



République Algérienne Démocratique et Populaire

899



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 8 Mai 1945 – Guelma

Faculté des Sciences et Technologies

Département de Génie des Procédés



## Mémoire de Projet de Fin d'Etudes

Pour l'obtention du diplôme de *Master Académique*

### *Thème*

*Contribution à l'étude phytochimique et  
évaluation de l'activité antioxydante de Vitis  
vinifera*

Filière : Génie des Procédés.

Spécialité : Génie chimique.

Réalisé par :

Sadou Souleymane Issa

Encadreur :

*Dr. Rouaiguia Samia*

Co-encadreur

*Dr. Ali Benayahoum*

Juin 2018

*Dédicaces*

18/3772 ✓

*À mes très chers parents ;*

*À mes très chers frères et sœurs ;*

*À tous les membres de ma famille ;*

*À tous mes amis ;*

## Remerciements

Tout d'abord à Dieu le tout puissant qui nous a donné la force, la santé, le courage et la persévérance afin de réaliser ce modeste travail.

Je remercie chaleureusement mes parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études, parfois au prix de quelques sacrifices et sans qui je n'aurais pas pu atteindre ce niveau.

Je tiens à remercier mon encadrante, Dr Rouaiguia Samia, pour sa supervision, sa présence, ses conseils précieux et pour les efforts qu'elle avait consentis durant la rédaction de tout le long de mon mémoire de Master. Je tiens à souligner la qualité de ses observations pertinentes, sa grande rigueur scientifique et son investissement dans cette étude.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mr Benayahoum Ali, Maître de Conférences à l'université de Guelma, d'avoir accepté d'être mon Co-encadrant mais aussi pour son aide scientifique précieux, ses conseils qu'il a pu me fournir durant la réalisation de ce modeste travail et pour ses encouragements.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie toute ma famille à savoir mes frères, mes sœurs, mes tantes et oncles pour leurs soutiens et encouragement dans la rédaction de ce travail.

Je remercie du fond du cœur tous les enseignants qui m'ont tenus et dirigé durant cette formation et le personnel de génie des procédés.

Un remerciement à Mme Moumeni Boultif Assia, ingénieur du laboratoire de chimie appliquée pour son soutien pour la réalisation de mes expériences.

J'exprime toute ma gratitude à mes proches que ce soit ma famille ou mes amis pour le soutien permanent et leur patience pendant ces 5 années.

## Acronymes

**Abs** : Absorbance

**DPPH** : 2,2-diphenyle-1-picryl hydrazyl

**EAG** : Equivalent d'Acide Gallique

**EC<sub>50</sub>** : Concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH

**H** : Hydrogène

**h** : Heure

**ha** : Hectare

**LCA** : Laboratoire de Chimie Appliquée

**LDL** : Lipoprotéine à basse densité

**min** : Minute

**MS** : Matière Sèche

**nm** : Nanomètre

**R<sub>aj</sub>** : Coefficient de détermination ajustée

**TAH** : Transfert d'Atome d'Hydrogène

**TPC** : Totaux Polyphénols Compound

**Tr** : Tour ?

**UV-vis** : Ultra-violet Visible

## Table des matières

Introduction .....	1
Chapitre I : Etude botanique, phytochimique et activités biologiques de <i>Vitis vinifera</i>	
I.1 Introduction .....	5
I.2. Historique .....	5
I.3. Ampélographie (classification) .....	6
I.4. Les différentes espèces de vigne .....	7
I.5. Description .....	7
I.5.1. Le raisin .....	8
I.5.2. Le tronc .....	8
I.5.3. Les rameaux .....	9
I.6. La composition chimique de la vigne .....	9
I.6.1. Les composés phénoliques .....	9
I.6.2 Classification des polyphénols .....	10
I.6.3. Effets biologiques des polyphénols .....	11
I.6.4. Les compositions phénoliques de la vigne .....	11
I.7. Les propriétés curatives de la vigne .....	15
I.8. Les valeurs nutritives .....	15
I.9. Utilisations de la vigne .....	16
I.10. Conclusion .....	16
Chapitre II : Généralités sur l'extraction des polyphénols totaux et leur activité antioxydante	
II.2. Extraction des polyphénols .....	18
II.2.1. L'extraction conventionnelle par solvant .....	18
II.2.2. La filtration .....	19
II.2.3. La distillation sous vide .....	19
II.2.4. Congélation et lyophilisation .....	20
II.3. Dosage des polyphénols totaux par réaction à base du Folin Ciocalteu .....	20
II.4. Activité antioxydante .....	21
II.4.1. Stress oxydant .....	21
II.4.2 Les principales sources d'antioxydants .....	22
II.4.3 Méthodes de tests des antioxydants .....	23
II.5. Conclusion .....	25
Chapitre III : Matériels et méthodes	
III.1. Matériel végétal .....	27
III.2. Le broyage .....	27

III.3. Procédé d'extraction de polyphénols à partir des sarments de vigne .....	28
III.3.1. Le screening phytochimique des polyphénols.....	28
III.3.2. La filtration.....	30
III.3.3. La distillation sous vide .....	30
III.3.4. La lyophilisation .....	31
III.4. Dosage des composés phénoliques totaux: Le test TPC .....	31
III.4.1. Principe .....	32
III.4.2. Mode opératoire.....	32
III.4.3. Expression des résultats.....	33
III.5. Activité antioxydante des extraits hydroalcooliques.....	33
III.5.1. Test DPPH.....	34
III.5.2. Principe .....	34
III.5.3. Mode opératoire.....	35
<b>Chapitre IV : Résultats et discussion</b>	
IV.1. Introduction.....	37
IV.2. Extraction des polyphénols .....	37
IV.2.1. Optimisation des conditions d'extraction .....	37
IV.2.2. Calcul du rendement d'extraction.....	38
IV.3. Dosage des polyphénols totaux.....	38
IV.3.1. Calcul des polyphénols totaux.....	39
IV.3.2. Les résultats expérimentaux par TPC .....	40
IV.4. Les résultats de TPC obtenus par optimisation .....	41
IV.4.1. Analyse des variances (analyse statistique) .....	41
IV.4.2. Analyse des interactions.....	42
IV.4.3. Paramètres optimaux .....	44
IV.5. Comparaison des résultats obtenus par méthode optimisée et par méthode conventionnelle .....	45
IV.6. Evaluation de l'activité antioxydante des sarments de la vigne .....	45
IV.6.1. Test de l'activité antiradicalaire .....	45
IV.6.2. Détermination de l'EC50.....	46
Références bibliographiques .....	52

## Liste des tableaux

Tableau I. 1 : Classification classique de la vigne :.....	6
Tableau I. 2 : Principales classes des composés phénoliques (Benkhedimalleh et Kismoun, 2014).....	10
Tableau I. 3 : Valeur nutritive du raisin cru.....	15
Tableau III. 1 : Paramètres d'extraction des 17 extraits réalisés.....	29
Tableau IV. 1 : Optimisation des paramètres d'extraction.....	37
Tableau IV. 2 : Poids des extraits obtenus après lyophilisation et leur rendement.....	38
Tableau IV. 3 : Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.....	39
Tableau IV. 4 : Les résultats expérimentaux et prédits d'extraction des polyphénols en terme de TPC. .....	40
Tableau IV. 5 : Conditions optimales d'extraction des polyphénols avec la méthode optimisée.....	45
Tableau IV. 6 : Comparaison entre les résultats obtenus par extraction optimisée et extraction conventionnelle.....	45
Tableau IV. 7 : Valeurs des pourcentages d'inhibition.....	46

## Liste des figures

Figure I. 1 : la place de l'Algérie parmi les producteurs méditerranéens (1950). .....	6
Figure I. 2 : Vitis vinifera .....	8
Figure I. 3 : Le rameau. ....	9
Figure I. 4 : Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002). ....	11
Figure I. 5 : Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique présents dans les raisins. ....	12
Figure I. 6 : Structures chimiques de quelques stilbènes. ....	12
Figure I. 7 : Squelette d'un flavonoïde.....	13
Figure I. 8 : Structures chimiques de quelques flavonols. ....	13
Figure I. 9 : Structures chimiques de quelques anthocyanidines: Forme monoglucoside, R=glucose..	13
Figure I. 10 : Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés. ...	14
Figure I. 11 : Structure de quelques coumarines.....	14
Figure II. 1 : Schéma d'un évaporateur rotatif.....	20
Figure II. 2 : Acide ascorbique.....	23
Figure III. 1 : Des sarments à la poudre de vigne.....	27
Figure III. 2 : Le broyeur POLYMIX. ....	28
Figure III. 3 : Le montage de filtration .....	30
Figure III. 4 : Le montage de la distillation sous vide avec le rotavap. ....	31
Figure III. 5 : Lyophilisation .....	31
Figure III. 6 : Le produit après lyophilisation .....	31
Figure III. 7 : La pesée du produit sur la balance .....	31
Figure III. 8 : La mise en solution des extraits.....	33
Figure III. 9 : Avant la mise du Folin.....	33
Figure III. 10 : Après la mise du Folin.....	33
Figure III. 11 : Réaction de test DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) (CONGO, 2012).....	34
Figure IV. 1 : Courbe d'étalonnage en termes d'acide gallique.....	39
Figure IV. 2 : Comparaison entre les résultats expérimentaux et prédits. ....	42
Figure IV. 3 : Surface de réponse pour le temps et la température d'extraction dans le cas: ratio=25. ....	42
Figure IV. 4 : Surface de réponse pour la température et le ratio pour une durée d'extraction de 20 minutes. ....	43
Figure IV. 5 : Surface de réponse pour le ratio et le temps d'extraction.....	44
Figure IV. 6 : Courbe de pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait étudié.....	47



# *Introduction*

## Introduction

La phytochimie ou chimie des végétaux est la science qui étudie la structure, le métabolisme ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes. Les substances isolées à partir des végétaux ont montré des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie: en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche a permis de trouver chez les plantes des molécules actives nouvelles.

Les plantes médicinales constituent un véritable réservoir de substances naturelles bioactives. En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses études *in vivo* comme *in vitro*, notamment dans la recherche des nouveaux composés naturels tels que les composés phénoliques.

Les études portant sur le métabolisme de ces composés ont montré que les polyphénols sont faiblement absorbés au niveau de l'estomac ou de l'intestin grêle et qu'ils sont présents en grande quantité dans la lumière du côlon où ils pourraient exercer des effets antioxydants.

Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. Sur les milliers d'espèces de plantes à usage thérapeutique répertoriées en Algérie, très peu sont celles qui ont été valorisées sur le plan phytochimique.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre recherche portant sur l'effet des extraits végétaux sur le stress oxydant d'une plante médicinale très commune en Algérie, il s'agit de l'espèce dite *Vitis vinifera*.

La vigne, considérée comme ayant des usages condimentaires et/ou alimentaires, se retrouve dans la cuisine méditerranéenne, chez le pâtissier, raisin de table, le jus de raisin, etc.

Ce travail sera présenté en quatre chapitres:

L'état des connaissances bibliographiques botaniques et photochimiques sur *Vitis vinifera* ainsi que les activités biologiques les plus importantes des différentes parties de cette plante seront présentés dans un premier chapitre.

Dans un deuxième chapitre, nous aborderons un aperçu général sur la théorie des tests et activité visée par cette étude notamment le dosage des polyphénols totaux par la méthode du folin-Ciocalteu et l'activité anti radicalaire par le test DPPH.

Le troisième chapitre sera consacré aux méthodes et techniques utilisées pour l'extraction, des polyphénols totaux et le test de l'activité biologique.

L'interprétation des résultats de notre étude feront l'objet du quatrième chapitre.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives.

# *Chapitre I*

# *Etude botanique, phytochimique et activités biologiques de Vitis vinifera*

## **I.1 Introduction**

La vigne est une espèce cultivée depuis des temps immémoriaux en Europe, dans l'ouest de l'Asie (Moyen-Orient, Caucase) et le nord de l'Afrique. Elle a été introduite dans tous les continents, et la viticulture a pris de l'importance en Amérique du Nord (Californie), du Sud (Argentine, Chili), Australie, en Afrique du Sud et en Chine ([https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitis\\_vinifera](https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitis_vinifera)).

Dans ce travail, nous allons faire une présentation de la vigne, sa famille et ses diverses espèces, ses propriétés morphologique et chimique ainsi que ses usages.

## **I.2. Historique**

La vigne est une plante spécifiquement méditerranéenne. Dans la préhistoire, elle produisait des petits grains qui furent consommés frais ou séchés par les herbères. Aussi, dès l'antiquité, l'Afrique du Nord produisait 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, Hippone (Annaba) ou Cuicul (Djemila) et de Tipaza, où des mosaïques antiques représentent le déchaussage et le sarclage de la vigne, le foulage du raisin ([http://algerroi.fr/Alger/agriculture\\_algérienne/textes/vigne\\_ofalac.htm](http://algerroi.fr/Alger/agriculture_algérienne/textes/vigne_ofalac.htm)).

Dans la période qui suit la chute de l'empire Romain, la viticulture régresse progressivement au point de presque disparaître. Après la conquête de l'Afrique du Nord par les musulmans, auxquels leur livre saint interdit la consommation du vin, les populations indigènes ne s'intéressent plus à la vigne que pour la production du raisin frais, qu'elles apprécient particulièrement.

