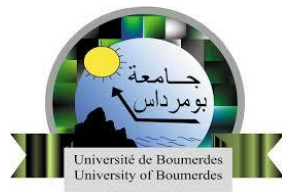


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique
Université M'Hamed Bougara de Boumerdes



Faculté des sciences

Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

**Évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de la
vigne rouge *Vitisvinifera***

Réalisé par :

M^{elle} KHALEM Amina

Devant le jury :

M^{me} AISSAT Faiza MAA (UMBB) Présidente

M^{me} AGOUAZI Ounissa MAB (UMMTO) Promotrice

M^r ARAB Karim Professeur (UMBB) Examineur

Année Universitaire 2016/2017

Remerciements

Avant tout, je remercie ''Allah'' le tout puissant de m'avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et ma a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce travail. Merci de m'avoir éclairé le chemin de la réussite.

Je voudrais témoigner ma profonde reconnaissance à Mme AGOUAZI Ounissa (UMBB), Pour avoir encadré ce travail. Je la remercie pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses conseils ainsi que pour ses qualités relationnelles.

Un grand merci aux membres du jury M^{me} AISSAT Faiza(UMBB) et M^r ARAB Karim (UMBB) pour avoir accepté d'évaluer ce travail

À tous les étudiants de Mastère 2 de la promotion 2017.

Enfin ,Je remercie toutes les personnes qui ont participées de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel et je souhaite que cemémoire puisse être un support assez valorisantet profitable pour ceux qui auront à l'utiliser.

Merci à ma famille et à mes amis.

DEDICACE

Je dédie ce travail à mes parents qu'ils trouvent ici toute
ma gratitude

Pour leur soutien tout le long de mes études

A mes Sœurs et mes Frères

À mes Amis A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour.

Figure 1 : aspect de <i>Vitisviniferaslvestris</i>	03
Figure 2 : cycle végétatif et reproducteur de la vigne.....	06
Figure 3 : structure et nomenclature générale des principaux esters hydroxycinnamiques.....	08
Figure 4 : structure générale du trans-resvératrol.....	09
Figure 5 : structure générale de la 2–phényl-benzopyrone.....	09
Figure 6 : structure des anthocyanes présents dans le raisin.....	10
Figure 7 : structure des unités monomériques constitutives des tanins condensés présents dans le raisin.....	11
Figure 8 : structure générale des tanins condensés des variétés de raisin <i>Vitisvinifera</i>	11
Figure 9 : structure générale des flavonols.....	12
Figure 10 : schéma du principe de l'appareil D'HPLC.....	14
Figure 11 : région de la récolte de vigne rouge.....	16
Figure 12 : protocole d'extraction des flavonoïdes.....	18
Figure 13 : appareil d'extraction des huiles essentielles soxhlet.....	19
Figure 14 :protocole de dosage des flavonoïdes.....	20
Figure 15 : étapes de préparation des boites d'antibiogrammes.....	23
Figure 16 : étapes de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des molécules.....	24
Figure 17 : réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	26
Figure 18 :diagramme circulaire représente le rendement desdifférentes fractions.....	30
Figure 19 :courbe d'étalonnage de la Quercétine.	31
Figure20 : teneurs en flavonoïdes pour les fractions et l'huile de <i>Vitisvinifera</i>	32
Figure 21 : chromatogramme des fractions flavonoidique et d'huile de vigne rouge.....	33
Figure 22 : profil chromatographique HPLC de la phase acétate d'éthyle.....	34
Figure 23 : profil chromatographique HPLC de la phase butanolique.....	34
Figure 24 : profil chromatographioque HPLC de l'extrait de la phase aqueuse.....	35
Figure 25 : profil chromatographioque HPLC de l'extrait d'huile des pépins.....	35
Figure 26 : diamètres d'inhibition obtenus sur les souches testé.....	40
Figure 27 : résultats du virage de la couleur d'huile et des fractions flavonoidiques...	43
Figure 28 : variation du pouvoir anti-radicalaire en fonction des concentrations.....	43
Figure 29 : résultats de l'évaluation de pouvoir réducteur des différentes fractions de l'extrait flavonoidique et d'huile des pépins.....	45
Figure 30 :évaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Vitisvinifera</i> par la méthode de FRAP.....	45

Figure 31 :cinétique de la décoloration de β -carotène induite par les différentes fractions et l'huile..... 47

Liste des abréviations

BHT :butylhydroxytoluène.

CI50 :concentration inhibitrice à 50%.

CIVC :comité Interprofessionnel du Vin de Champagne.

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl .

DO:densitéoptique.

FRAP :ferric Reducing Ability of Plasma.

Fig :figure.

HPLC :high performance liquid chromatography .

INRA :institut national de la recherche agronomique.

NCCLS :national comite for clinicallaboratory standards.

OMS: Oorganisation mondiale de la santé.

O.P.C :proanthocyanidols.

RMN :résonance magnétique nucléaire.

UFC:unité formant des colonies .

Planche 1 :zones d'inhibitions d'ensemble des phases acetate, butanolique ,aqueuse.....	39
Planche 2 : zones d'inhibitions des extraits d' huiles essentielles de pépinsdevigne.....	40

Tableau 1: classification de la vigne rouge.....	03
Tableau 2: souches microbiennes testées dans l'activité antimicrobienne.....	15
Tableau 3: estimation de la sensibilité des souches.....	25
Tableau 4: rendement en flavonoïdes des trois phases obtenues.....	30
Tableau 5: diamètre de zone d'inhibition en mm en présence de quelques antibiotique	36
Tableau 6: diamètres moyens des zones d'inhibition en mm de la fraction acétate d'éthyle.....	37
Tableau 7: diamètres moyens des zones d'inhibition en mm de la solution mère de la phaseacétated'éthyle.....	37
Tableau 8: diamètres moyens des zones d'inhibition de phase butanolique brut.....	38
Tableau 9: diamètres moyens (mm) des zones d'inhibition de phase butanolique.....	38
Tableau 10: diamètres moyens (mm) des zones d'inhibition de phase aqueuse brut.....	39
Tableau 11: diamètres moyenne (mm) des zones d'inhibition de l'huile.....	39
Tableau 12: valeurs des IC50 trouvées pour les différentes fractions etl'huile.....	44

Introduction	01
Chapitre I : synthèse bibliographique.....	03
I.1. La Vigne Rouge.....	03
I.1.3. Importance de la vigne.....	04
I.4. Les Exigences de la vigne.....	04
I.1.5. Développement de la vigne.....	04
I.1.6. La composition de la vigne rouge.....	06
I.2. Les polyphénols.....	07
I.2.1. Biosynthèse des composés phénoliques.....	07
I.2.2. Principales classes des polyphénols de raisin.....	08
I.2.2.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes.....	12
I.2.2.3.1. Activité antioxydante	12
I.2.2.3.2. Activité antibactérienne des flavonoïdes.....	13
I.3. Méthodes et caractérisation des substances bioactives	13
I.3.1. Spectroscopie par Infrarouge (IR).....	13
I.3.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	13
Chapitre II : matériel et méthodes.....	15
II.1. Matériel.....	15
II.1.1. Matériel biologique.....	15
II.1.2. Matériel non biologique.....	16
II.2. Méthodes.....	16
II.2.1. Récolte de la plante	16
II.2.2. Séchage et broyage.....	16
II.3. Méthode d'extraction.....	17
II.3.1. Extraction des flavonoïdes.....	17
II.3.2. Extraction des huiles à partir des pépins de vigne rouge.....	19
II.4. Caractérisation de l'extrait de vigne rouge.....	20
II.4.1. Dosage quantitatif des flavonoïdes.....	20
II.4.2. Analyse par infrarouge.....	21
II.5. Etude de l'activité antimicrobienne des molécules bioactives.....	21
II.5.1. Revivification des souches microbiennes.....	21
II.5.2. Préparation de l'inoculum.....	22
II.5.3. Préparation des boîtes d'antibiogrammes.....	22

II.5.4. Préparation des disques d'antibiogrammes.....	22
II.5.5. Préparation de la solution mère et les dilutions.....	22
II.6. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>vitisvinifera</i>	25
II.6.1. Piégeage par le radical libre DPPH	25
II.6.2. Méthode de réduction du FRAP.....	27
II.6.3. Test de blanchissement par la β carotène.....	28
II.7.Caractérisation des extraits de vigne rouge par HPLC.....	29
Chapitre III : Résultats et discussion.....	30
III.Rendement	30
III.1.1.Rendement des fractions flavonoïdiques et leur aspect	30
III.2.1.Le rendement d'extraction de l'huiles des pépins.....	31
III.2.2.Les caractérisation organoleptique de l'huile.....	31
III.2. Caractérisation spectrale de dosage des flavonoïdes.....	31
III.3.Caractérisation des fractions flavonoidique et d'huile par infrarouge.....	32
III.4.Chromatographie en phase liquide à haute performance des extraits de vigne.....	34
III.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne	36
III.5.1.1 Résultats de l'Antibiogramme.....	36
III.5.2. Résultats de l'activité antimicrobienne de vigne rouge.....	37
III.5.2.1. Diamètres des zones d'inhibitions de phase acétate d'éthyle.....	37
III.5.2.1.1. Diamètres des zones d'inhibitions de la solution mère de la phase d'acétate ...	37
III.5.2.2.Diamètres des zones d'inhibitions des extraitsflavonoidique phase butanolique..	38
III.5.2.2.1. Diamètres des zones d'inhibitions de la solution mère de la phase butanolique.....	38
III.5.2.3. Diamètres des zones d'inhibitions des extraitsflavonoidique fraction auqueuse...	39
III.5.2.4. Diamètres des zones d'inhibitions de huile des pépins.....	39
III.6.Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Vitisvinifera</i>	42
III.6.1.Pouvoir anti radicalaire par la méthode de DPPH.....	43
III.6.2. Résultats par la méthode de réduction de fer.....	45
III.6.3. Résultats de test de blanchissement par la β carotène.....	46
Conclusions.....	49
Référence bibliographiques.....	50

Annexes

Les végétaux constituent des sources très importantes d'antioxydants dont l'efficacité est reconnue aussi bien pour la santé humaine que dans l'industrie agroalimentaire. Parmi ces végétaux, le raisin possède une spécificité par les composés phénoliques antioxydants qu'il renferme, comme les flavonols (quercétine), les stilbènes (resvératrol), les anthocyanes (cyanidine et autres) ou encore les tanins (catéchine). Sa composition phénolique a été étudiée par plusieurs auteurs Bail *et al* (2008) ; Spranger *et al* (2008) Giovanelli et Brenna (2007) Revilla et Ryan (2000) Yi *et al* (1997). Ce fruit a fait l'objet de nombreuses études à travers le monde montrant sa richesse en produits antioxydants Breksa *et al* (2010) ; Mulero *et al* (2010) Esna-Ashari *et al* (2008) Davalos *et al* (2005). Ces composés, par leurs propriétés antioxydantes conséquentes, pourraient diminuer les risques de thromboses et d'athérosclérose Freedman *et al* (2001).

