de cet effet.

Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (Heim, *et al*, 2002)

L'activité antioxydante est affectée non seulement par la teneur en polyphénols, mais d'autres facteurs doivent être pris en compte, tels que le degré de polymérisation, les groupes fonctionnels, la conformation moléculaire et autres. (Olszowy, 2019).

#### 4. Analyse chromatographique par HPLC

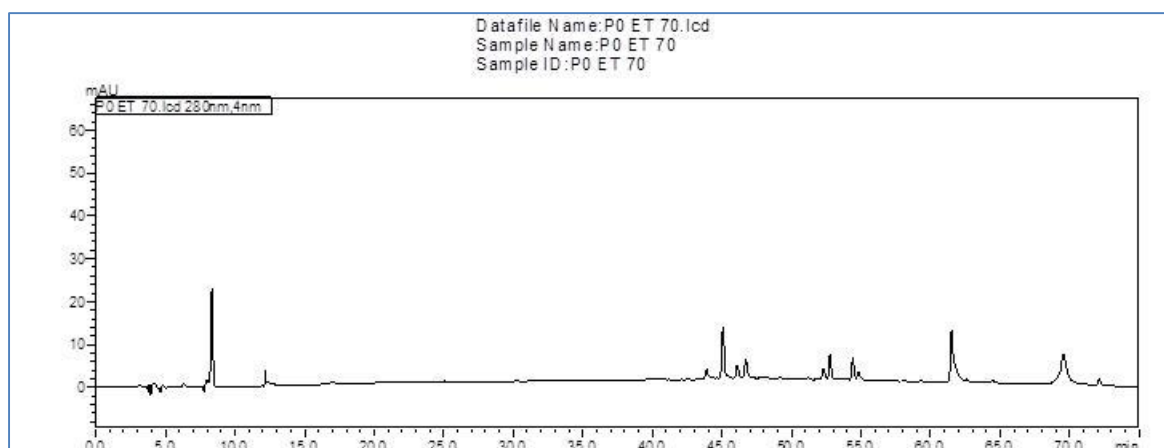
Le profile phénolique des extraits pour les échantillons analysés nous a montrée clairement la richesse des variétés de raisin cultivés dans la région de MASCARA en métabolites secondaires. se dernier représente une source importante d'antioxydants largement recherchés pour leurs propriétés biologiques.

Cependant, les activités biologiques réalisées n'ont pas donné une corrélation linéaire avec les concentrations en polyphénols totaux pour quelques extraits. Une activité modeste et dans certains cas faible a été enregistrée pour quelques parties.

Pour toutes ces raisons, une tentative d'identification des composés phénoliques contenus dans les extraits qui ont représentés des activités biologiques significatives par séparation chromatographique a été réalisée par comparaison des temps de rétentions des pics obtenus avec ceux des standards.

L'analyse chromatographique par HPLC des composés phénoliques est effectuée exclusivement pour les parties révélant les meilleurs activités biologiques : la pellicule et le pépin de variété cinsault et la pulpe de la variété Grenache.

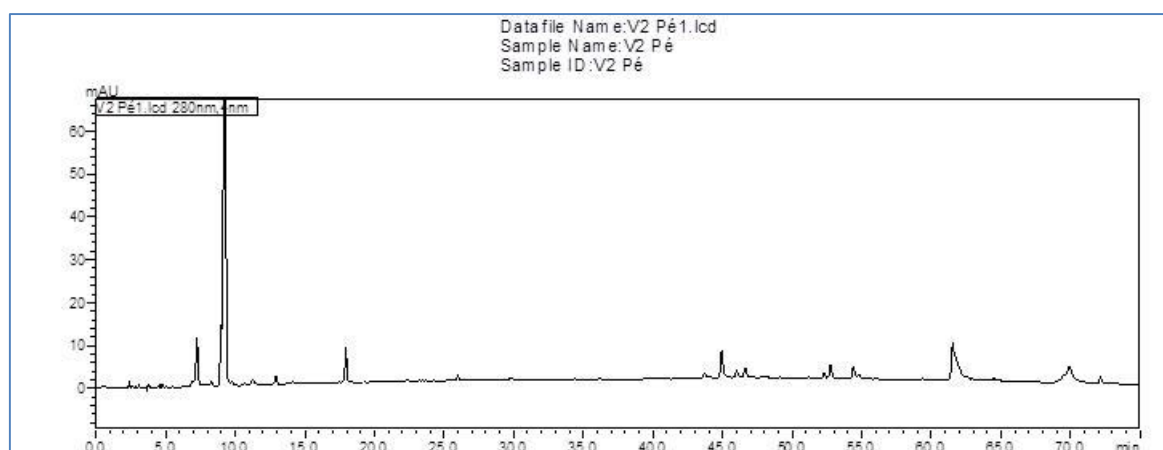
Les constituants identifiés par analyse HPLC et leurs pourcentages dans les extraits phénoliques sont listés dans le tableau N°19, 20 et 21. Figure N°62, 63et 64



**Figure N°62 :** Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pellicule de cinsault.

**Tableau N°19 :** Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pellicule de cinsault

N°	Temps de rétention	surface	% de surface	$\lambda$ max	composant
01	7,989	35162	2,011	198 282	Procyanidine B3
02	8,338	255001	14,583	283	Naringine
03	12,362	19355	1,107	212 269 332	Procyanidine B2
04	43,894	30876	1,766	272 327 373	Acide gallique
05	45,077	150326	8,597	211 270 327	Epicatechine
06	46,108	39086	2,235	215 327 374	Quercitine
07	46,716	65166	3,727	211 290 327	/
08	52,303	33339	1,907	212 327 374	Quercitine
09	52,771	70972	4,059	198 274 327	Acide syringique
10	54,401	62491	3,574	227 327 373	Quercitine
11	54,824	26393	1,509	213 271 391 327	Acide cafféique
12	61,512	240242	13,739	276 327	Coumarine
13	69,542	247844	14,174	217 201 327	Acide chlorogénique
14	72,124	15778	0,902	221 270 327	Acide ferulique

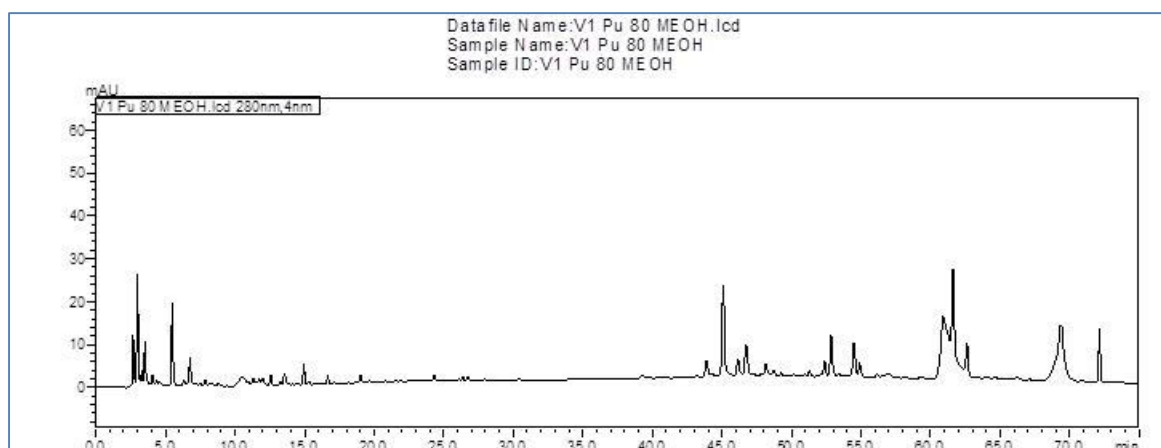


**Figure N°63 :** Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pépin de cinsault.

**Tableau N°20 :** Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pépin de cinsault.

N°	Temps de rétention	Area	% Area	$\lambda$ max	composant
01	7,252	123635	4,151	202	/
02	8,996	109430	3,674	275	Acide cinnamic
03	9,235	1639311	55,043	283	Naringenine
04	12,920	24528	0,824	275 327	Coumarine
05	17,952	74632	2,506	275 327	Coumarine
06	26,002	12835	0,431	204 271 293	Acide 2.4-dihydrobenzoic
07	43,720	16928	0,568	271 327	Kaempferol
08	44,949	88372	2,967	206 271 327	Kaempferol glucoside
09	46,620	30959	1,040	205 272 294 327	acide Protocatechique
10	52,759	37587	1,262	273 327	Acide Gallique
11	54,388	34721	1,166	209 324 373	/
12	61,530	256656	8,618	275 327 379	/
13	69,904	122196	4,103	211 202 327	Acide Caftarique





**Figure N°64 :** Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pulpe de grenache.

**Tableau N°21 :** Profil représentatif par chromatographie liquide haute performance d'extraits de pulpe grenache

N°	Temps de rétention	surface	% de surface	$\lambda$ max	Composant
01	2,979	221548	5,278	193 267	Procyanidine
02	3,525	95453	2,274	260	Acide p-coumarique
03	5,486	149949	3,572	265	/
04	43,895	57193	1,362	218 275 327	Coumarine
05	45,093	289071	6,886	217 271	épicatéchine
06	46,152	63072	1,502	231 327	Acide chlorogénique
07	46,733	115944	2,762	217 288 327	Acide caftarique
08	48,154	43968	1,047	201 274 327	Kaempferol
09	52,853	108962	2,596	276 327	Coumarine
10	54,480	106193	2,530	233 327 371	Acide cafféique
11	54,896	41979	1,000		/
12	60,885	525097	12,509	222 273 327	Acide gallique
13	61,609	463204	11,034	222 276 327	/
14	62,612	105199	2,506	219 276 327	/
15	69,325	505225	12,035	222 283 322	Acide ferrulique
16	69,325	505225	12,035	222 283 322	Acide caftarique
17	72,133	103137	2,457	224 273	/

## 4.2 Discussion HPLC

Tous les extraits de pépins et de pellicules de *Vitis vinifera* étudiés ont été analysés par HPLC-DAD. L'étude du profil phénolique a été réalisée à l'aide de 15 étalons phénoliques. Les résultats sont présentés dans le tableau 19, 20 et 21 sont exprimés en µg/g d'extrait. Nos résultats indiquent que 14 composés ciblés ont été identifiés dans l'extrait de pellicule, tandis que 13 ont été détectés dans l'extrait de pépins. L'épicatéchine 7-O-rutinoside était le principal composant de la peau (14,174 mg/g) et détecté en plus grande quantité que l'extrait de graines (4 103 mg/g), suivi du kaempférol 3-O-glucoside (13,739 mg/g), de l'acide trans-férulique (12,583 mg/g), de l'acide hydroxybenzoïque (8,597 mg/g), de l'épicatéchine (4,059 mg/g), de la catéchine (3 727 mg/g) et de l'isorhamnétine-3-O-di-glucoside (3,574 mg/g) tableau 2. En outre, les composés abondants trouvés dans l'extrait de graines étaient les dérivés de l'acide caféique (55 043 mg/g) et le kaempférol 3-O-glucoside (8 618 mg/g), l'acide gentisique (4 151 mg/g) et l'épicatéchine 7-O-rutinoside (4 103 mg/g).

Dans les références bibliographiques, les principaux composés phénoliques présents dans les graines sont l'acide gallique, la (+) catéchine, l'épicatéchine et les proanthocyanidines, tandis que dans la peau du raisin, nous avons trouvé de l'acide ellagique, de la myricétine, de la quercétine, du kaempférol, du trans-resvératrol et, comme dans les graines, des proanthocyanidines. (Pastrana-Bonilla et al, 2003). (Hernandez-Jimenez et al, 2009). (Huang, D et al, 2005)

Les flavonols sont une classe de composés flavonoïdes présents dans la pellicule des baies de raisin *Vitis vinifera*.

Les temps de rétention de ces polyphénols extraits concordent bien avec ceux observés dans l'échantillon standard (de référence). L'éthanol et le méthanol ont été utilisés en raison de leur forte polarité, ce qui permet de former des liaisons hydrogène avec les groupes (-OH) des polyphénols. Les polyphénols des pépins de raisin ont une absorbance maximale (280 nm).

Des observations similaires ont été enregistrées pour Samuel, T. et Welzel, A, 2006, Onyesom, I. ; Edijala, J. K. et Etoh, J. U, 2005 et Yilmaz et Toledo, 2015.

Cependant, nous constatons que les concentrations d'acide coumarique (1,107 % et 0,824 % respectivement) sont faibles dans les deux extraits.

Ces résultats ont été confirmés par de nombreux rapports mentionnant la présence de nombreux composés bioactifs (**En-Qin Xia et al, 2010** et **Guendez, R et al, 2005**).

De nombreux facteurs peuvent être responsables de cette diversification et de cette spécification, tels que : la génétique, le climat, l'altitude (**Shuts et Galpers, 2020**), la nutrition minérale, l'eau, la lumière, la température, l'attaque d'agents pathogènes, de ravageurs et d'herbivores (**Boaro et al, 2019**).

Même les molécules présentes avec des pourcentages minoritaires peuvent représenter une activité biologique significative. Selon l'étude de Zhang et al, 2011, l'acide caféique et l'acide p-coumarique ont inhibé l'oxydation des LDL et éteint les radicaux.

## **5. Evaluation de l'activité antimicrobienne**

La résistance microbienne contre les antibiotiques est un phénomène préoccupant ou les microorganismes évoluent au fil du temps et deviennent résistants aux médicaments utilisés pour les traiter. Cela a rendu la découverte de nouveaux agents antibactériens plus qu'indispensables,

L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologique inédites.

Dans ce contexte et afin de valoriser nos extraits, l'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée par la technique de diffusion sur milieu solide.

### **5.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode diffusion sur gélose**

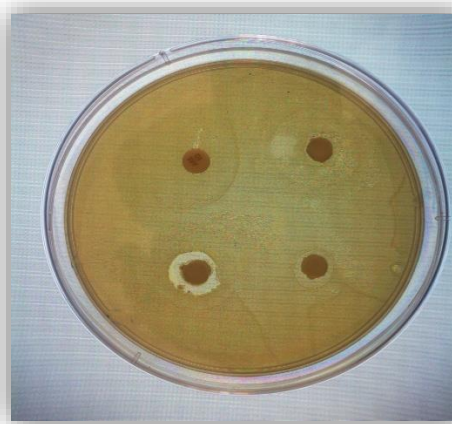
Cette technique nous permet une estimation qualitative de l'effet antibactérien des extraits en mesurant les diamètres de la zone d'inhibition, en millimètre (mm) des disques contenant un volume de 15 µl d'extrait végétal à une concentration prédéfinie (50 mg/ml)



**Figure N°65 :** Réalisation de l'antibiogramme des souches vis-vis des extraits en milieu solide(photo personnel)



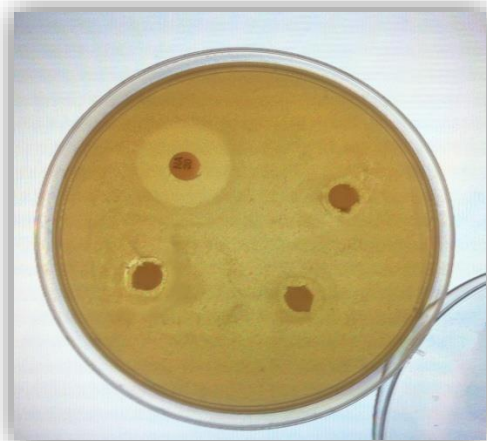
*Extrait de pépin de variété Grenache contre  
Entérocooccus faecalis*



*Extrait de pépin de variété Grenache contre  
Candida albicans*



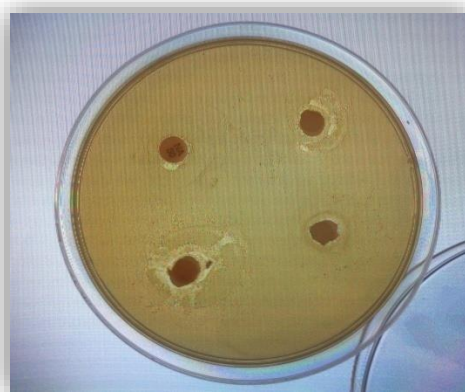
*Extrait de pépin de variété Cinsault contre  
Salmonella enterica*



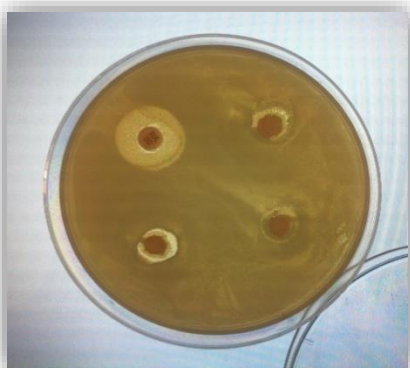
*Extrait de pulpe de variété Muscat contre  
Enterobacter cloacae*



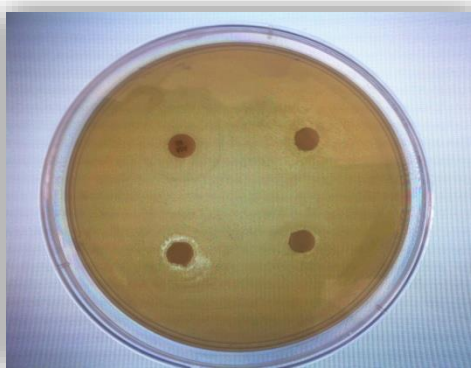
*Extrait de pellicule de variété Grenache contre  
Pseudomonas aeruginosa*



*Extrait de pulpe de variété Muscat contre  
Klebsiella pneumoniae*



*Extrait de pellicule de variété Grenache contre  
Bacillus subtilis*

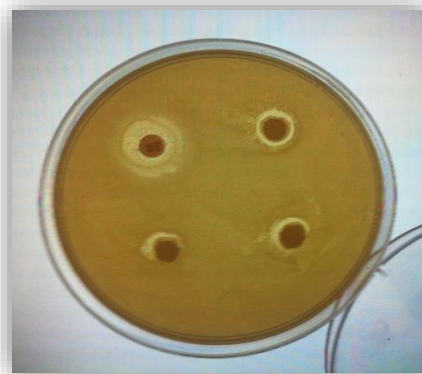


*Extrait de pulpe de Cinsault contre  
Staphylococcus aureus*





*Extrait de pépin de variété Cinsault contre Escherichia coli*



*Extrait de pellicule de variété Cinsault contre Candida albicans*



*Extrait de peau de variété Cinsault contre Bacillus subtilis*



*Extrait de pépin de variété Grenache contre Candida albicans*



*Extrait de pépin de variété Cinsault contre Entérocoque faecalis*



*Extrait de pulpe de variété Grenache contre Enterobacter cloacae*

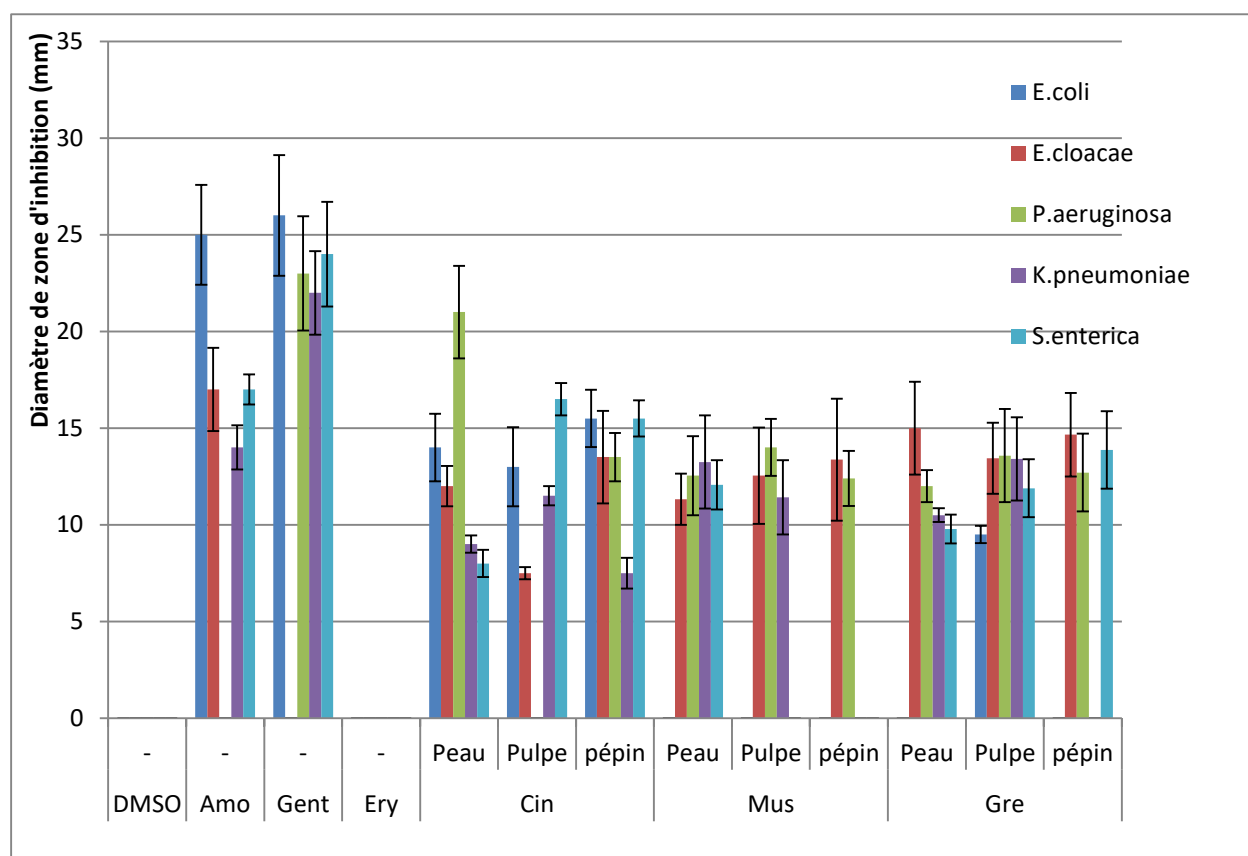


*Extrait de pépin de variété Cinsault contre Salmonella enterica*



*Extrait de pellicule de variété Grenache contre Staphylococcus aureus*

**Figure N° 66:** Quelques résultats représentant le meilleur effet antimicrobien par la méthode de contact direct en milieu solide.



**Figure N  67:** Diamètres des zones d’inhibition en mm de la croissance microbienne des bactéries Gram - obtenus par différents extraits du de fruit de *Vitis vinifera* et d’antibiotiques testés. **Cin.** :variété Cinsault.**Mus.**: variété Muscat. **Gre.** : variété Grenache. et Antibiotique testés (Amo : Amoxicilline, Gen ; gentamicine, Ery ; Erythromycine n= 3).

### 5.1.1 Les souches à Gram –

Les diamètres des zones d’inhibition des souches bactériennes étudiées obtenus avec les antibiotiques et les différents extraits sont représentés dans la figure N  67.