A l'arrivée des français en Algérie, en 1830, la vigne ne couvre plus que 2.000 ha. En 1861 la vigne ne couvre encore que 6.500 ha. C'est grâce aux découvertes de Pasteur sur les fermentations alcooliques (1857) qui permettent dorénavant de vinifier en pays chauds; puis à partir de 1864 le vignoble Algérien a pris son essor jusqu'à devenir l'un des éléments prépondérants de la mise en valeur et de la richesse du pays. Fin 1952, jusqu'à l'indépendance

en 1962 la vigne couvre à nouveau près de 400.000 ha du territoire Algérien, mais 367.000 ha seulement sont en production, et il faudra attendre plusieurs années encore pour que le potentiel de production 1968 soit complètement reconstitué.

Au début des années 1970, au cours de la crise diplomatique qui accompagne la nationalisation des hydrocarbures, la France avait menacé de ne plus acheter de vin Algérien, alors que celui-ci est encore la deuxième source de revenus en devises pour le trésor public.

Dans les années 2000, des plantations reprennent, notamment dans la région d'Aïn Témouchent, qui tend à devenir le centre viticole de l'Algérie ([www.wikipedia.org/wiki/viticulture\\_en\\_Alg](http://www.wikipedia.org/wiki/viticulture_en_Alg)).

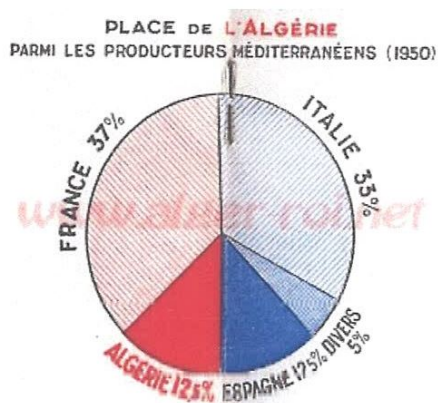


Figure I.1 : la place de l'Algérie parmi les producteurs méditerranéens (1950). [ref]

### I.3. Ampélographie (classification)

La vigne ou *Vitis vinifera* L. (Tableau I.1.), est un arbrisseau sarmenteux de la famille des Vitacées (Vitaceae) ([https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitis\\_vinifera](https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitis_vinifera)) précédemment appelée ampélidacées largement cultivée pour ses fruits en grappes, le raisin.

Tableau I.1 : Classification classique de la vigne

<u>Règne</u>	Plantae
<u>Classe</u>	Magnoliopsida
<u>Ordre</u>	Rhamnales
<u>Famille</u>	Vitaceae
<u>Genre</u>	<i>Vitis</i>
<u>Nom binomial</u>	<i>Vitis vinifera</i> L.

Il en existe d'innombrables variétés cultivées appelées cépages: Cabernet, Chardonnay, Merlot, Pinot, Sauvignon, etc. La culture de la vigne, ou viticulture, occupe environ 8 millions d'hectares dans le monde. Un terrain planté de vigne s'appelle un vignoble.

#### **I.4. Les différentes espèces de vigne**

Le genre *Vitis* comprend de très nombreuses espèces. On trouve notamment en Amérique du nord : *Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*,.....

En Extrême Orient, on trouve : *Vitis amurensis Rupr*, *Vitis coignetiae Pulliat*.

Elles ne présentent pas d'intérêt pour la viticulture mais qui sont des sources de stilbènes et de leurs oligomères. On appelle aussi vignes d'autres plantes de la famille des Vitacées: les vignes-vierges vraies, les vignes-vierges apparentées. Nous avons aussi la variété muscat qui est une ancienne variété et largement utilisée de nos jours.

Le Muscat de Hambourg, considéré comme l'un des meilleurs raisins de table: grains noir bleuté, très parfumés, légèrement musqués, bien sucrés, portés par de grosses grappes, mais qui se conserve mal.

Le Muscat d'Alexandrie, un raisin blanc, à gros grains charnus, de saveur musquée. (<http://www.gerbeaud.com/jardin/fiches/vigne-chasselas-muscat.php>)

D'autres plantes, qui se rapprochent vaguement de la vigne par le port, la forme des feuilles ou des fruits, portent également en français le nom de vigne. Ainsi on appelle : vigne blanche, vigne de Judée, vigne du Nord, vigne noire, le tamier.

#### **I.5. Description**

La vigne est un arbrisseau grimpant qui s'attache aux supports par des vrilles (attaches). Les tiges, taillées en culture, peuvent atteindre dans la nature de très grandes longueurs en grimpant dans les arbres. Les feuilles à nervure palmée comportent cinq lobes principaux plus ou moins découpés, et sont en forme de cœur à la base (Figure I.2).

Les fleurs sont très petites, verdâtres et regroupées en grappes composées. Les fruits murs sont des baies de forme et de couleur variables. Ils sont blancs, jaunâtres, violets ou noirs, et presque toujours noirs à l'état sauvage (<https://www.espritsante.com/articles/raisin-bio-vitis-vinifera-bio>).



**Figure I.2:** *Vitis vinifera*.

### **I.5.1. Le raisin**

Le raisin est le fruit amélioré de la vigne cultivée (*Vitis vinifera*). Il 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, le raisin blanc (verdâtre, jaunâtre, jaune doré) ou plus foncée, le raisin rouge (rose ou noir-violet) ([https://www.benchaabane.com/Le-raisin-est-l-un-des-fruits-les-plus-energetiques\\_a1465.html](https://www.benchaabane.com/Le-raisin-est-l-un-des-fruits-les-plus-energetiques_a1465.html)).

Il sert surtout à la fabrication du vin à partir de son jus fermenté (on parle dans ce cas de raisin de cuve), mais se consomme également 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 frais. Des baies on extrait aussi l'huile de pépins de raisin (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Raisin>).

### **I.5.2. Le tronc**

A l'origine, la vigne est une liane. Elle développe des tiges sarmenteuses qui s'accrochent à des supports très divers, grâce à ses vrilles, pour étaler son feuillage à la lumière. Les troncs que l'on peut observer dans les vignobles ne sont pas un fût droit, comme celui des arbres fruitiers ou forestiers, mais il est toujours flexueux, tordu autour des supports sur lesquels il grimpe. Le tronc se ramifie en plusieurs branches ou bras qui portent les tiges de l'année, appelées rameaux tant qu'elles demeurent herbacées et sarments après l'aouïtement. En dehors de son rôle de support, le tronc sert de réservoir pour les substances de réserve qui s'accumulent dans les cellules du bois (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).



### **I.5.3. Les rameaux**

Chaque année, au printemps, des pousses herbacées se développent à partir des bourgeons, ce sont les rameaux. Chaque rameau est composé d'une succession de nœuds (parties renflées) et de mérithalles (ou entre-nœuds). Les nœuds portent les différents organes: feuilles, bourgeons et inflorescences ou vrilles (Figure I.3). Le rameau reste herbacé devient ligneux au mois d'août puis s'aoûte.



**Figure I.3:** Le rameau.

## **I.6. La composition chimique de la vigne**

### **I.6.1. Les composés phénoliques**

En biologie végétale, les composés produits par les plantes sont subdivisés en deux groupes de molécules: les métabolites primaires qui jouent un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement végétal (protéines, lipides, glucides, acides aminés, acides nucléiques), et les métabolites secondaires dont l'action est déterminante pour l'adaptation de la plante au milieu naturel (agents protecteurs contre les stress physiques, défense contre les agressions extérieures, ...). Parmi les métabolites secondaires on cite les composés phénoliques.

Les polyphénols sont des métabolites secondaires des plantes, représentant les composés phytochimiques essentiels des légumes, des fruits et d'autres plantes. Ces molécules sont associées non seulement aux effets bénéfiques de la santé humaine mais aussi aux propriétés colorantes et sensorielles des boissons (Harborne, 2000; Brouillard, 2003; Duthie, 2003). Les polyphénols sont largement distribués dans le règne végétal.



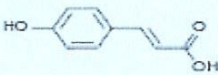
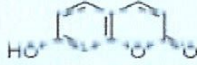

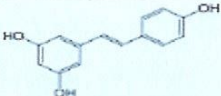
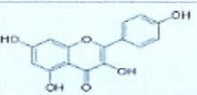
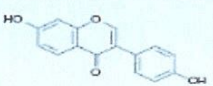
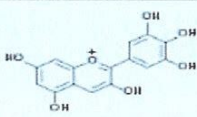
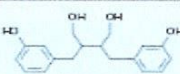

L'expression « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (Bloor., 2001). Un nombre considérable de ces composés sont formés de deux noyaux benzéniques reliés par un hétérocycle de type pyrane. Ces composés différents les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux, par la

nature de l'élément central et par la position, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées ainsi que par la nature de la liaison hétérosidique.

## I.6.2 Classification des polyphénols

Actuellement, environ 8000 composés phénoliques sont connus et sont distribués en différents groupes dont les plus connus sont les acides hydroxy-cinnamiques, les flavonoïdes, les anthocyanes, les coumarines, les tanins et les stilbènes (Hu et al., 2005 ; Luthria et Mukahapadhyay, 2006).

**Tableau I.2 :** Principales classes des composés phénoliques (Benkhedimallah et Kismoun, 2014).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule	Origine
C6	Phénols simples	Hydroquinone		<u>Busserole</u>
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	acide p-hydroxybenzoïque		Epices, fraises
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	acide p-coumarique		Tomates, ail
	Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C6-C4	Juglone		Noix	
C6-C2-C6	Stilbénoides	trans-resvératrol		Raisin
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Kæmpférol		Fraises
	Daidzéine		Graines de soja	
	Anthocyanes	Delphinidol		Raisin Cabernet-Sauvignon
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanes	Entérodiol		Bactéries intestinales
(C6-C3) <sub>n</sub>	<u>Lignines</u>			Bois, fruits à noyaux
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	<u>Tanins condensés</u>	Procyanidol		Raisins, kaki

On peut distinguer les différentes classes de polyphénols (Tableau I.2) en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base.

### I.6.3. Effets biologiques des polyphénols

Ces substances présentent des propriétés antioxydantes (Gomez-Caravaca et al., 2006), anticancéreuses (Babar et al., 2007), anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériennes, antivirales, anti-allergènes, vasodilatatrices (Falleh et al., 2008) et antibactériennes non négligeables (Redoyal et al., 2005 ; Hatano et al., 2005).

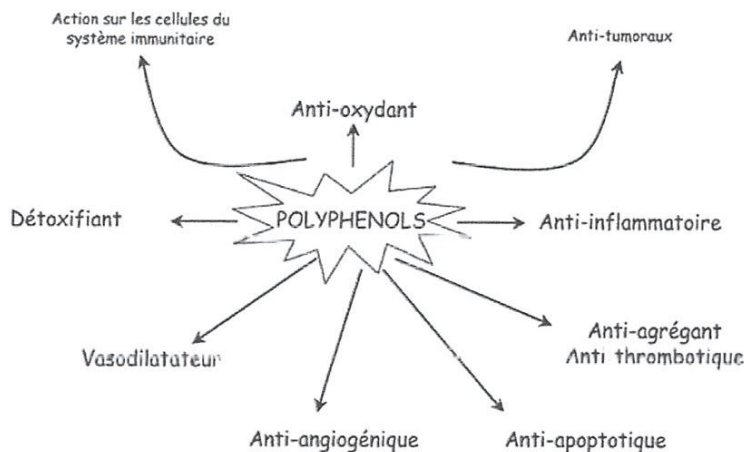


Figure I.4: Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

### I.6.4. Les compositions phénoliques de la vigne

La vigne *Vitis vinifera* est l'une des plantes particulièrement riche en polyphénols (Dreosti, 2000; Durbin, 2003; Brouillard, 2003; Wang, 2003) qui sont essentiellement des stilbènes.

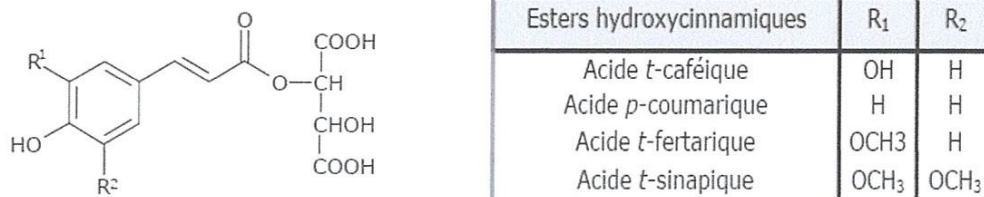
Le raisin, fruit de la vigne, contient à sa maturité principalement de l'eau et des sucres (glucose, fructose, pectine et polysaccharides). Il possède aussi d'autres composés comme, des terpènes (citrol, geraniol...), des flavones, des aldéhydes (éthanal, propanal, vanilline...), des anthocyanes (responsables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

#### I.6.4.1. Les composés non-flavonoïdes

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

### a. Les acides phénoliques

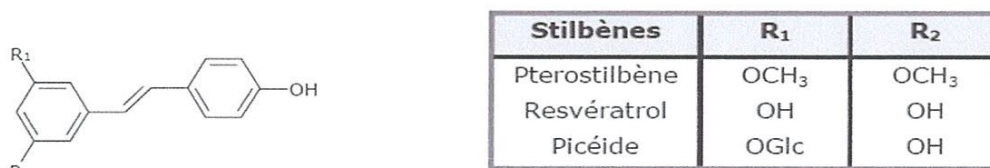
On distingue tout d'abord les dérivés de l'acide benzoïque, composés d'un squelette à sept carbones. Ils sont principalement représentés dans le raisin par l'acide gallique. D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure du type C6-C3 (Figure I.5). Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide t-caféique l'acide t-fertarique et l'acide t-sinapique (Singleton, 1978; Goetz, 1999).