L'activité biologique de la vigne et ses produits serait surtout associée au resvératrol et aux flavonoïdes comme la quercétine et les oligo -pro anthocyanidines . Des études suggèrent que les polyphénols présents dans la vigne et ses produits (raisin, extrait de pépins et vin désalcoolisé) auraient un effet positif sur plusieurs facteurs de risques des maladies cardiovasculaires . Ils amélioreraient la composition des lipides du sang en réduisant notamment, le taux de « mauvais cholestérol » (LDL). Ils inhiberaient l'agrégation des plaquettes sanguines, ils diminueraient la pression sanguine et ils réduiraient le stress oxydatif de l'organisme . Les flavonoïdes de la feuille de la vigne rouge, sont très étudiés dans le traitement de l'insuffisance veineuse chronique (IVC). La feuille de la vigne est aussi utilisée comme défensive pour traiter l'ulcération . Toutefois très peu de travaux scientifiques en Algérie sont consacrés à l'étude de la composition chimique et les propriétés biologiques de la vigne rouge. C'est dans cette optique que s'inscrit ce travail dont l'objectif est la valorisation de cette plante (*Vitis vinifera*) issu de la région de Benchécao de la wilaya de Médeaq qui passe inévitablement par des criblages phytochimique. En évaluant ses propriétés antimicrobiennes par la méthode de diffusion sur milieu gélosé et on caractérisant qualitativement et quantitativement les activités antioxydantes des extraits flavonoidiques de ses et l'huile extraite à partir de ses pépins.

Afin d'atteindre cet objectif, nous suivrons une démarche en trois parties : La première partie est une étude bibliographique synthétisant les connaissances sur la vigne rouge , ainsi que sur leur propriétés biologiques et leur biosynthèse ; la deuxième partie est une description du matériel végétal ainsi que du matériel et des méthodes utilisés au cours de l'étude ; la troisième

partie rapporte les résultats obtenus et leur discussion et enfin, une conclusion générale qui mettra l'accent sur les principaux résultats obtenus.

I. La Vignerouge

I.1.ClassificationLa vigne rouge ou le raisin appartient à la famille des Vitacées (*Vitaceae*), précédemment appelée *Ampélidacées* largement cultivée pour ses fruits en grappes. Sa classification est présenté dans (Tableau 1).

Tableau 1:Classification de la vigne rouge Huglin et Schneider (1998).

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyta (Angiospermae)
Classe	Dicotylédones
Ordre	Rhamnales
Famille	Vitaceae
Genre	<i>Vitis</i>
Espèce	<i>Vitisvinifera</i>

I.2.Description botanique

La vigne (*Vitisvinifera*)est une plante grimpante pérenne à croissance indéterminée, capable de se multiplier par voie sexuée, par bouturage ou par greffage This et *al*(2003).Les plants de vigne cultivés sont constitués d'une structure permanente, formée par des feuilles à nervure palmée comportent cinq lobes principaux plus ou moins découpés, et sont en forme de cœur à la base. Les fleurs sont très petites, verdâtres et regroupées en grappes ,le tronc et les racines pérennes, qui durent toute la vie de la plante et qui s'accroît chaque année. Une autre partie, aérienne et souterraine, repousse annuellement; elle est récupérée à la récolte sous la forme de grappes.



Source (Deluc ,2004)

Figure1 :aspect de *Vitisvinifera*slvestris.

I.3. Importance de la vigne

I.3.1. Dans le monde

C'est le deuxième fruit le plus cultivé au monde. En effet, selon un rapport de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture FAO (2013) concernant le marché mondial du fruit, le raisin représente 14,6 % de la production mondiale de fruits juste après l'orange. Selon le rapport de mois de juin 2014 du département de l'agriculture des USA (USDA), la production mondiale de raisin de table est en croissance, ainsi l'année 2013/2014 est supérieure d'environ un demi-million de tonnes par rapport à la Campagne précédente, pour atteindre 16,5 millions de tonnes. La Chine est le principal marché responsable de cette croissance (www.gifruit.com). Malgré sa grande importance économique dans le contexte mondial, la vigne n'est pas un modèle d'étude privilégié, et est finalement assez peu étudiée en regard de son importance économique. La vigne ne mobilise pas des moyens de recherche importants permettant d'aboutir rapidement à des avancées fondamentales dans la connaissance du végétal.

I.3.2. En Algérie

La vigne est partie à la conquête du monde, elle est implantée partout où elle trouve le climat physique et humain propice à son développement. Comme dans tous les vieux pays de civilisation méditerranéenne. L'Algérie offre par ses caractéristiques pédoclimatiques (nature du sol et ensoleillement) les conditions optimales pour la production de raisin. Les régions de production de raisins sont surtout situées au Nord du pays. On citera parmi ces régions : Arzew, Mostaganem, Mascara, Sidi-Belabeset Tlemcen à l'ouest, Boufarik, Médéa, Blida, Chéraga et Tipaza pour le centre. Selon les estimations de la FAO, le vignoble algérien s'étend sur une superficie de 69220 ha pour une production de 650000 tonnes (FAOSTAT data, 2010, 2011; <http://faostat.fao.org>).

I.4. Les Exigences de la vigne

La vigne a besoin d'un climat favorable avec notamment des exigences quant au rayonnement solaire, à la température et également à l'eau Briche (2011).

I.4.1. La lumière : la vigne est une plante de jour long, qui nécessite un ensoleillement entre 1500 et 1600 heures/an Simonet *al* (1992).

I.4.2. La température : la température joue un rôle primordial : en effet, le développement optimal de la vigne est limité par des seuils thermiques aux différents stades du cycle végétatif, notamment d'avril à septembre quand la vigne est active Briche (2011).

I.4.3. Source hydrique : l'alimentation hydrique de la vigne doit être suffisante pour la croissance et le développement de la plante. Cependant, une faible alimentation hydrique est souhaitable durant la maturation, ce qui favorise l'accumulation de sucres dans les baies

Attia(2007).

I.4.4. Exigences édaphiques :

la vigne est une culture dont on attend des performances au travers d'une valorisation des milieux pauvres du point de vue agronomique. Selon Huglinet Schneider (1998), la vigne s'adapte à une large gamme de sol, depuis les sols secs, pauvre jusqu'aux sols argilo-calcaires.

I.5. Développement de la vigne

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

I.5.1. Le cycle végétatif

Le cycle végétatif, qui correspond à la croissance des organes : rameaux, feuilles, vrilles et racines, comporte plusieurs stades phénologiques (Baggiolini, 1952; Lorenzet *al.*, 1995). Il débute au printemps après une phase de dormance hivernale quand les températures du sol commencent à dépasser les 10°C°. S'il y a eu élagage, des pleurs de sève brute apparaissent au niveau des coupures, suite à une poussée d'eau venant des racines par force osmotique Huglin et Schneider (1998). Elle est suivie par le débourrement qui marque la reprise d'activité du bourgeon latent et de la croissance. Le bourgeon gonfle, les écailles s'écartent et la bourre (ou coton) apparaît avant qu'émergent une pointe verte, puis les premières feuilles. Des inflorescences apparaissent au sommet des pousses entre les premières feuilles. Un rameau contenant jusqu'à 3 grappes commence à se former dedans Huglin et Schneider (1998). La phase de croissance se poursuit jusqu'au milieu de l'été, menant à l'aoutement qui est caractérisé par un brunissement de l'écorce des rameaux, des vrilles et des grappes. Le liège se forme et des réserves s'accumulent sous forme d'amidon et de lignine dans les sarments. Les teneurs en eau dans les tissus du bois diminuent de façon synchrone. Les réserves proviennent des feuilles qui sont progressivement vidées de leur contenu. La vigne commence à perdre ses feuilles au début de l'automne, ce qui marque la fin du cycle végétatif de

l'année. L'aouement se poursuit jusqu'à la fin de l'automne, avant les premières gelées. La vigne passe ensuite en dormance hivernale jusqu'au printemps suivant.

I.5.2. Le cycle reproducteur

Le cycle reproducteur qui mène vers la formation des baies est un processus qui dure deux années et est interrompu par la dormance hivernale (Figure2). Les inflorescences sont initiées et préformées dans les bourgeons latents l'année précédant leur développement après débourrement Lebon et *al*(2008). La différenciation des fleurs commence au printemps avec la reprise d'activité du bourgeon latent. Les inflorescences apparaissent au sommet des pousses entre les premières feuilles, se séparent et commencent à prendre la forme d'une grappe. Des températures basses après le débourrement semblent provoquer une augmentation de la taille des inflorescences et le nombre de fleurs Petrie et Clingeleffer (2005). La floraison qui a lieu vers la fin du printemps dure une quinzaine de jours. Elle aboutit à la libération du pollen et est rapidement suivie de la fécondation. Des gelées tardives et des conditions climatiques.

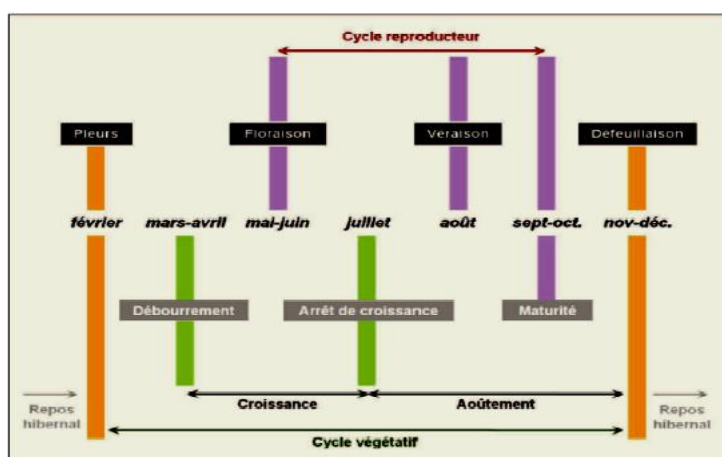


Figure2 : cycle végétatif et reproducteur de la vigne Galet (2006)

I.6. La composition de la vigne rouge

Les principes actifs de la vigne rouge se situent en majeure partie au niveau des pépins du raisin et du feuillage. Les pépins contiennent des O.P.C (proanthocyanidols) et des antocyanosides. Le feuillage ne peut, lui, être utilisé qu'après l'automne car c'est à cette période que les feuilles atteignent leur maturité et rougissent. Elles sont ensuite séchées et conservées dans un lieu frais, à l'abri de toute lumière. Très bénéfiques pour la santé, les feuilles de la vigne rouge sont riches en flavonoïdes, polyphénols, tanins, acide organique, vitamine C.

I.6.1. Les propriétés bienfaisantes de la vigne rouge

La vigne rouge améliore la circulation sanguine. Excellent antioxydant par sa richesse en polyphénols et en resvératrol et stabilise le collagène Gomez(2009).

I.2. Les polyphénols

Actuellement, plus de 8000 polyphénols ont été identifiés Dreosti (2000). Ce sont des métabolites secondaires des plantes, représentant les composés phytochimiques essentiels des légumes des fruits et d'autres plantes. Les polyphénols sont associés non seulement aux effets

bénéfiques de la santé humaine mais aussi aux propriétés colorantes et sensorielles des boissons tel que le vin Durbin (2003) Brouillard (2003) Duthie (2003) Harborne (2000).

Les plus communs parmi les polyphénols sont les acides hydroxy-cinnamiques les flavonoïdes et les anthocyanes. La plupart des flavonoïdes existant dans les plantes sont conjugués avec des sucres, pectines, des acides organiques ou sont sous forme de polymères

Wang (2003) German (2000). Les polyphénols sont largement distribués dans le règne végétal.

I.2.1. Biosynthèse des composés phénoliques

I.2.1.1. La voie de shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde Kening et al (1995).

I.2.1.2. La voie de phénylpropanoïde

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acides salicyliques, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose Hoffmann et al (2004).