Les résultats de sensibilité des extraits sur les bactéries à gram négatif montrent une grande hétérogénéité du comportement des souches bactériennes qui, en effet réagissent différemment vis-à-vis des extraits testés, ce qui rend l’interprétation difficile.

le DMSO, on observe que ce dernier n’a aucun effet vis-à-vis des souches bactériennes testées.

#### 5.1.1. 1 La variété de Cinsault

Au regard de ces résultats, On constate que à l’exception de l’extrait de la pulpe tous les extraits de cette variété sont pourvu d’un effet inhibiteur vis-à-vis les cinq souches à Gram

négatif testées. Les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues par l'extrait de pellicule vis-à-vis de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, avec une zone d'inhibition moyenne de 21mm.

En revanche l'effet antibactérien le plus faible 8mm a été obtenu avec l'extrait de la pulpe sur la souche *E.cloacae*

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir antibactérien n'est pas le même, sachant que la même concentration est appliqué pour les cinq bactéries.

### 5.1.1.2 La variété de Muscat

Les extraits des différentes parties de variété Muscat ont donné des diamètres plus au moins moyennes par rapport aux antibiotiques et aux extraits de la variété Cinsault.

La souche *Escherichia coli* a prouvé une résistance contre tous les extraits de cette variété. Cependant les souches *E.cloacae* et *P. aeruginosa* étaient sensibles aux trois extraits ; pellicule ; pulpe et pépin.

L'extrait de la pellicule seulement été douée d'un pouvoir anti-salmonella avec un diamètre de 12 mm, par contre les deux autres extraits n'ont aucun effet antibactérien vis-à-vis de cette espèce.

### 5.1.1.3 La variété de Grenache

Les résultats de l'effet inhibiteur des extrait phénoliques de variété la variété Grenache sont très proche, il est évident que nos souches à Gram (-) sont sensibles à ces extraits mais avec des zones d'inhibition plus faible par rapport aux antibiotiques : l'extrait de peau de cette variété adonné une zone d'inhibition de 14mm de diamètre en présence d'E coli. Tandis qu'à la présence de l'antibiotique, un diamètre de 18 mm a été enregistré.

Il est important de signaler qu'aucune activité n'a été observée en présence d'*Escherichia coli* avec les extraits de pellicule et de pépin de cette variété.

La faible activité de certains extraits peut être expliquée soit par l'absence des molécules fortement antimicrobiennes, soit par leur faible capacité de se diffuser de manière uniforme à travers l'agar (Rauha et al, 2000),

Rotava et al, 2009, ont montré que les composés phénolique de l'extrait de pépins de raisin (*Vitis vinifera*) a inhibé la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, alors qu'ils n'ont montré aucun effet sur *Salmonella sp.*



La zone d'inhibition augmente considérablement avec la concentration des extraits, ce qui a été constaté aussi par Dordevic et ses collaborateurs, 2007.

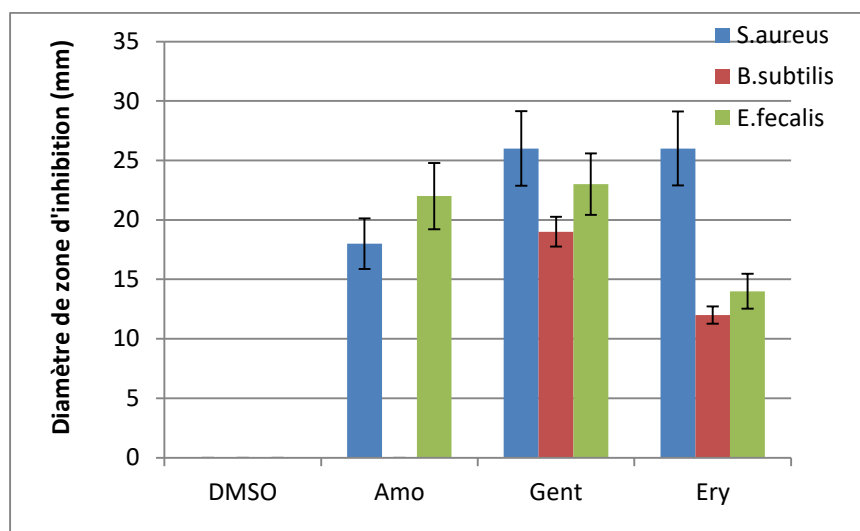
Les tests de corrélation entre la teneur des polyphénols et l'effet antibactérien ont été également étudiés pour chercher s'il y a une relation entre l'effet antimicrobien et la composition phénoliques des différentes parties du fruit étudié. Avec une corrélation de ( $R^2=0.804$ ) entre la concentration des flavonoïdes et la sensibilité des souches à gram négatif, nous pouvons confirmer que ces molécules sont responsable de inhibition. Proposition confirmé par beaucoup de travaux parmi eux nous pouvons citer Anastasiadi *et al*, 2009, qui ont confirmés que la concentration élevé en flavonoïds dans les pépin et pellicules des raisins noirs sont responsable de cette activité antimicrobienne.

A partir de ces résultats, on peut déduire et confirmer le pouvoir antibactérien des polyphénols de fruit *Vitis vinifera*, dont les extraits de la variété Cinsault sont plus puissants par rapport aux extraits des variétés muscat et Grenache.

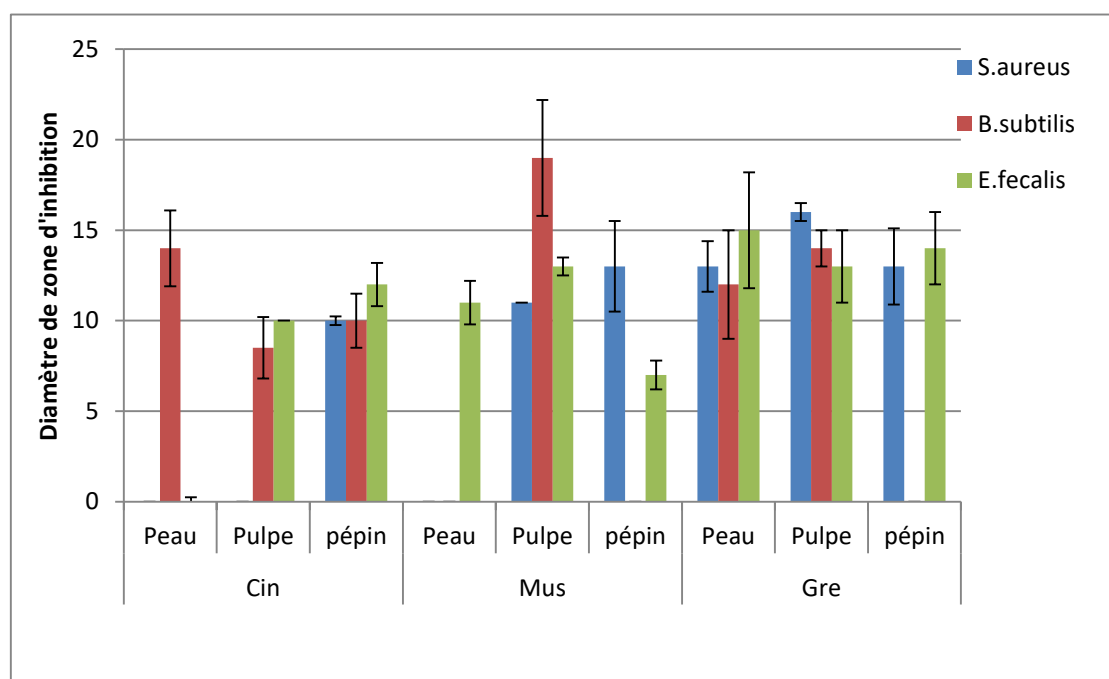
Certains souche à gram négatif son moins sensible aux extraits végétaux, comme E coli contre l'extrait de pépin de variété grenache. Cette grande résistance peut etre expliquée par la complexité de leur paroi cellulaire qui contient une double membrane. **(Burt, 2004).**

### 5.1.2 Souches à Gram +

Les diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes étudiées obtenus avec les antibiotiques et les différents extraits sont représentés dans la figure N° 68.



**Figure 68:** Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance microbienne des bactéries Gram + obtenus par les antibiotiques testés.  
(Amo : Amoxicilline, Gen ; gentamicine, Ery ; Erythromycine n= 3).



**Figure 69:** Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance microbienne des bactéries Gram + obtenus par différents extraits du de fruit de *Vitis vinifera*.  
**Cin.** : variété Cinsault. **Mus.**: variété Muscat. **Gre.** : variété Grenache. (n= 3).

#### 5.1.2.1. La variété de Cinsault

Une valeur maximale a été notée en présence de l'extrait de peau de la variété Cinsault (17,5mm) avec la souche *Bacillus subtilis*.

La souche *E.faecalis* est sensible seulement à l'extrait de pépin de cette variété avec une zone d'inhibition de 13mm, on peut conclure que les extraits de différentes parties de la même variété n'ont pas la même composition en différents types phénoliques.

#### 5.1.2.2. La variété de Muscat

En comparant avec les résultats des antibiotiques, l'extrait de pulpe de la variété Muscat présente un effet marquant avec une zone d'inhibition de 14,5 mm contre *Bacillus subtilis*.

Cependant, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* sont résistantes vis-à-vis de l'extrait de la pellicule, même l'extrait de la partie pépin n'a aucune action contre *Entérocooccus faecalis* et *Bacillus subtilis*.

#### 5.1.2.3. La variété de Grenache

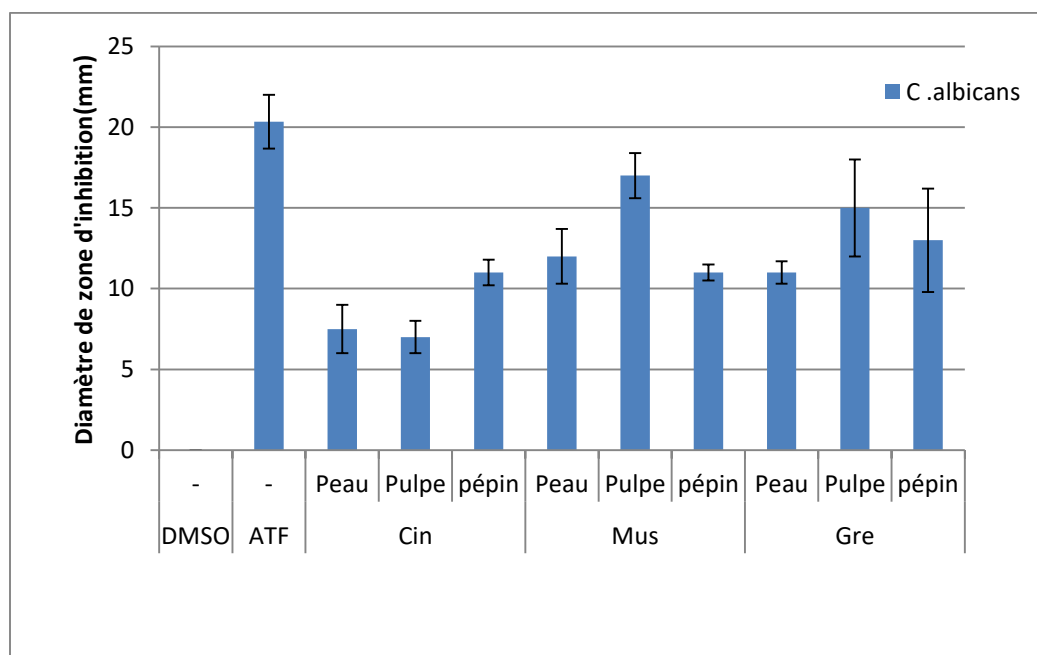
On remarque que les extraits de la variété Grenache sont douées de propriétés antimicrobiennes très appréciés avec des diamètres entre  $12\pm 0.45\text{mm}$  et  $16\pm 1.2\text{mm}$  de zone d'inhibition contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* respectivement.

Tandis que l'extrait de pépin ne montre aucune activité contre *Bacillus subtilis*.

Cela peut être expliqué par les conditions optimales d'extraction pour cette partie ou nous avons trouvé que la température optimale dans cette partie été 45°C, une température affectant certains type de flavonoïdes dites thermosensible.

### 5.1.3 *Candida albicans*

Les résultats du screening antimicrobien des extraits sur *Candida albicans* sont représentés dans les figures 70.



**Figure 70:** Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance microbienne de *Candida albicans* obtenus par différents extraits du de fruit de *Vitis vinifera* testés.  
**Cin.** : variété Cinsault. **Mus.**: variété Muscat. **Gre.** : variété Grenache.

On remarque que tous les extraits se sont révélés actifs en présence de la souche *Candida albicans* avec un degré différent, lié au contenu des extraits et aux substances à activité antifongique. Avec des valeurs comprises entre 10 -18 mm. La plus forte activité a été obtenue avec l'extrait de pépin de la variété Cinsault.

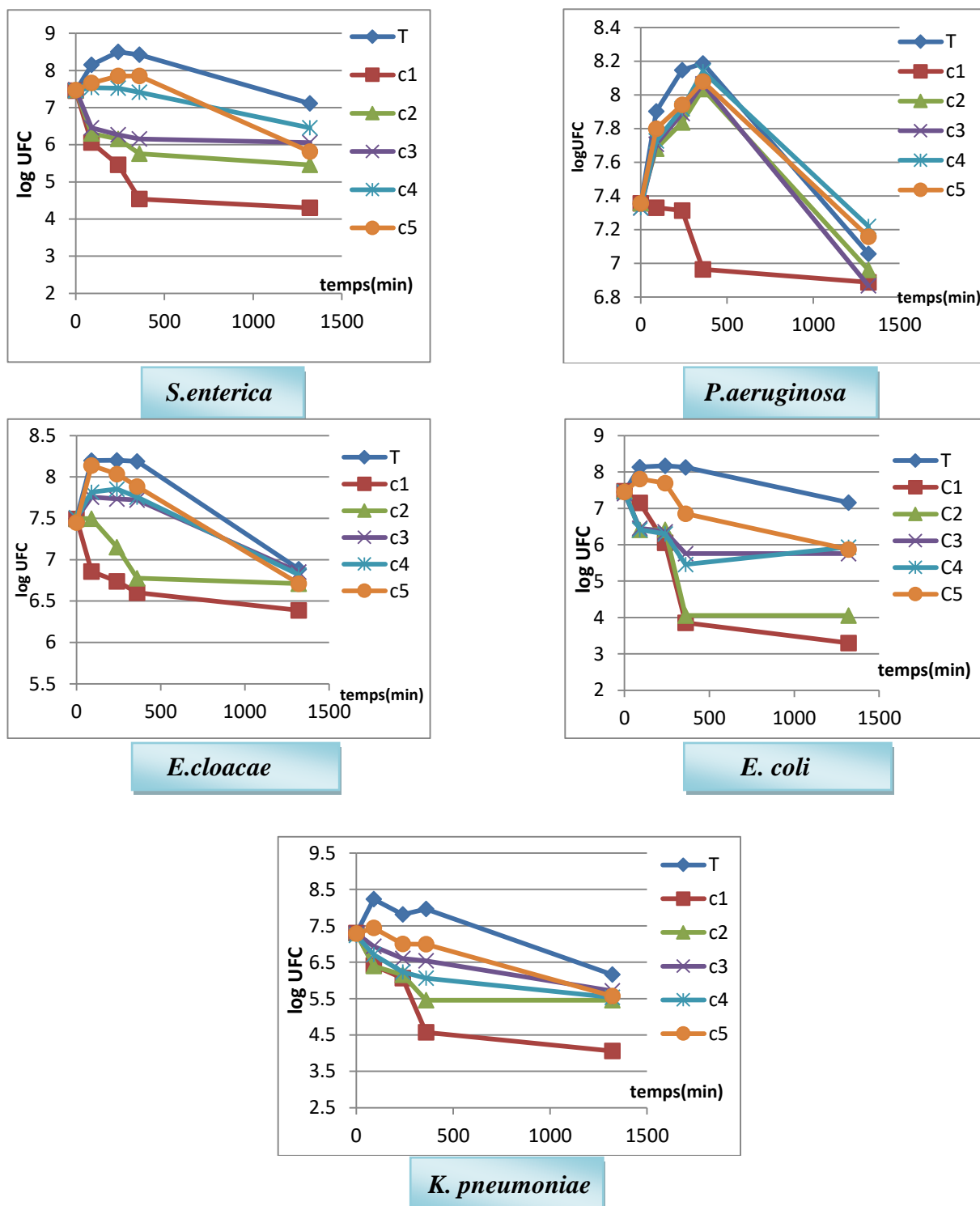
On constate une activité presque similaire pour la partie peau des trois variétés.

## 5.2 Résultats de l'étude de la cinétique de croissance microbienne

On a suivi la croissance des différentes souches microbiennes en mesurant l'évolution de l'absorbance à 620 nm à 0min, 90min, 240min, 360, et 1320min d'incubation à 37°C.

## 5.2.1 L'influence de l'extrait de peau de variété cinsault sur la croissance microbienne

### 5.2.1.1 Les bactéries à Gram négatif

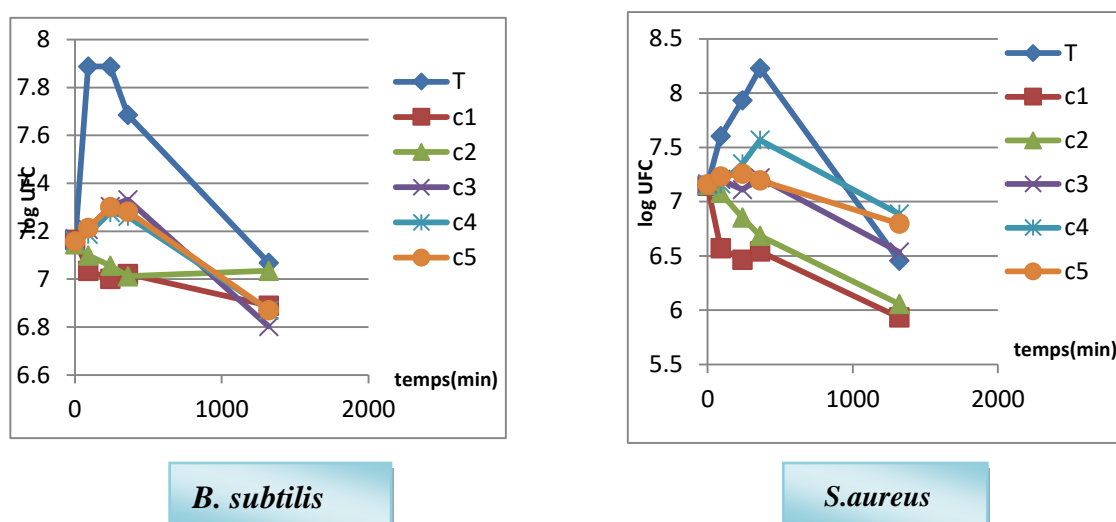


**Figure 71:** Effet de l'extrait de pellicule de la variété Cinsault sur la croissance des bactéries à Gram (-). C1;250 µg/ml, C2;125 µg/ml, C3;62.5 µg/ml, C4;31.25 µg/ml, C5;15.62 µg/ml

L'extrait phénolique de pellicule de variété Cinsault donne une activité remarquable contre *K.pneumoneae*, la concentration C<sub>4</sub> (31,25 µg/ml) inhibe la croissance microbienne par rapport au témoin qui évolue au cours du temps

La souche *Salmonella enterica* représente une forte sensibilité à une concentration qui égale C<sub>3</sub>= 62,5 µg/ml, une action bactéricide est notée pour la même souche à une concentration C<sub>1</sub>=250 µg/ml.

### 5.2.1.2 Les bactéries à Gram positif



**Figure 72 :** Effet de l'extrait de peau de la variété Cinsault sur la croissance de bactéries à Gram(+), C<sub>1</sub>;250 µg/ml, C<sub>2</sub>;125 µg/ml, C<sub>3</sub>;62.5 µg/ml, C<sub>4</sub>;31.25 µg/ml, C<sub>5</sub>;15.62 µg/ml

Les résultats représentent une sensibilité variable d'un germe à l'autre devant les différentes doses de l'extrait de la pellicule de variété de Cinsault.

En comparant avec l'évolution de la croissance de témoin, nos extraits ont données des résultats remarquables avec les bactéries étudiées.

A une dose de C<sub>2</sub>=125 µg/ml, les deux souches à Gram(+): *Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 représente une sensibilité à l'extrait de pellicule de variété Cinsault, la même concentration montre un effet bactéricide pour *Staphylococcus aureus*, tandis que *Bacillus subtilis* a subi une action bactéricide avec une concentration égale à 250 µg/ml.

### 5.2.1.3 *Candida albicans*

Malgré le comportement inhibiteur de l'extrait de pellicule de la variété Cinsault sur milieu solide, nous n'avons enregistré aucune inhibition dans le milieu liquide en présence de la souche *Candida albicans*.

**Papadopoulou et al. 2005** ont démontré que *Candida albicans* était moins sensible par rapport à *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et les mêmes résultats ont été obtenus par **Radovanovic et al. 2009**.

Nous pouvons proposer quelques points de vue qui peut être des perspectives pour des travaux similaires :

-la composition de milieu de culture liquide peut influe sur certain type de polyphénols, notamment les tanins totaux (phénomène de tannage), Certain nombre d'études ont rapportés les propriétés antimicrobiennes des tanins (**Scalbert, 1991**), ils peuvent constituer un complexe avec les protéines par des liaisons d'hydrogène ou d'hydrophobe (**Hshem et El-Kiey, 1982**)

-l'action résistante contre les extrait sera mieux dans le milieu liquide, ce qui facilite l'intervention des enzymes microbienne à réagir rapidement.