**Figure I.5:** Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique présents dans les raisins.

### b. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué (Figure I.6). Les plus abondants dans le raisin sont le trans-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide. Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (LDL). Ils pourraient ainsi jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires (Frankel, 1993). On leur attribue aussi des activités chimio-préventives contre le cancer (Jang, 1997).



**Figure I.6:** Structures chimiques de quelques stilbènes.

#### I.6.4.2. Les composés flavonoïdes

Les composés flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6), correspondant à la structure de la 2-phényl-benzopyrone (Figure I.7). Ce groupe comprend principalement trois familles de composés : les flavonols, les anthocyanes et les flavan-3-ols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central (Bourzeix, 1986).

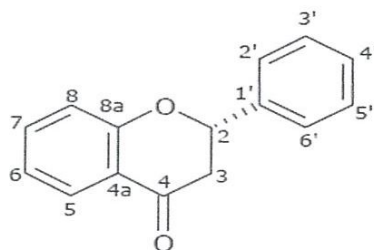
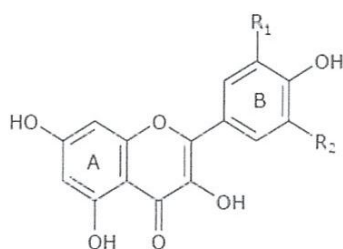


Figure I.7: Squelette d'un flavonoïde.

**a. Les flavonols**

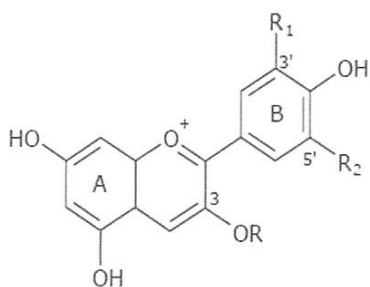
Quatre flavonols sont majoritairement présents dans le raisin: le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine (Bohm, 1998; Hertog, 1993; Vinson, 1995) (Figure I.8).



Flavonols	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Kaempferol	H	H
Quercétine	OH	H
Myricétine	OH	OH
Isorhamnétine	OCH <sub>3</sub>	H

Figure I.8: Structures chimiques de quelques flavonols.

**b. Les anthocyanes**



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

Figure I.9: Structures chimiques de quelques anthocyanidines: Forme monoglucoside, R=glucose.

Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration des raisins rouges. Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavone » généralement glucosylé en position C-3 (Ribereau-Gayon, 1968). On distingue cinq anthocyanidines dans le genre *Vitis*: La cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine (Figure I.9).

### c. Les tanins condensés (flavan-3-ols)

Les tanins condensés ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud (Bate-Smith, 1986; Hemingway, 1983). Dans le raisin, on distingue deux types de proanthocyanidines. D'une part, les procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine), libèrent de la cyanidine ; d'autre part, les prodelphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine), libèrent de la delphinidine (Czochanska, 1979).

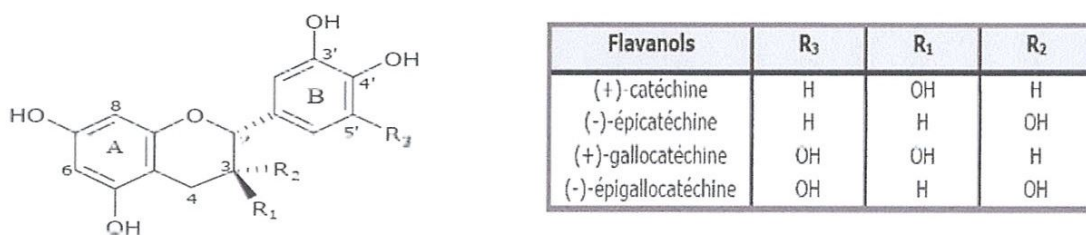


Figure I.10: Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés.

### I.6.4.3. Les coumarines

Les coumarines (figure I.11) connues aussi sous le nom de benzopyrones sont présentes à des quantités importantes chez les plantes. Elles ont été reportées comme antifongiques (Sardari, 1999), anti-inflammatoires (Lino, 1997. Garcia-Argaez., 2000), anti-malariennes (Yang, 1992), antimicrobiennes (kayser, 1997), et antitumorales ( in vitro) (Fujioka, 1999) .

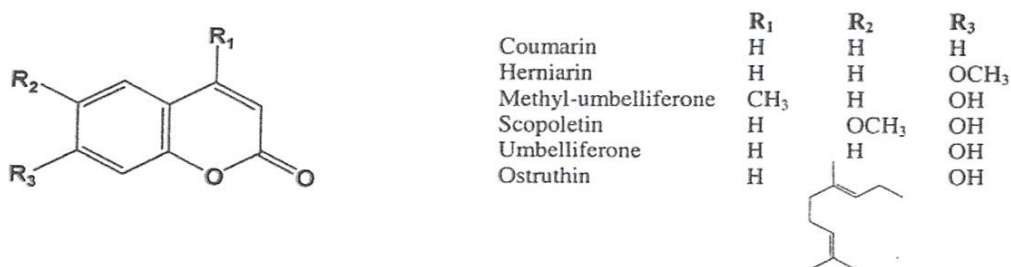


Figure I.11: Structure de quelques coumarines

## I.7. Les propriétés curatives de la vigne

Les propriétés curatives de la vigne sont largement associées aux activités biologiques du resvératrol. A ce jour, les principales activités biologiques du resvératrol répertoriées sont :

### a. *Activité anti-oxydante*

Les principales activités biologiques attribuées au resvératrol présent dans la vigne sont essentiellement dues à son activité antioxydante (Orallo, 2006). Cette capacité antioxydante évaluée par piégeage des radicaux libres et par chélation ce qui permet de piéger l'anion superoxyde qui est une espèce souvent à l'origine des dégâts oxydatifs (LDL) (Holvoet, 2004).

### b. *Le domaine cardiovasculaire*

En inhibant l'oxydation lipidique, le resvératrol réduit les dépôts de cholestérol dans les artères et diminue ainsi les accidents cardio-vasculaires (Holvoet, 2004).

### c. *L'activité anticancéreuse*

C'est dans ce domaine que les travaux effectués ont été les plus nombreux. Le resvératrol présente des propriétés anticancéreuses, grâce à sa capacité de supprimer la prolifération d'une grande variété de cellules tumorales, y compris les cancers lymphoïdes et myéloïdes; myélome multiple ; cancers du sein, prostate, estomac, côlon, pancréas, et thyroïde; mélanome; carcinome de cellules de tête et de cou; carcinome ovarien et carcinome cervical (Jang, 1997).

## I.8. Les valeurs nutritives

**Tableau I.3 :** Valeur nutritive du raisin cru.

Raisin cru (valeur nutritive (g) pour 100g)			
eau : 80,54	cendres totales : 0,48	fibres : 0,9	valeur éner. : 69 kcal
protéines: 0,72	lipides: 0,16	glucides: 18,10	sucres simples : 15,48
oligo-éléments (mg)			
calcium : 10	fer : 0,36	magnésium : 7	phosphore : 20
potassium : 191	cuivre : 0,127	sodium : 2	zinc : 0,07
vitamines (mg)			
vitamine C : 10,8	vitamine B1 : 0,069	vitamine B2 : 0,070	vitamine B3 : 0,188
vitamine B5 : 0,050	vitamine B6 : 0,086	vitamine B9 : 0 µg	vitamine B12 : 0,00 µg
vitamine A : 66 UI	rétinol : 0 µg	vitamine E : 0,19 µg	vitamine K : 14,6 µg
acides gras (g)			
saturés : 0,054	mono-insaturés : 0,007	poly-insaturés : 0,048	cholestérol : 0 mg

### **I.9. Utilisations de la vigne**

Il y a les fruits raisin de table, le jus de raisin bien sûr, mais aussi les eaux de vie, l'huile de pépin de raisin, le vinaigre, les colorants à base d'anthocyanes, les tanins de pépins et évidemment tous les produits utilisés dans les cosmétiques. La vigne est aussi utilisée dans la phytothérapie traditionnelle, la production des confitures grâce au raisin.

### **I.10. Conclusion**

A l'issue de ce travail, nous pouvons conclure que la vigne est une plante méditerranéenne très répandue. Elle comporte plusieurs espèces dont la plus importante est *Vitis vinifera* non seulement pour ses fruits, mais aussi pour la production du vin et ses vertus thérapeutiques. Vu toute cette importante quantité produite en Algérie, il serait judicieux de faire une recherche sur l'effet antioxydant de cette plante qui pourrait remplacer les conservateurs chimiques dans l'industrie.



## *Chapitre II*

## *Généralités sur l'extraction des polyphénols totaux et leur activité antioxydante*

### **II.1. Introduction**

La préoccupation pour la qualité et la sécurité des aliments, occupe une grande place tant industrielle que sociale avec les règlements pour le niveau de toxicité, et la volonté d'accroître la préférence pour les produits «naturels» par opposition aux substances synthétiques. En outre, la croyance populaire qui présente ce qui est «naturel» comme bon, fournit une incitation positive au développement de l'industrie des produits naturels, en particulier dans les aliments, les aromatisants, les produits de parfumerie, et le secteur pharmaceutique. Il ne fait aucun doute que la sécurité des producteurs et des consommateurs est désormais devenue une exigence majeure de tout produit ou procédé.

Dans cette partie du travail, nous allons évoquer des généralités sur les différentes étapes mises en place pour l'extraction de polyphénols à partir de plantes naturelles, ces polyphénols jouant le rôle d'antioxydant naturel.

### **II.2. Extraction des polyphénols**

Généralement avant de subir une extraction, les plantes doivent être broyées plus ou moins finement afin d'augmenter la surface spécifique et par suite leur réactivité. Donc pour faciliter la mise en solvant de notre matière première et s'assurer d'un bon rendement cette dernière devrait être broyée.

L'extraction des composés bioactifs peut être décrite comme étant un phénomène de transfert de masse où les solides solubles, contenus dans des structures végétales, migrent dans le solvant jusqu'à l'équilibre. Il existe plusieurs méthodes d'extraction des composés phénoliques à partir des sarments de la vigne comme l'extraction conventionnelle par solvant, l'extraction par eau chaude, l'extraction par fluide supercritique, etc.

#### **II.2.1. L'extraction conventionnelle par solvant**

L'extraction conventionnelle par solvant est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des composés phénoliques. De nombreux paramètres d'extraction doivent être pris en compte pour l'optimisation de cette méthode: le type et la concentration du solvant organique, la température, le temps d'extraction et le rapport solvant/solide (ratio).

**a. La nature du solvant**

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de la nature du solvant sur le contenu phénolique, le choix du solvant est une étape clé de l'extraction. On pourrait utiliser plusieurs solvants organiques tels l'acétone, le méthanol, l'éther diéthylique, le n-butanol, l'isopropanol ou l'éther etc.

**b. La concentration du solvant**

L'eau est généralement ajoutée au solvant d'extraction tel que l'éthanol ou le méthanol afin d'améliorer l'extraction des composés phénoliques polaires. Une étude sur les valeurs théoriques de l'hydrophobicité des composés phénoliques, ainsi que ceux de certains solvants organiques a montré que le méthanol et l'éthanol mélangés avec de l'eau, sont les solvants les plus appropriés pour l'extraction des composés phénoliques (<http://docnum.univ-lorraine.fr>)

**c. La température et le temps**

La température est un accélérateur d'extraction, elle augmente la solubilité des composés phénoliques dans le solvant. Toutefois, en raison de la sensibilité des composés phénoliques à la chaleur, une température trop élevée peut conduire à leur décomposition et leur dégradation. Egalement, le temps d'extraction joue un rôle capital sur le rendement de l'extrait.

**d. Le rapport solvant/solide (ratio)**

Il définit le rapport volume de solvant utilisé par la masse de la plante en poudre qui sera mélangé pour la mise en œuvre du procédé d'extraction. Ce rapport est un facteur influent sur l'atteinte de l'équilibre de transfert des solubles.

**II.2.2. La filtration**

La filtration est une technique de séparation qui permet de séparer un constituant solide mélangé à un constituant liquide.

**II.2.3. La distillation sous vide**

L'évaporateur rotatif (ou rotavap, ou rotavapor) est un appareil utilisé en chimie afin de distiller rapidement des solvants, dans le but de concentrer partiellement ou pour concentrer à sec (on enlève tout le solvant) une solution ou une suspension. Le principe de cet appareil est basé sur la distillation simple sous vide, qui permet d'éliminer rapidement de grandes quantités

de solvant. La solution est mise en rotation dans un ballon adapté pour éviter des bulles d'ébullition trop grosses ou mousseuses, pour augmenter la surface en contact avec l'air ainsi que pour éviter l'aspiration de la solution lors de la baisse de pression (grâce à la force centrifuge qui la plaque contre les parois du ballon). Ensuite, la pression est diminuée grâce, généralement, à une pompe et la solution est chauffée en fonction du solvant à éliminer pour compenser le caractère endothermique de la réaction (Figure II.1).