I.2.1.3. La voie de biosynthèse des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau du chloroplaste et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme transporteurs d'électrons. Certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles Elicoh-Middleton (2000).

I.2.2. Principales classes des polyphénols de raisin

Le raisin contient deux classes de polyphénols : les non flavonoïdes et les flavonoïdes.

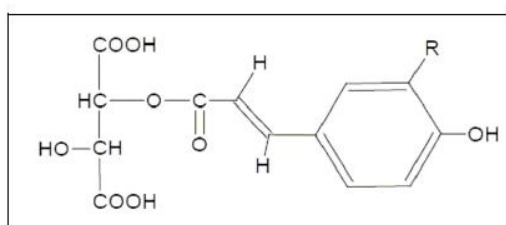
I.2.2.1. Les acides phénoliques

I.2.2.1.1. Les acides benzoïques

Les acides benzoïques ont une structure de type C6-C1. Les plus importants sont les acides vanillique, syringique et notamment l'acide gallique Flanzy(1998). Ils sont impliqués dans les phénomènes d'oxydation enzymatique qui conduisent au brunissement du jus de raisin et du vin Singleton (1987).

I.2.2.1.2. Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques sont les composés phénoliques les plus oxydables du raisin et ont une structure de type C6-C3, et sont rencontrés sous forme d'esters tartriques dans le raisin Flanzy(1998) : acide caftarique, acide fertarique et acide coutarique



Esters hydroxycinnamiques	R
Acide <i>t</i> -caféoyl tartrique (caftarique)	OH
Acide <i>t-p</i> -coumaroyl tartrique (coutarique)	H
Acide <i>t-p</i> -féroloyl tartrique (fertarique)	OCH ₃

Figure 3: structure et nomenclature générale des principaux esters hydroxycinnamiques.

I.2.2.1.3. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison (C6-C2-C6). Les plus abondants dans le raisin sont le trans-resvératrol (Fig 4) ainsi que ses dérivés glycosylés Waterhouse et Lamuela-Raventos (1994). La présence de resvératrol est observée particulièrement dans la pellicule de la baie. Les quantités présentes fluctuent en fonction de l'état sanitaire du raisin. La teneur en resvératrol augmente en présence de *Botrytis cinerea* (Borie et al., 2004) et peut atteindre jusqu'à 400 µg/g de baie (Langcake et Pyrcce, 1976).

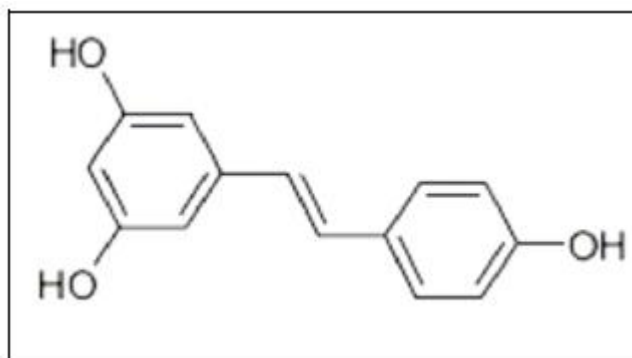


Figure 4: structure générale du trans-resvératrol.

I.2.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de base à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), correspondant à la structure de la 2-phényl-benzopyrone (Figure 5). Ce groupe comprend plusieurs familles qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyrane central. Chez le raisin, deux grandes familles de composés sont principalement représentées, les anthocyanes et les flavan-3-ols, auxquels s'ajoutent les familles des flavonols et des flavanols.

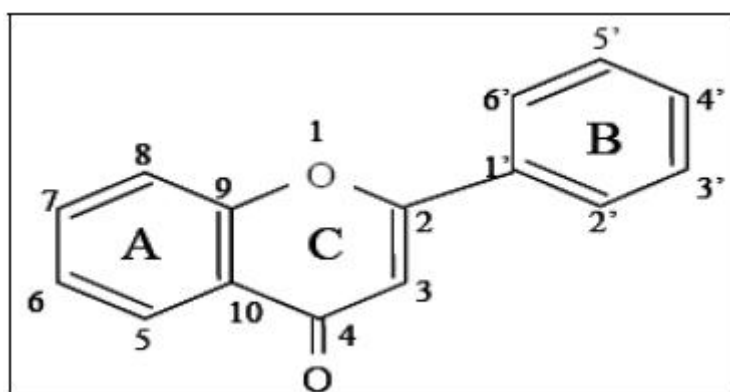


Figure 5: structure générale de la 2-phényl-benzopyrone.

I.2.2.2.1. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont les composés responsables de la couleur des raisins issus de variétés rouges et des vins qui en résultent. La couleur des raisins est due à l'accumulation des anthocyanes qui sont généralement localisées dans la pellicule de la baie, plus exactement dans les vacuoles des cellules (Amrani-Joutei et Glories, 1994 ;Darné, 1991). Elles sont constituées de deux cycles phénoliques A et B reliés par un hétérocycle flavylum. Les principales anthocyanes du vin et du raisin peuvent être classées en trois familles (Figure 6). Le type de substitution des radicaux R1 et R2 donne 5 anthocyanidines (cyanidine, péonidine, delphinidine, pétunidine, malvidine). Ces dernières sont à leur tour liées par un ou deux glucoses, on parle alors d'anthocyanes 3-monoglucoside ou 3, 5-diglucoside (anthocyanines stables par rapport aux anthocyanidines). Les sucres les plus connus pour être liés aux

anthocyanidines sont le glucose, le rhamnose, l'arabinose et le galactose Mazza et Miniati, (1993). La malvidineglycosylée est l'anthocyane la plus courante, cependant chaque cépage possède sa propre composition. Ces glucoses peuvent aussi être acylés par l'acide para coumarique, caféique ou acétique, on parle alors d'anthocyanines acylées.

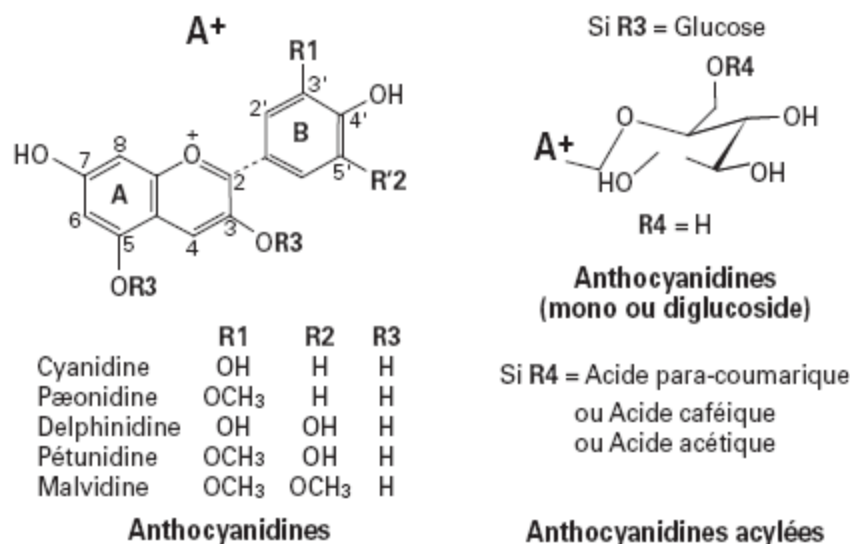


Figure 6: structure des anthocyanes présents dans le raisin Kahn(2006).

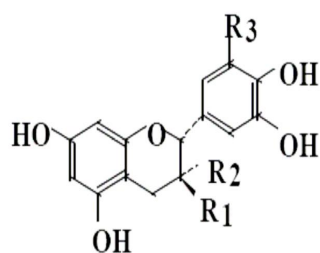
Ces différentes formes d'anthocyanes présentent des propriétés différentes les unes des autres vis à vis de leur couleur et leur stabilité Cheynier(2006) ; Kahn(2006).

1.2.2.2. Les flavanols (proanthocyanidines)

Les flavanols sont présents dans les pellicules et les pépins du raisin sous forme de monomères et aussi sous formes d'oligomères et de polymères appelés tanins condensés ou proanthocyanidines parce qu'ils libèrent des anthocyanidines par chauffage en milieu acide (Réaction de Bate-Smith). Dans les pépins, les tanins sont localisés dans les enveloppes internes et externes Cadot et al(2006). Dans les pellicules, ils se présentent au niveau des vacuoles des cellules sous forme granulaire ou d'amas Amrani Joutei et Glories(1995).

a- Les unités monomériques

Les monomères principaux dans le raisin sont la catéchine (C), l'épicatéchine (EC), l'épigallocatechine (EGC) et l'épicatéchine-3-gallate (ECG) Su et Singleton, (1969) (Figure7).



$R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = \text{H}$: (+)-catechine

$R_1 = R_3 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$: (-)-épicatechine

$R_1 = R_3 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$: (+)-gallo catechine

$R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{OH}$: (-)-épigallo catechine

Figure 7 : structure des unités monomériques constitutives des tanins condensés présents dans le raisin.

b-Les tanins condensés

Les tanins des pépins sont des proanthocyanidines composés par des unités catéchine (C), l'épicatéchine (EC), l'épigallocatéchine (EGC) et l'épicatéchine-3-gallate (ECG), liées entre elles par des liaisons C4-C6 ou C4-C8 (Figure 8). Les tanins des pellicules comprennent aussi des prodéphinidines et présentent des proportions de gallates inférieures à ceux des tanins des pépins. Les degrés de polymérisation moyens sont de l'ordre de 10 dans les pépins et de 30 dans les pellicules Souquet et *al*(1996). La concentration des tanins est plus élevée dans les pépins que dans les pellicules, mais la contribution des pellicules à l'ensemble des tanins de la baie dépasse parfois celle des pépins.

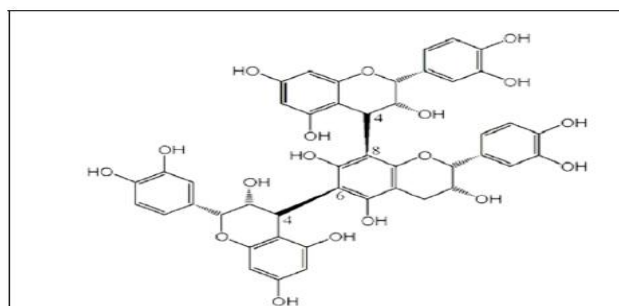
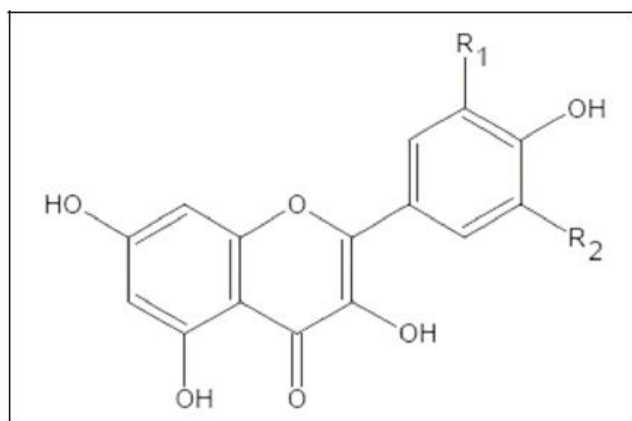


Figure 8: structure générale des tanins condensés des variétés de raisin *Vitis vinifera*.