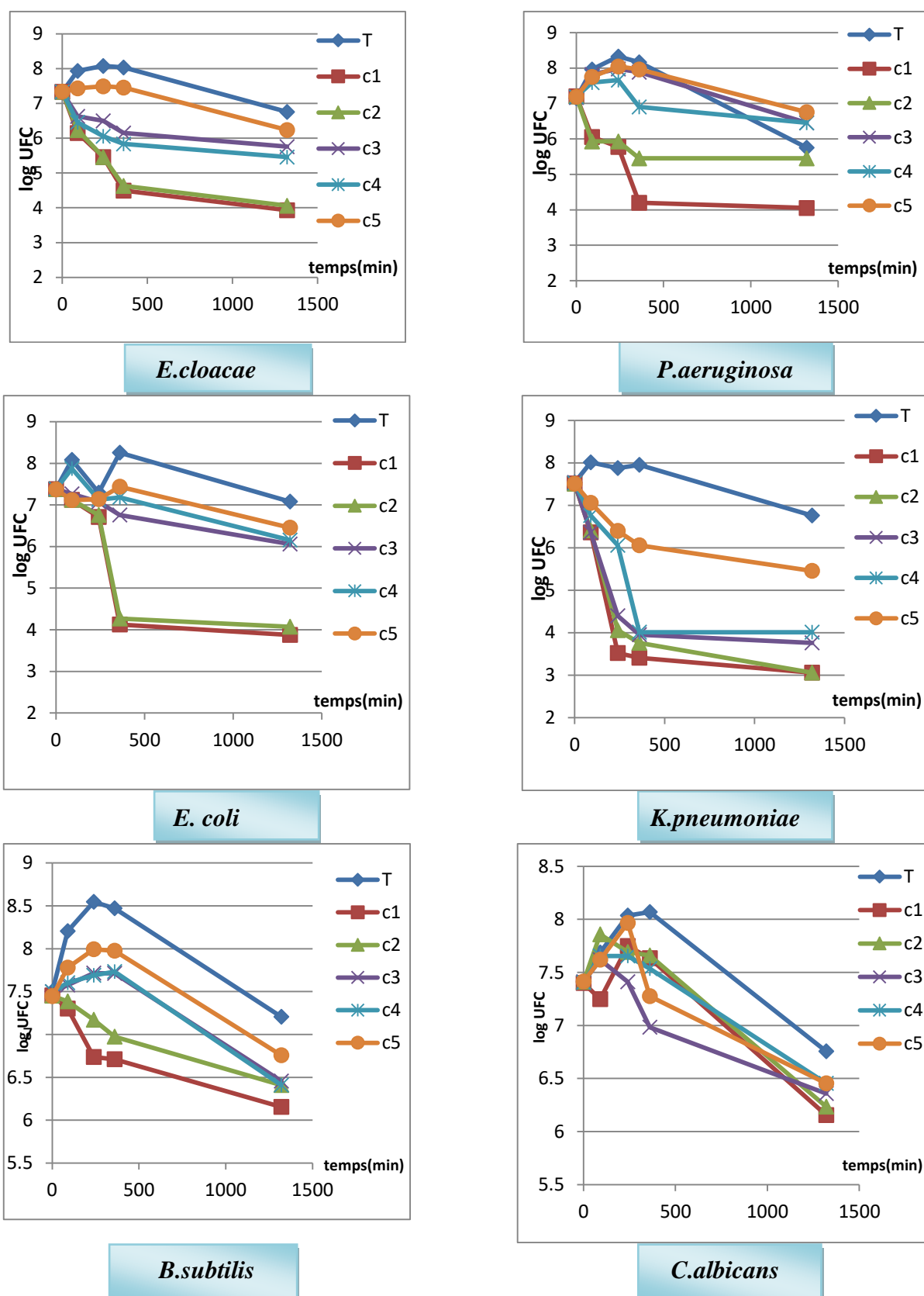
-Leur mode d'action peut être liés à leur capacité d'empêcher l'adhésion microbienne, inactiver les enzymes et les protéines transporteurs de la membrane cellulaire (**Salman et al, 2002**)

### 5.2.1.2 L'influence de l'extrait de pulpe de variété cinsault sur la croissance microbienne

Les résultats de la partie pulpe révèlent une inhibition très marquante contre les souches à Gram-, avec une CMI=7.81µg/ml en présence de *Klebsiella pneumonea*. et une CMI=15.62µg/ml vis-à-vis *Enterobacter cloacae*.

Les résultats de l'effet bactéricide sur milieu gélosé à montré une sensibilité sélective pour les souches à Gram- : une concentration de 7.81µg/ml à été enregistrée en présence de *Klebsiella pneumonea*.

Tandis que pour les souches à Gram+, on constaté l'effet bactériostatique de cette extrait qu'avec *Bacillus subtilis*, avec une CMI=31.25µg/ml.

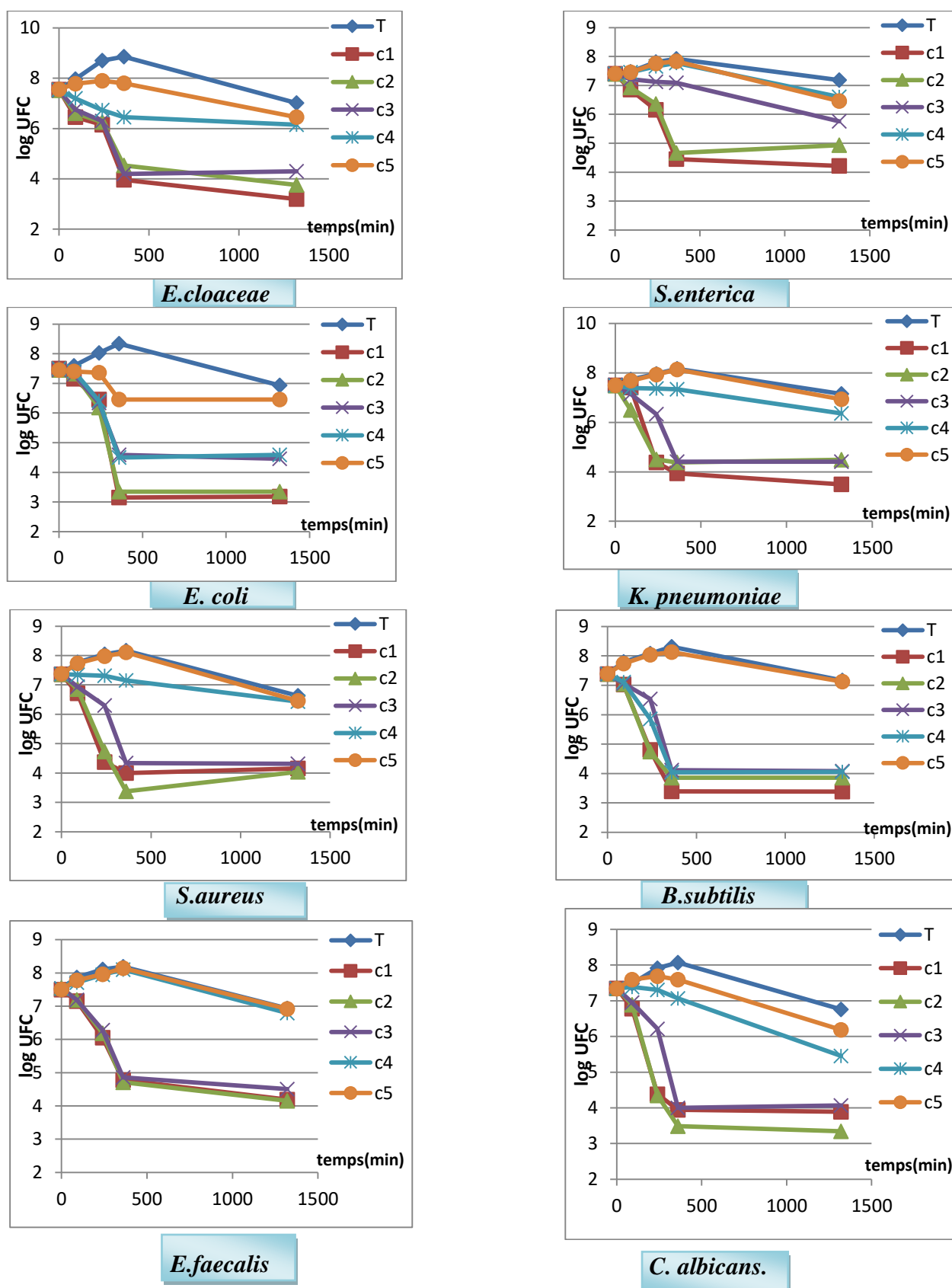


**Figure 73:** Effet de l'extrait de pulpe de la variété Cinsault sur la croissance des germes les plus sensibles.

C1 : 125 µg/ml C2; 62.5 µg/ml, C3; 31.25 µg/ml, C4; 15.62 µg/ml, C5; 7.81 µg/ml



## 5.2.1.3 L'influence de l'extrait de pépin de variété cinsault sur la croissance microbienne



**Figure 74:** Effet de l'extrait de pépin de variété Cinsault sur la croissance des germes les plus sensibles C1 : 125  $\mu\text{g/ml}$  C2; 62.5  $\mu\text{g/ml}$ , C3; 31.25  $\mu\text{g/ml}$ , C4; 15.62  $\mu\text{g/ml}$ , C5; 7.81  $\mu\text{g/ml}$

On note qu'il y a une forte sensibilité enregistrée de la part d'*Escherichia coli* ATCC 25922, avec toutes les doses testées et les doses C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, et C<sub>3</sub>(125 µg/ml, 62.5 µg/ml, et 31,25 µg/ml), ses concentrations sont les plus efficaces pour les souches Gram +, des résultats légèrement proche de celle-ci à été enregistré chez Jayaprakasha *et al.*(2003) qui ont montré que les extraits phénoliques de pépins de raisin ont inhibé la croissance des bactéries Gram- à 340-390 mg GAE / L et des Gram+ à 475-575 mg GAE / L, respectivement. et concernant cette partie de la variété Cinsault, Huang, D et al, (2005) à trouvé que la partie pépin est très riche en acide Protocatéchique, ce polyphénol qui provoque, d'après Rodriguez *et al*, 2008 l'inhibition de la croissance d'*Escherichia coli* à une CMI égale à 50 µg/ml.

Selon Aliagiannis et ses collaborateurs (2001), l'extrait phénolique de pépin de variété Cinsault sera classé comme un extrait végétal qui montre une forte inhibition avec toutes les souches analysées.

## 5.2.2 L'influence de l'extrait de peau de la variété Muscat sur la croissance microbienne

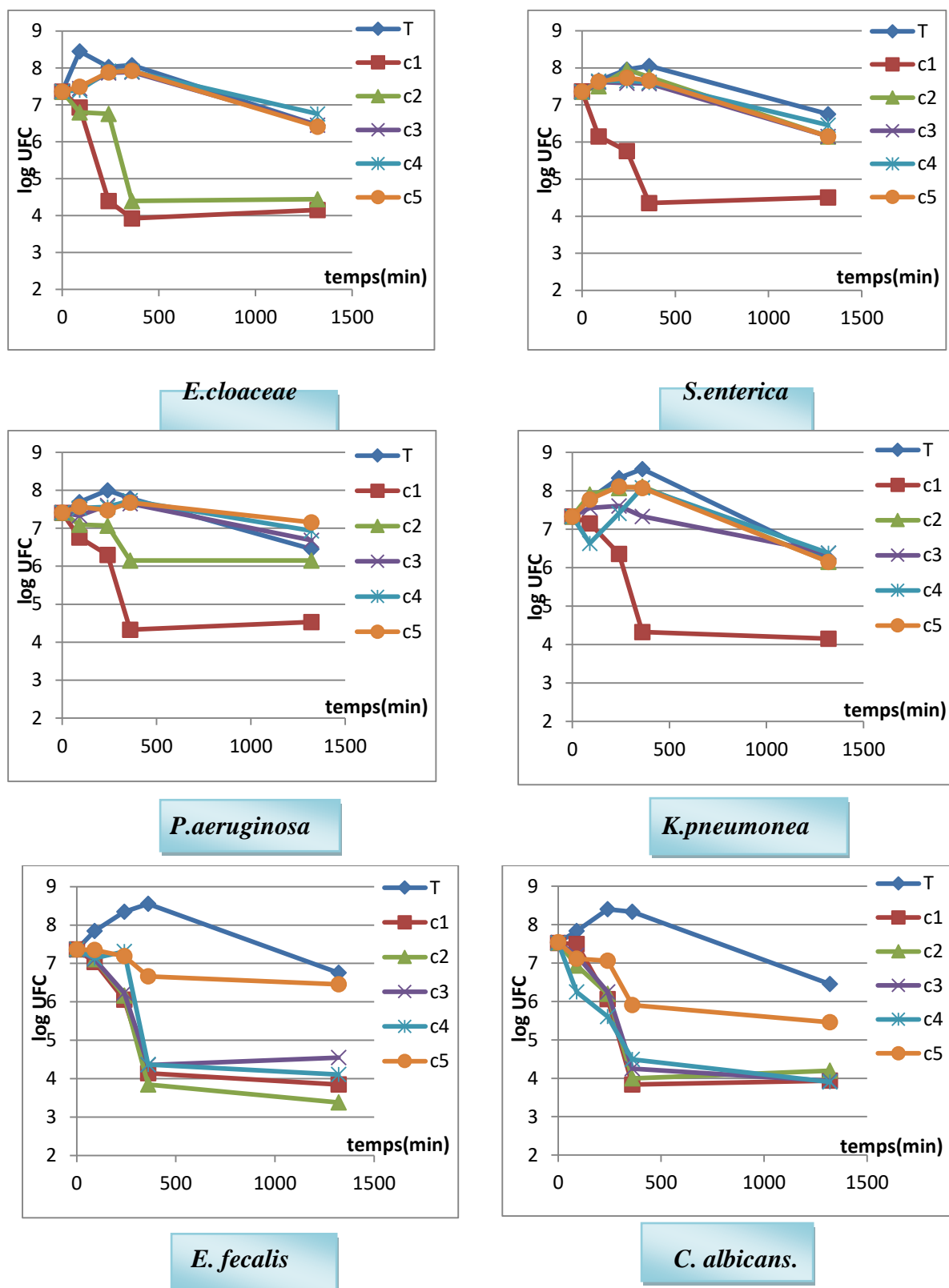
### 5.2.2.1 L'influence de l'extrait de peau

D'après les résultats de notre étude, l'extrait de pellicule de la variété Muscat a une activité inhibitrice et bactéricide sur la croissance des bactéries à gram positif et a gram négatif par rapport au témoin.

La figure 65 nous montre l'effet inhibiteur de cette pour la plus part des souches testées.

Pour les souches à Gram(-), l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est inhibée à des CMI les plus faible C<sub>2</sub> (62.5 µg/ml), qui nous informe donc sur la forte sensibilité de cette souche vis-à-vis des polyphénols de la partie externe de *Vitis vinifera* variété Muscat.

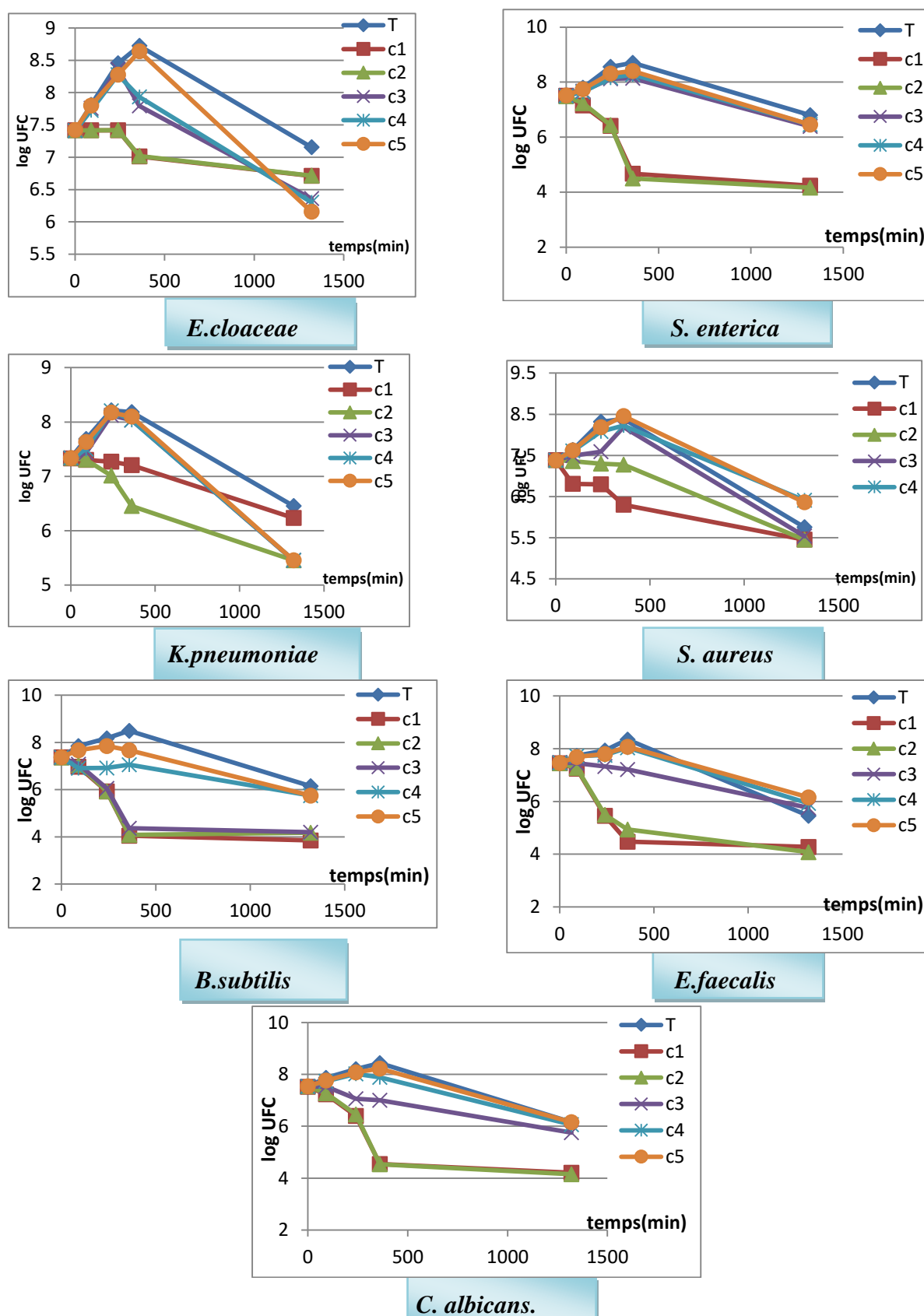
L'efficacité de cet extrait était évidente avec *Candidas albicans* isolée à partir de laboratoire d'analyses médicales Hôpital de Mascara, avec une CMI=7.81 µg/ml



**Figure 75:** Effet de l'extrait de peau de variété Muscat sur la croissance des germes les plus sensibles

C1; 62.5 µg/ml, C2; 31.25 µg/ml, C3; 15.62 µg/ml, C4; 7.81 µg/ml, C5; 3.90 µg/ml

## 5.2.2.2 L'influence de l'extrait de pulpe de variété Muscat



**Figure 76:** Effet de l'extrait de pulpe de variété Muscat sur la croissance des germes les plus sensibles, C1; 62.5 µg/ml, C2; 31.25 µg/ml, C3; 15.62 µg/ml, C4; 7.81 µg/ml, C5; 3.90 µg/ml

Selon les figures 76, on remarque une diminution de la croissance microbienne de certaines souches sous l'effet de l'extrait de pulpe de la variété Muscat.

Nous notons une CMI minimale chez *Entérocooccus faecalis* ATCC 29212, (31.25µg/ml) avec un effet bactéricide et *Candida albicans* avec la même CMI

Cet extrait n'a pas d'effet bactéricide contre *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella pneumoniae*, et *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

On remarque donc qu'il n'y a pas une sélectivité inhibitrice de cet extrait entre les souches à Gram(-) et Gram(+)

Certaines études ne révèlent aucune activité antimicrobienne sélective vis-à-vis les bactéries Gram (+) ou Gram (-) (Guesmi et Boudabous, 2006).

### 5.2.2.3 L'influence de l'extrait de pépin de variété Muscat

Nous constatons que l'extrait de pépin de variété Muscat est pourvu d'un effet inhibiteur très important en présence de *Staphylococcus aureus*, qui a présenté un effet bactéricide (CMB/CMI=2)

Pour les souches à Gram(-), malgré la faible CMI signalé pour les deux espèces : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 (15,62 µg/ml et 31,25 µg/ml respectivement) mais on a signalé aucun effet bactéricide avec toutes les doses phénoliques de l'extrait de la partie pépin de la variété Muscat.

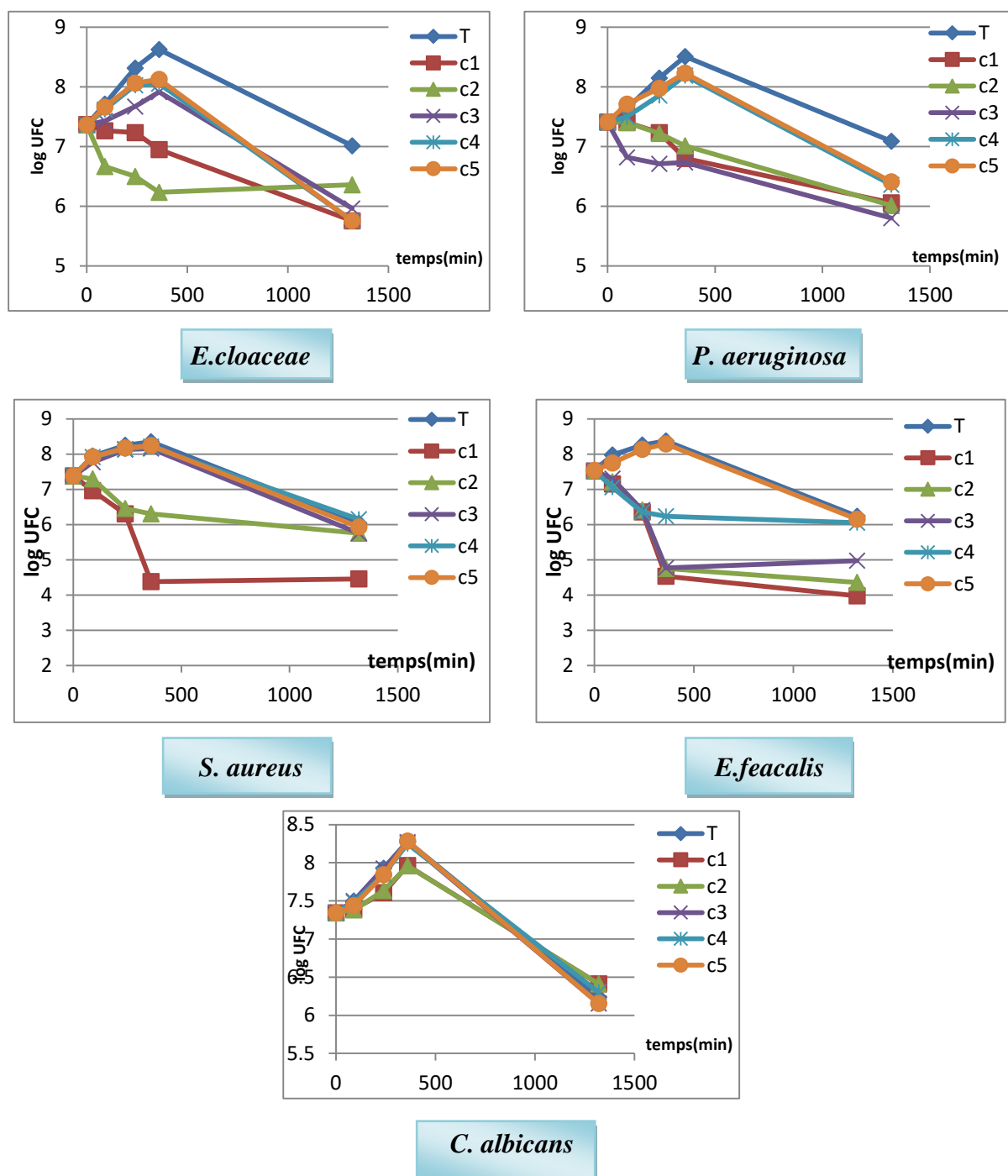
Il ne faut pas oublier que le produit actif qui se présente dans la plante peut être : soit actif sans être métabolisé et aura ainsi une activité *in vitro* et *in vivo* ; soit actif après métabolisation et dans ce cas il sera inactif *in vitro* et actif *in vivo*.