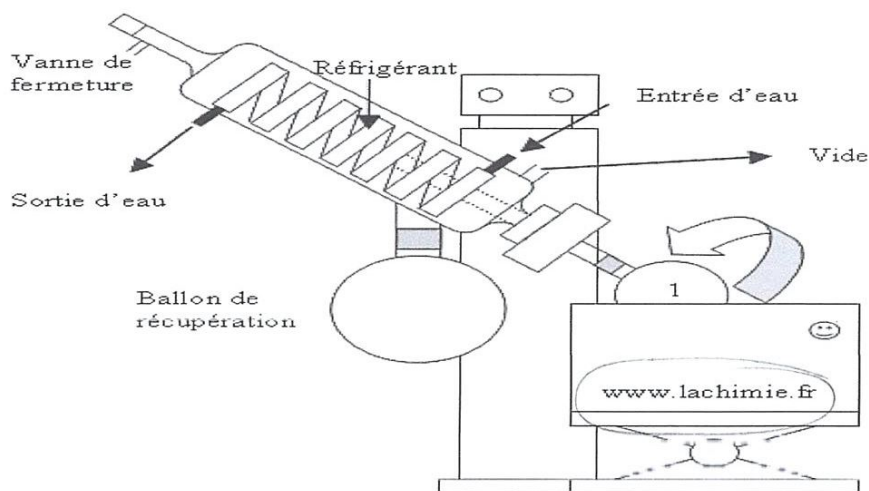


Figure II.1 : Schéma d'un évaporateur rotatif.

#### II.2.4. Congélation et lyophilisation

La lyophilisation est une opération de sublimation à basse température (-53°C). Cette autre méthode de séchage consiste à congeler l'eau liquide contenue dans le solide, puis à abaisser la pression et enfin à vaporiser la glace contenue. On obtient ainsi un solide sec, dont l'eau a été éliminée par sublimation. Ce procédé nécessite l'usage de basses températures et un niveau de vide inférieur à 100Pa.

#### II.3. Dosage des polyphénols totaux par réaction à base du Folin Ciocalteu

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses.

Le réactif colorimétrique de Folin Ciocalteu qui est un acide de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide

phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribereau, 1968).

La coloration produite, dont l'absorption maximum est à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

## **II.4. Activité antioxydante**

Les antioxydants sont des composés qui peuvent retarder, entraver ou empêcher l'oxydation des composés sensibles par différents mécanismes comme les radicaux libres, les enzymes pro-oxydantes ou chélation des ions métalliques actifs en fonction de la nature des agents oxydants (Nordberg et Arner, 2001).

### **II.4.1. Stress oxydant**

L'oxygène est essentiel à notre survie, cependant son utilisation par les cellules de notre corps n'est pas sans danger. Une partie significative (1-2 %) de l'oxygène que nous respirons est transformée en dérivés toxiques appelés radicaux libres (Boveris et Chance, 1973). Qui sont des dérivés du fonctionnement normal du corps mais qui sont aussi produits en plus grand nombre lorsque le corps est agressé (cigarette, pollution, infections, etc.). A cause de leur réactivité (ils possèdent un ou plusieurs électrons libres), les radicaux libres peuvent réagir et endommager les composantes cellulaires comme les protéines, les lipides et l'ADN (Evans et Halliwell, 1999). L'oxydation des biomolécules par les radicaux libres est impliquée dans plusieurs pathologies comme les maladies cardiovasculaires (artériosclérose) (Koetal., 1998), la cancérogenèse (Klaunig et Kamendulis, 2004), l'arthrite, l'asthme, les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, le mongolisme) (Cavin, 1999), l'arthrose, la cataracte, le diabète, la chute de cheveux et le vieillissement (Pastre et priymenko, 2007 ; Bekro et al., 2008).

Les radicaux libres sont capables de favoriser des dommages et l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour les cellules (Aravodis, 2005). Les cibles biologiques les plus vulnérables à cet endommagement oxydatif sont : l'ADN (modification des bases, cassure des brins) (Rehman et al., 1999), les protéines (modification structurales et fonctionnelles) et les lipides (peroxydation lipidique) (Hu et al., 2005).

L'incapacité des antioxydants systémiques d'atténuer l'aggravation de la formation de radicaux libres à partir des polluants environnementaux réclame d'urgence l'identification et la conception de nouvelles entités chimiques ayant une activité antioxydante.

## **II.4.2 Les principales sources d'antioxydants**

Il existe deux sources d'antioxydants l'une est médicamenteuse et l'autre alimentaire.

### **II.4.2.1 Médicaments**

Actuellement, plusieurs agents thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-hyperlipoprotéïnémiques et autres anti-hypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes (Keita, 2004 ; Niare, 2006).

#### ➤ **Le probucol**

C'est un produit utilisé pour baisser le taux sanguin du cholestérol, prévenir l'athérogenèse en agissant comme antioxydant et en supprimant la modification oxydative des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Cavin, 1999).

#### ➤ **N- Acétyl- Cystéine**

Il a un important intérêt dans les affections des poumons dues à des espèces réactives de l'oxygène. C'est un tripeptide composé de Cystéine, d'acide glutamique et de glycine, le glutathion est le transporteur d'hydrogène dans l'organisme (Patomo, 2006).

### **II.4.2.2 Aliments**

L'organisme utilise des substances naturelles, qui peuvent agir en tant qu'antioxydants (Svoboda et Hampson, 1999). Ils sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont des composés phénoliques (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,.....).

#### ➤ **La vitamine C (acide ascorbique)**

C'est un puissant réducteur contenant une forme énediol qui produit la forme dicétonique par transferts successifs de ses deux atomes d'hydrogène. Elle a été isolée et identifiée par Szent-györgyi au début du siècle. On trouve la vitamine C dans les légumes, les choux, le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi.

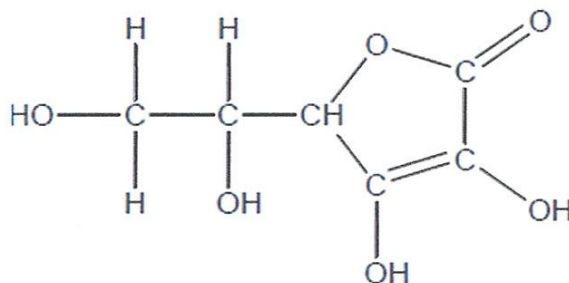


Figure II.2: Acide ascorbique

### ➤ La vitamine E ou tocophérol

Elle est dite également vitamine de la reproduction, c'est le principal agent antioxydant membranaire. Il prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes (Cavin, 1999). Elle est rencontrée dans les fruits et légumes à feuilles vertes, le lait et les graines.

### ➤ Le $\beta$ -carotène

Il est parmi les photo-protecteurs actifs, le  $\beta$ -carotène apparaît comme un piègeur efficace (Muanda, 2010). Il est capable de réagir avec l'oxygène singulet et empêche ainsi l'oxydation des constituants biologiques (Niare, 2006), il se trouve dans les légumes verts, la salade, les carottes, les épinards, l'abricot, la papaye, le melon, le potiron et d'autres fruits jaunes (Tolo, 2002).

### ➤ Les polyphénols

Les polyphénols constituent un groupe de métabolites très répandu dans les plantes. Ils se trouvent presque dans toutes les parties de la plante, à différentes concentrations où ils jouent un rôle déterminant dans le système de défense comme antioxydants (Keita, 2004).

Les polyphénols sont présents dans les fruits, les légumes, le thé et le vin et agissent soit comme chélateurs de métaux (quercétine, catéchine), soit comme capteurs de radicaux hydroxydes, superoxydes, alkoxydes, peroxydes (quercétine, rutine, kaempférol) (Keita, 2005).

## II.4.3 Méthodes de tests des antioxydants

De nombreuses méthodes ont été développées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Ces méthodes diffèrent entre elles en termes de mécanismes de réaction, substrat et antioxydant, états des réactions et la forme dont sont exprimés les résultats. Une meilleure compréhension de ces méthodes contribue à l'interprétation correcte des résultats (kholkhal, 2014 ; Chikhi, 2014). De nombreux facteurs entre en jeu, en effet, la méthode

choisie est fortement liée aux paramètres réactionnels: le solvant, le temps de réaction et le pH, etc. (Magalhaes et Coll., 2008).

La plupart des méthodes sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition " dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. Les plus répandues sont : Piégeage du radical superoxyde ( $O_2^-$ ), Piégeage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ , scavenging activity), de l'acide hypochloreux (HOCl), de l'hydroxyle (OH), le test par DPPH, le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), le test mesurant l'activité antioxydante au moyen de caroténoïdes, piégeage du ABTS (2,2'-azynobis- [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), la réduction de fer: FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), etc. Afin de choisir la bonne méthode, il faut savoir ce que l'on va mesurer et évaluer.

#### **11.4.3.1. Test de réduction du radical 1,1 diphényl 1-2-picrylhydrazyle (DPPH)**

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha, \alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyl) fut l'un des premiers radicaux libres les plus stables d'une couleur violette utilisé pour évaluer l'activité antioxydante. Par cette méthode on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piégeur des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la disparition du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration dans la solution initiale (Hellal, 2011).

Ce test, largement utilisé, est rapide et facile à réaliser; il permet de comparer un grand nombre de composés. De plus, contrairement aux autres tests, les conditions utilisées (solvants organiques et faible température) évitent l'auto-oxydation des molécules testées. Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH, pour une concentration en antioxydant donnée et en un temps donné. L' $EC_{50}$  (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH) calculée pour chaque antioxydant permet de les classer entre eux. Plus l' $EC_{50}$  est petite, plus la molécule est antioxydante (Portes, 2008).



## **II.5. Conclusion**

L'extraction des composés polyphénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ses principes actifs, elle dépend de la méthode et du solvant approprié qui permettent de préserver leurs propriétés biologiques.

Les polyphénols sont connus comme molécules antioxydantes, compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter leur profil antioxydant.

# *Chapitre III*

## Matériels et méthodes

### III.1. Matériel végétal

*mois??* Le matériel végétal utilisé est représenté par les sarments de la vigne qui ont été récoltés en 2016, dans la willaya de Guelma. La vigne est de variété muscat et ses tiges ont été séchées à l'abri de la lumière du soleil pendant quatre mois puis découpées en petits morceaux afin de faciliter leur broyage. Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction des polyphénols (Figure III.1).



Figure III.1 : Des sarments à la poudre de vigne.

### III.2. Le broyage

Pour cela, nous avons utilisé le broyeur POLYMIX PX-MFC 90 D du centre LCA (Figure III.2) dans lequel on a fait passer notre produit découpé auparavant en petits morceaux, la vitesse a été réglée à 3000 tr/min pour obtenir une poudre pas trop fine afin de faciliter le procédé de filtration par la suite. La poudre ainsi obtenue est conservée dans une boîte pour éventuelles extractions.

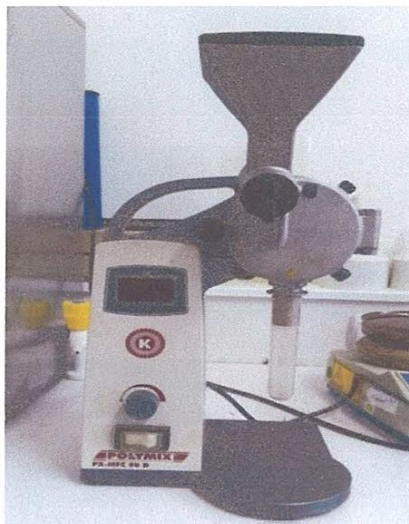


Figure III.2: Le broyeur POLYMIX.

### III.3. Procédé d'extraction de polyphénols à partir des sarments de vigne

#### III.3.1. Le screening phytochimique des polyphénols

##### Type de solvant

L'extraction des composés phénoliques à partir de matière végétale peut être effectuée en utilisant des solvants organiques (Vermerris et al., 2006). L'efficacité de l'extraction est directement liée à la compatibilité entre les composés phénoliques et le solvant utilisé, ainsi lorsque la polarité des composés est adaptée avec celle du solvant, ils seront facilement extraits. En général, le choix du solvant tient compte non seulement de son affinité avec le composé ciblé, mais aussi de sa capacité à absorber l'énergie. Les substances phénoliques des plantes sont généralement extraites en utilisant des solvants organiques tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle.

Pour le solvant d'extraction, notre choix s'est porté sur l'éthanol pour sa disponibilité, sa non toxicité et du fait qu'il soit toléré par notre organisme, vu que certains le consomment comme boisson (alcool). Certains auteurs affirment qu'il donne en outre un bon rendement.

Vu l'importance de l'eau dans l'extraction des produits polaires, un rapport eau/ éthanol: 50%-50% a été pris pour chaque extraction. Afin d'aboutir à un rendement meilleur on a joué sur les facteurs: température et durée d'extraction.

Le rendement d'extraction est limité par l'atteinte de l'équilibre, qui correspond à l'épuisement des composés phénoliques dans la matière végétale. Suite à une petite quantité de

solvant utilisé, on peut atteindre la saturation du solvant par les composés solubles et cela jouera sur le rendement de l'extraction. Pour cela, on a aussi pris en considération le paramètre ratio qui est le rapport solvant-solide afin d'optimiser notre procédé.

Comme collecte, nous avons réalisé 17 extraits en jouant sur divers paramètres qui sont : la température, le temps et le rapport masse-volume (Tableau III.1).