I.2.2.2.3. Les flavonols

Les flavonols sont des pigments jaunes, caractérisés par un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 360 nm. Leur concentration dans le raisin est très faible et ils sont localisés uniquement dans la pellicule. Ils existent sous forme glycosylée en position 3. Pour le raisin, onze flavonols ont été identifiés. Les quatre majoritaires sont la quercétine, lamyricétine, le kaempférol et l'isorhamnétine (Figure 9).



Aglycones	R1	R2
Myricétol	OH	OH
Quercétol	OH	H
Kaempférol	H	H
Isorhamnétol	OCH3	H

Figure 9: structure générale des flavonols.

I.2.2.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont suscité l'intérêt scientifique depuis plusieurs décennies. D'abord à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et de leurs rôles dans la pigmentation, mais aussi parce qu'ils sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes Manach et al(2004).

Ils ont également pour fonction de protéger ces dernières contre les pathogènes d'origine virale ou bactérienne, les prédateurs comme les insectes Bravo(1998).

Certains flavonoïdes ont également démontré un potentiel d'agent vasodilatateur Woodmanet Chan (2004). Ils ont été surnommés les « modificateurs naturels des réponses biologiques» Middleton et al ; 2000).

I.2.2.3.1 Activité antioxydante

Plus particulièrement, les flavonoïdes sont impliqués, chez les plantes, dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse et ils jouent un rôle de protection contre les effets néfastes des rayons ultraviolets en agissant comme antioxydantsHavsteen (2002).

Les flavonoïdes parviennent à capturer les espèces réactives de l'oxygène associées au stress oxydatif, les empêchant ainsi de créer des dommages cellulaires. En effet, ils sont capables d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils inhibent aussi l'oxydation des LDL et, de ce fait, peuvent prévenir l'athérosclérose et diminuer les risques de maladies cardiovasculaires Tu et al(2007).

Les flavonoïdes sont capables d'exercer en plus des propriétés antioxydantes, des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et antiulcérogènesDi carlo et al(1999).

I.2.2.3.2. Activité antibactérienne des flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve : les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* Babayi et al(2004), *Escherichia coli* Ulanowska et al (2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* etc. Didrak (1999) ; Modak(2001), Okigbo et al(2005).

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Exemple : Sur plusieurs bactéries testées l'apigénine n'a montré une faible activité que contre *Staphylococcus aureus*, toutes les autres ont été fort sensibles à ce flavonoïde. Au contraire, la galangine n'a donné une activité que sur *Staphylococcus aureus* ; les autres microorganismes se sont avérés résistants contre cette molécule Martini et al (2004) Cushnie et al(2003) Basile et al(1999) Aussi dans certains travaux, il a été cité que les flavonoïdes extraits avec du méthanol 95 % étaient actifs sur certaines bactéries, alors que ceux extraits avec du méthanol 60 % de la même plante ne l'étaient pas Akroum Souâd (2011)

I.3.Méthodes et caractérisation des substance bioactives

Le but majeur de la spectroscopie moléculaire consiste à étudier le spectre émis par les molécules suite à un signal d'excitation par une onde électromagnétique ou par un faisceau de particules. Elle analyse également la reconstitution de la molécule sous la forme d'un spectre d'absorption, d'un spectre d'émission, d'un fragment ou de modification chimique Biemont (2008).

I.3.1.Spectroscopie Infrarouge (IR)

La spectrométrie infrarouge est une méthode utilisée pour identifier les différents groupes de métabolites secondaires des plantes. La méthode est basée sur l'excitation des molécules par des radiations infrarouge. L'absorption des rayonnements de nombres d'ondes comprises entre 4000 et 400 cm^{-1} entant qu'énergie de vibration moléculaire modifie à la fois les états de rotation et de vibration des molécules Bertrand et Dufour(1987).

I.3.2.Chromatographie en phase liquide a haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide haute-performance (CLHP) est une puissante technique de séparation utilisée pour l'identification, la quantification et/ou la purification

(chromatographie semi-préparative ou préparative) des composés dans un mélange. Ce dernier est mis en solution dans la phase mobile (solvant) puis est injecté sous haute pression en tête de la colonne (tube en acier inoxydable contenant la phase stationnaire) Dong (2006) Snyder et *al* (2009). Il existe plusieurs types de phases stationnaires mettant en jeu des mécanismes de rétention variés les temps de rétention diminuent avec la polarité des analytes Rosset et *al*(1991) et peuvent être ajustés en utilisant un gradient d'éluion combinant l'eau et un solvant organique (notamment le méthanol et l'acétonitrile) comme phase mobile. Cette méthode détermine la phase normale du fait d'une meilleure reproductibilité des temps de rétention. Ceux-ci, spécifiques de chaque constituant, sont fortement dépendants de la nature de la phase stationnaire, de la composition de la phase mobile et des conditions opératoires (débit, pression et température)

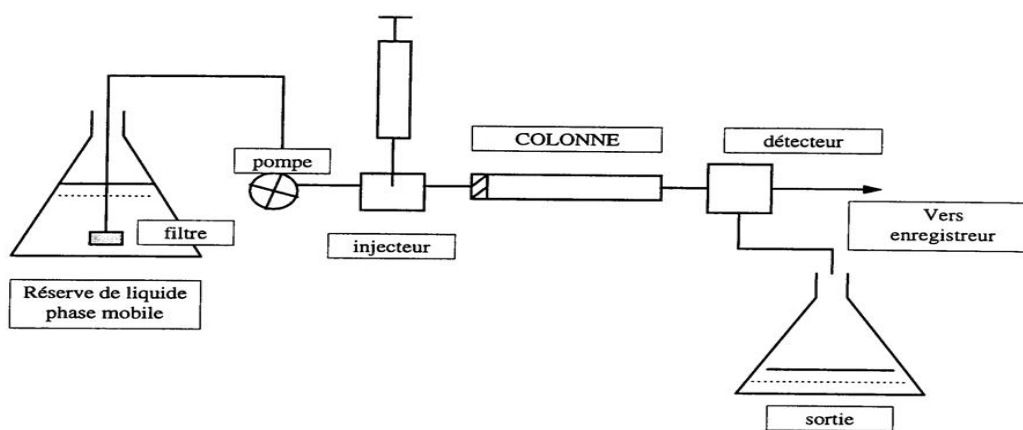


Figure10 :schéma du principe de l'appareil D'HPLC Mendham et Toullec(2005)

L'objectif de ce travail est l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits de la vigne rouge. L'extraction des huiles et des molécules bioactives ont été faites au niveau du laboratoire contrôle qualités « Mahdi » à Corso., l'évaluation de l'activité antioxydante ainsi que l'activité antimicrobienne est réalisée conjointement au niveau du laboratoire de Biotechnologie microbienne (BTM), et au niveau de l'hôpital de Dellys. La caractérisation des molécules bioactives par infrarouge a été réalisée au niveau du laboratoire de la chimie d'UMBB. L'identification des flavonoïdes a été faite par la chromatographie à haute performance (HPLC).

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Matériel végétal

Les feuilles et les pépins la variété AHMAR BOUAMER qui est un cépage rouge local (Algérien) et tardif a été cueilli à son âge mature à la fin de mois d'octobre (2016) dans la région de Benchéao de la wilaya de Médéa.

II.1.1.2. Matériel microbiologique

Tableau 2 : les souches microbiennes testées dans l'activité antimicrobienne Hopital de Dellys (2017).

Souches microbiennes	Gram	Références	Origine	
Bactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC27853	HopitalDellys
	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC25922	HopitalDellys
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Négatif	ATCC 26013	HopitalDellys
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC25923	HopitalDellys
Levure	<i>Candida albicans</i>	/	Souche pathogène isolé à partir d'urine	Hopital Dellys

II.1.2. Matériel non biologique

Pour les différentes expériences, nous avons utilisé un ensemble de matériel formé de verreries, réactifs, produits chimiques et appareillages (Annexe 3).

II.2. Méthodes

II.2.1. Récolte de la plante :

La récolte des feuilles de la vigne rouge a eu lieu à la fin de mois d'octobre (2016) quand elles sont bien rouges et donc suffisamment riches en anthocyanosides, responsables de leurs colorations et de leurs propriétés veinotoniques. La récolte des pépins elle était faite au même temps dans la région de Benchéca de la wilaya de Médéa.



Figure 11 : région de la récolte de vigne rouge Google (2017).

Benchéca est une commune de la wilaya de Médéa en Algérie. Elle se situe à 1080 m d'altitude avec une superficie totale de 59 km² et une surface agricole utile de 3913 ha.

II.2.2. Séchage et broyage

La matière végétale (feuilles et pépins) sont séchées pendant 15 jours à l'air libre à l'abri de la lumière dans le but de diminuer leur teneur en eau. Ce procédé empêche la réaction d'altération qui peuvent se produire et limite ainsi la prolifération des microorganismes.

Les feuilles et les pépins secs sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique et tamisés. La poudre résultante est conservée à l'abri de la lumière dans des flacons en verre hermétiquement.

II.3. Méthode d'extraction

II.3.1.Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes des feuilles a été effectuée selon le protocole suivant :30g de la poudre est introduite dans un bécher contenant un mélange d'eaudistillé -méthanol (30/ 70 ml eau distillée), l'ensemble est laissé en macération pendant 72h à l'ambre BENHAMMOU et *al* (2008)avec des modifications (fig 12).

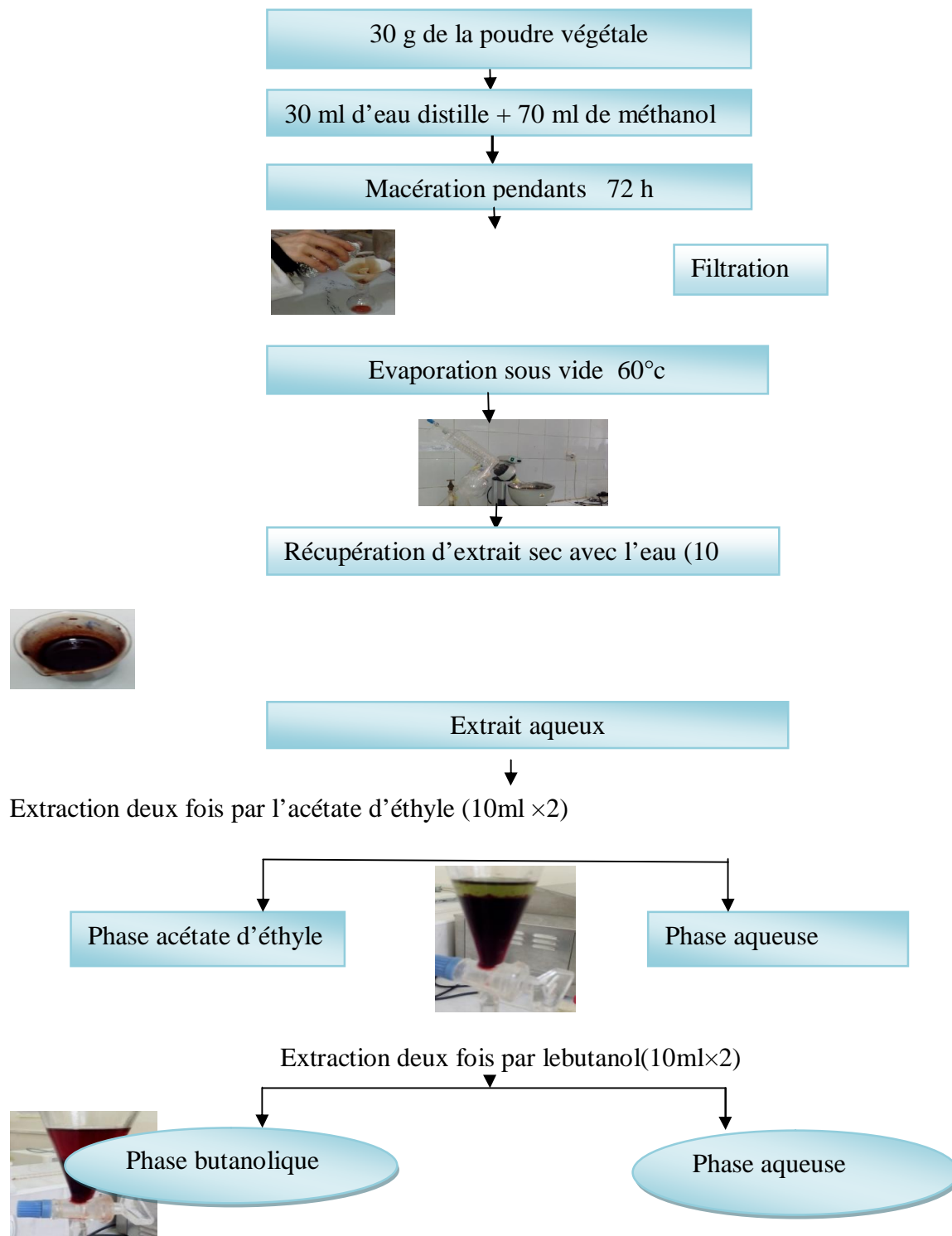


Figure12 :protocole d'extraction des flavonoïdes Bekkara et *al*(1998).