On remarque que *Candida albicans* a été développé d'une façon ordinaire malgré la présence de l'extrait à des concentrations différentes.

Il a été rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne semblent vraisemblablement être les diterpénoïdes phénoliques, qui sont les composés principaux de la fraction apolaire des extraits des plantes (Fernandez-Lopez et al, 2005)

Ceci pourrait expliquer la modeste activité de nos extraits polaires.

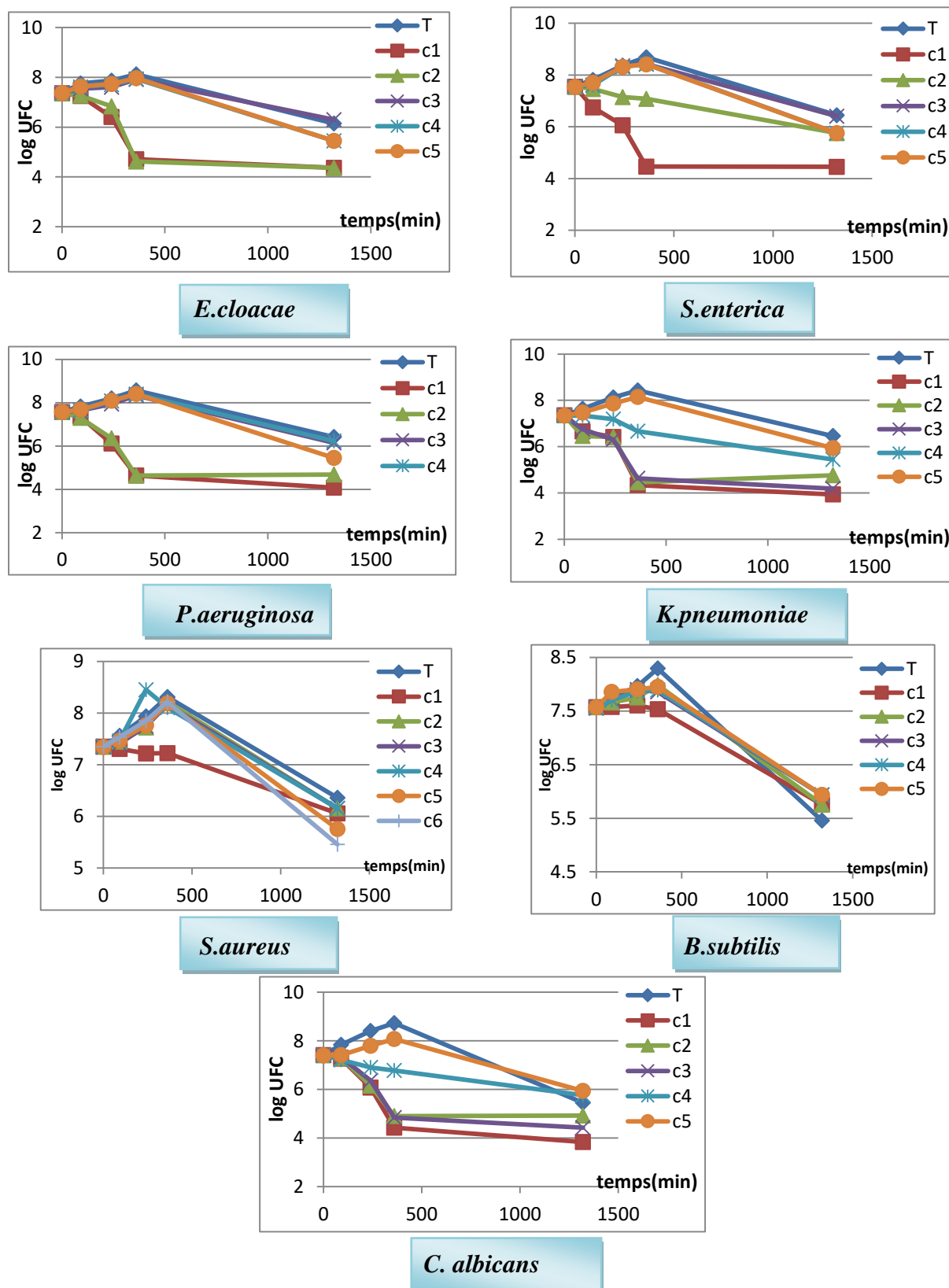
Néanmoins, il est toujours possible que l'ajout de DMSO à un extrait végétal diminue son activité intrinsèque de telle manière que dans ce cas le résultat n'a qu'une valeur relative (Balansard, 2007).



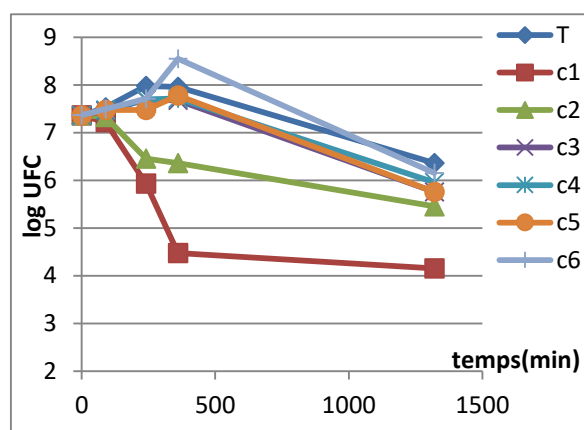
**Figure 77:** Effet de l'extrait de pépin de variété Muscat sur la croissance de souches les plus sensibles, C1; 62.5 µg/ml, C2; 31.25 µg/ml, C3; 15.62 µg/ml, C4; 7.81 µg/ml, C5; 3.90 µg/ml

### 5.2.3 L'influence de l'extrait de variété Grenache sur la croissance microbienne

#### 5.2.3.1 L'influence de l'extrait de peau



**Figure 78:** Effet de l'extrait de peau de variété Grenache sur la croissance des souches Gram – et Gram + les plus sensibles. C1; 125 µg/ml, C2; 62.5 µg/ml, C3; 31.25 µg/ml, C4; 15.62 µg/ml, C5; 7.81 µg/ml

*Candida albicans.**C. albicans.*

**Figure 79 :** Effet de l'extrait de peau de variété Grenache sur la croissance de *Candida albicans*. C1; 125  $\mu\text{g/ml}$ , C2; 62.5  $\mu\text{g/ml}$ , C3; 31.25  $\mu\text{g/ml}$ , C4; 15.62  $\mu\text{g/ml}$ , C5; 7.81  $\mu\text{g/ml}$

L'extrait de pellicule de variété Grenache a donné des résultats plus au moins importantes vis-à-vis les souches à Gram(-)

Cet extrait est douée d'un pouvoir antibactérien marquant (CMI=15.62 $\mu\text{g/ml}$ ) en présence d'*Entérocooccus faecalis* ATCC 29212. Le même résultat était signalé pour la souche *Klebsiella pneumoniae*.

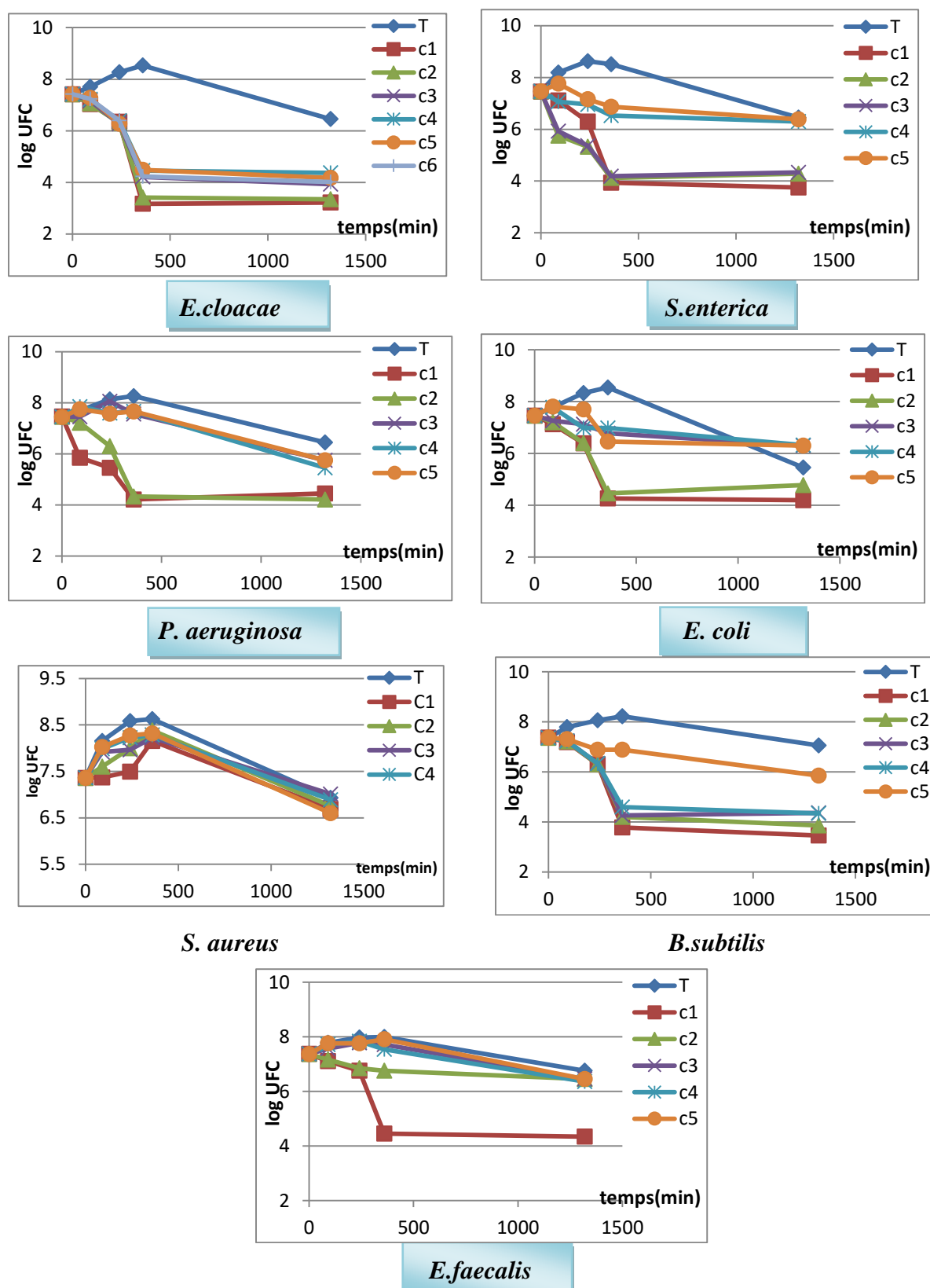
En comparant les résultats entre les Gram(-) et Gram(+), on remarque que les premiers sont plus sensible par la faible CMI et l'effet bactéricide de l'extrait.

La souche *Bacillus subtilis* ATCC 6633, a une forte résistance à cet extrait, l'évolution de la courbe de croissance a été influencée par la présence de l'extrait à différentes doses en comparant avec le témoin, mais cette différence n'atteindre pas une inhibition significative.

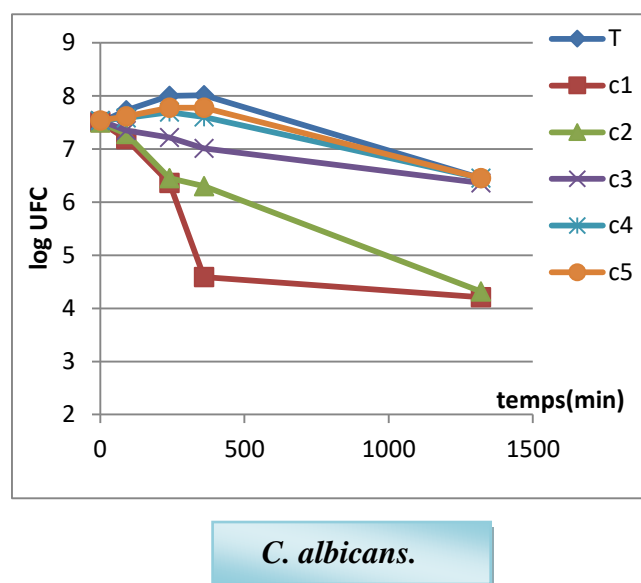
Un effet bactéricide est signalé en présence de *Candidas albicans* à une CMI=125  $\mu\text{g/ml}$  et une CMB=250  $\mu\text{g/ml}$ .



## 5.2.3.2 L'influence de l'extrait de pulpe de variété Grenache



**Figure 80:** Effet de l'extrait de pulpe de variété Grenache sur la croissance des bactéries à Gram(-) et Gram (+), C1; 125 µg/ml, C2; 62.5 µg/ml, C3; 31.25 µg/ml, C4; 15.62 µg/ml, C5; 7.81 µg/ml

➤ *Candida albicans*.

**Figure 81 :** Effet de l'extrait de pulpe de variété Grenache sur la croissance de *Candida albicans*. C1; 125 µg/ml, C2; 62.5 µg/ml, C3; 31.25 µg/ml, C4; 15.62 µg/ml, C5; 7.81 µg/ml

La souche *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 montre une sensibilité très importante exprimée par une CMI la plus faible 3.90µg/ml

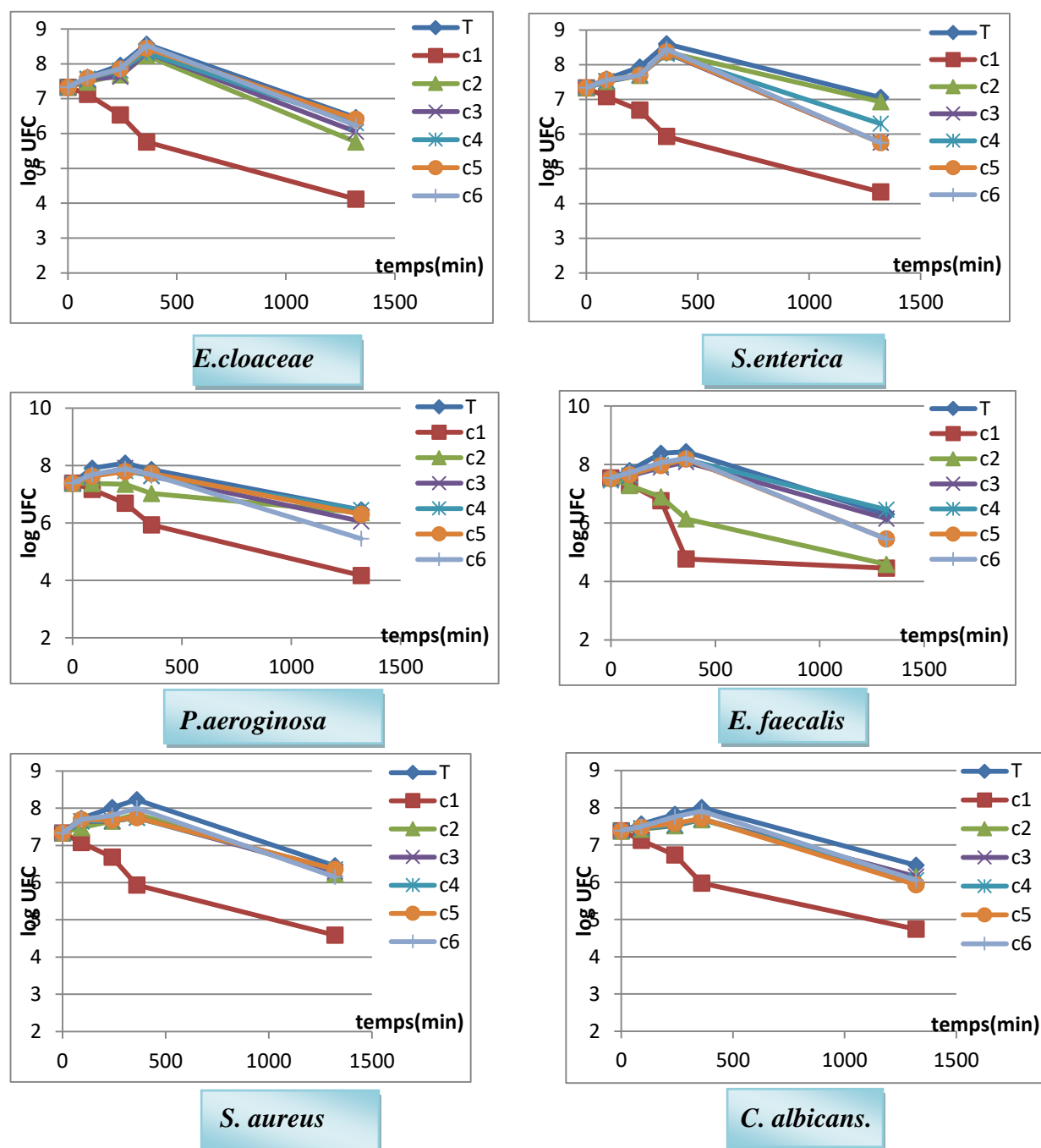
Et pour les souches à Gram(+), l'inhibition de la croissance de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, à une dose de C<sub>5</sub>=7.81 µg/ml été le résultat la plus remarquable.

D'après la figure 81, l'effet inhibiteur de cet extrait est très marqué dans les premiers deux heures de l'incubation de *Candida albicans*. (CMI=15.62 µg/ml et CMB=31.25 µg/ml)

La souche *Staphylococcus aureus* a présenté une résistance remarquable vis-à-vis de cet extrait en milieu liquide.

### 5.2.3.3 L'influence de l'extrait de pépin de variété Grenache

Globalement on constate que l'extrait de pépin de variété Grenache inhibe les souches testées avec à des doses nettement supérieures aux doses inhibitrices des deux autres variétés.



**Figure 82 :** Effet de l'extrait de pépin de la variété Grenache sur la croissance des souches les plus sensibles, C1; 250 µg/ml, C2; 125 µg/ml, C3; 62.5 µg/ml, C4; 31.25 µg/ml, C5; 15.62 µg/ml, C6; 7.81 µg/ml

### 5.3 Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits en milieu liquide

#### 5.3.1 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB).

##### 5.3.1.1. Les souches Gram -

Nous rapportons dans le tableau ci-dessous (Tableau 22) les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de nos extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide, qui sont obtenues par micro-méthode de contact direct en milieu liquide en utilisant une microplaque de 96 puits (Elof J. N. 1998, Türk A. Ö. et al, 2003).

**Tableau 22 :** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB), exprimées en µg/ml, des extraits les plus actifs vis-à-vis des bactéries Gram – testées. (/) ; absence d'activité.

		<i>P.aeruginosa</i>		<i>E.cloacae</i>		<i>S.enterica</i>		<i>E.coli</i>		<i>K.pneumoneae</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Cin.	Peau	250	/	125	/	62.5	500	15.62	31.25	31.25	250
	Pulpe	31,25	62.5	15.62	31.25	/	/	31.25	31.25	3.90	7.81
	pépin	/	/	31.25	125	125	125	15.62	31.25	31.25	125
Mus.	Peau	62.50	125	62.50	62.5	125	125	/	/	125	125
	Pulpe	/	/	31.25	/	62.5	62.5	/	/	62.5	/
	pépin	15.62	/	31.25	/	/	/	/	/	/	/
Gre.	Peau	62.5	31.25	62.50	62.5	62.5	125	/	/	15.62	31.25
	Pulpe	31.25	31.25	/	/	7.81	31.25	15.62	31.25	/	/
	pépin	125	250	125	250	250	>250	/	/	/	/

Aligiannis et ses collaborateurs (2001) ont proposés une classification des extraits du matériel végétal sur la base des résultats des CMI, comme suit :

- forte inhibition : CMI inférieure à 500 µg/ml ;
- inhibition modérée : CMI varie de 600 µg/ml à 1 500 µg/ml ;
- faible inhibition : CMI supérieure à 1 600 µg/ml.

Ainsi, selon cette classification, on constate une très forte inhibition avec presque tous nos extraits.

Nous remarquons surtout la grande sensibilité de la souche référenciée *S.enterica* avec une CMI de 7.812 µg/ml et CMB de 32.25 µg/ml

La souche d'*E.coli* se révèle la plus résistante, cela est liée à sa grande capacité de développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, d'où son implication fréquente dans les infections hospitalières (Mann et al, 2000).

Vaquero et al, 2010, ont confirmé l'effet inhibiteur de l'extrait flavonoïque de pellicule de quelques variétés de raisin *Vitis vinifera* contre *Escherichia coli*, ce qui est en accord avec nos résultats. ces extrait ont inhibés sa croissance à des CMI= 50µg/ml

Nos résultats de screening phytochimique et analyse HPLC montre la richesse des pellicules de raisin noir en flavonoïdes surtout la resveratrol (stilbène) et la quercitrine (flavanol). Résultat confirmé par Pastrana-Bonilla et al, 2003, et Hernandez-Jimenez et al, 2009, avec une CMI=CMI=500 µg/ml contre *Bacillus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio*, et *E. coli* sp (Naz et al, 2007)

### 5.3.1.2 Souches à Gram +

Les résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de nos extraits vis-à-vis des souches Gram + sont résumées dans le tableau 16.

**Tableau 23 :** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB), exprimées en µg/ml, des extraits les plus actifs vis-à-vis des bactéries Gram + testées. (/) : absence d'activité.

		<i>S.aureus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>E.faecalis</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Cin.	Peau	125	125	250	250	/	/
	Pulpe	/	/	62.5	/	/	/
	pépin	31.25	62.5	31.25	31.25	62.5	62.5
Mus.	Peau	/	/	/	/	15.62	31.25
	Pulpe	62.5	/	7.81	7.81	31.25	62.5
	pépin	31.25	62.5	/	/	15.62	31.25
Gre.	Peau	250	/	/	/	15.62	31.25
	Pulpe	125	/	15.62	31.25	31.25	62.5
	pépin	250	250	N.D	N.D	250	250

Les résultats obtenus par microdilution en milieu liquide ont confirmé ceux en milieu solide, une forte activité antimicrobienne a été enregistré avec la souche *Bacillus subtilis* ATCC 6633 vis-à-vis de l'extrait de pulpe de la variété muscat, la concentration minimale inhibitrice est égale à 7.81 µg/ml, avec une action bactéricide pour une dose de 15.62µg/ml.

En revanche, on remarque que l'extrait de pépin de variété Muscat est pourvu d'un effet inhibiteur très important en présence de *Staphylococcus aureus*, qui a présenté un effet bactéricide (CMB/ CMI=2) ce qu'est en accord avec les résultats de l'effet antimicrobien en milieu solide.