**Tableau III.1** : Paramètres d'extraction des 17 extraits réalisés.

Numéro de l'extrait	Quantité de poudre en (g)	Ratio en (ml/g)	Température en (°C)	Temps en (min)
01	2	25	45	20
02	4	25	45	20
03	4	25	30	30
04	4	10	30	20
05	4	25	30	10
06	4	40	30	20
07	4	40	45	30
08	4	40	45	10
09	4	10	45	30
10	4	10	45	10
11	4	25	45	20
12	4	25	45	20
13	4	25	45	20
14	4	10	60	20
15	4	25	60	30
16	4	25	60	10
17	4	40	60	20

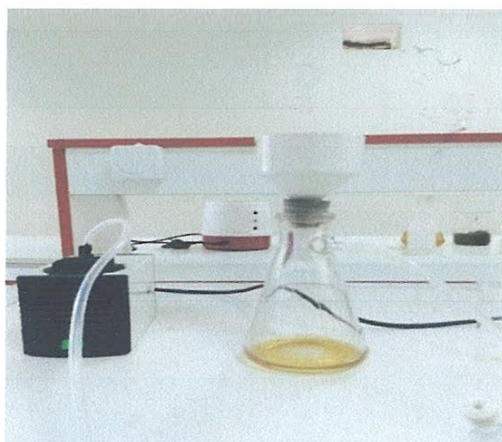
### Protocol

Nous avons procédé comme suit :

- à l'aide d'une éprouvette graduée, prélever le volume d'eau distillée et d'éthanol qu'on introduit dans un ballon,
- peser la quantité de matière (poudre de sarment de la vigne) grâce à la balance de précision, sachant que le bain huile de silicone,
- ajuster le chauffage de la plaque pour atteindre la température voulue au sein du bain,
- raccorder grâce à un support un système de refroidissement,
- régler l'agitation à 1000tr/min et lancer le chronomètre,
- vérifier la température de temps à autre durant tout le procédé,
- une fois le temps écoulé, arrêter l'agitation et récupérer le mélange qui va passer à la filtration.

#### III.3.2. La filtration

Comme illustré sur la figure III.3, le mélange récupéré est filtré à travers un entonnoir à plaque filtrante en utilisant une fiole à vide. I.e filtrat (liquide) obtenu va ensuite passer à une distillation dans un évaporateur rotatif.



**Figure III. 3** : Le montage de filtration

#### III.3.3. La distillation sous vide

Notre extrait est mis dans un ballon à rotavap (Rotavapor -210), le ballon introduit dans un bain ne dépassant pas une température de 40°C et en créant un vide près de 20 mbar. Ainsi la phase organique est évaporée, condensée au niveau du système de refroidissement et récupérée dans le ballon de récupération. A la fin notre extrait est dépourvu d'éthanol.

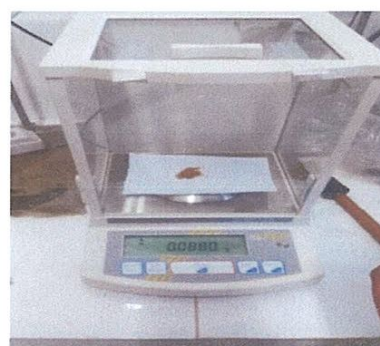


**Figure III.4 :** Le montage de la distillation sous vide avec le rotavap.

### III.3.4. La lyophilisation

Chaque extrait aqueux ainsi obtenu est étiqueté et congelé pendant 24 heures puis placé dans un lyophilisateur pour devenir une poudre sèche, la durée de lyophilisation a varié de 48h à 72h. La lyophilisation a été réalisée au laboratoire de chimie appliquée avec le lyophilisateur alpha 2.5L MANIFOLD (Marque Christ) (Figure III.5)

Le produit est enfin récupéré sous forme de poudre généralement non homogène (Figure III.6). Cette poudre est alors écrasée et pesée grâce à la balance de précision (Figure III.7) et conservée au réfrigérateur pour éventuelles analyses.



**Figure III.5 :** Lyophilisation

**Figure III.6 :** Le produit après Lyophilisation

**Figure III.7 :** La pesée du produit sur la balance

### III.4. Dosage des composés phénoliques totaux: Le test TPC

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin Ciocalteu. Ce dosage a été effectué au centre de recherche, laboratoire de chimie appliquée (LCA) de Guelma à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible à double faisceaux de type SHIMADZU UV-1800. La technique à double faisceaux nous a aidé à éliminer l'absorbance du blanc et à donner directement la densité optique de l'échantillon. Pour s'assurer que les résultats

sont fiables, la lecture de l'absorbance de chaque composé phénolique a été réalisée en triplicata, la moyenne des trois densités optiques mesurées a été déterminée.

### III.4.1. Principe

Comme il a été évoqué précédemment, le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Cet essai est basé principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réaction de Folin) dans une solution alcaline (Vuorela., 2005). La coloration produite, dont l'absorption maximum est à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

Brièvement, les extraits ont été ajoutés au réactif de Folin-Ciocalteu dilué, les solutions ont été mélangées et incubées pendant quelques minutes. Après une incubation, une solution de Bicarbonate de Sodium  $Na_2CO_3$  a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre UV-Vis.

### III.4.2. Mode opératoire

Le contenu des composés phénoliques de nos extraits est estimé par la méthode de Folin Ciocalteu (Adesegun et al., 2007). Pour chaque extrait on a procédé de la sorte :

- 250µl d'extrait de l'échantillon,
- 500µl d'une solution de bicarbonate de sodium (0.01M),
- Ajouter 4ml d'eau distillée,
- 250µl du réactif de Folin Ciocalteu (dilué 50% avec de l'eau distillée)
- Incuber pendant 25 min à une température ambiante
- Lire l'absorbance à 725 nm,
- Le total des composés phénoliques est déterminé selon l'équation :

$$T=C.V/M \quad (III-1)$$

T : Représente le total des composés phénoliques (g Equivalent Acide Gallique / 100 g de matière sèche de la plante)

C : Concentration d'extrait éthanolique équivalente à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml)

V : le volume d'extrait éthanolique (ml)

M : poids de la matière sèche de la plante (g).



### III.4.3. Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique et exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec de la plante ou 100 g de la matière sèche de la plante.

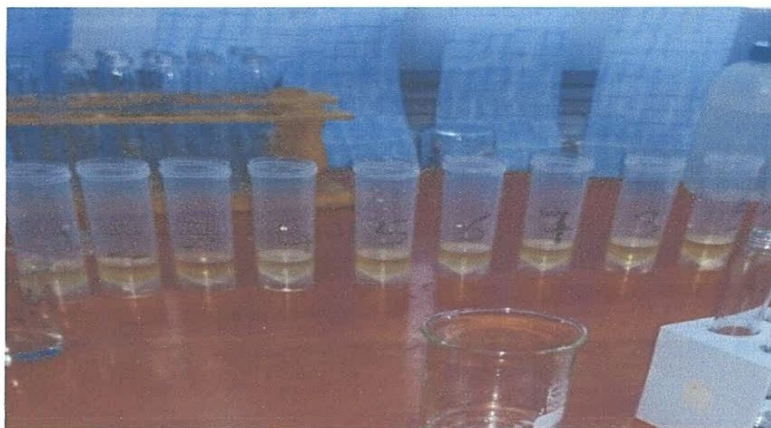


Figure III.8 : La mise en solution des extraits.

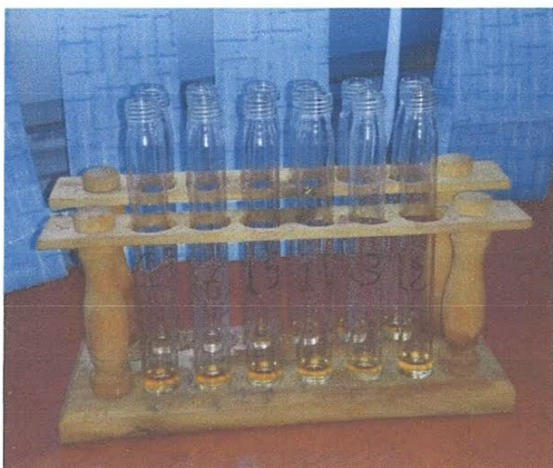


Figure III.9 : Avant la mise du Folin.



Figure III.10 : Après la mise du Folin.

### III.5. Activité antioxydante des extraits hydroalcooliques

La capacité du composé phénolique à piéger les radicaux libres, en leur transférant son atome d'hydrogène est le facteur clé de l'activité antioxydante de ce type de molécules. Selon les connaissances actuelles, le mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène (TAH) est le

mécanisme qui intervient principalement dans les réactions des radicaux avec les polyphénols. Le mécanisme TAH correspond à la dissociation homolytique d'une liaison O-H.

### III.5.1. Test DPPH

Le radical libre DPPH a permis l'estimation de l'activité antioxydante des composés isolés et identifiés, dont le DPPH est un radical synthétique de couleur violette qui vire vers le jaune quand il est capté par les produits polyphénoliques testés. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité anti radicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule (Madi., 2010).

### III.5.2. Principe

La réduction du radical libre DPPH<sup>•</sup> (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (MOLYNEUX, 2004). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (MAATAOUI *et al.*, 2006), voir la figure (III.11).

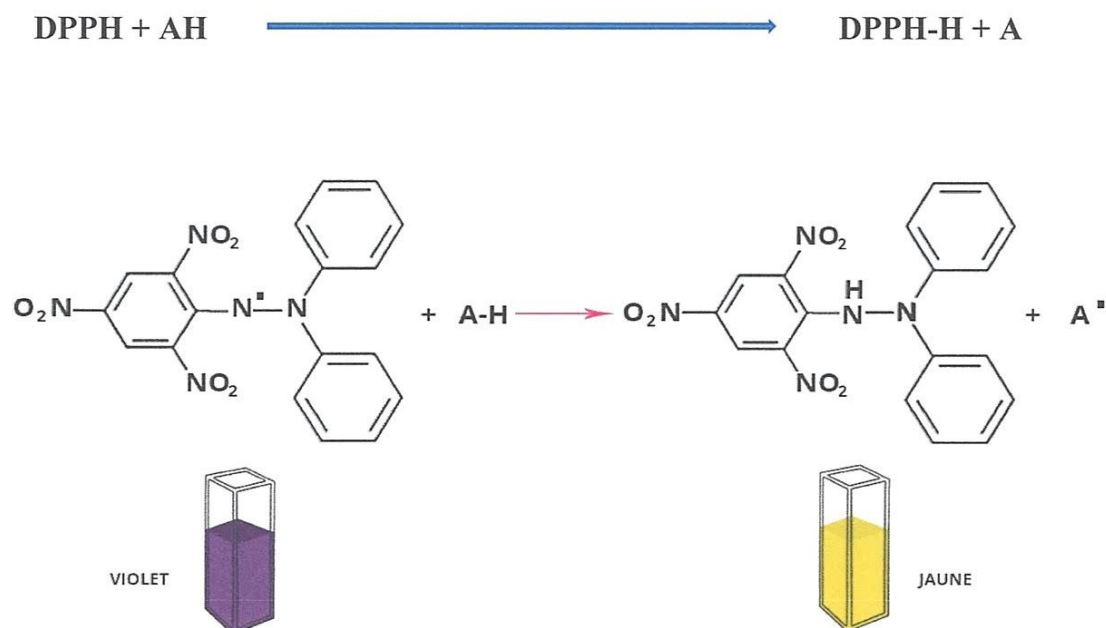


Figure III.11 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (CONGO, 2012).

### **III.5.3. Mode opératoire**

L'activité antiradicalaire de cet extrait est mesurée selon la méthode décrite par (ES –Safi et al., 2007).

- 2,5ml de l'extrait à tester
- 2,5ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%)
- La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide gallique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon et pour chaque concentration, le test est répété 3fois.
- L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\%d'activité\ antiradicalaire = [(Abs\ contrôle - Abs\ échantillon)/Abs\ contrôle] \times 100 \quad (III-2)$$

Abs: absorbance

- La valeur de l'EC50 est déterminée graphiquement par la régression linéaire.

# *Chapitre IV*

## Résultats et discussion

### IV.1. Introduction

A partir des sarments de *Vitis vinifera*, différents extraits ont été obtenus, les principales analyses effectuées sur ces extraits consistaient en la détermination de la quantité de polyphénols totaux et de l'activité biologique ciblée par notre étude qui est l'activité antioxydante de cette plante. Pour cela, nous avons déterminé une analyse quantitative des polyphénols totaux (TPC) présents dans les sarments de la vigne et le test d'activité antioxydante par DPPH pour le meilleur extrait obtenu d'après notre optimisation.

### IV.2. Extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols à partir des tiges de *Vitis vinifera* a été réalisée en mettant 4g de matière sèche dans un ballon avec l'ajout de l'éthanol (50%). Le mélange a été mis dans un bain d'huile avec une vitesse d'agitation de 1000 tr/min.

L'optimisation des 03 paramètres d'extraction a été effectuée suivant le tableau suivant:

**Tableau IV.1:** Optimisation des paramètres d'extraction.

Niveau	Température (°C)	Temps (min)	Ratio (ml/g)
01	30	10	10
02	45	20	25
03	60	30	40

#### IV.2.1. Optimisation des conditions d'extraction

L'extraction est l'une des étapes cruciales pour la recherche et l'étude des métabolites secondaires des plantes. En général, l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques est influencée par de multiples paramètres. Il fallait donc, étudier les paramètres d'extraction afin de déterminer les meilleures conditions qui permettent d'avoir les meilleurs rendements.

Dans cette étude, 17 extraits ont été réalisés en tenant compte de l'effet de plusieurs paramètres d'extraction: la température, le temps d'extraction et le rapport solvant-solide comme mentionné dans le tableau IV.1. Ces trois paramètres ont été systématiquement étudiés pour obtenir le rendement en TPC maximal. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau IV.2.