II.3.1.1. Calcul du rendement

Le rendement est défini comme étant le rapport de la masse de flavonoïdes sur la masse de la matière végétale sèche Mebarki(2010).

Le rendement est calculé grâce à la forme suivante :

$$R(\%) = (m_f / m_{mvs}) \times 100$$

M_f : Masse de flavonoïde en g.

M_{MVS} : Masse de matière végétale sèche en g.

R : Rendement en %.

II.3.2. Extraction des huiles à partir des pépins de vigne rouge :

a-Mode opératoire :

La matière végétale (43 g) a été extraite 4 fois .On a pesée 9 g de la poudre des pépins et on les a mets dans un bécher de 500 ml, ona ajouté 150 ml d'éther de pétrole .On a mis le mélange sur une plaque chauffante à 70 C° pendant 1h. Après on le lave avec de l'eau distillée qui a été chauffée dans le bain marie à 70C° On lave notre extrait avec l'eau distille jusqu'à l'élimination totale d'acide à l'aide d'un papier pH. Puis, on place notre mélange dans la cartouche poreuse au niveau de soxhlet.

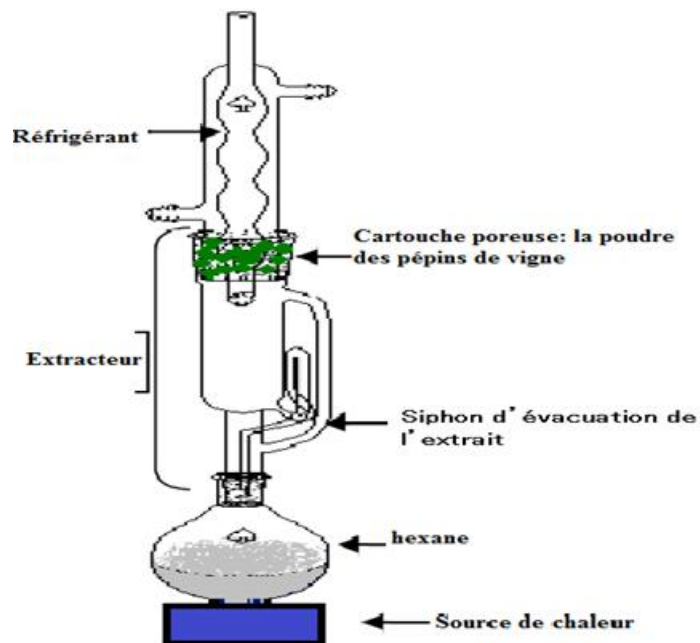


Figure13 : appareil d'extraction des huiles essentielles Bourguet *et al*(2008).

c-Calcul du Rendement

Le rendement en huile grasse est défini comme étant le rapport de la masse de l'huile grasse sur la masse de la matière végétale sèche, exprimé dans les mêmes unités de masse (Carre, 1953).

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

R : Rendement.

m_{HG} : masse de l'huile grasse en (g)

m_{MV} : masse de matière végétale sèche en (g)

II.4. Caractérisation de l'extrait de vigne rouge

II.4.1. Dosage quantitatif des flavonoïdes

❖ Principe

Les réactifs utilisés sont: les solutions incolores de nitrite de sodium (NaNO₂, 5%) et de chlorure d'aluminium (AlCl₃, 10%). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs, elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 510 nm. La comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes. La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par Zhishen *et al* (1999).

Mode opératoire

Solution mère (SM) (0.5ml d'extrait + 4.5ml de méthanol) on prépare d'abord les dilutions (l'extrait flavonoidique et l'huile)

Extraits flavonoidiques et huile 500µl de chaque concentration + 1.25 µl d'eau
75µl de NaNO ₂ (5%) est ajoutée à chaque tube
500µl de NaOH (1N) + 275µl d'eau distillée est ajoutée à chaque tube
125µl d'AlCl ₃ (10%) est ajoutée à chaque tube
L'absorbance est mesurée à 510 nm

Figure 14 : protocole de dosage des flavonoïdes Zhishen *et al* (1999).

❖ Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir de la gamme d'étalonnage établis avec la quercétine à différentes concentrations, dans les mêmes conditions que l'échantillon (voir annexe). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par g de la matière sèche.

II.4.2. Analyse par infrarouge

Afin de connaître les différents groupements fonctionnels des extraits obtenus, nous les avons analysés par infrarouge. L'appareil est de type Fourier Transforme ifraredspectromemeter, de model FT/IR -4100 (N° de série : B056861016, Japon) Il dispose d'une source lumineuse, d'un filtrage numérique avancé algorithmique destiné à compenser les émissions de CO₂ et l'absorption d'H₂O en temps réel , d'un interféromètre , d'un compartiment échantillon qui permet d'accueillir plusieurs types d'accessoires (porte-échantillon) dépendant du mode de convertisseur analogique numérique transforme le signal analogique en un signal numérique manipulable par le système informatique .on a utilisé La table d'infra rouge pour interpréter le résultat obtenu Mabry et *al*(1970).

II.5. Etude d l'activité antimicrobienne des molécules bioactives

La technique que nous avons utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits des flavonoides(fig 16) est l'antibiogramme. Cette dernière une méthode de diffusion en milieu gélosé standardisée par NCCLS(National comite for ClinicalLaboratory standards) cité par celiktas et *al*(2007).Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de la croissance des agents bactériens par la mesure du diamètre d'inhibition autour du disque imprégné de nos extraits.

II.5.1. Revivification des souches microbiennes

La revivification des souches bactériennes a pour objectif l'obtention d'une culture pur et jeune .Elle est réalisées par la méthode des stries (quatre cadrans).Les souches sont alors revivifiées à partir des tubes de conservation sur milieu Gélose nutritive (GN). Les cultures sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h.

II.5.2.Préparation de l'inoculum

Après incubation, 4 à 5 colonies bien isolées sont transférées, avec une pipette pasteur stérile, dans un tube contenant l'eau physiologique stérile afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine à celle de 0,5 McFarland (10^6 UFC/ml). Cette charge microbienne est mesurée à l'aide d'un densitomètre (Densimat), soit une absorbance comprise entre 0.2 et 0.3 pour les bactéries et entre 2 et 3 pour les levures, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm.

II.5.3. Préparation des boîtes d'antibiogrammes

Après avoir coulé le milieu Muller Hinton (MH) pour les bactéries et le Sabouraud pour les levures, dans des boîtes de Pétri, l'ensemencement a été effectué par écouvillonnage. Il s'agit de la méthode préconisée par le NCCLS. Elle consiste à imbiber un écouvillon stérile de l'inoculum et le faire passer sur toute la surface de la gélose par simple rotation de 120° (fig 15)

II.5.4. Préparation des disques d'antibiogrammes

A l'aide d'une micropipette, les disques sont imprégnés avec 10 μ l d'extrait, puis déposés sur la surface du milieu gélosé, préalablement ensemencé par l'inoculum. L'incubation se fait à 37° C pendant 24h pour les bactéries et 48 h à 27° C pour les levures.

II.5.5. Préparation de la solution mère et les dilutions

La solution mère de chaque extrait flavonoïdique et l'huile est préparée à partir de 1ml du brut et 9 ml d'eau distillée. Une série de dilution de 1/2 ; 1/4 ; 1/8 ; 1/16 est faite pour chaque extrait à partir de la solution mère dans l'eau distillée.

Bactéries levure

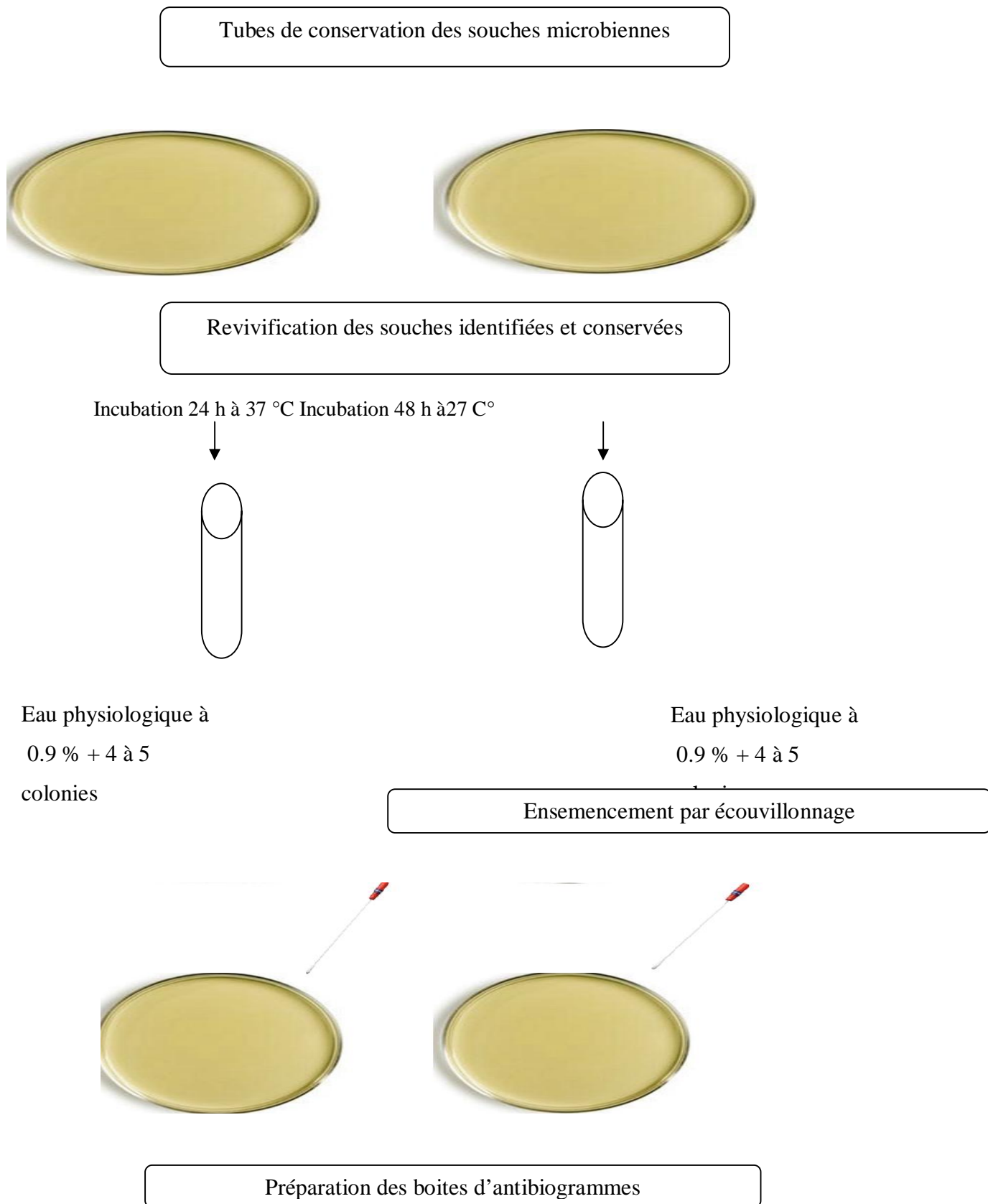


Figure 15 :étapes de préparation des boîtes d'antibiogrammes.