Cet extrait possède aussi un effet considérable et important sur la souche *Entéroccoccus faecalis* ATCC 29212 avec une CMI=15.62µg/ml et une CMB=31,25µg /ml

#### **5.3.1.3 *Candida albicans***

Au regard des résultats résumés dans le tableau 24, globalement, on remarque que les mécanismes d'action des extrait phénoliques ; peau et pulpe de la variété Cinsault et l'extrait pépin de la variété muscat ne sont pas les mêmes en milieu solide qu'en milieu liquide, nous avons trouvé que cette souche été sensible en présence de ces extraits sur un milieu solide, tandis que la souche a une résistance contre les différentes doses en milieu liquide.

Peut-être que l' $a_w$  (activité de l'eau) a une influence négative sur l'activité des polyphénols dans l'extrait, puisque la différence majeur entre les deux milieux solide et liquide c'est la teneur en eau.

**Tableau 24 :** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB), exprimées en µg/ml, des extraits les plus actifs vis-à-vis de la souche *Candida albicans*. (/) ; absence d'activité.

		<i>C. albicans</i>	
		<i>CMI</i>	<i>CMB</i>
Cin.	Pellicule	/	/
	Pulpe	/	/
	pépin	31,25	62.5
Mus.	Pellicule	7.81	15.62
	Pulpe	31.25	62.5
	pépin	/	/
Gre.	Pellicule	125	250
	Pulpe	15.62	31.25
	pépin	250	250

**Remarque :** les valeurs de CMB sont obtenues par de la méthode de strie à partir des puits qui ne présente pas de croissance microbienne sur milieu gélosé, et après incubation de 24h à 37°C, les stries qui ne produisent aucun développement représentent donc la CMB.

## 6. Discussion générale des résultats de l'effet antimicrobien

Dans cette partie de ce travail, on a étudié les propriétés antimicrobiennes des extraits phénoliques obtenus à partir de différentes parties des variétés de raisins cultivées dans la région de Sud-est de wilaya de MASCARA et plus exactement à GHRIS et précisément dans la région d'Oulad lakhdar au mois de septembre 2018.

Nos extraits ont montré une richesse en flavonoïde, donc on peut dire que l'activité antimicrobienne de ces extraits est due, au moins partiellement, à la présence de ce type de composés chimiques actifs dans leur composition.

Plusieurs d'autres classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, flavonoïdes et les tannins servent de mécanisme de défense des plantes contre les micro-organismes, les insectes, et les herbivores pathogènes ( **Falleh et al., 2008**).

## 6.1. Partie peau

Esquenazi et *al*, 2002 ont mis en évidence un effet inhibiteur puissant de catéchine et de procyanidines de type B, (présent en forte concentration au niveau de la peau), du germe *Staphylococcus aureus*, en revanche, ces deux molécules n'avaient aucune activité vis-à-vis du *Candida albicans*, d'où l'effet antimicrobien sélectif noté par ces chercheurs, ce qui est en accord total avec nos résultats

Toutes les extraits de la partie peau des trois variétés montrent une forte activité inhibitrice contre la majorité des souches à Gram(-) : *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica*, et *Klebsiella pneumoniae*.

La souche *Escherichia coli* été sensible qu'à la présence de l'extrait de pellicule de la variété Cinsault.

Les résultats de l'identification des polyphénols par chromatographie nous a données une similarité entre les deux extraits de pellicule de la variété Cinsault et variété Muscat.

L'extrait de pellicule de la variété Grenache est très riche (de point de vue qualitative) en polyphénols, on remarque son effet inhibiteur contre les souches à Gram(+).

Selon plusieurs auteurs (Gaby, A. 2001, Lim, J. et *al*, 2003, Smith, S. et *al*, 2004), l'acide ellagique et la Resvératrol, présents dans la pellicule de variété Muscat, exercent une activité anti-cancérigène, qui peuvent altérées les protéines de structure des bactéries et affectées la fonction des pompes d'ions, Cependant, on ne sait pas si c'est le même mode d'inhibition contre les espèces étudiées, parce que selon Tsuchiya, H. et *al*, 1987, ces polyphénols sont partiellement hydrophobes. Ce qui peut leur permettre de faire des interactions avec les lipopolysaccharides de la paroi de la bactérie plus efficacement en diminuant la stabilité des membranes.

## 6.2. Partie pulpe

Les résultats concernant l'activité antimicrobienne des extraits de pulpe montrent la grande sensibilité de la souche *Enterobacter cloacae* avec une forte activité bactéricide chez la variété de Grenache (CMB=3.90µg/ml)

D'après Scalbert, 1991 le mécanisme qui est à la base de la toxicité des composés phénoliques vis-à-vis des microorganismes inclus donc l'inhibition des enzymes.

Les extraits pulpeuses des deux variétés Muscat et Grenache donnent une activité inhibitrice importante contre les souches à Gram(+)



Les raisins noirs (4.9 et 4.7 mg/100 g, Catéchine et Epicatéchine, respectivement) sont une des sources les plus riches de fruits de catéchines (Oyvind et al, 2006)

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (Falleh et al, 2008, Hayouni et al, 2007, Turkmen et al, 2007, Shan et al, 2007).

Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules.

Ces deux extraits ont la même exclusivité en termes de pouvoir bactéricide contre *Candida albicans*.

Selon En-Qin Xia et al, 2010, Les composés phénoliques dans le raisin, comme le resvératrol affiché une activité antifongique puissante contre les champignons pathogènes pour l'homme, comme par exemple *Candida albicans* à des concentrations de 10-20µg/ml. ce qui est en accord avec les résultats obtenus : 7.81µg/ml

### 6.3. Partie pépin

Les extraits de pépin des trois variétés ont montré un effet inhibiteur sélectif pour les espèces à Gram(-)

Ces extraits exercent une activité bactéricide marquante contre les souches à Gram(+)

Cette activité est peut être attribuée aux tanins localisés dans la pellicule et les pépins (HuglinP.et al, 1998).

En effet certain nombre d'études ont rapportés les propriétés antimicrobiennes des tanins (Scalbert, 1991), ils peuvent constituer un complexe avec les protéines par des liaisons d'hydrogène ou d'hydrophobe (Hshem et El-Kiey, 1982)

Leur mode d'action peut être liés à leur capacité d'empêcher l'adhésion microbienne, inactiver les enzymes et les protéines transporteurs de la membrane cellulaire (Salman et al, 2002)

Selon Sato et al, 1995, l'effet antimicrobien des flavonoïdes est peut-être dû à leurs capacités de séquestrer les substrats nécessaires à la croissance microbienne ou à la chélation de métaux tel que le fer.

D'autre part, certains auteurs ont trouvé que les flavonoïdes qui ne possédant pas d'hydroxyles sur l'anneau B sont plus actifs sur les microorganismes que ceux possédant deux hydroxyles (**Chabot et al, 1992**)

Cependant, plusieurs auteurs ont trouvé l'inverse, l'augmentation de l'hydroxylation des phénols simples conduit à une augmentation de la toxicité (**Scalbert, 1991**)

Enfin, et d'après les résultats obtenus de la partie expérimentale, nous pouvons confirmer que Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe et peut impliquer multiples modes d'actions. Parmi les hypothèses avancées, on peut citer :

1. L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiens.
2. La séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer.
3. L'inhibition de métabolisme microbien (**Milane, 2004**)
4. Dégradation de la paroi cellulaire microbienne
5. Perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une fuite de composants cellulaires.
6. L'influence de la synthèse de l'ADN et l'ARN (**Zhang et al, 2009**), des protéines, des lipides et la fonction mitochondriale (**Balentine et al, 2006**). Exemple, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont des puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase (**Ohemeng et al, 1993**).
7. Formation des complexes avec la paroi (**Gangoué piéboji, 2007**).

Ces mécanismes ne sont pas des cibles séparées, certains peuvent être comme conséquence d'un autre mécanisme. Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organisme et à l'arrangement de la membrane externe (**Shan et al, 2007**).

Nos résultats sont beaucoup plus élevés ou plus basse par rapport à des résultats des autres travaux sur cette plante, cela est dû à plusieurs raison,

- Premièrement, leurs souches sont peut-être plus résistantes que les nôtres

- Deuxièmement, au fait que les échantillons de plante (*Vitis vinifera*) utilisés sont d'origines géographiques différentes, ce qui fait intervenir le phénomène de polymorphisme chimique ;

# Conclusion Générale

Les substances appartenant au groupe des composés phénoliques, très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure, ont été pendant longtemps très mal connues, considérées comme des substances secondaires, métaboliquement inactives, elles ne suscitaient que peu d'intérêt.

A l'heure actuelle, cette opinion est en train de changer. Les recherches des dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils sont soumis, dans les tissus végétaux, à d'importantes variations quantitatives et qualitatives, témoignant ainsi d'une dynamique biochimique incontestable

Dans ce contexte, cette étude a pu démontrer l'importance de la technique d'extraction de point de vue quantitative et qualitative

Notre étude a reporté les conditions optimales de l'extraction des métabolites secondaires à partir de pellicule, pulpe et pépin de trois variétés de raisin d'espèce *Vitis vinifera* : Cinsault, muscadine noire et Grenache rouge cultivées à grande échelle dans la wilaya de MASCARA.

Les paramètres étudiés étaient : le ratio, le solvant, la température, le PH et le temps d'extraction.

Pour les neuf parties interprétées, nous avons trouvé une méthode optimale spécifique pour un meilleur rendement ainsi que meilleures activités biologiques antioxydant et antimicrobien.

L'estimation quantitative des composés phénoliques totaux des flavonoïdes totaux et des tanins dans les neuf extraits phénoliques a révélé des teneurs considérables en polyphénols avec des quantités appréciables en flavonoïdes chez la variété Cinsault et le pourcentage majoritaire est toujours pour la pellicule.

L'analyse chromatographique par HPLC des composés phénoliques est effectuée exclusivement pour les parties révélant les meilleures activités biologiques : la pellicule et les pépins de variété cinsault et la pulpe de la variété Grenache

Cette analyse nous a permis l'identification de plusieurs flavonoïdes principalement des kaempferol 3-O-glucoside, acide hydroxybenzoïque et acide caféique.

Dans la majorité des extraits étudiés, une corrélation linéaire a prouvée l'effet de concentration élevé en composés phénoliques notamment les flavonoïdes sur les activités antioxydantes: DPPH et CAT, et l'activité antimicrobienne.

L'étude de l'effet piègeur du radical DPPH révèle que les extraits de pépin représentent les extraits les plus actifs. En revanche les extraits de peau représentent les activités antiradicalaires les plus faibles.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des neuf extraits par les deux méthodes ; diffusion en milieu solide et en milieu liquide vis-à-vis de neuf souches différentes a révélé que les extraits possèdent un pouvoir antibactérien dose dépendant appréciable sur les souches Gram + et Gram- testées et même sur la levure *Candida albicans*.

En fin, d'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

1. D'après la littérature scientifique, il y a à peu près 300 types de polyphénols existant dans les différentes parties de la baie de raisin, tandis que l'analyse qualitative en utilisant la CCM et HPLC ont données que quelques familles de ses molécules, Une étude détaillée sur les fractions des extraits naturels par des méthodes plus spécifiques comme, RMN et HPLC-MS, en vue d'identifier l'espèce chimique responsable de ces activités biologiques.
2. Partant du fait qu'une substance pouvant être très active *in vitro*, peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps ; Une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue globale sur l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits testés.
3. Evaluation d'autres effets biologiques *in vitro* comme *in vivo* des extraits bruts et de leurs composés actifs en utilisant différentes techniques.
4. Durant nos recherches bibliographiques, nous avons trouvé beaucoup de difficultés bureaucratiques pour l'obtention des informations sur les variétés de raisin cultivées dans l'ouest et au niveau de la wilaya de Mascara, leurs productions annuelles ainsi que leurs distributions géographiques. Pour ces raisons, nous proposons de faire un dépistage complet qui couvre toute la wilaya pour obtenir des chiffres réels aidant les chercheurs à bien orienter leurs travaux scientifiques.

# Références Bibliographiques

- AARN. Algerian Antimicrobial Resistance Network (2008) ;** «9<sup>ème</sup> rapport de la surveillance des bactéries aux antibiotiques », Algérie, Santé Algérie, 2008.
- Achat, S. (2013).** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques, thèse de Doctorat.
- Afssa, 2010,** Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Saisine(s) liée(s) n°2008-SA-0392. Afssa – Saisine n°2010-SA-0109
- Agbo Matthias Onyebuchi, Philip Felix Uzor, Uchenna Nneamaka**
- Ahsan H., Ali A., Ali R., 2003.** Oxygen free radicals and systemic autoimmunity.*Clinical and experimental immunology*.**131**: 398-404.
- Akazie-Nneji, 2015,** Antioxidant, Total Phenolic and Flavonoid Content of Selected Nigerian Medicinal Plants, Dhaka Univ. J. Pharm. Sci. 14(1): 35-41, 2015 (June)
- Ali N.A.A., Julish W.D., Kusunick C., Lindesquist U., 2001.** Screening of yamani medicinal plant for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, **74**:173-179.
- Aliogiannis N., E Kalpoutzakis, S Mitaku, I B Chinou, 2001,** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species, J Agric Food Chem . 2001 Sep;49(9):4168-70. doi: 10.1021/jf001494m.
- Aliyu, A.B., Ibrahim, M.A., Musa, A.M., Bulus, T & Oyewale, A.O. (2011).** Phenolics content and antioxidant capacity of extracts and fractions of *Verninia blumeoides* (Asteraceae). *International Journal of Biological Chemistry*, 5(6), 352-359.
- Amendola, D.; De Faveri, D.M.; Spigno, G.2010.** Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extract. *Journal of Food Engineering* Volume 97, Issue 3, April 2010, Pages 384-392.
- Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D & Trinajsti, N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76(1), 55-61.
- Anastasiadi, M., Chorianopoulos, N. G., Nychas, G.-J. E., & Haroutounian, S. A. (2009).** Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 457–463.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. Methods for testing antioxidant activity.** *The Analyst Journal*.**2002**, 127, 183-198.
- Aouissa I.W. R., 2002.** Etude des activités biologiques et de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux des feuilles de *mangifera indica* (anacardiaceae). Thèse de doctorat .Université de Bamako.127 p.



- Armendola D, De faveri dante marco et Giorgia spigno**, 2010. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts, April 2010, Journal of Food Engineering 97(3):384-392, DOI:10.1016/j.jfoodeng.2009.10.033
- Atefeibu E.S.I**, 2003. Contribution à l'étude des tannins et de l'activité antibactérienne de *Acacianilotica var adansonii*, Thèse de pharmacie, Université Chikh Diop de DAKAR
- Attia F**, 2007. effet du stress hydrique sur le comportement ecophysiologique et la maturité phenolique de la vigne *vitis vinifera* L.:étude de cinq cepages autochtones de midi-pyrenees, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Balansard G.**, 2007. -Analyse critique des protocoles pharmacologiques utilisés pour la recherche d'extraits et de substances pures d'origine végétale à propriétés Antibactérienne ou antiparasitaire. Revue ethnopharmacologie.42
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S**, 2006, *Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food Chemistry, 99, (1), 191-203.
- Baldi A., Romani A., and Mulinacci N.**1995.HPLC/MS application to anthocyanidins of *Vitis vinifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2104-9.
- Baur Joseph A.\*, Kevin J. Pearson\*, Nathan L. Price, Hamish A.,2006**, Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet, Nature. 2006 November 16; 444(7117): 337–342. doi:10.1038/nature05354.
- Bautista-Ortín A.B. , J.I. Fernández-Fernández , J.M. López-Roca , E. Gómez-Plaza,2007**, The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics, Journal of Food Composition and Analysis Volume 20, Issue 7, November 2007, Pages 546-552
- Baydar a Nilgeun Geokteurk, Geulcan eozkan b, Osman Sagdic**, 2004, Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. Food Control 15 (2004) 335–339
- Bennet R.J. and A.D. Johnson.**2005.Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle.*Annurev Microbiol* , 59:233-255
- Besle J.M., Lamaison J.L., Pradel P., Fraisse D., Viala D., Martin B., 2004**. Les flavonoïdes, des fourrages au lait. *Renc. Rech .Ruminants*, **11** :67-70.
- Boaro C. S. f., Vieira m. a. r., campos f. g., ferreira g., de-la-cruz- chacón i., marques m. o. m. (2019)**. Factors influencing the production and chemical composition of essential oils in aromatic plants from brazil in: essential oil research: trends in biosynthesis, analytics, industrial applications and biotechnological production (malik s., ed.), springer, pp. 19-47

**-Boizot N., Charpentier J.P., 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques, Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques, INRA, France.

**-Bojilov, D.G., Simeonova, Z.B., Solakov, N.Y., Angelova-Romova, M.Y., Tsvetanova, V.M & Ivanov, I.I. (2014).** Chemical composition of *Gleditsia Triacanthos* L.: application in phytotherapy of socially significant diseases. *Journal of international scientific publications: materials, methods and technologies*, 8, 382-392.

**-Boldi a.m., 2004,** capacity of muscadine grapes. *j. agric. food chem.* 2003, 51, 5497–4503.

**-Bordiga M.** Valorization of Wine Making By-Products. CRC Press, Taylor & Francis Group 2016; p. 29.

**-Boudier, A., Tournebize, J., Bartosz, G., El Hani, S., Bengueddour, R., Sapin-Minet, A., Leroy, P.** High-performance liquid chromatographic method to evaluate the hydrogen atom transfer during reaction between 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical and antioxidants.

**-Bouquet, A.; Torregrosa, L.; Locco, P.; Thomas, M. R.; 2008:** Grapes 189-231. Chittaranjan Kole and Timothy C. Hall-Blackwell Publishing Ltd.

**-Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., 1995.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.* 28 : 25-30.

**-Bravo L., 1998.** polyphenols; dietary source, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition*. 317-333p.

**-Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales. Paris, France: Lavoisier. 278 - 279p.

**Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales, 3eme édition, Tec et Doc (ED). Paris, 658p.

**-Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M & Velić, D. (2011).** Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica* L.). *Polish journal of food and nutrition academy*, 61(3), 195-199.

**-Burits, M., & Bucar, F. (2000).** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14, 323–328.

**-Burnichon N, Texier A, 2003.** L'antibiogramme : la détermination de sensibilité aux antibiotiques. Bactériologie, Paris. 16p.

**-Burt, S.A, 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

**-Cacace J.E. , G. Mazza, 2003,**Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries , *Journal of Food Engineering* ,Volume 59, Issue 4, October 2003, Pages 379-389.

**-CADET Alexandra, 2005,** lecepagevitis vinifera l. cv. ferservadou : etude de la nutrition minerale et des relations cepage, terroir, qualite du vin, thèse de doctorat institut national polytechnique de toulouse, pp : 14-15

**-Calvin A., 2001.** Investigation phytochimique de trois plantes indonesiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires. *Tinospora crispa*, *Merremiae marginata* et *Oropheaenne-andra*. Thèse de doctorat. Université de Lausanne, 243p

**-Camila GOMEZ, 2009,** étude des mecanismes de stockage des anthocyanes dans la baie de raisin caracterisation fonctionnelle des genesimpliques dans ces mecanismes, these de doctorat, Montpellier Supagro, pp : 1-5

**-Cantos E., Espin J.C., Tomas-Barberan F.A. 2002.** Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *J. Agric. Food Chem*, 50, 5691–5696.

**-Carbonneau A. Deloire<sup>1</sup>, H. Ojeda, O. Zebic, N. Bernard<sup>3</sup>, J.J. Hunter, 2001,** Influence De L'état Hydrique De La Vigne Sur Le Style De Vin-Cardinale V. 2001 : Les Candidoses Vaginales Récidivantes À *Candida Albicans*. Thèse De Doctorat, UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY 1, Faculté De Pharmacie. Page: 29.

**- Carbonneau, P., Fonstad, M. A., Marcus, W. A., & Dugdale, S. J. (2012).** Making riverscapes real. *Geomorphology*, 137(1), 74-86.

**-Carpita, N.C. and Gibeaut, D.M.1993,** Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of walls during growth. *The Plant Journal*, 3, 1-30. doi:10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x

**-Castilla P, 2006** “*Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects*”. *Am J Clin Nutr*. Jul;84(1):252-62.

**-Chabot S. 1992,** Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub>-enriched conditions, *New Phytol.* (1992)

**-Chacona M.R., Ceperuelo-Mallafrea V., Maymo-Masipa E.2009.**Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes *in vitro*. *Cytokine*, 47, 137–142.

- Chanforan, C. (2010).** Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate (Thèse de doctorat). Université d'Avignon.
- Chaouch, T.M. (2014).** Contribution à l'étude des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales (Thèse de doctorat). Université AbouBekr Belkaid Tlemcen
- Chen C.N., Weng M.S., Wu C., Lin J.k., 2004 .**Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanosoma cells. *Food Chemistry*, **1**(2):175-185.
- Chou E.J., Keevil J.G., Aeschlimann S. et al., 2001.**Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol*, 88:553-555.
- Christèle Bastian, 2006,** extraction, concentration et caractérisation des composés polyphénoliques du café vert, haute école valaisanne, sciences de l'ingénieur, pp : 20, 27.
- Chung K.t et Wei C-I., 2001.** Are tannins a double edged sword in biology and health, *Trends in food Science et Technology*, **9**:168-175.
- Coombe B.G., 1987,** Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation to Its Morphology, *Am J Enol Vitic.* **1987 38:120-127** ; DOI: **10.5344/ajev.1987.38.2.120**
- Cushine T.P.T., Lamb A.J., 2005.** Antimicrobial activity of flavonoids.*Int. J. Antimicrob. Agent*, **26**:343-356.
- D.S.A, 2020.** Direction des Services Agricoles de la Wilaya de mascara, données statistiques.
- Dal-Ros S., 2009.**dysfonction endothéliale et pathologies cardiovasculaires : rôle du stress oxydant et effets protecteurs des polyphénols végétaux, thèse de doctorat, université de strasbourg, 105p.
- Das H.C., Wang J.H., Lien E., 1994.** Carcinogenecity and cancer preventing activities of flavonoides: a structure system-activity relationship analysis. *Journal of Food Engineering*, **69**:133-136.
- Dean F.M., 1963.**Natural occurring Oxygen Ring Compounds, Butterworths. Londres. *J Nature* **volume 200**, page509 (1963)
- Deepti Rathee , Permender Rathee , Sushila Rathee , Dharmender Rathee, 2012,** Phytochemical screening and antimicrobial activity of Picrorrhizakurroa, an Indian traditional plant used to treat chronic diarrhea, *Arabian Journal of Chemistry* (2012), pp : 3-4

- Deloire 2020**, des ions métalliques (Thèse de doctorat). Université d'Avignon.
- Denis F., Dabernath., Monteil H., Avril J.L., 1998.** Bactériologie clinique. Edition marketing, Paris, 1998 ; 144-145.
- Densiov E.T., Afanas'ev I.B., 2005.** Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: *Taylor & Francis Group* (U.S.A), Pp: 703-861.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo, A. A. and Capasso, F., 1999.** Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. 65, 337.
- Diakou, P., Carde, JP 2001.** In situ fixation of grape berries. *Protoplasma* **218**, 225–235 (<https://doi.org/10.1007/BF01306611>)
- Diallo D., Sango R., Yasambou H., Traoré A., Coulibaly K., Maïga A.** (2004). Etude des constituants des feuilles de *Zizyphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *Comptes rendus .Chimie*, **7** :1073-1080.
- Dixon R.A., Xie D.Y., Sharma S.B., 2005.** Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research, *New Phytologist* **165**: 9-28
- Djeridane A, Yous M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N., 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97: 654-660.
- DOI:10.1016/j.seppur.2012.09.004
- Dopico-Garcia M.S., Figue A., Guerra L., Afonso J.M., Pereira O., Valentao P., Andrade P.B., Seabra R.M. 2008.** Principal components of phenolics to characterize red Vinho Verde grapes: anthocyanins or non-coloured compounds, *Talanta*, 75, 1190–1202
- Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., Milenkovic M., Vucicevic D., Zizic S., Kukic J., (2007).** Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J Ethnopharmacol*
- DRAME B.** (2001). Microméthode d'identification et l'étude de la sensibilité des entérobactéries : intérêts thérapeutique. Thèse pharm. Université Dakar, n° 86
- Ďuračková, Z. (2010).** Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiological Research*, 59(4), 459-469.
- Edeoga, H. O., Okwu, D. E., & Mbaebie, B. O. (2005).** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, 4(7), 685-688.)
- Eloff, J.N., 1998.** A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.*, 64: 711–713.