#### IV.2.2. Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction a été calculé à partir de l'équation:

$$R\% = (\text{Poids de l'extrait obtenu}) / (\text{poids de la plante utilisée}) * 100. \quad (\text{IV-1})$$

Les résultats des rendements obtenus sont illustrés dans le tableau IV.2.

**Tableau IV.2:** Poids des extraits obtenus après lyophilisation et leur rendement.

Essai	Température (°C) (X <sub>1</sub> )	Temps (min) (X <sub>2</sub> )	Ratio (g/ml) (X <sub>3</sub> )	Poids de l'extrait solide (g)	Rendement (%)
1	45	20	25	0,3324	8,31
2	45	20	25	0,3203	8,07
3	30	30	25	0,1553	3,88
4	30	20	10	0,1426	3,56
5	30	10	25	0,0756	1,89
6	30	20	40	0,1863	4,65
7	45	30	40	0,2022	5,05
8	45	10	40	0,1982	4,95
9	45	30	10	0,1524	3,81
10	45	10	10	0,1145	2,86
11	45	20	25	0,3216	8,04
12	45	20	25	0,3275	8,18
13	45	20	25	0,3257	8,14
14	60	20	10	0,2468	6,17
15	60	30	25	0,2719	6,79
16	60	10	25	0,2430	6,07
17	60	20	40	0,3156	7,89

#### IV.3. Dosage des polyphénols totaux

L'estimation quantitative des polyphénols totaux en équivalent d'acide gallique, des extraits hydroalcooliques des sarments de *Vitis vinifera* a été réalisée par la méthode de Folin Ciocalteu (Adesegun et al., 2007). L'acide gallique a été utilisé comme standard et l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 725 nm.

Les polyphénols, classe des métabolites secondaires, sont majoritairement extraits par des solvants de moyenne à forte polarité. Parmi ces solvants, nous avons choisis celui qui présente une polarité moyenne à savoir l'éthanol ainsi que l'eau dont la polarité est la plus élevée. L'acide gallique a été utilisé comme standard pour tracer une courbe d'étalonnage à différentes concentrations. Les quantités des polyphénols correspondantes ont été rapportées en grammes

équivalent de l'étalon utilisé par gramme de matière sèche de la plante (g Equivalent Acide Gallique / g de matière sèche de la plante) ((mg EGA/ g MS).

### IV.3.1. Calcul des polyphénols totaux

Les gammes de concentration d'acide gallique utilisées pour le dosage des polyphénols et les absorbances respectives à 725 nm, sont représentés dans le tableau IV.3.

**Tableau IV.3** : Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.

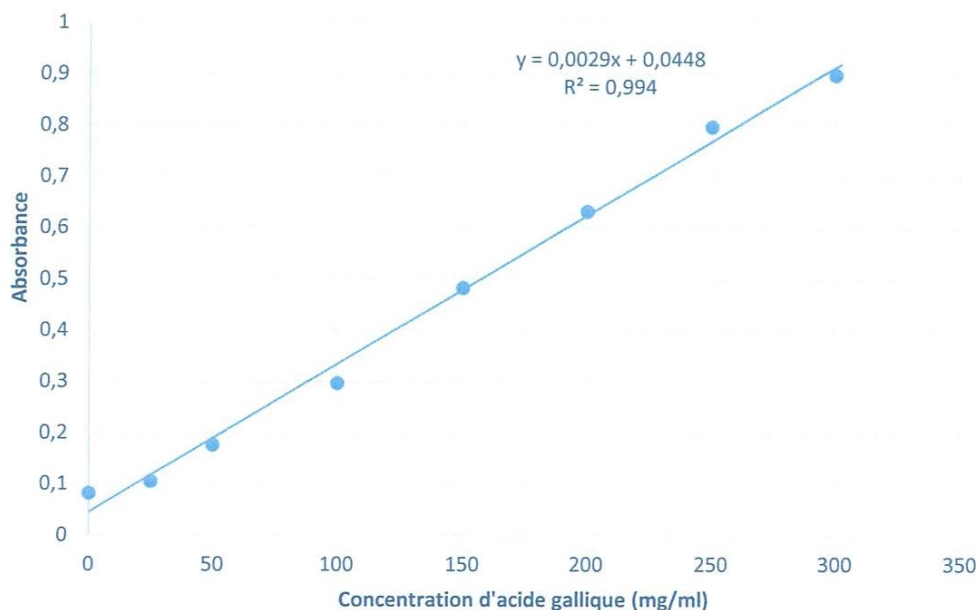
Acide gallique (mg/ml)	Abs
0	0,082
25	0,105
50	0,177
100	0,297
150	0,483
200	0,632
250	0,797
300	0,898

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été calculée en utilisant l'équation :

$$y = 0,002x + 0,044 \quad (IV-2)$$

où : y est l'absorbance, quand à x représente les concentrations.

Le facteur de régression était de 0,994 (Figure IV.1).



**Figure IV. 1** : Courbe d'étalonnage en termes d'acide gallique.

### IV.3.2. Les résultats expérimentaux par TPC

#### IV.3.2. 1. Variation des composés phénoliques selon la méthode d'extraction

Les données expérimentales obtenues à partir des 17 essais illustrés dans le tableau IV.2 ont été analysées. Les valeurs mesurées sont alors comparées à celles prédites, afin de mesurer la validité du model choisi. On peut observer que la concentration des TPC obtenue par l'extrait hydroéthanolique est assez élevée, ceci est dû à la large gamme des phénols que le mélange d'éthanol et eau peut dissoudre (Tomsone et al., 2012).

Les résultats ont pu montrer que la teneur en TPC varie entre 425 et 784 mg EAG/g MS (Tableau IV.3), ceux-ci ne font que confirmer que les facteurs (ratio, température et temps d'extraction) ont une influence sur l'extraction de ces composés phénoliques.

**Tableau IV.4:** Les résultats expérimentaux et prédits d'extraction des polyphénols en terme de TPC.

Essai	Température (°C) (X1)	Temps (min) (X2)	Ratio (g/ml) (X3)	TPC (Y1) expérimental (mg EGA/g)	TPC(Y2) prédit (mg EGA/g p <sup>a</sup> )
1	30	20	40	539	552,12
2	30	10	25	425	420,23
3	30	20	10	446	450,62
4	30	30	25	539	525,99
5	45	20	25	630	629
6	45	30	40	712	711,88
7	45	10	10	525	525,12
8	45	20	25	631	630
9	45	20	25	634	633
10	45	20	25	630	629
11	45	20	25	633	632
12	45	10	40	695	686,62
13	45	30	10	572	580,38
14	60	20	40	784	779,38
15	60	30	25	638	642,75
16	60	20	10	601	587,88
17	60	10	25	655	667,99

P<sup>a</sup> : poudre.



#### IV.4. Les résultats de TPC obtenus par optimisation

Les données collectées à partir de l'extraction expérimentale ont été centrés parallèlement par trois répétitions puis analysées par le logiciel Origin 6.0. Une analyse univariée reposant sur l'analyse de la variance à deux facteurs a été utilisée. Les différences ont été considérées comme statistiquement significative si  $p < 0,05$ , hautement significative si  $p < 0,01$  ou fortement significative si  $p < 0,001$ . Les valeurs mesurées sont alors comparées à celles prédites, afin de mesurer la validité du model choisi (Figure IV.2).

##### IV.4.1. Analyse des variances (analyse statistique)

###### *Le modèle mathématique*

L'introduction des paramètres d'extraction, nous a permis de déterminer les valeurs des coefficients significatifs et la fonction qui régit l'extraction des TPC à partir des sarments de la vigne. Le modèle mathématique de la présente étude peut être représenté par la relation suivante .

$$Y = 630 + 91,13X_1 + 20,13X_2 + 73,25X_3 - 32,75 X_1X_2 + 20,5 X_1X_3 - 7,5 X_2X_3 - 49,63X_1^2 + 16,25 X_2^2 + 20,75X_3^2. \quad (IV-3)$$

L'analyse de la variance de la régression du model, montre que le model est très significatif ( $P < 0,0001$ ).

###### *Le coefficient de détermination ( $R^2$ )*

Dans la présente étude, le coefficient de détermination ( $R^2$ ) du model est égale à 0,9931 (Figure IV.2), ce qui signifie qu'uniquement 1% des variations ne sont pas expliquées par le model.

De plus, la valeur du coefficient de détermination ajustée est de l'ordre de :  $R_{aj} = 0,9843$  ce qui est assez élevé pour confirmer la haute significativité du model.

###### *Effet interaction*

Les analyses statistiques ont montré que l'intensité de l'interaction entre le facteur du temps et la température d'extraction est la plus efficace avec un P de 0,0007, suivit par l'interaction entre le facteur de la température et le ratio avec un P de 0,0056. Notez que l'interaction entre le temps et le ratio n'était pas significative avec  $P = 0,229$ .

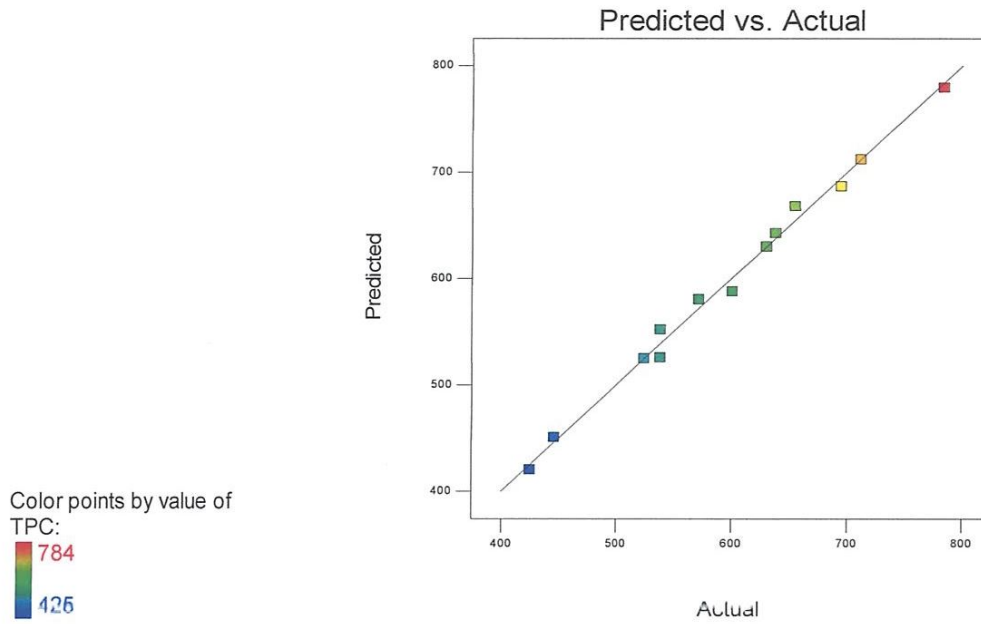


Figure IV.2: Comparaison entre les résultats expérimentaux et prédits.

#### IV.4.2. Analyse des interactions

##### Temps - température d'extraction

Les résultats obtenus de l'étude d'interaction entre la température et le temps d'extraction des polyphénols (TPC) sont représentés dans la figure IV.3.

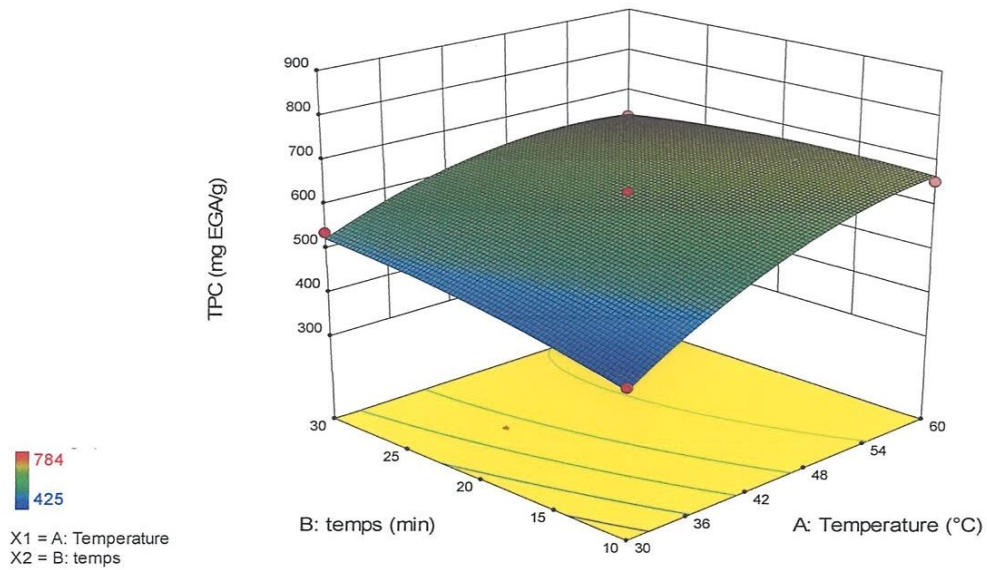


Figure IV.3: Surface de réponse pour le temps et la température d'extraction dans le cas: ratio=25.