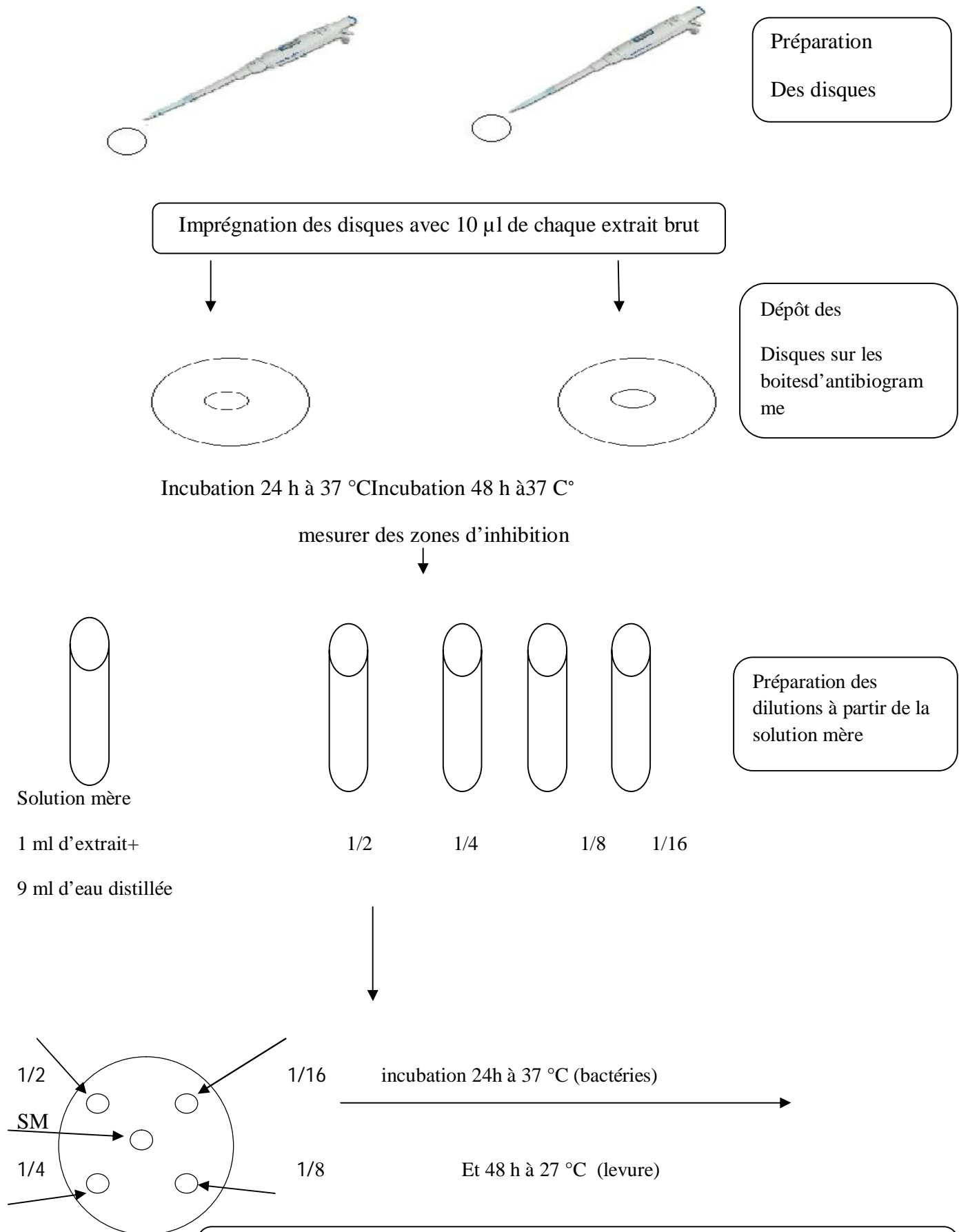


Figure 16: Les étapes de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des molécules

II.5.6. Lecture des résultats

La lecture de l'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse de type HOLEX (Tab3).

Tableau 3 :estimation de la sensibilité des souches Moreira et *al*(2005).

Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Sensibilité des souches
d < 7	Non sensible /résistance(-)
d [7 -14]	Sensible(+)
d [15 - 19]	Très sensible (++)
d > 20	Extrêmement sensible(+++)

II.6. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *vitisvinifera*

L'activité antioxydant de l'extrait et de l'huile de *Vitis vinifera* est évaluée par trois méthodes différentes : le pouvoir réducteur de fer, l'activité anti radicalaire DPPH et le teste de blanchissement par la β carotène.

II.6.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazil) :

II.6.1.1. Méthode quantitative par DPPH

Pour évaluer l'activité antioxydante, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par **Sanchez-Moreno et al(1998)**.

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est Inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

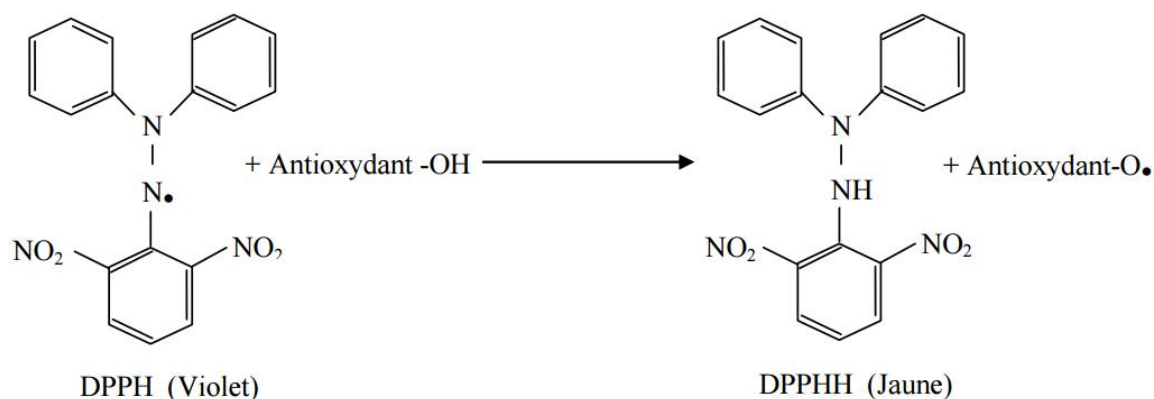


Figure17 :réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Pour cela, 25 μ l de chacune des fractions flavonoidiques et l'huile testées à différentes concentration sont mélangées avec 975 μ l d'une solution méthanoïque de DPPH . Après une période d'incubation de 30min à la température de laboratoire, l'absorbance est lue à 517 nm.

II.6.1.1.1. Préparation de la solution de DPPH

La solution de DPPH , d'une coloration violette , est préparée dans du méthanol à une concentration de 0.012g/ml.

II.6.1.1.2.Péparation des contrôles

Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 25 μ l de méthanol avec 975 μ l de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration.

II.6.1.1.3.Expression des résultats

Selon Sharififar et al(2017).Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$A\% = \frac{(A \text{ blanc} - A \text{ échantillon})}{A \text{ blanc}} \times 100$$

A blan : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol) ;

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

Tous les essais ont été effectués trois fois. Nos résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues.

- Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC50 qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH .

II.6.2.Méthode de la réduction du FRAP (Ferricreducingantioxydant power)

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu (1986), basée sur la réduction du Fe_3^+ présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe_2^+ .

II.6.2.1.Mode opératoire :

Le protocole expérimental réalisé pour la détermination du pouvoir réducteur est le suivant : 1 ml de chaque concentrations de l'extrait Flavonoïdique et l'huile de *vitis vinifera* est mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate (0.2 M , Ph = 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] à 1 % . le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min , Après 2.5 ml de l'acide trichloracétique à (10%) est additionné .Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min .A la fin , 2.5 ml de surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ (0.1%).L'absorbance est mesurée à 700 nm .contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant; l'acide ascorbique et le BHT dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

II.6.2.2. Expression des résultats

Le pouvoir réducteur est déterminé en se référant à la courbe d'étalonnage en utilisant acide ascorbique et le BHT comme des standards.

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenus en fonction des différentes concentrations. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés Hubert (2006).

II.6.3. Test de blanchissement par la β carotène

II.6.3.1. Principe

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β carotène.

II.6.3.2. Mode opératoire

Nous avons adopté le protocole expérimental décrit par Sun *et al* (2005) in Ozsoy *et al.* (2008).

Pour préparer l'émulsion de l'antioxydant, 2 mg de la β carotène (Fluka ,Allemagne) sont dissous dans 10 ml de chloroforme, puis 1 ml de cette solution est mélangé avec 20 mg d'acide linoléique purifié (Sigma Chemical Co., Etats-Unis) et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme a été éliminé en utilisant un bain Marie et le résidu obtenu est repris par 50 millilitres de peroxyde d'hydrogène. Un volume de 200 μ l d'extrait brut méthanolique ou d'antioxydant de référence (acide ascorbique) à une concentration de 2.5 mg/ml sont ajoutés à 5 ml de l'émulsion. Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, comprenant 5 millilitres de l'émulsion de β -carotène et 200 μ l de méthanol. Le mélange est bien agité et la lecture de l'absorbance à 470 nm se fait immédiatement à t_0 contre un blanc qui contient l'émulsion sans la β -carotène. Les tubes sont mis dans un bain Marie à 50 °C et la lecture de l'absorbance est faite toutes les 10 minutes durant 60 minutes.

II.6.3.3. Expression des résultats

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène en employant la formule suivante :

$$\% \text{ d' inhibition} = [1 - (A_t - A_0 / A_0 - A_0^t)] \times 100$$

Tel que :

◆ A_0 : Absorbance de l'échantillon à t_0 ;

◆ A_t : Absorbance de l'échantillon après incubation de 60 minutes ;

♦ A_0° : Absorbance du contrôle négatif à t_0 ;

♦ A_t° : Absorbance du contrôle négatif après incubation de 60 minutes.

II.7. Caractérisation des extraits de la vigne rouge par HPLC (chromatographie liquide à haute performance)

La technique de séparation la plus appréciée en analyse photochimique est la chromatographie liquide à haute performance.