- El-Sayed, M.M., El-Nahas, H.A., Adel-Hameed, E.S & El-Wakil E.A. (2013).** Investigation and antioxidant of phenolic compounds of the leaves of *Gleditsia Triacanthos* L. International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 5(2), 172-177.
- En-Qin Xia, Gui-Fang Deng, Ya-Jun Guo and Hua-Bin Li.2010.** Biological Activities of Polyphenols from Grapes, *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 622-646.
- Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MM, Rodrigues HM, Tostes JB, Rozental S, da Silva AJ, Alviano CS.2002** Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Res Microbiol. Dec*;153(10):647-52. doi: 10.1016/s0923-2508(02)01377-3. PMID: 12558183
- Euzéby J.P, 2009.**Bactériologie générale, Société de Bactériologie Systématique et vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, France.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C.,2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.* **331**: 372-379.
- FAO, 2023** <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Farhan F. Alrubaye HH, Fakhry SS, Jebur ZA, 2018.** Biochemical and Molecular Characterization of *Lactobacillus* spp. Isolated from Dairy Products. *JSM Microbiology.* 6(1):1048.
- Fauchere J .L., Avril J.L., 2002.** Bactériologie générale et médicale, Paris, Ellipses, 364p.
- Favier A., 2003.** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique.* **108-115** .
- Ferguson L. R., Chavan R. R. et Harris P. J., 2001.** Changing concepts of dietary fiber :implication for carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, 39(2), 155-169.
- Ferradji, A., Goudjal, Y., & Malek, A, 2008.** Séchage du raisin de variété Sultanine par un séchoir solaire à convection forcée et un séchoir de type coquillage. *Revue des Energies Renouvelables SMSTS*, 8, 177-185.)
- Fkyerat A., Métais N., Kunz M., Tabacchi R., Pezet R., Pont V, 1999.** Resistance factors to grey mould in grape berries: Identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase ;November 1999,*Phytochemistry* 52(5):759-767DOI:10.1016/S0031-9422(99)00351-9
- Fleuri et A., Jay-Allemand C., Macheix J.J., 2005.** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romande spp 121-216.



**-Ford R.A., Hawkins D.R., Mayo B.C., Api A.M., 2001.**The *in vitro* dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, **39**: 153-162.

**-François Denis, Marie-Cécile Ploy., 2007,** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson, - page 573.

**-Fujii, S, 2006.** Environmental concern, attitude toward frugality, and ease of behavior as determinants of pro-environmental behavior intentions. *Journal of Environmental Psychology*, 26, 262–268.  
**-Furuno JP, Harris AD, Wright MO, 2004.** Prediction rules to identify patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci upon hospital admission. *American Journal of Infection Control*; 32(8), 436-440.

**-Galili, S., Avin-Wittenberg, T., Angelovici, R., & Fernie, A. R, 2014.** The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 447. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00447>

**-Gangoué piéboji J, 2007.** Caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat, Liège-Georgé, S.; Brat, P.; Alter, P. et Amiot M.J. *J. Agric. Food Chem.*53 (2005) 1370-1373.

**-Gibeaut DM. Carpita NC, 1993.** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J. Jan*;3(1):1-30. doi: 10.1111/j.1365-3113x.1993.tb00007.x. PMID: 8401598.

**-Giusti MM, Wrolstad RE, 2001** Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Wrolstad REaS, R.E., Eds., , editor. New York: John Wiley.

**-Gómez-Alonso S, Hermosín-Gutiérrez I, García-Romero E. 2007** Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *J Agric Food Chem.* 7;55(3):608-13. doi: 10.1021/jf062820m. PMID: 17263449.

**-Guendez, R , Ramila Guendez, Stamatina Kallithraka, Dimitris P. Makris1 and Panagiotis Kefalas al., 2005.** An analytical survey of the polyphenols of seeds of varieties of grape (*Vitis vinifera*) cultivated in Greece: Implications for exploitation as a source of value-added phytochemicals *Phytochemical Analysis* 16(1):17-23 DOI:10.1002/pca.804

**-Guesmi, A., Boudabous, A, 2006.** Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. *Revue des Régions Arides*, numéro spécial, p. 224-230.

**-Guingard J, 1996.** Biochimie végétale. Lavoisier, Paris, 175-192 p.

**-Guinoiseau, E, 2010** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action (Thèse de Doctorat). Université de Corse.

- Güler, S, Cathelijn J.F.Waaijer Yassene Mohammed a , M agnus Palmblad, 2016.** Automating bibliometric analyses using Taverna scientific workflows: A tutorial on integrating Web Services. *Journal of Documentation*, 72(6), 1140-1156.  
<https://doi.org/10.1108/JD-10-2015-0101>
- Gurbuz I., Yesilada E., Ito S., 2009.**An anti-lcerogenic flavonoldi glucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology*121: 360 -365.
- Hagerman, A. E (2002)** ,tannins handbook, 2eme edition .Miami university . oxford , USA. 116p
- Hale A. L., 2003.**Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis.Office of Graduate Studies of Texas A&M University.Genetics. 260p.
- Halliwell B., Whiteman M., 2004.** Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*.142: 31-2.
- Halliwell, B., 1996.** Antioxydants in human heath and disease.*Annu. Res. Nutr.*, **16** : 33-50
- Harborne J.B., Williams C.A., 2001.**Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*,18: 310-333
- Harrison D., Griendling K.K., Landmesser U., Hornig B., Drexler H.,2003.** Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*.91: 7-11.
- Haslam E., 1998.** Preaticalpolyphénolics: from structure to molecular recognition and physiological action, Cambridge University press, Combridge University
- Hayes A.J. & Markovic B., 2002.-** Toxicity of australian essential oil Backhousia citriodora(Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 40: 535-543.
- Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M & Hamdi, M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126–1134.
- Heimler D ., Vignolini P ., Giulia Dini M ., Francesco Vincieri F ., Rmani A.(2006).**Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties .*Food Chemistry* ,99:464-469.
- Heller W. et Forkmann G., 1993.** The Flavonoids, Advances in research since 1986, éd. J. B. Harborne, Chapman and Hall, London, 499-535.



**-Hemingway R.W., 1992.** Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : L'ant polyphenols: synthesis, properties, significance. Hemingway R W, Laks P. E. New York.

**-Hennebelle T., 2006.** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la famille productrice d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées). Thèse de doctorat. Lille, 304p.

**-Hernandez-Jimenez, A.; Gomez-Plaza, E.; Martinez-Cutillas, A.; Kennedy, J.A. 2009.** Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell x Syrah grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 10798–10803.

**-Hitara T., Fujii M., Akita K., Yanaka N., Ogawa K., Kuroyanagi M., Hongo D., 2009.** Identification and physiological evaluation of the components from *Citrus* fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 25- 28.

**-Hoffman L., 2003.** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes. Thèse de doctorat. Strasbourg, 245p

**-Holvoet B and B. Muys,** "Sustainable Forest Management Worldwide: A Comparative Assessment of Standards," *International Forestry Review*, Vol. 6, No. 2, 2004, pp. 99-122. <http://dx.doi.org/10.1505/for.6.2.99.38388>

**-Hshemet El-Kiey, 1982)** <http://www.oiv.int/en/oiv-life/oiv-2019-report-on-the-world-vitivinicultural-situation>)

**-Huang D-J., Lin C-D, Chen H-J. et Lin Y-H., 2004.** Antioxydant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') constituents. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45, 179-186.

**-Huang X.M., Huang H.B., et Wang, H.C., 2005.** Cell walls of loosening skin in postveraison grape berries lose structural polysaccharides and calcium while accumulate structural proteins. *Scientia Horticulturae*, 104(3), 249-263.

**-Huglin P, Schneider C, 1998.** Biologie et écologie de la vigne. Lavoisier, Paris, 2<sup>ème</sup> édition, 978-2-7430-0260-2.

**-Ito C., Itoigawa M., Onoda S., Hosokawa A., Ruabgrungsi N., Okuda T., Tokuda H., Nishino H. Furukawa H., 2005.** Chemical constituents of *Murrayasiamensis*: three coumarins and their anti-tumor promoting effect. *Phytochemistry* 66: 567 -572.

**-Jayaprakasha G.K., Tamil, S., Sakartah K.K. 2003.** Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Int.* 36, 117–122.

**-Jean-Pierre Brun,** 2004. Archéologie du vin et de l'huile. De la préhistoire à l'époque hellénistique, Éd. Errance.

- Joffin J.N., Leyral G., 2001. Microbiologie technique 1 dictionnaire des techniques. CRDP, 248p.
- John shi, jianmeiyu, joseph pohorly, j. christopher young, mike bryan and yingwu., optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution, 2003, food, agriculture & environment vol.1(2) : 42-47. 2003.
- Joseph C. Brown, Guohui Huang, Vivian Haley-Zitlin, and Xiuping Jiang, 2008. Antibacterial Effects of Grape Extracts on Helicobacter pylori, Department of Biological Sciences<sup>1</sup> and Department of Food Science & Human Nutrition,<sup>2</sup> Clemson University, Clemson, South Carolina, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Feb. 2009, Vol. 75, No. 3, p. 848–852
- Jovanovic S, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic M (1994): Flavonoids as anti-oxydants. *J Am ChemSoc* 116 4846-4851.
- Juma B-F., Majinda R-R-T. (2004). Erythrinaline alkaloids from the flowers and pods of Erythrinalysistemon and their DPPH radical scavenging properties. *Phytochemistry*, **65**: 1397- 1404
- Jung, K., Chung, H. Y., Sung, B., Jung, K. J., Zou, Y., & Yu, B. P., 2006. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxidants & redox signaling*, 8(3-4), 572-581.
- Karacabey, E., & Mazza, G., 2010. Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food chemistry*, 119(1), 343-348.
- Karadeniz F.; Durst R.W., 2000. Wrolstad R.E. Polyphenolic composition of raisins. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5343–5350
- Kaur, M., Muthe, K. P., Deshpande, S. K., Choudhury, S., Singh, J. B., Verma, N., ... & Yakhmi, J. V., 2006. Growth and branching of CuO nanowires by thermal oxidation of copper. *Journal of Crystal Growth*, 289(2), 670-675.
- Kennedy J.A., Hayasaka Y., Vidal S., -Waters E.J., Jones G.P., 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 5348-5355
- Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin., 2005. Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **15**: 3584-3587.
- Kim H.P., Son k.H., Chang H.W., kong S.S., 2004. Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action mechanism. *J. Pharmacol. Sci.*, **96**: 229-254.
- Kim J Y., Lim H J., Lee D Y., Kim D H., Jeon R., Ryu J H., 2009. In vitro anti inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargessii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 937 -940.

- Kini F., Saba A., Tits M., Angelot L., Guisson P.I., 2008.** Analyse par chromatographie et par spectrométrie électronique des extraits de feuilles de *Odontonem strictum* (Acanthaceae). Mise en évidence de flavonoïdes du type flavone. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim*, **25**:117-121.
- Koehn, F. E., & Carter, G. T. (2005).** The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, *4*(3), 206-220.
- Kohen R., Nyska A., 2002.** Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *ToxicologicPathology*.**30**: 620-650.
- Kubata BK., Nagamune K., Murakami N, Merkel P., Kabututua Z., Martin SK., Kalulug TM., Mustakuk H., Hoshida M., Ohnishi-kameyama M., Kinoshita T., Duszenko M., Uradea Y., 2005.** *Kola acuminata* proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against trypanosome brucei. *International Journal for Parasitology* *35*: 91- 103.
- Kumar ar, subburathinam km,2007.** prabakar g, phytochemical screening of selected medicinal plants of asclepiadaceae family. *asian j microbial biotechnol environ sci* 2007;9(1): 177-180.
- Lamb, A. J. Cushnie, T. T., & Lamb, A. J, 2005.** Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, *26*(5), 343-356.
- Lamuela-Raventos R. M., 1994.** The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries, *Phytochemistry* Volume 37, Issue 2, 1994, Pages 571-573
- Lee NE, Taylor MM, Bancroft E, et al.,2005,**Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections among HIV-positive men who have sex with men. *Clinical Infectious Diseases*. *15*;40(10):1529-34.
- Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001.**Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. **30**: 1076-1081.
- Leifert,W.R., Abeywardena, M.Y., 2008.** Cardioprotective actions of grape polyphenols.*Nutrition Research*, **28**: 729–737
- Lev, M Leikin, R., 2007.** Multiple solution tasks as a magnifying glass for observation of mathematical creativity. In *Proceedings of the 31st international conference for the psychology of mathematics education* (Vol. 3, pp. 161-168).
- Levy S.B., Marshall B,2004.** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*, **10**,S122-129 .

- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., chen F., Tian Y., 2007.** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chimestry*, **102**:771-776.
- Li, W Zhai, X., Zhang, P., Liu, C., Bai, T., Dai, L., & Liu, W, 2012.** Highly luminescent carbon nanodots by microwave-assisted pyrolysis. *Chemical communications*, **48**(64), 7955-7957.
- Lim, J. Kim, K. K., Kim, H. S., Hwang, D. K., H., & Park, S. J. 2003.** Realization of p-type ZnO thin films via phosphorus doping and thermal activation of the dopant. *Applied Physics Letters*, **83**(1), 63-65.
- Lisard Iglesias-Carres, ., Mas-Capdevila, A., Sancho-Pardo, L., Bravo, F. I., Mulero, M., Muguerza, B., & Arola-Arnal, A, 2018.** Optimized extraction by response surface methodology used for the characterization and quantification of phenolic compounds in whole red grapes (*Vitis vinifera*). *Nutrients*, **10**(12), 1931.
- Louli, V., Ragoussis, N., & Magoulas, K, 2004.** Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource technology*, **92**(2), 201-208.
- Lu K.T., Yang, Y. L., Chao, P. K. (2006).** Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. *Neuro psycho pharmacology*, **31**(5), 912-924.
- Lu, Y.;Bennick, A.1998,** Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Arch. Oral.Biochem*, **43**, 717–728.
- Lugasi A, Hovari J, Sagi, K V et Biro L, 2003.**The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *ActaBiologica Szegedientsis*.1-4, 119-125 p.
- Luthria, D. L., Mukhopadhyay, S., & Krizek, D. T. (2006).** Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of food composition and analysis*, **19**(8), 771-777.
- M.A.D.R. (2019).** Ministère de l’agriculture et de développement rural ; données statistiques.
- Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S. 2006.**Activités anti-radicalaires d’extraits de jus defruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, **7**(1):3-8.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : unexemple de métabolites secondaires d’importance économique. Lausanne, Suisse. Pressespolytechniques et universitaires romandes.
- Mainil, J. (2005).** Bactériologie générale. [www2.ulg.ac.be/fmv/bacterio3c02.doc](http://www2.ulg.ac.be/fmv/bacterio3c02.doc). p48

- Makris, D.P., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K., Kefalas, P., 2008.** Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera*) stems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.*, 226, 1075–1079.
- Mann Connor, R. C., Wells, R. S., & Read, A. J. (2000).** The bottlenose dolphin. *Cetacean societies*, 91-125.
- Marfak A., 2003.** Radiolyse Gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat, 220p.
- Marie-Agnès DUCASSE, 2009,** Impact Des Enzymes De Macération Sur La Composition En Polysaccharides Et En Polyphenols Des Vins Rouges –Etude De L’évolution De Ces Composés En Solution Modèle Vin, thèse de doctorat, université MONTPELLIER II, pp : 20.
- MarkowiczBastos D. H., Saldanha L. A., Catharino R. R., Sawaya A.C.H. F., Cunha I B. S., Carvalho P. O. Eberlin M. N., 2007.** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camellia sinensis*) Extracts. *Molecules*. 12: 423-432.
- Martínez-Cayuela, M. 1995.** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 77: 147-161.
- Masquelier J, Dumon M et Dumas J, 1979.** Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta thérapeutique* 1, 101-104 p.
- Matthäus, B. 2002.** Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3444-3452.
- Mattivi F., Guzzon R., Vrhovsek U., Stefanini M., Velasco R., 2006.** Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7692-7702
- Medic Sanic M, Jasprica I, SmolicBubaloAetMornar A. 2004.** Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoides and phenolic acids. *Croatian chemical acta*. 361-366 p.
- Milane H., 2004.** La quercétine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, étude et applications thérapeutique. Thèse de doctorat .Paris, 155p.
- Miquel Mulero, Begoña Muguerza and Anna Arola-Arnal, 2018.** Optimized Extraction by Response Surface Methodology Used for the Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Whole Red Grapes (*Vitis vinifera*), 2018, *J Nutrients* 2018, 10, 1931; doi:10.3390/nu10121931.
- Moroh J.-L. A., Bahi C., Dje K., Loukou Y. G., Guede-Guina F., 2008.** Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (*rubiaceae*)

acetatiquextract (ACE) on *in-vitro* growth of *Escherichia coli* strains, *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 77, 2008, pp. 44 – 61

**-Morré, D. M., & Morré, D. J. (2006).** Anticancer activity of grape and grape skin extracts alone and combined with green tea infusions. *Cancer letters*, 238(2), 202-209.

**-Mukhopadhyay, S., Luthria, D. L., & Robbins, R. J. (2006).** Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 156-162.

**-Naz et al.; 2007**

**-Nebeling, L. (2002).** Phytochemicals: The color of a healthy diet. *Pediatric Basics: The Journal of Pediatric Nutrition and Development*, 98, 2-9.

**-Novelli G.P., 1997.** Role of free radicals in septic shock. *Journal of PhysiolPharmacol.*48:517- 527

**-O.I.V. (2019).** Organisation internationale de la vigne et de vin ; Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Spécialité : sciences agronomiques. Université d'angers.p.7.8

**-OEC World, 2003:** the Observatory of Economic Complexity, <https://oec.world/en>

**OFALAC, 2003,** Office Algérien D'action Économique Et Touristique, <https://recherche-anom.culture.gouv.fr/ark:/61561/pd360tnt>

**-Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., & Barrett, J. F. (1993).** DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3(2), 225-230

**-Ojala T., Rames S., Haansu P., Vuorela H., Hiltunen R., Haahtela K., Vuorela P., 2000.** Antimicrobial activity of some coumarin containing hebal plants growing in finland. *Journal of Enthopharmacology*, 73: 299-305

**-Okamura H Yamashita, Y., Torashima, M., Takahashi, M., Tanaka, N., Katabuchi, H., Miyazaki, K.. (1993).** Hyperintense uterine leiomyoma at T2-weighted MR imaging: differentiation with dynamic enhanced MR imaging and clinical implications. *Radiology*, 189(3), 721-725.

**-Okuda, T., KIMURA, Y., YOSHIDA, T., HATANO, T., Okuda, H., & Arichi, S. (1983).** Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 31(5), 1625-1631.

**-Olszowy, M., Dawidowicz, A. L., & Józwik-Doleba, M. (2019).** Are mutual interactions between antioxidants the only factors responsible for antagonistic antioxidant effect of their



mixtures? Additive and antagonistic antioxidant effects in mixtures of gallic, ferulic and caffeic acids. *European Food Research and Technology*, 245, 1473-1485.

**-Onyesom, I. (2005).** Honey-induced stimulation of blood ethanol elimination and its influence on serum triacylglycerol and blood pressure in man. *Annals of nutrition and metabolism*, 49(5), 319-324

**-Organisation Mondiale de la Santé, 2010:** Statistiques sanitaires mondiales 2010. les *Statistiques sanitaires mondiales*.

**-Pal Yu B,1994.** Cellular defences against damage from reactive oxygen species *.Physiopathological Reviews.74:* 139-155.

**-Papadopoulou C., Soulti K., Roussis I.G.2005.**Potential antimicrobial activity of red and white winephenolic extracts against strains of *Taphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technol. Biotechnol.*43, 41–46.

**-Park Y.K.2003.**“Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans”. *Mutat Res.* 28;529(1-2):77- 86

**-Parthasarathy S, Bin Azizi J, Ramanathan S, Ismail S, Sasidharan S, Said MI, et al.** Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragynaspeciosa*(Rubiaceae Family) leaves. *Molecules* 2009; 14: 3964-3974.

**-Pastrana-Bonilla E., Akoh C.C, Sellappan S, Krewer G., 2003.** Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes.*J.Agric. Food Chem*, 51, 5497–4503.

**-Pauline Rousserie,** de la biosynthèse des flavanols aux tannins du vin: quelle place pour les pépins de raisin, these de doctorat en oenologie, université de BORDEAUX, 2019, pp: 41-45

**-Peng Z, Hayasaka Y, Iland PG, Sefton M, Hoj P, Waters E.** Quanti-tative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 26-31.

**-Penna C, Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O.,, & Luna, V. (2009).** *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of soil biology*, 45(1), 28-35.

**-Peronny S., 2005.** La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*). Thèse de doctorat, 151p.

**-Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O., 2002.** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 16: 233-239.