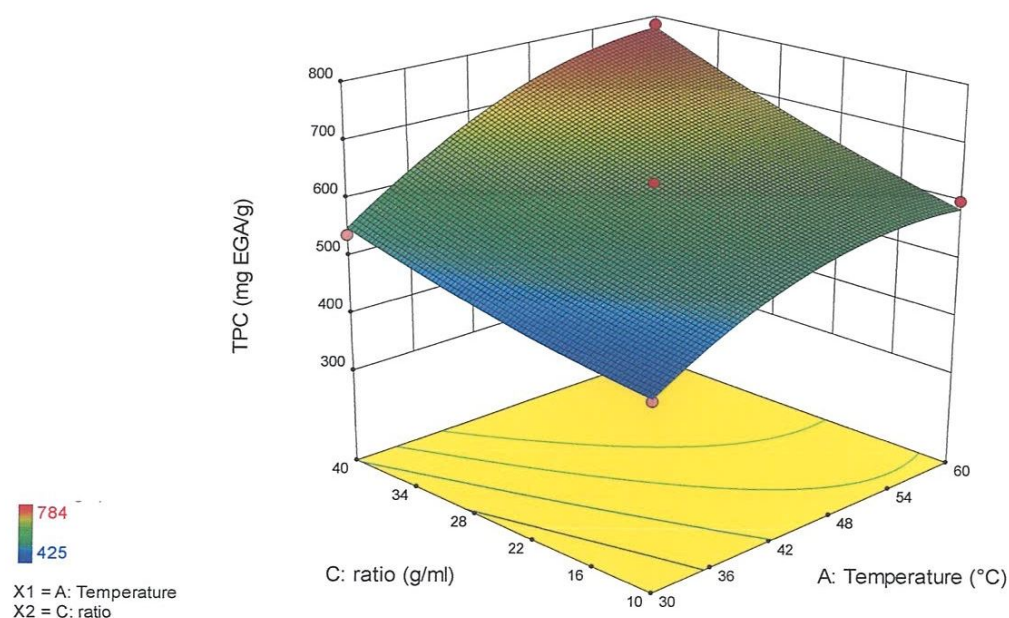
Le couple temps –température d’extraction influence d’une manière significative et joue un rôle important dans l’extraction des polyphénols avec  $P=0,0007$ . Les résultats montrent que la teneur en TPC augmente de 425 à 539 mg EGA/g lorsque le temps varie de 10-30 minutes. En revanche le TPC augmente de 425 à 655 mg EGA/g lorsque la température varie de 30 à 60°C, si le ratio est fixé à 25 ml/g.

### Ratio- température d’extraction

Les résultats obtenus de l’étude d’interaction entre la température d’extraction, le ratio et le taux d’extraction des CPT sont représentés dans la figure IV.4.

Les résultats obtenus montrent que le couple température d’extraction et ratio présente un effet significatif avec  $P=0,0056$ . Si on augmente la température et le ratio et on fixe le temps à 20 minutes simultanément, la teneur en TPC augmente de 476 à 784 mg EGA/g.

Notez que la température et le ratio augmentent proportionnellement avec le taux d’extraction des polyphénols (TPC). Cette augmentation peut s’expliquer par la puissance d’une température élevée qui offre un transfert rapide de l’énergie de la matrice au solvant, ce qui permet la dissolution des composants à extraire. Cette température améliore la solubilité des composés phénoliques et diminue la viscosité des extraits, accélérant ainsi la libération et la dissolution de ces composés (Kappe et al., 2013).

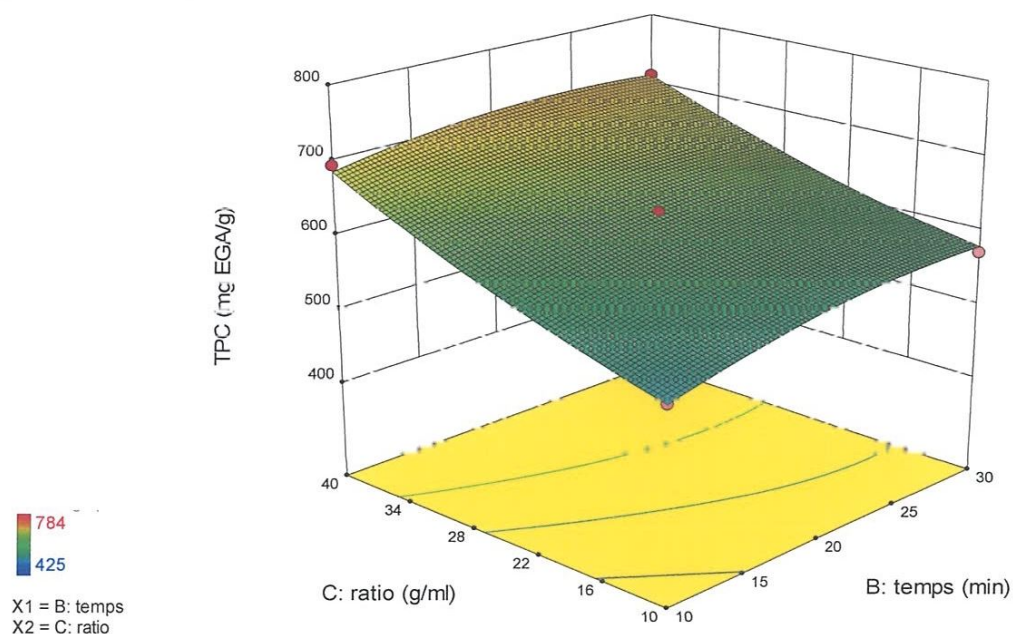


**Figure IV.4:** Surface de réponse pour la température et le ratio pour une durée d’extraction de 20 minutes.

### Ratio-temps d'extraction

En effet, un ratio faible donne un faible rapport de distribution à l'équilibre, la quantité solvatée (polyphénols et interférents) est largement inférieure à celle restante dans la phase solide (tige de vigne), par conséquent, le rendement d'extraction en terme de polyphénols sera faible (Expériences 03, 07, 13 et 16).

Par contre, un ratio fort donne un rendement plus important (Expériences 06 et 14), bien que l'extraction puisse être toujours faible car plus de liquide peut fournir plus d'oxygène dissout en provoquant l'oxydation des polyphénols, surtout pour un temps d'extraction très long et un solvant aqueux très riches en oxygène dissout, ce qui explique la signifiante des deux interactions (Shi et al., 2003).



**Figure IV.5 :** Surface de réponse pour le ratio et le temps d'extraction à une température de 45°C.

#### IV.4.3. Paramètres optimaux

Donc cette étude a montré qu'un modèle polynomiale d'ordre deux peut modéliser correctement le phénomène d'extraction. Il semble évident que les conditions expérimentales optimales qui conduisent à une maximisation de l'extraction des polyphénols sont obtenues au sein du domaine expérimental.

La poudre des tiges de *Vitis vinifera* a subi une nouvelle extraction par la méthode du Folin Cioclatu dans les conditions d'extraction optimale identifiées par l'utilisation du logiciel origin 6.0, et les résultats sont représentées dans le tableau IV.4.

**Tableau IV.5:** Conditions optimales d'extraction des polyphénols avec la méthode optimisée.

Température (°C)	Ratio (ml/g)	Temps (min)	Valeur TPC prédite mg EAG/1g de poudre.	Valeur prédite mg EAG/1g de plante.	Valeur expérimental mg EAG/1g de poudre	Valeur expérimentale mg EAG/1g de plante.
59,89	39,87	13,26	784,30	61,88	779,29	61,48

#### IV.5. Comparaison des résultats obtenus par méthode optimisée et par méthode conventionnelle

Les résultats ont montré que la valeur de TPC obtenue par l'extraction des sarments de vigne avec la méthode standard pendant 24 heures était beaucoup inférieure à celle obtenue par la méthode optimisée pendant 13 minutes (374 mg EAG/g de poudre lyophilisée et de 9,61 TPC mg EAG/g de plante) (Tableau IV.5), ce qui valorise la méthode optimisée vu le gain énorme de temps avec un rendement d'extraction beaucoup meilleur.

**Tableau IV.6 :** Comparaison entre les résultats obtenus par extraction optimisée et extraction conventionnelle.

	Méthode expérimentale conventionnelle	Méthode expérimentale optimisée
Température (°C)	Ambiante	59,89
Ratio (ml/ g)	10	39,87
Temps (min)	1440	13
Rendement (%)	2,51	6,17
TPC mg EAG/1 g de poudre.	374	779,29
TPC mg EAG/1 g de plante.	9,61	61,48

#### IV.6. Evaluation de l'activité antioxydante des sarments de la vigne

##### IV.6.1. Test de l'activité antiradicalaire

L'activité antioxydante des sarments de *Vitis vinifera* vis-à-vis du radical libre DPPH a été évaluée spectrophotométriquement à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune autrement dit le suivi de sa cinétique de décoloration. Pour cela notre extrait brut (extrait réalisé dans les conditions optimisées) a été

préparé dans l'éthanol à 96% de telle façon à obtenir une concentration de 1mg/ml. La solution mère de DPPH a subit une série de dilution pour obtenir une gamme de concentration allant de 10 à 350 µg/ml ou 0,01 à 0,35 mg/ml (cas des plantes médicinales).

Un volume de 50 µl de notre extrait exprimé en g/l est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanoïque du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. La mesure de la décoloration à 517 nm correspondante à la réduction des radicaux du DPPH dans le milieu réactionnel est faite à partir d'un témoin positif (acide gallique) à différentes concentrations et dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

#### IV.6.2. Détermination de l'EC50

La valeur de l'EC50 exprimée en micro grammes/ml a été déterminée graphiquement à partir de la courbe de régression de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon testé. Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) d'inhibition (Tableau IV.6).

La figure ci-dessous montre l'activité anti-radicalaire (effet scavenger) de l'extrait contre le radical DPPH à différentes concentrations. Une relation proportionnelle est observée entre la concentration en antioxydant et le pourcentage d'inhibition du radical DPPH.

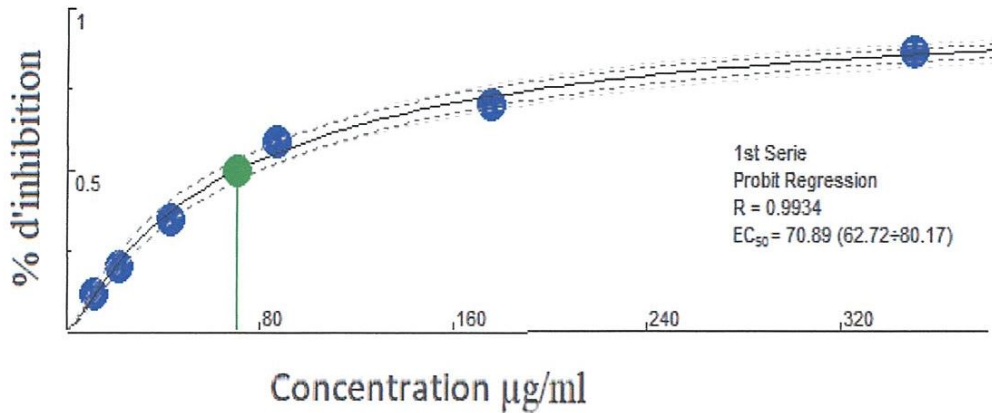
Les résultats de l'activité antioxydante ont montré que l'extrait hydroalcoolique des sarments de *Vitis vinifera* a montré une haute valeur d'activité antioxydante, on suppose que les extraits présentant plus d'activité antioxydante sont plus riches en composés polyphénoliques doués d'une activité de piégeage des radicaux libres. Cette activité est strictement liée à la structure du composé polyphénolique, en effet de nombreuses études ont établi la relation entre la structure et l'activité antiradicalaire des polyphénols (Amic et al.,2003 ; Marfak, 2003 ; Sokol-Letowska, 2007).

**Tableau IV.7 : Valeurs des pourcentages d'inhibition.**

Concentration µg/ml	100 %INB
350	86,63
175	70,46
87	58,88
43.5	34,59
21.75	19,93
10.87	11,64

Après incubation des extraits avec le DPPH, on a remarqué une augmentation de l'activité antiradicalaire proportionnelle à l'augmentation de la concentration (Figure IV.6) L'activité anti-radicalaire augmente avec la concentration, dans la gamme allant de 0-0,035 µg/ml, avec un pourcentage d'inhibition variant de 11,6% jusqu'à 86,6%. L'importance de

l'activité antioxydante de l'extrait pourrait être attribuée aux produits majoritaires présents dans ce dernier.



**Figure IV.6 :** Courbe de pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait étudié.

La forte activité anti radicalaire signalée pour l'extrait étudié peut être attribuée aux fortes teneurs en composés phénoliques, notamment les stilbènes très connus par leur capacité de piégeage des radicaux libres. Erol (2010), rapporte que les polyphénols sont des donneurs efficaces d'atome d'hydrogène au radical DPPH en raison de leurs structures chimiques idéales.

# *Conclusion*



# Conclusion

Une estimation quantitative des polyphénols totaux en équivalent d'acide gallique des extraits hydroalcooliques des sarments de *Vitis vinifera* a été réalisée par la méthode de Folin Ciocalteu (Adesegun et al, 2007), l'acide gallique a été utilisé comme standard.

Dans cette étude, 17 extraits ont été réalisés en tenant compte de l'effet de plusieurs paramètres d'extraction: la température, le temps d'extraction et le rapport solvant-solide. Ces trois paramètres ont été systématiquement étudiés pour obtenir le rendement en TPC maximal. Les quantités des polyphénols correspondantes ont été rapportées en grammes équivalent de l'étalon utilisé par gramme de la matière sèche de la plante (g Equivalent Acide Gallique /g de matière sèche de la plante).

Dans cette étude et via le logiciel Origin 6.0, on a pu montrer qu'un modèle polynomiale d'ordre deux peut modéliser correctement le phénomène d'extraction. En effet les résultats ont montré que la valeur de TPC obtenue par l'extraction des sarments de vigne avec la méthode standard pendant 24 heures était beaucoup inférieure à celle obtenue par la méthode optimisée pendant 13 minutes (374 mg EAG/g de poudre lyophilisée et de 9,61 TPC mg EAG/g de plante).