II.7.1. Principe :

La méthode de séparation qu'elle utilise fait appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire, mais avec un appareillage plus sophistiqué. La grande différence par rapport à la chromatographie classique réside dans la durée d'élution. Cette vitesse est obtenue par l'application d'une pression élevée grâce à une pompe qui maintient constant le débit de l'éluant, elle se distingue également de la chromatographie classique par l'utilisation d'un détecteur dont le message est enregistré puis exploité par un détecteur relié au système.

II.7.1.1. Mode opératoire :

La séparation chromatographique des composés phénoliques a été effectuée avec une colonne Ascentis C18 HPLC (250 mm X 4,6 mm, 5 ml, 5microns), chauffé à 40 °C. La première phase mobile (A) utilisée pour la séparation est composé d'eau, méthanol, acide acétique avec les proportions 89/10/1(v/v/v). La deuxième phase mobile (B) est composée d'eau, méthanol et acide acétique avec les portions 9, 90,1 (v/v/v). En mode gradient, la détection à été réalisée à 360 nm. Le détecteur UV /visible est de type WATERS 2996 (PDA). Le volume d'extrait injecté est de 20 μ l. Après chaque cycle, le système est reconditionné pendant 20minutes avant une nouvelle analyse. L'identification et la quantification des composés phénoliques contenu dans les extraits se fait par comparaison du temps de rétention, des surfaces des étalons utilisés par rapport à ceux obtenus en analysant les extraits. Les analyses ont été répétées 3 fois.

Dans cette partie du travail, nous avons exposé les résultats concernant la caractérisation phytochimique de la plante *Vitisvinifera*, ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de ses molécules bioactives. L'ensemble des résultats obtenus sont suivis d'une discussion.

III. Rendement

III.1. Résultats

III.1.1. Rendement des fractions flavonoïdiques et leur aspect

Après évaporation des phases flavonoïdiques des feuilles de *Vitisvinifera* (masse de poudre utilisée 30g), les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4: rendement en flavonoïdes et l'aspect des trois phases obtenues

Les fractions	Rendement En flavonoïdes %	Aspect et couleur
acétate	2.81	Gel vert foncé
butanolique	5.93	Gel rouge foncé
aqueuse	6.7	Gel Marron

Diagramme des rendements des différentes fractions flavonoïdiques présentés ci-dessous :

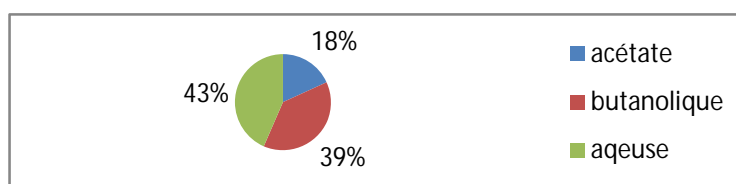


Figure 18 : diagramme circulaire représente le rendement des différentes fractions.

III.1.2 Discussion

Le rendement global en flavonoïdes des fractions flavonoïdiques égale à 15.49%. Ce résultat est similaire avec celui trouvé par Amara et al (2016) qui est de 16.76%. Cette grande différence serait due aux facteurs climatiques qui influent sur le taux des métabolites secondaires des végétaux.

Nous avons obtenu des rendements élevés en flavonoïdes dans les feuilles de *Vitisvinifera*. Cela est dû probablement à la méthode d'extraction utilisée l'acécération dans l'eau et le méthanol pour les flavonoïdes. En effet beaucoup d'étudeImenZouid (2011),ont montré que le méthanol reste le solvant le mieux choisi pour extraire les polyphénols. En outre, selon l'utilisation de l'acétate d'éthyle et le n-butanol permet la dissolution d'une grande quantité de polyphénols, ce qui justifie le rendement élevé des extraits.

III.2. Résultats

III.2.1.Le rendement d'extraction de l'huiles des pépins :

Le rendement d'huile de pépins obtenu pour 43g égale à 14.08%

III.2.2.Les caractérisation organoleptique de l'huile

L'huile de raisin de pépin a un aspect liquide huileux sa couleur et jaune foncé avec une odeur neutre.

III.2. Caractérisation spectrale de dosage des flavonoïdes

III.2.1. Résultat

Les résultats obtenus pour le dosage des flavonoïdes totaux sont exprimés en mg équivalent catéchine par milligramme de matière sèche des extraits obtenus (mg EQR/g MS) respectivement. En utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de laQuercétine (fig19).

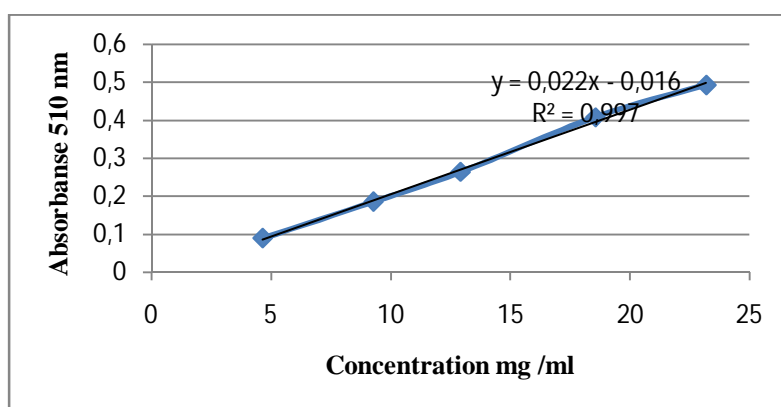


Figure 19: courbe d'étalonnage de la Quercétine.

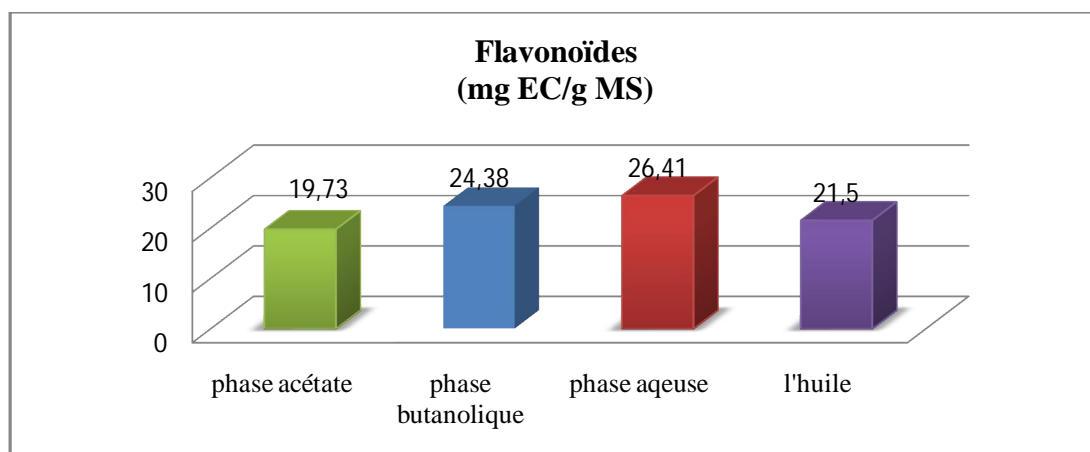


Figure 20 :teneurs en flavonoïdes pour les différentes fractions et l'huile de *Vitisvinifera* .

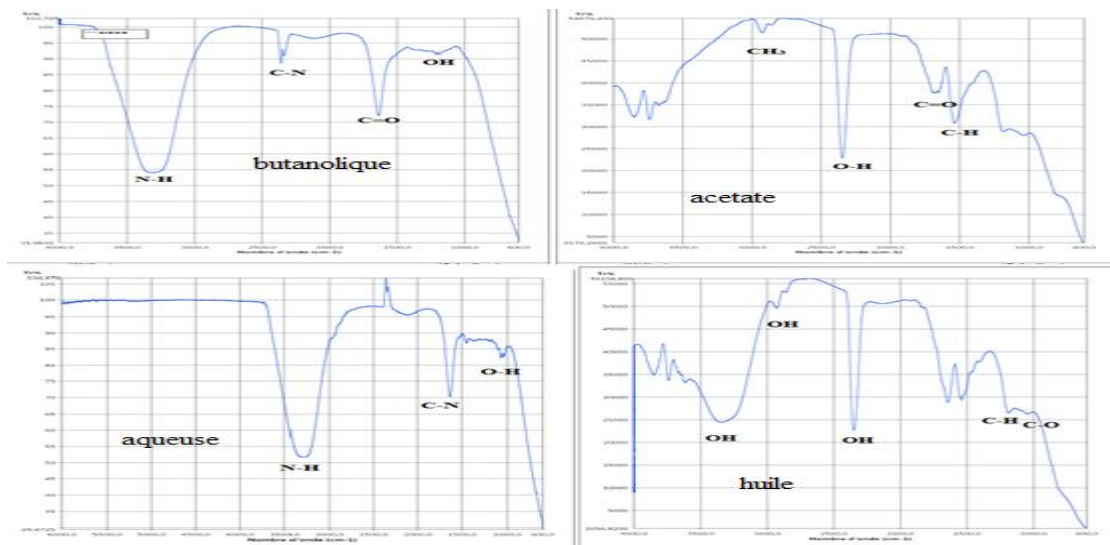
Les teneurs en flavonoïdes des différentes fractions et l'huile sont montrées dans la figure 19, où on remarque que les feuilles de *Vitisvinifera* sont plus riches que les pépins. La teneur la plus élevée a été enregistrée chez la fraction aqueuse avec 26.41 mg EQC /g Ms suivie par la fraction butanolique avec 24.38 mg EQC /g Ms et l'huile à donner une teneur de 21.5 mg EQC /g Ms et enfin la phase d'acétate d'éthyle avec 19.73. Les résultats obtenus dans l'étude de Marinova *et al.* (2005) des teneurs respectives de 36.5 et 77.1 mg/100g du poids frais de deux variétés de raisins blanc et noir (*Vitisvinifera*) pour la phase d'acétate d'éthyle et butanolique qui sont inférieures à nos résultats. Ces différences dans les teneurs en flavonoïdes des raisins est fonction de leur origine génétique, des périodes de récolte et des différentes parties du fruit Lu *et al* (2006), de la variété, des pratiques agricoles ; de la méthode d'extraction et/ou de la sensibilité de la méthode de dosage ainsi que de l'exposition à la lumière et à la température Kim *et al* (2003).

III.3. Caractérisation des fractions flavonoïdiques et d'huile par infrarouge

Cette technique fournit des informations sur les groupements fonctionnels d'une molécule.

Pour les fractions flavonoïdiques et l'extrait d'huile, les résultats obtenus sont présentés dans la figure 21.

III.3.1.Résultats



La longueur d'onde cm^{-1}

Figure 21: chromatogramme des fractions flavonoïdique et d'huile de vigne rouge.

D'après les spectres (IR) enregistré dans la figure 21 de la phase d'acétate d'éthyle la vibration d'élongation du groupement (C-N) apparaissent 2280 cm^{-1} , une bande de vibration située à 1690 cm^{-1} indique les (C=O), L'absorption enregistrée à 2280 cm^{-1} est attribuée à la vibration d'élongation du groupement (C-N).

Le spectre de la phase butanolique montre une bande d'absorption à une forte élongation à 1080 cm^{-1} attribuée à la vibration (C-O) du groupe Ester et une élongation Moyenne de pour la fonction d'acide ascorbique (C=O) à 1683 cm^{-1} , et une bandes d'absorption à 2390 de (C-N) et 2900 cm^{-1} de la fonction (CH₂) Alcane avec une forte élongation et une élongation moyenne de (NH₂) à 3440 cm^{-1} et enfin une forte bande à 3600 cm^{-1} de la fonction Alcool (OH).