- Pisoschi, A.M., Cheregi, M.C & Danet, A.F. (2009).** Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches. *Molecules*, 14(1), 480-493.
- Podsedeck A., 2007.** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT*.40:1-11.
- Porter L J, Hirtstich L N, Change B J, 1986.** The conversion of procyanidins and prodlephinidins to cyanidines and delphinidins, *phytochemistry*.25, 223-230 p.
- Prasad, K. N., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A., & Ismail, A. (2011).** Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chemistry*, 128(4), 1121-1127.
- Prescott L.M et al., 1999.** Microbiologie, Paris, Deboeck, 1015p.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. (2005).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269:337–341.
- Prieur C., Rigaud J., Cheynier V., et Moutounet M. 1994.** Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781-784.
- Prior, R.L., Wu, X & Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-302.
- Psotova J., Lasovsky J. et Vicar J., 2003.** Metal chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. *Biomed.Papers* 174-153 p.
- Radovanovic A., Radovanovic B., Jovancevic B. 2009.** Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chem*.117, 326–331.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K et al. (2000).** Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 3-12.
- Regnault J.P., Egnault J.P et Decarie V. (1992).** Agression et défense du corps humains, Montréal, Bibliothèque National du Québec, p448.
- Ribereau G. P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. *Dunod, Paris*, 254 p.
- Rice-Evans C., 2001.** Flavonoids antioxydants. *Curr.Med, Chem.*, 8:797-800



- Richardson M, Elliman D, 2001**, Evidence base of incubation periods, periods of infectiousness and exclusion policies for the control of communicable diseases in schools and preschools. *Pediatr Infect Dis J.* 2001 Apr;20(4):380-91.
- Robards K., Antolovich M., 1997**.Analytical chemistry of fruit bioflavonoids.*Analyst*, 122, 11-34.
- Robinson J., 1986**. Ethics and transgenic crops: A review. *EJB* 2, 71-81.
- Rochette, L., Lorin, J., Zeller, M., Guillard, J. C., Lorgis, L., Cottin, Y., & Vergely, C. (2013)**. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?.*Pharmacology & Therapeutics*, 140 (3), 239-257.
- Rodrigues ML, Santos T, Rodrigues AP, et al. 2008**. Hydraulic and chemical signalling in the regulation of stomatal conductance and plant water use of field grapevines growing under deficit irrigation. *Functional Plant Biology* 35: 565–579.
- Rotava RI Irineo ZanellaII Leila Picolli da Silva, 2009**, Antibacterial, antioxidant and tanning activity of grape by-product, j *Ciência Rural* · June 2009, v39, n.3 p941-944, mai-juin, 2009
- Ryan K.J. et Ray C.G.,2004**. Sherris Medical Microbiology, 4th ed., McGraw Hill, 294–5.
- Salman, D.D. and Khaliale, I .M. 2009**. Assessing some of physiochemical and functional characteristics of alkali prepared chitosan from shrimps shells. *The Iraqi Journal of Agriculture sciences* 40(4):63-75.)
- Sampson, L.; Rimm, E.; Hollman, P. C. H.; De Vries, J. H. M.; Katan, M. B.,2002** Flavonol and Flavone Intakes in US Health Professionals. *Journal of the American Dietetic Association*, 102, (10), 1414-1420.
- Samuel ,t. and welzel , a. 2006** . a method for fast determination of epigallocatechingallate (egcg), epicatechin (ec), catechin (c) and caffeine (caf) in green tea using hplc. j. cienctecnol. aliment.,campinas. 15: 222-226.
- Sannomiya M., Fonseca V B., Da silva M A., Rocha LRM. Dos Santos L C, Hiruma-Lima C A., Britoc A R M S, Vilegas W., 2005**. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonimacrassaleaves* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*97: 1- 6.

-Sant'Anna, V.; Brandelli, A.; Marczak, L.D.F.; Tessaro, 2012 I.C. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts ,October 2012, Separation and Purification Technology 100(3):82–87

-Sato K, Mamoru Nakayama, Jun-ichi Shigeta, 1995. Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. Plant Science Volume 113, Issue 1, 5 January 1996, Pages 91-98

-Saucier C, Mirabel M, Daviaud F, Longieras A, Glories Y, 2001. Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. J Agric Food Chem 2001; 49: 5732-5.

-Scalbert A., Williamson G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphénols. *J Nutr.*130, 2073-2085 p.

- Sharma, S. K., Agrawal, S., Damodaran, D., Sreenivas, V., Kadhiravan, T., Lakshmy, R et Kumar, A. (2011). CPAP for the metabolic syndrome in patients with obstructive sleep apnea. *New England Journal of Medicine*, 365(24), 2277-2286.

-Schofield P ., Mbugua D-M ., Pell A N.(2001).Analyses of condensed tannins: a review .*Animal Food and Technology*,91:21-40.

-Schorderet M.*et al.*, 1992. Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. 2e édition, Genève :Slatkine, 1992 : 671-757.

-Schwarz S., Chaslus-Dancla E.,2001.Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.*32 : 201-225.

-Seigler D.S., Seikheime S., KeesyJ ., Huang H.F.,1986. Tannins from common acacia species of Texas and North-eastern Mexico, *Economic Botany* 40(2),220-232.

-Shan B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of food microbiology*, 117(1), 112-119.

--Shanmugapriya P. Suthagar P. Lee W-C, Roziahaman M. SurashR.. 2012. Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Euphorbia hirta (L.) Extracts by TetrazoliumMicroplate Assay.*Journal of Natural Products*, Vol. 5: 68-76

-Shon H Y, Son K H, Kwon C S, Kang S S. , 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medical plants: *MorusalbaEchinosopharakoreesisNakai*. *Phytomedicine*11: 666 - 672.

-Shrikhande, A. J. (2000). Wine by-products with health benefits. *Food Research International*, 33(6), 469-474.

-Shutes, J. and Galper, A. (2020). The ultimate guide to aromatherapy: an illustrated guide to blending essential oils and crafting remedies for body, mind and spirit, first edition. Fair wind spress, 47.

- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152-178
- Smith SD, Baum DA.** 2004. Phylogenetics of the florally diverse Andean clade Iochrominae (Solanaceae). *Am J Bot.* 93:1140–1153.
- Smyth T; Ramachandran V. N.; Smyth W. F., 2009.** A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins .*International journal of antimicrobial agents* 33: 421 - 426.
- Sonenshein,ja Hoch, R. Losick.,2001,** *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells Tufts Univ Boston MA:ASM press,
- Sorg O., 2004.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies.* **327**: 649-662.
- Souquet J.-M., Labarbe B., Le Guernevé C., Cheynier V., et Moutounet M., 2000.** Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4),
- Spáčil, Z., Nováková, L., & Solich, P. (2008).** Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta*, 76(1), 189-199.
- Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, Tonelli C (1994.** Cloning and Molecular Analysis of Structural Genes Involved in Flavonoid and Stilbene Biosynthesis in Grape (Vitis-Vinifera L).*Plant Molecular Biology* 24: 743-755
- Spencer A.L.R, Spencer J.F.T., 2004.** *Public Health Microbiology: Methods and Protocols.* Human Press Inc. New Jersey. pp. 325-327.
- Stéphane Salmieri, 2023.** INRS, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie Février .pp :3-4
- Sun A.Y., Simonyi A. and G.Y. Sun, 2002.** The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med.* 32:314-322.
- Tabaraki, R.; Nateghi, A.** Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice *technologies*, 8, 382-392
- Théo baillet, 2021.** Comparaison of the dynamic of development and maturation of berries from méditerranéen Grape variety Vitis vinifera L in a context of climate imbalance.
- Tkacz, K., Wojdyło, A., Turkiewicz, I. P., Bobak, L., & Nowicka, P. (2019).** Anti-oxidant and anti-enzymatic activities of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) fruits modulated by chemical components. *Antioxidants*, 8(12), 618.

- Toursel P.,1997.**Antioxydants extraits végétaux, alternative aux produits de synthèse ? Process, **1130** : 38-42.
- Tripoli E., Guardia M L Giammanco S. Di Majo D. Giammanco M., 2007.** Review Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: *Food chemistry* 104: 466 - 479.
- Tsuchiya, H., M. Sato, Y. Kameyama, N. Takagi, and I. Namikawa.** 1987. Effect of lidocaine on phospholipid and fatty acid composition of bacterial membranes. *Lett. Appl. Microbiol.* 4:141-144.
- Türk, A. Ö., Yılmaz, M., Kıvanç, M., & Türk, H. (2003).** The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(11-12), 850-854.).
- Türker, N., & Erdogan, F. (2006).** Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.). *Journal of Food Engineering*, 76(4), 579-583.
- Turkmen N., Velioglu Y. S, Sari F., Polat G., 2007.**Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*.**12**:484-496.
- Ugartondo, V.; Mitjans, M.; Lozano, C.; Torres, J.L.; Vinardell, M.P.** Comparative study of the cytotoxicity induced by antioxidant epicatechin conjugates obtained from grape. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 6945–6950.
- USDA, NRCS. (2009).** The Plants Database: Honey locust, *Gleditsia triacanthos* L.-Plant symbol. U.S.). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. Consulté sur <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=GLTR>.
- Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- Vaquero, M. R., Serravalle, L. T., De Nadra, M. M., & De Saad, A. S.**2010. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food control*, 21(5), 779-785.
- Verge S., Soulet S., Lacan F., Mas T., Arnaudinaud V., Nay B., 1999.**les polyphenols du vin: de la chimie pour la vie. *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux. 138, 75-90 p.
- Verries C., Guiraud J.L., Souquet J.M., Vialet S., Terrier N., Olle D., 2008.**Validation of an extraction method on whole pericarp of grape berry (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz) to study biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,**56**: 5896-5904

- **Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006).** Isolation and identification of phenolic compounds: a practical guide. In *Phenolic compound biochemistry* (pp. 151-196). Dordrecht: Springer Netherlands.
- **Vidaud, J ,Mornas, F. A., Cardinet, C, Landry, P., & Lloret, J. (1993).** Raisin de table: la qualité gustative des variétés nouvelles. *Infos CTIFL*, (93), 37-40.
- **Vinson J. A., Zubik L., Bose P., Samman N., Proch J.2005.** Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* **2005**, *24*, 44-50.
- **Wada, m.; kido, h.; ohyama, k; ichibangas, t.; kishikaw, n.; ohba, y.; nakashima, m.n.;kurod, n; nakashima, k. 2007.** Chemiluminescent screening of quenching effects of natural colorants against reactive oxygen species: evaluation of grape seed, monascus, gardenia and red radish extracts as multi-functional food additives. *food chem.* 2007, *101*, 980–986.
- **Walsh C., 2003.** Antibiotics : actions, origins, resistance. Washington, D.C., ASM Press.
- **Wan Yizhen, H. Schwaninger, Dan Li, C. J. Simon, Yuejin Wang And Puchao He , 2008).** The Eco-Geographic Distribution Of Wild Grape Germplasm In China. *J Vitis* *47* (2), 77–80 (2008)
- **Wollgast J., Anklam E., 2000.** Review on polyphenols in *Theobromacacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* *33*: 423 - 447.
- **Wroblewski, K.; Muhandiram, R.; Chakrabartty, A.; Bennick, A, 2001.** The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds. *Eur. J. Biochem.* 2001, *268*, 4384–4397.
- **Yang L.L., Lee C.Y., Yen K.Y. 2000.** Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukaemia cells. *Cancer Letters*, **157**: 65-75.
- **Yang, L.; Jiang, J.G.; Li, W.F.; Chen, J.; Wang, D.Y.; Zhu, L, 2009.** Optimum extraction process of polyphenols.
- **Yilmaz, F. M., Karaaslan, M., & Vardin, H, 2015.** Optimization of extraction parameters on the isolation of phenolic compounds from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) pomace. *Journal of food science and technology*, *52*, 2851-2859.
- **Yochum L., Kusli L., Meyer K., Folsom A.R., 1999.** Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am. J. Epiderma.* **149**:943-949
- **Zabri H., Kodjo C., Beni A., Marnyrbekova B., Ko J., Bekro Y.A., 2008.** Hytochemical screening and determination of flavonoids in *Secamone afzeli*(Asclepiadaceae) extracts. *African journal of Pure and Applied Chemistry*, **2**(8):80-82.

**-Zhang YJ, Gan RY, Sha Li S, Yue Zhou Y, Li AN, Xu DP, Li HB. 2015.** Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules* 2015; 20: 21138–56.

**-Zrihi G. N., Kra A. K. M., Etien D. T, 2007.** Étude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV) (*Rubiaceae*) et *spermacoce verticillata* (SV) (*Rubiaceae*) sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*. *Revue Méd. Pharm. Afr.*, **20**, 7, 9-17

**--Zweier J.L., Talukder M.A.H., 2006.** The role of oxidants and free radicals in reperfusion Injury. *Cardiovascular Research*. **70**: 181-190.

-anonymes

<http://www.oiv.int/en/oiv-life/oiv-2019-report-on-the-world-vitivinicultural-situation>

# Annexes

## ***Annexe I***

### **Composition des milieux de cultures :**

#### **Bouillon nutritif**

Extrait de viande.....5g  
Peptone.....10g  
Chlorure de sodium.....5g  
Eau distillée.....1000ml  
pH 7,2 autoclaver 15mn à 121°C

#### **Milieu de Man, Rogosa et Sharpe (MRS)**

Peptone.....10g  
Extrait de viande.....10g  
Extrait de levure.....05g  
Glucose.....20g  
Tween 80 (polysorbate 80).....1ml  
Phosphate dipotassique.....2g  
Acétate de sodium.....5g  
Citrate triammonique.....2g  
Sulfate de magnésium.....200mg  
Sulfate de manganèse.....50mg  
Agar.....15g  
pH : 6,5. Stérilisation: 120°C/ 15 minutes.

#### **Chapman (milieu de Chapman gélatine)**

Extrait de levure.....2,5g  
Peptone de caséine.....10g  
Gélatine.....30g  
Lactose.....2g  
Mannitol.....10g  
Chlorure de sodium.....75g  
Phosphate dipotassique.....5g  
Gélose.....12g  
Eau distillée.....1000ml  
pH 7. autoclaver 15mn à 120°C

#### **Bouillon de Sabouraud**

Peptone de viande.....5g  
Peptone de caséine.....5g  
Glucose.....20g  
Eau distillée.....1000ml  
pH 7,6 autoclaver 15mn à 120°C



**EMB (gélose lactosée)**

Peptone.....10g  
 Lactose.....10g  
 Phosphate bipotassique.....2g  
 Eosine.....0,4g  
 Bleu de méthylène.....65mg  
 Gélose.....15g  
 pH 7,1. autoclaver 15mn à 121°C

**Mueller Hinton (Bio Mérieux)**

Extrait de viande.....3g  
 Hydrolysate acide de caséine.....17,5g  
 Amidon.....1,5g  
 Agar.....16g  
 Eau distillée.....1000ml  
 pH 7,3. autoclaver 15mn à 121°C

**Gélose Hecktoen**

Protéose peptone.....12g  
 Extrait de levure.....3g  
 Chlorure de sodium.....5g  
 Thiosulfate de sodium.....5g  
 Sel biliaires.....9g  
 Citrate de fer ammoniacal.....1,5g  
 Salicine.....2g  
 Lactose.....12g  
 Saccharose.....12g  
 Fuschine acide.....0,1g  
 Bleu de bromothymol.....65mg  
 Gélose.....13g  
 Eau distillée.....1000ml  
 pH 7,6. stériliser par 5mn d'ébullition (ne pas autoclaver)

**BCP (Bromocresol Purple)**

Peptone ..... 5,0 g  
 Extrait de viande de bœuf ..... 3,0 g  
 Lactose..... 10,0 g  
 Pourpre de bromocrésol ..... 25 mg  
 Agar..... 15 g  
 Eau distillée.....1000ml  
 pH = 6,8

**Gélose au sang**

Peptone..... 23,0 g  
Amidon..... 1,0 g  
Chlorure de sodium..... 5,0 g  
Agar .....10,0 g  
Sang..... 50 ml  
pH = 7,3

**Gélose S.S**

Extrait de viande de bœuf.....5g  
Bio-polytone.....5g  
Sels biliares.....8,5g  
Lactose.....10g  
Citrate de sodium.....8,5g  
Thiosulfate de sodium.....8,5g  
Citrate ferrique.....1g  
Vert brillant.....0,33mg  
Rouge neutre.....0,025g  
Agar.....13,5g  
pH = 7,0

**Eau physiologique (sérum physiologique):**

Chlorure de sodium.....8,5g  
Eau distillée.....1L  
Stérilisation: 120°C/ 20 minutes.

**OGA (gélose oxytétracycline-glucose = milieu OGYE)**

Extrait de levure.....05g  
Glucose.....20g  
Gélose.....16g  
pH : 7.      Stérilisation: 115°C/ 20 minutes.

## ***Annexe II***

### **I. Les étapes de coloration de Gram:**

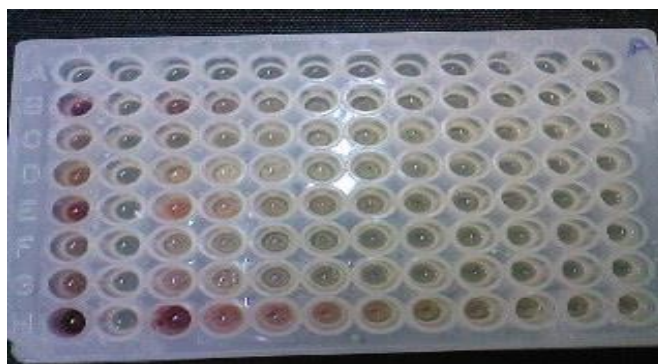
- Faire un frottis bactérien.
- Sécher le frottis par passage sur la flamme de bec bunsen.
- Couvrir de violet de Gentiane pendant 1 minute.
- Laver à l'eau ordinaire.
- Couvrir de Lugol pendant 1 minute.
- Laver à l'eau ordinaire.
- Rincer à l'éthanol (solvant) pendant 15 à 20 secondes.
- Couvrir la lame par la fushine de Ziehel et laisser 30 secondes.
- Sécher la lame à la flamme du bec bunsen, puis essuyer les bords de la lame par un papier filtre.
- Utiliser une petite goutte d'huile d'immersion et étaler sur la lame.
- Observation microscopique, on utilisant l'objectif x100.

### **II. Matériels utilisés:**

- Spectrophotomètre.
- Bec bunsen.
- Bain Marie.
- Autoclave.
- Balance.
- Agitateur magnétique.
- Microscope optique.
- Centrifugeuse.

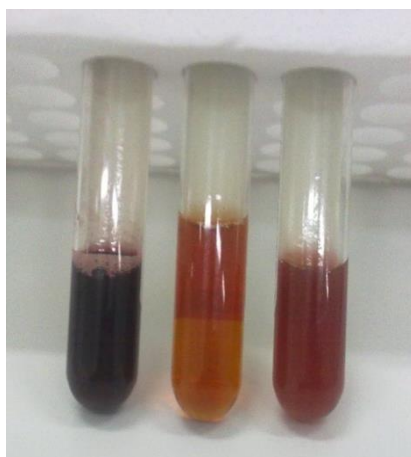
- Frigo.
- Incubateur.
- Tubes à essai.
- Les flacons.
- Les béchers.
- Les entonnoirs.
- Les Erlenmeyer.
- Les pipettes Pasteur, pipettes graduées, burette, lames.
- Boîtes de Pétri.
- Tubes sec.
- Portoirs.

### Annexe III

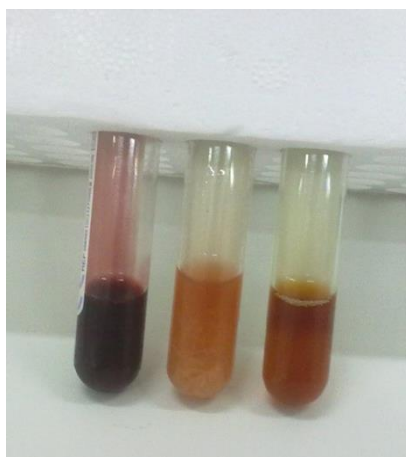


Résultat de la cinétique microbienne sur une microplaque

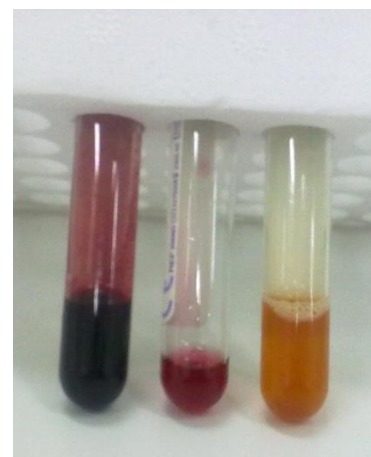
Extrait des différentes parties de variétés étudiées



Cinsault (pellicule, pulpe et pépin respectivement)

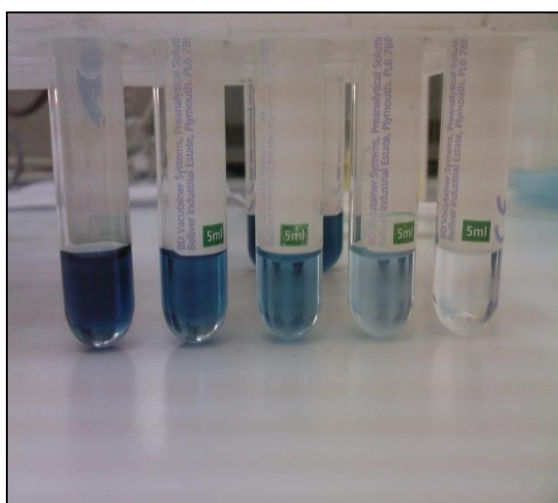


Muscat (pellicule, pulpe et pépin respectivement)

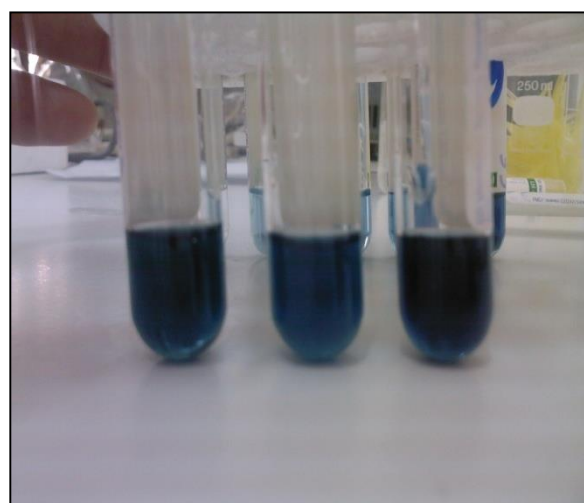


Grenache (pellicule, pulpe et pépin respectivement)