Selon les résultats on a distingué que l'extrait hydroalcoolique des sarments de *Vitis vinifera* était très riche en composés polyphénoliques. En effet, on a pu montrer que la concentration des TPC obtenue par l'extrait hydroéthanolique était assez élevée, ceci est dû à la large gamme de phénols que le mélange d'éthanol et eau peut dissoudre.

La teneur en polyphénols n'est pas stable, et se diffère d'une plante à une autre et aussi entre les fleurs, les sarments et les feuilles de la même plante. Donc le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre et d'un organe à un autre, cela peut être dû à plusieurs facteurs: facteurs climatiques, patrimoine génétique, le stade de développement de la plante et son degré de maturation, la période de sa récolte, la durée de stockage, la méthode d'extraction et la méthode de quantification des composés d'intérêt biologique (Aganga, 2001 ; Pedneault et al.,2001 ; Fiorucci, 2006).

L'activité antioxydante de l'extrait des sarments de *Vitis vinifera* a été évaluée par le test antiradicalaire qui consiste à estimer la capacité du DPPH à piéger les radicaux libres. L'étude a révélé que l'extrait possède une excellente activité antioxydante, il s'agit d'un extrait

contenant un grand nombre de composés différents. Il est donc très probable qu'ils contiennent des composés qui, une fois purifiés, peuvent présenter une activité comparable à celle de substances de références.

Malheureusement l'utilisation de nos extraits comme conservateurs dans les tomates conserves et la faisabilité des analyses correspondantes ne nous ont pas été facilités ni au niveau de l'usine de Amor ben Amor ni au niveau de l'usine belabidi Guelma.

Enfin l'ensemble de ces résultats obtenus ouvre des perspectives d'utilisation de cette plante pour différents usages et ne constitue qu'un début dans le domaine de la recherche des substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires afin de pouvoir confirmer les activités mises en évidence (tests de conservation dans différents produits alimentaires, étude quantitative et qualitative par HPLC,.....).

*Références  
bibliographiques*

- Adesegun S.A., Fajana A., Orabueze C.I., Coker H.A.B. (2007). Evaluation of Antioxidant Properties of *Phaulopsis Fascisepsepala* CBCI (Acanthaceae). *Oxford Journal*. 6 : 227-213.
- Amic D., Davidic-Amic D., Beslo D., Trinajstic. (2003) Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA*. 76 (1) : 55-61.
- Aravodis. (2005). Antioxydant potential of African medicinal plants. *African journal of Biotechnology*, 4(2) :128-133.
- Babar et al., Babar Ali M., Hahn E.J., Paek K.Y. (2007). Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures., *Molecules*. 12: 607 -621.
- Bate-Smith E. C. (1986). Astringency in foods. *Food Processing* 23, 1954. 124-35.
- Bekro J.A.M., Konan K.M., Békro Y-A., Djié Bi M.G., Zomi Bi T.J., Mambo V., Boua B.B . (2008). Phytochemicals of the extracts of four medicinal plants of Cote D'ivoire and assessment of their potential antioxidant by thin layer chromatography. *Euro Journal Publishing*, 24(2), 219-228.
- Benkhadimallch R et Kismoun S. (2014). Etude phytochimique et biologique de la plante stureja calamintha . Mémoire du Master Université de constantine-1
- Bloor Bloor, J.M.G. (2001). Effects of light on the performance of shade - tolerant tropical rainforest tree seedlings . PhD thesis. University of Cambridge, Cambridge.
- Bohm., Hempel J. (1998). Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 37(2) :147-63
- Bourzeix M., Weiland D., Heredia N. (1986). A study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other by-product of the wine. *Bulletin de l'O.I.V* 669-670, 1173-254.
- Boveris., Chance. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide : properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, 134: 357-716.
- Brouillard, R. (1986). The flavonoids Advances. In : research since 1993. Harborne J B, Chapman and Hall, London. 525-538 p

- Cavin A. (1999). Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires, *Tinospora crispa* (Menispermaceae) ; *Merremia emarginata*(convolvulaceae) et *Orphea enneandra* (Annonaceae). Thèse de doctorat. Lausanne, 243p.
- Chikhi I. (2014). Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest D'Algérie. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen.121p.
- Czochanska Z., Yeap Foo L., Porter L. J (1979). Composition changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry* 18, 1819-22.
- Dreosti I.E. (2000). Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, 16, 692-694.
- Durbin M.L., Lundy K.E., Morrell P.L., Torres-Martinez C.L., Clegg M.T. (2003) .Genes that determine flower color: the role of regulatory changes in the evolution of phenotypic adaptations. *Mol.Phylogenet.Evol.*, 29, 507-518.
- Duthle G.G., Gardner P.T., Kyle J.A. (2003). Plant polyphenols : are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc* , 62 : 599-603
- Es-safi R.I., Sadok A., Khalaf N., Fathallah D.M. (2007) A strategy for high -level expression of soluble and functional human interferon alpha as a GST-fusion protein in *E. coli*. *Protein Eng Des Sel*. 20: 201–209.
- Evans P., Halliwell B. (1999). Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria.*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 28 : 19-40.
- 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. FerricReducingAbility of Plasma
- Frankel, E. N. (1993). In Search of Better Methods to Evaluate Natural Antioxidants and Oxidative Stability in Food Lipids. *Trends Food Sci. Technol.* 4, 220-225.
- Fujioka Furimi K., Fujih H., Okabe H., Mihashi K., Nakano Y., Atsunage H., Katano M., Mori M. (1999). Antiproliferative constituents from umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and falcariindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica* *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 47(1): 96-100.

- GALET P. (2000). Précis de viticulture, JF impression, Saint Jean de Vedas.
- Goetz G, 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. *Phytochemistry* 52, 759-67.
- Garcia-Argaez A., Delgado H.P., Velazquez G., Martinez-Vazquez M. (2000). Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model *Planta Med.* 66: 279-281.
- Gomez-Caravaca A.M., Gomez - Romero M., Arraez - Roman D., Segura - Carretero A., Fernandez- Gutierrez A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 41: 1220 -1234.
- Harborne J.B., Williams C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55 : 481-504.
- Hatano T., Kusuda M., Inada K., Ogawa T.O., Shiota S., Tsuchiya T., Yoshida T. (2005). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66:2047-2055.
- Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Van de Putte B. (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wine and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1242-6.
- HELLAL Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.
- Hemingway R. W., McGraw G. W. (1983). Kinetics of acid-catalysed cleavage of procyanidins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 3(4), 421-35.
- Hu S.G., Li L., He X.W. (2005). Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of Chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1062:31-37.
- HUGLIN P. et SCHNEIDER C. (1998). Biologie et écologie de la vigne, Tec & doc, Paris.
- Holvoet P. (2004). Oxidized LDL and coronary heart disease., *Acta Cardiol.*, 59, 479-484.

- Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W., Fong H.H., Farnsworth N.R., Kinghorn, A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. (1997) .Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218-220.
- Kappe, C. O., B. Pieber, et al. (2013). "Microwave effects in organic synthesis: myth or reality?" *Angewandte Chemie International Edition* 52(4): 1088-1094.
- Kayser O. (1997). "Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*." *Planta Med.*, 63(6): 508–10.
- Keita, A., Coppo, P., Aké, A.L., Diakité, C., Diallo, D., Diarra, N., Koné, N., Pisani, L., Tapo, M., Wallet, O.F. (1993). *Plantes et remèdes du plateau Dogon*. Ed. CRMT/PSMTM, Bandiagara, Pergia, Italie.156p
- Kholkhal F. (2014). *Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de thymus cialiatu ssp coloratus et ssp eucaliatus*. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen.164p
- Klaunig et Kamendulis. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44: 239-67.
- Langcake P. (1981). Disease resistance of *Vitis* spp.v and the production of stress metabolites resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin,  $\alpha$ -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* 9, 77-86.
- Lino C.S., Taveira M.L., Viana G.S.B., Matos F.J.A. (1997). Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents:coumarin and umbelliferone *Phytother. Res.* 11: 211-215.
- Luthria D.L., Mukahapadhyay S. (2006). Influence of sample preparation on Assay of phenolic acids from eggplant *.Agric .Food. Chem.*, 54:41-47.
- Maataoui B.S., Hunyeur A., Hilalis. (2006). Activités antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du Figuier de Barbarie (*Opuntia Ficus Indica*). *Lebanese Science Journal*. 7(1) : 3-8.
- Madi A. (2010) *Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques*. Thèse de Magister de l'Université de Constantine.

Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties, *Analytica Chimica Acta*, Vol.613; pp01-19

Marfak A. (2003). Radiolyse Gamma des flavonoides, étude de leur réactivité avec les radicaux. Thèse de doctorat. Université de Limoges.

Martin S., Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51:304-315.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarim J .Sci .Technol*, 26, 211 – 219.

Muanda FN. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, Metz, 239 p

Niare A. (2006). Etude de la phytochimie et des activités pharmacologiques de *Syzygium guineense* Willd. (Myrtaceae). Thèse de doctorat. Université de Bamako. 88p.

Nordberg J, Arner ES. (2001): Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*; 31 (11): 1287-1312.

Orallo F. (2006). Comparative Studies of the Antioxidant Effects of Cis- and Trans-Resveratrol., *Curr. Med. Chem.*, 13, 87-98.

Pastre et priymenko. (2007) .Intérêt des antioxydants de l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Med. Vet.*, 158(4)180-189.;

PORTES E. (2008). Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes. Propriétés Photochimiques et antioxydants. Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. Thèse de doctorat Université Bordeaux I. p 44-46.

Redoyal L.M., Beltram M., Saicho R., Olmedo D.A. (2005). Bioorganic and medicinal chemistry Letters. *Fitoterapa*, 15:4447-4450.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice -Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.



Ribérrreau G.P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. 1968. Edition Dunod, Paris. p 254.

Sardari S. Mori Y., Horita K., Micetich R.G., Nishibe S., Aneshtaleb M. (1999). Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins Bioorg. Med. Chem. 7(9): 1933-1940.

Shi, J., J. Yu, et al. (2003). "Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution." *J. Food Agric. Environ* 1(2): 42.

Singleton V.L., Ortorfer R., Lamnela R.M. (1999). Analyse of total phenols and other oxidation substrate and antioxydants by mean of Folin Ciocalteu reagent. Academic press, 5:152-178.

Svoboda Hampson J.B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Departement, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, Uk., KA6 5HW.

Tolo A.D. (2002). Etude des activités biologiques de la toxicité des écorces de racine de *Securidaca longepedunculata* Fres (Polygalaceae). Thèse Pharmacie. Université de Bamako, 110p.

Tomsone, L., Kruma, Z., Galoburda, R. (2012). Comparison of Different Solvents and Extraction Methods for Isolation of Phenolic Compounds from Horseradish Roots. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 6(4): 903–908

Vermerris, W. and R. Nicholson. (2006). "Phenolic compound biochemistry." *New York: Publisher Springer*: 151-196.

Vinson J.A., Dabbagh Y.A., Serry M.M, Jang J. (1995). Plant flavonoïds, especially tea flavonoïds, are powerful antioxydants using in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43 :2800-2802.

Vuorela S. (2005). Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki.

Wang H., Race E.J., Shrikhande A.J. (2003). Anthocyanin transformation in Cabernet Sauvignon wine during aging. *J.Agric.Food Chem.*, 51, 7989-7994.

Waterhouse A. L., Lamuela-Raventos R. M. (1994). the occurrence of piceid, a stilbene glycoside in grape berries *Phytochemistry*, 37, 571-573.

Wickens A.P. ( 2001). Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*, 128 : 379-391.

Yang Y.Z. , Ranz A., Pan H.Z., Zhang Z.N., LIN X.B. Meshnick S.R. (1992). Daphnetin: a novel antimalarial agent with in vitro and in vivo activity *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(1): 15-20.

#### Webographie

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitis\\_vinifera](https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitis_vinifera)

[http://alger-roi.fr/Alger/agriculture\\_algerienne/textes/vigne\\_ofalac.htm](http://alger-roi.fr/Alger/agriculture_algerienne/textes/vigne_ofalac.htm)).

[www.wikipedia.org/wiki/viticulture\\_en\\_Alg](http://www.wikipedia.org/wiki/viticulture_en_Alg)

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitis\\_vinifera](https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitis_vinifera)

[https://www.benchaabane.com/Le-raisin-est-l-un-des-fruits-les-plus-energetiques\\_a1465.html](https://www.benchaabane.com/Le-raisin-est-l-un-des-fruits-les-plus-energetiques_a1465.html)).

(<https://www.espritsante.com/articles/raisin-bio-vitis-vinifera-bio>).

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Raisin>

[https://www.memoireonline.com/07/08/1340/m\\_dosage-biochimique-composes-phenoliques-datte-miel-sud-algerie22.html](https://www.memoireonline.com/07/08/1340/m_dosage-biochimique-composes-phenoliques-datte-miel-sud-algerie22.html)

<http://chimactiv.agroparistech.fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>

<http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/introduction-%C3%A0-la-spectroscopie-uv-visible>

<http://www.gerbeaud.com/jardin/fiches/vigne-chasselas-muscat.php>

[http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC\\_T\\_2015\\_0183\\_M\\_HIRI.pdf](http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC_T_2015_0183_M_HIRI.pdf)