### Test de Folin-Ciocalteu



Résultat de test Folin sur l'acide gallique



Résultat de test Folin sur les extraits

## Résultats des tests de caractérisation

### Test des anthocyanes



**anthocyanidine**

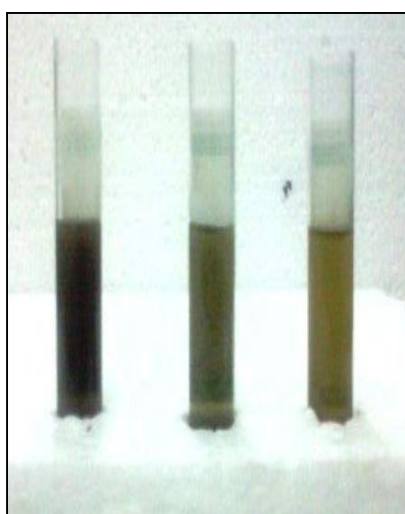


**Anthocyane acide**

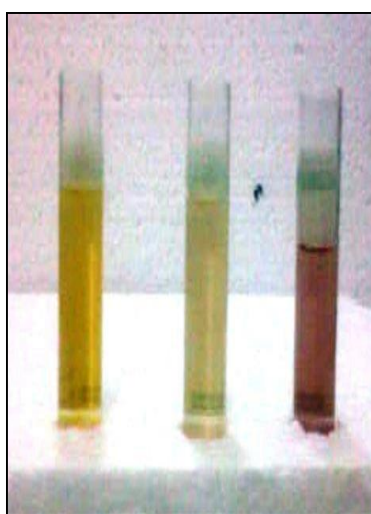


**Anthocyane base**

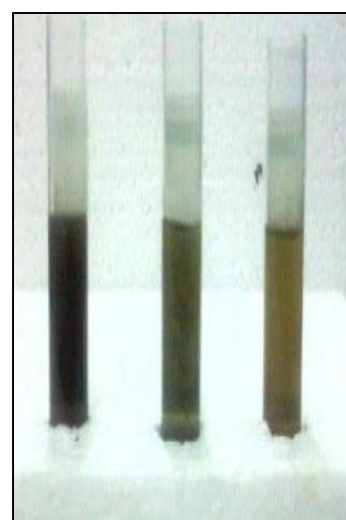
### Test de tanins



Mise en évidence des tanins

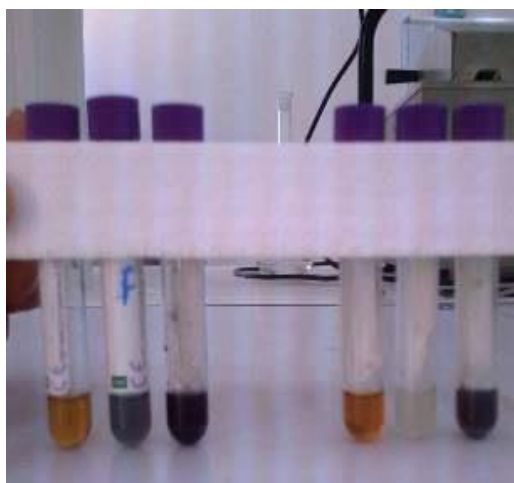


Mise en évidence tanins catéchiques



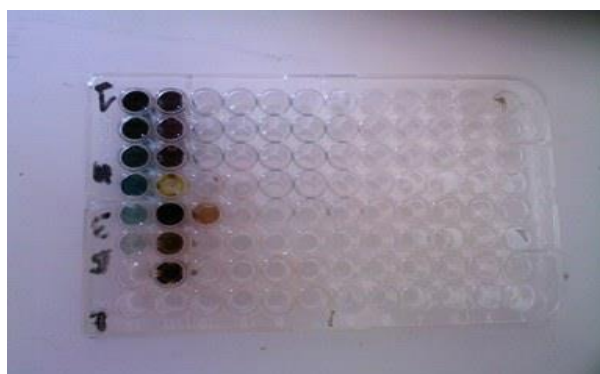
Mise en évidence tanins pour la pulpe, peau et pépin

. Mise en évidence des flavonoïdes



Mise en évidence des flavonoïdes

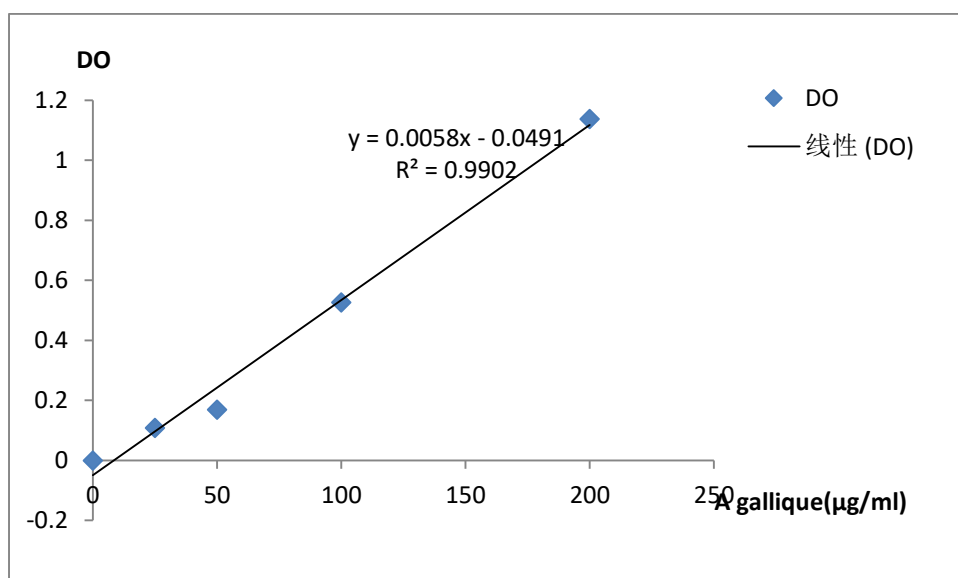
. Dosage spectrophotométrique des tanins



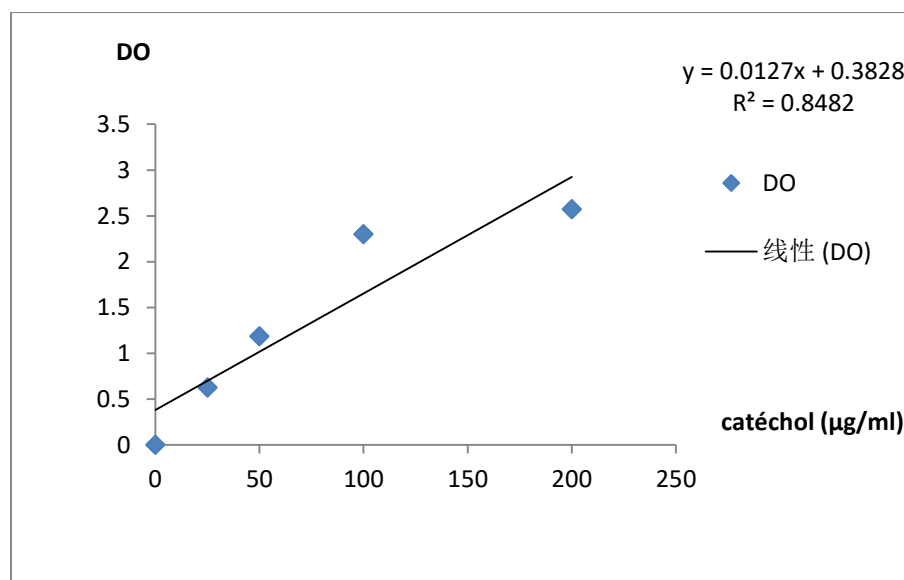
Dosage spectrophotométrique des tanins

*Annexe IV*

Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux



## Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes



## Annexe V

### Effet antioxydant (DPPH)

#### DO

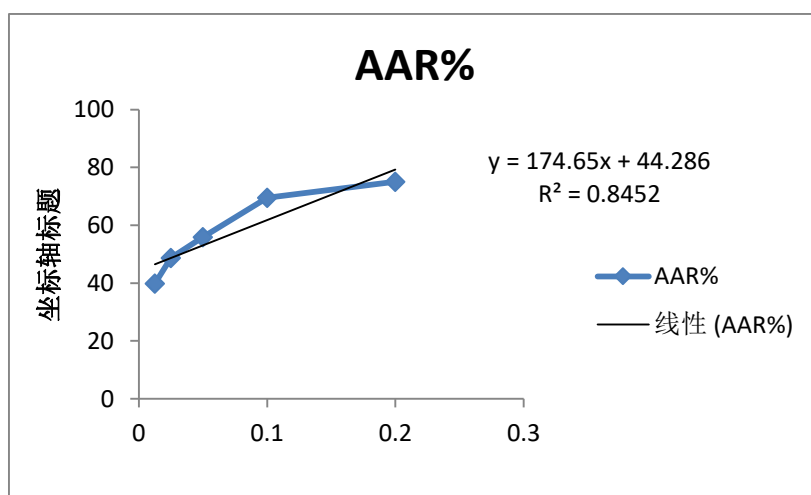
Echantillon		Extrait brute	1 / 2	1/4	1/8	1/16
Acide gallique		0,037	0,081	0,096	0,247	0,264
Acide tannique		0,02	0,045	0,205	0,385	0,359
Acide ascorbique		0,021	0,023	0,185	0,187	0,412
Cins	Pellicule	0,203	0,280	0,231	0,145	0,106
	Pulpe	0,164	0,112	0,131	0,209	0,213
	pépin	0,095	0,1	0,064	0,066	0,045
Mus	Pellicule	0,245	0,271	0,216	0,071	0,046
	Pulpe	0,2	0,159	0,179	0,246	0,314
	pépin	0,058	0,018	0,030	0,035	0,109
Gre	Pellicule	0,105	0,112	0,119	0,217	0,119
	Pulpe	0,122	0,109	0,102	0,156	0,249
	pépin	0,065	0,062	0,06	0,03	0,006



AAR%

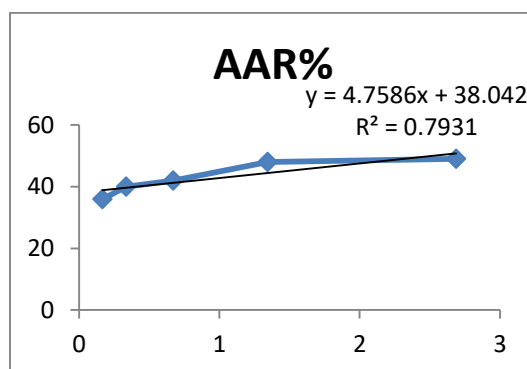
Echantillon		Extrait brute	demi	quart	huitième	seizième
Acide gallique		91,19	80,71	77,14	41,19	37,14
Acide tannique		95,23	89,28	51,19	8,33	14,52
Acide ascorbique		95	94,52	55,95	55,47	29,28
Cin	Pellicule	51,66	33,33	45	65,47	74,76
	Pulpe	60,95	73,33	68,8	50,23	20,7
	pépin	77,38	76,19	84,76	84,28	89,28
Mus	Pellicule	41,66	35,47	48,57	83,09	89,04
	Pulpe	52,38	62,14	57,38	41,42	25,23
	pépin	86,19	95,71	92,85	91,66	74,04
Gre	Pellicule	75	73,33	71,66	48,33	71,66
	Pulpe	70,95	74,04	75,71	62,85	40,71
	pépin	84,52	85,23	85,71	92,85	98,57

Concentration mg/g	0.2	0.1	0.05	0.025	0.0125
AAR%	75	69.52	55.95	48.74	39.90



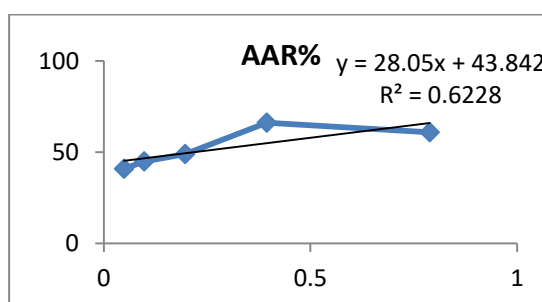
**Pellicule Cin :**

<b>Conc mg/g</b>	2,6889	1,3444	0,6722	0,3361	0,168
<b>AAR%</b>	49	48	42	40	36



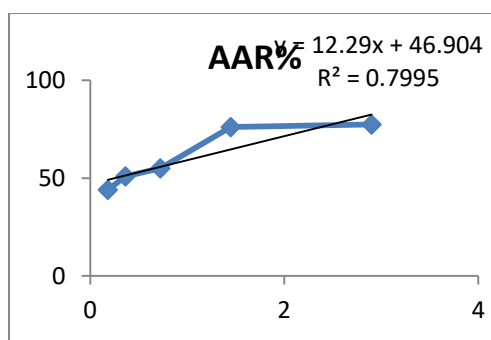
**Pulpe Cin :**

<b>Concentration mg/g</b>	0,7889	0,3944	0,197	0,098	0,049
<b>AAR%</b>	60,9	66,15	49	45	41



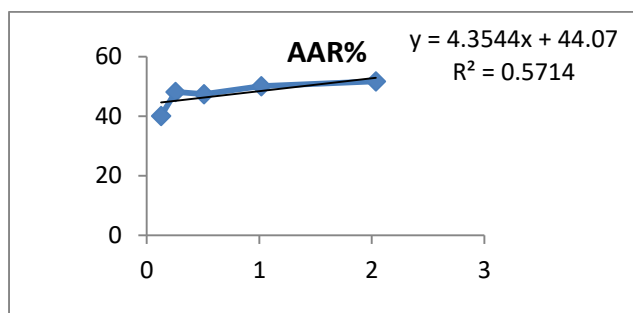
**Pepin Cin:**

<b>Conc mg/g</b>	2.9	1.45	0.725	0.3625	0.181
<b>AAR%</b>	73.38	74.19	52.76	51.28	45.28



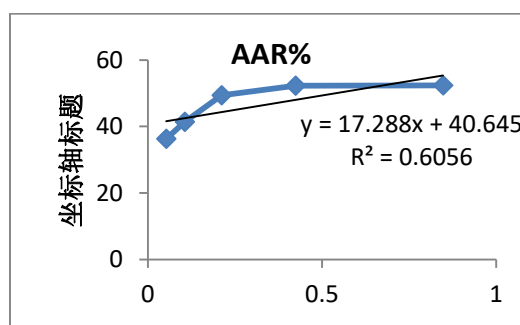
**Pellicule Mus :**

<b>Conc mg/g</b>	2.035	1.017	0.508	0.254	0.127
<b>AAR%</b>	51.75	50.14	47.38	48.12	36



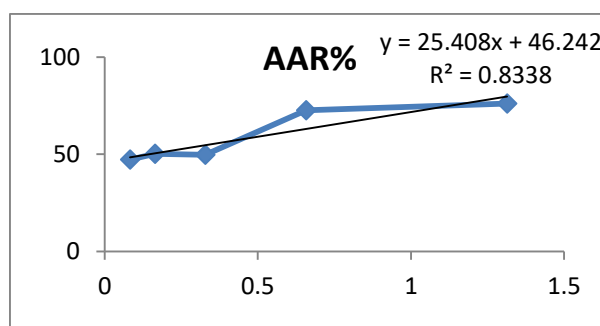
**Pulpe Mus**

<b>Conc mg/g</b>	0,848	0,424	0,212	0,106	0,053
<b>AAR%</b>	52,38	52,24	49,34	41,42	36,25



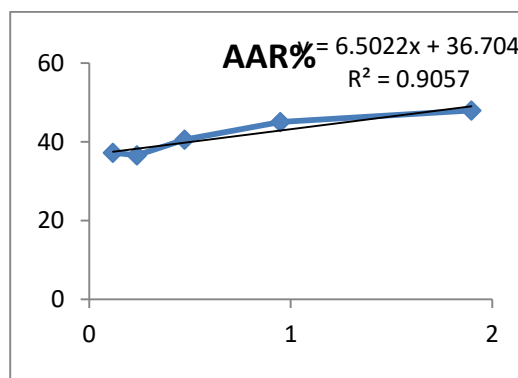
**Pepin Mus :**

<b>Conc mg/g</b>	1.314	0.657	0.328	0.164	0.082
<b>AAR%</b>	76.12	72.54	49.74	50.25	47.22



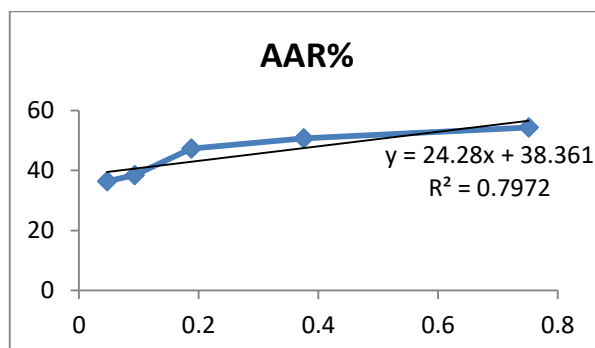
**Pellicule Gre :**

<b>Conc mg/g</b>	1.898	0.949	0.474	0.237	0.118
<b>AAR%</b>	47.99	45.04	40.56	36.58	37.25



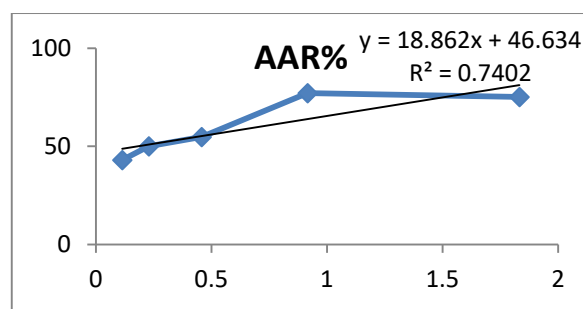
**Pulpe Gre**

<b>Conc mg/g</b>	0.751	0.3755	0.1877	0.093	0.047
<b>AAR%</b>	54,35	50,74	47,25	38,42	36,35



**Pepin Gre :**

<b>Conc mg/g</b>	1.833	0.916	0.458	0.229	0.114
<b>AAR%</b>	75.22	77.11	54.75	49.98	43.07



## Résumé

L'objectif de cette thèse est de contribuer à définir le rôle biologique des polyphénols des trois variétés de raisin *Vitis vinifera* cultivée dans la région de MASCARA, effet antioxydant et antimicrobien sur la croissance de quelques souches référenciées. Durant ce travail, on a optimisé les conditions de l'extraction pour chaque parties de baie de raisin selon les paramètres : ratio, température, gradient du pH, durée d'extraction et polarité des solvants.

L'éthanol, avec différentes pourcentage, à été le meilleur solvant pour la plupart des parties. La T° 45°C été l'optimal dans la plupart des cas, et une durée de 240min été nécessaire pour quelques échantillons.

Le dosage des polyphénols des différents extraits par les méthodes colorimétriques, nous a permet d'évaluer la composition des trois variétés en polyphénols totaux, flavonoïdes et des tanins.les fortes concentrations ont été enregistrées pour la partie pépin de la variété Cinsault (290 mgEAG/100g) de polyphénols totaux.et (194 mgEAG/100g) de flavonoides chez la pellicule de la même variété et une concentration de 65, 75 mgEAG/100g pour la même partie de cette variété.

On a testé l'effet antioxydant des extraits acétoniques, Les résultats obtenus ont montré que les extraits ont un grand effet antioxydant avec une ARP égale à 5,617 enregistrée chez les pépins de la variété Grenache.

En utilisant la méthode de l'antibiogramme et de la microdilution, ou toute les cinétiques de croissance ont été réalisées en duplicata, les extraits de différentes parties de la baie de raisin : pellicule, pulpe et pépin, ont montrés une activité inhibitrice très importante contre les bactéries Gram –, Gram + et *Candida albicans*. Tandis que quelques germes ont montrés une résistance remarquable en présence de quelques extraits polyphénoliques.

**Mots clés :** raisin, *Vitis vinifera*, optimisation, polyphénols, flavonoides, tanins, antioxydant, antibiogramme, microdilution, activité inhibitrice, HPLC

## Abstract

The objective of this thesis is to contribute to defining the biological role of polyphenols from three *Vitis vinifera* grape varieties cultivated in the Mascara region, specifically their antioxidant and antimicrobial effects on the growth of several reference strains. During this work, the extraction conditions were optimized for each part of the grape berry according to the following parameters: ratio, temperature, pH gradient, extraction time, and solvent polarity.

Ethanol, at varying percentages, proved to be the best solvent for most parts. A temperature of 45°C was optimal in most cases, and duration of 240 minutes was required for some samples.

The estimation of polyphenols in different extracts by colorimetric methods, allows us to assess the composition of three varieties in total phenols, flavonoïds and tanins.the concentrations were recorded for the portion of the seed variety Cinsault (290 mg GAE / 100g) of total polyphenols. (194 mgEAG/100g) of flavonoïds in the skin of the same variety and a concentration of 65,75 mg GAE /100g for the same part of this variety.

We tested the antioxidant effect of acetone extracts, the results showed that the extracts have an antioxidant effect with a large ARP equal to 5.617 recorded in the seeds of the variety Grenache.

Using the method of antibiogram and microdilution, where all the growth kinetics were performed in duplicate, extracts of different parts of the grape: skin, pulp and seed, have shown very significant inhibitory activity against Gram -, Gram+ and *Candida albicans*. While some germs have shown remarkable resistance in the presence of some polyphenolic extracts.

**Key words:** grape, *Vitis vinifera*, optimisation, polyphenols, flavonoïds, tannins, antioxydant, antibiogram, microdilution, inhibitory activity. HPLC

## الملخص

تهدف هذه الرسالة إلى المساهمة في تحديد الدور البيولوجي للبولىفينولات من ثلاثة أصناف من عنب فيتيس فينيفيرا (*Vitis vinifera*) المزروعة في منطقة معسكر، وتحديدًا آثارها المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات على نمو عدة سلالات مرجعية. خلال هذا العمل، تم تحسين ظروف الاستخلاص لكل جزء من ثمار العنب وفقًا للمعايير التالية: النسبة، ودرجة الحرارة، وتدرج الرقم الهيدروجيني (pH)، ومدة الاستخلاص، وقطبية المذيب. وقد أثبت الإيثانول، بنسب متفاوتة، أنه المذيب الأمثل لمعظم الأجزاء. وكانت درجة الحرارة المثلى 45 درجة مئوية في معظم الحالات، بينما تطلبت بعض العينات مدة 240 دقيقة.

سمح لنا تحديد البولىفينولات في المستخلصات المختلفة باستخدام طرق القياس اللوني بتقييم تركيب الأصناف الثلاثة من البولىفينولات الكلية والفلافونويدات والعفص. سُجِّلَت تراكيز عالية في جزء بذور صنف سينسولت (290 ملغ من GAE/100 غرام) من البولىفينولات الكلية، و(194 ملغ من GAE/100 غرام) من الفلافونويدات في قشرة الصنف نفسه، وتركيز 65.75 ملغ من GAE/100 غرام لنفس الجزء من هذا الصنف. تم اختبار التأثير المضاد للأكسدة لمستخلصات الأسيتون. أظهرت النتائج أن للمستخلصات تأثيرًا قويًا مضادًا للأكسدة، حيث سُجِّلَت قيمة ARP قدرها 5.617 في بذور صنف غريناش.

باستخدام طريقة التحليل الحيوي والتخفيف المجهرى، حيث أُجريت جميع اختبارات حركية النمو بشكل مكرر، أظهرت مستخلصات من أجزاء مختلفة من حبة العنب - القشرة واللُب والبذور - نشاطًا مثبطًا ملحوظًا ضد البكتيريا سالبة الجرام وموجبة الجرام والمبيضة البيضاء. ومع ذلك، أظهرت بعض البكتيريا مقاومة ملحوظة في وجود بعض المستخلصات متعددة الفينول.

**الكلمات المفتاحية :** العنب، فيتيس فينيفيرا، التحسين، البولىفينولات، الفلافونويدات، التانين، مضادات الأكسدة، المضادات الحيوية، التخفيف الدقيق، النشاط المثبط، HPLC