Les spectres (IR) de la phase aqueuse enregistrés dans les bandes de vibrations illustrés dans les figures (22) et le suivant l'absorption située à 1650 cm^{-1} est attribuée à (C=O) fonction élongation amide. et celle de 2130 cm^{-1} correspondent à la vibration d'élongation (C≡C) fonction Alcyne et une faible à moyenne bande apparaissent 2420 cm^{-1} et une forte bande de (C-H) se situe à 3300 cm^{-1} .

Le spectre d'huile Les bandes de vibrations illustrés dans les figures (21) suivant l'absorption située à 1250 cm^{-1} est attribuée à (C-O)fonction élongation Acide carboxylique par une forte bande. et celle de 1600 cm^{-1} correspondent à une liaison variable de la fonction Aromatique et la vibration d'élongation (CH_3) de la fonction Alcane et une forte bande apparaissent 2980 cm^{-1} et (OH) une fonction Alcool se situe à 3600 cm^{-1} .

La richesse de ces extraits en double liaisons lui confère une activité antioxydant très importante.

III.4. Chromatographie en phase liquide à haute performance des extraits de vigne

III.4.1. Résultats

Dans le but de démontrer l'efficacité de la technique HPLC dans la détection et la quantification des composés flavonoïdiques des extraits on a analysé, à titre indicatif, trois fractions de l'extrait flavonoïdique des feuilles de *Vitis vinifera* et l'huile de ses pépins. Les chromatogrammes, présentés ci-dessous, montrent respectivement la fraction acétate d'éthyle, la fraction butanolique, la fraction aqueuse et l'extrait l'huile.

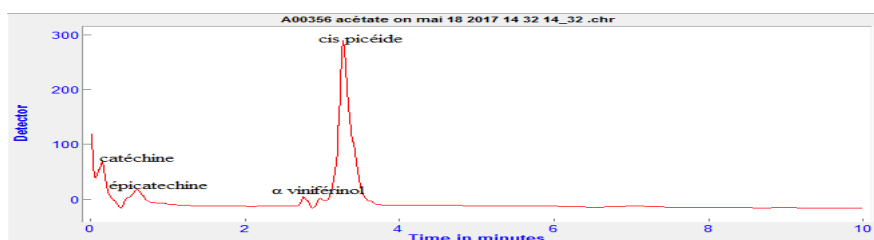


Figure 22 : profil chromatographique HPLC de la phase acétate d'éthyle

1 : catéchine ; 2 : épicatechine ; 3 : α viniférinol. ; cis-picéide

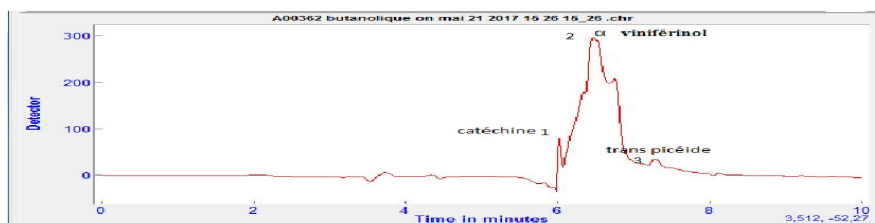


Figure 23 : profil chromatographique HPLC de la phase butanolique

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

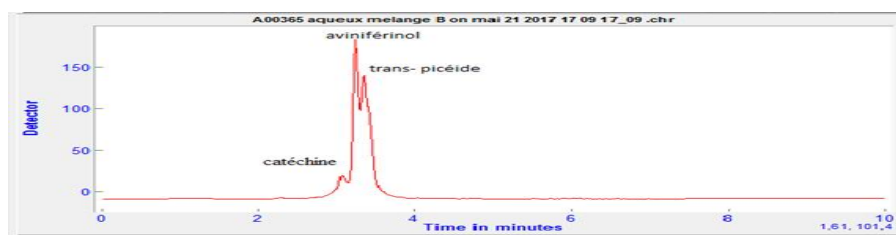


Figure 24 : profil chromatographique HPLC de l'extrait de la phase aqueuse

1 : catéchine 2 :aviniférinol 3 :trans -picéide

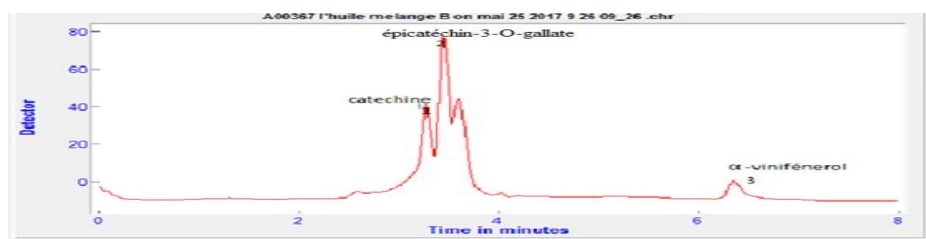


Figure25 : profil chromatographique HPLC de l'extrait d'huile des pépins

1 : catéchine ; 2 : épicatechine ;3 : α -viniférol

La comparaison des temps de rétention des standards avec ceux enregistrés dans les Profils chromatographique HPLC des différentes fractions et l'huile, nous a permis d'identifier 6 flavonoïdes : catéchine, épicatechine, α viniférol, épicatechin-3-O-gallate, cis picéide et le trans-picéide.

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

Nous remarquons que la catéchine et le α viniférol ont été identifiés dans toutes les fractions et même l'huile.

Le cis-picéide est le flavonoïde majoritaire de la fraction acétate d'éthyle, le α viniférol est le majoritaire pour la fraction butanolique et aqueuse par contre le majoritaire identifié chez l'huile est épicatechin-3-O-gallate.

III.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

III.5.1 Résultats

III.5.1.1 Résultats de l'Antibiogramme

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de 5 souches bactériennes (tab 5).

Tableau 5: diamètre de zone d'inhibition en mm en présence de quelques antibiotiques.
(ANNEXE 3)

Antibiotique	FO T	CI T	RIF		CIP	CN10	TOB1 0	PRL75		TIC75		
Souches <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	30	17	0		32	20	24	21		25		
Antibiotique	A M C3 0	CT X3 0	A M L2 5	TI C7 5	KZ 30	NA 30	CN 10	OF X5	F3 0G	SX T2 5	C3 0	FO X3 0
Souches <i>Escherichia coli</i> ATCC25922	27	35	28	32	32	31	30	46	30	30	30	32
Antibiotique	C3 0	R I F	FO T2 00	T E3 0	SX T2 5	FO X4 2	P1 0	OF X5	O X1	C N1 20	C N1 0	OF X5
Souches <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	15	25	14	18	12	32	32	9	9	25	21	18

Selon les résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* présentés dans le tableau ci-dessous, les antibiotiques à savoir le Ciprofloxacine, Fosfomycine et Tétracycline et Tobramycine et Piperacilline et Gentamicine et Tétracycline possèdent les zones d'inhibitions les plus élevées avec des valeurs de 32,30, 25, 24,21,20 et 17 mm, respectivement. Nous constatons une résistance totale remarquable de la souche *Pseudomonas aeruginosa* à l'antibiotique Rifampine par un diamètre égal à zéro.

E-coli est sensible à la plupart des antibiotiques (tab) avec une zone d'inhibition qui varie entre 30 et 46 mm pour CTX₃₀, AML₂₅, TIC₇₅, KZ₃₀, NA₃₀, CN₁₀, OFX₅, F₃₀G, SXT₂₅, C₃₀ et FOX₃₀. Alors qu'elle est plus ou moins résistante à la AMC₃₀, AML₂₅, CT₅₀ et avec des diamètres de zones d'inhibition de 27, 28 et 21.

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram +, elle possède une sensibilité contre FOX₄₂, P₁₀, C N₁₂₀, CN₁₀, RIF, OFX₅, TE₃₀, C30, FOX avec des diamètres qui varient entre 32 et 15 mm et est plus ou moins aux SXT₂₅, OFX₅, OX₁ et résistante à la AMC₃₀, AML₂₅, CT₅₀ et avec des diamètres de zones d'inhibition de 27, 28 et 21.

III.5.2. Résultats de l'activité antimicrobienne de vigne rouge

Les résultats de l'activité antimicrobienne de vigne rouge testés sur les souches bactériennes sont présentés dans les tableaux 6, 7, 8, 9, 10, 11.

obtenus sont présentés

III.5.2.1. Diamètres des zones d'inhibitions des extraits flavonoïdiques phase acétate d'éthyle

Tableau 6 : diamètres moyens (mm) des zones d'inhibition de la fraction acétate brut.

Souches	Moyenne du diamètre (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,5
<i>Bacillus Thuringiensis</i>	7,66
<i>Conidialbicans</i>	6,44
<i>Escherichia coli</i>	9,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,58

Il ressort de ces résultats que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *BT* (*Bacillus thuringiensis*), *Pseudomonas aeruginosa* sont sensibles à la fraction acétate d'éthyle. Cependant *Conidialbicans* s'est montré une résistance pour la même fraction (Planche 1).

III.5.2.1.1. Diamètres des zones d'inhibitions de la solution mère de la phase acétate d'éthyle

Tableau 7 : diamètres moyens (mm) des zones d'inhibition de la solution mère de la phase acétate d'éthyle

bactérie	Moyenne des diamètre (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,83
<i>BT</i>	-
<i>Conidialbicans</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	8,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-

Ces résultats révèlent que sauf *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* qui sont sensible à la solution mère de la phase aqueuse (Planche 1).

III.5.2.2. Diamètres des zones d'inhibitions des extraits flavonoïdique phase butanolique

Tableau 8 : représente les diamètres moyenne (mm) des zones d'inhibition de phase butanolique.

bactérie	Moyenne des diamètre(mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,58
<i>Bacillus Thuringiensis</i>	8,41
<i>Condidaalbicans</i>	7,91
<i>Escherichia coli</i>	8,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/

D'après les résultats portés dans le tableau 9 et (Planche 1) les souche *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *BT (bacillus thuringiensis)*, *Condidaalbicans* sont sensible à l'extrait butanolique. aucune zone d'inhibition n'a été observée pour *Pseudomonas aeruginosa*

III.5.2.2.1. Diamètres des zones d'inhibitions de la solution mère de la phase butanolique

Tableau 09 : diamètres moyenne (mm) des zones d'inhibition de phase butanolique.

bactérie	Moyenne des diamètre(mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacillus Thuringiensis</i>	6,49
<i>Condidaalbicans</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-

D'après ces résultat mais à part *bacillus thuringiensis* tous les autres souche sont résistants à la fraction butanolique (Planche 1).

III.5.2.3. Diamètres des zones d'inhibitions des extraits flavonoïdique fraction aqueuse

Tableau 10 : diamètres moyens (mm) des zones d'inhibition de phase aqueuse brut

bactérie	Moyenne des diamètre (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,91
<i>Bacillus Thuringiensis</i>	10,25
<i>Condidaalbicans</i>	9,58
<i>Escherichia coli</i>	10,08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,08

Ces résultat révèlent que toutes les souches *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *BT* (*Bacillus Thuringiensis*), *Condidaalbicans*, *Pseudomonas aeruginosa* sont sensible à l'extrait brut (Planche 1).

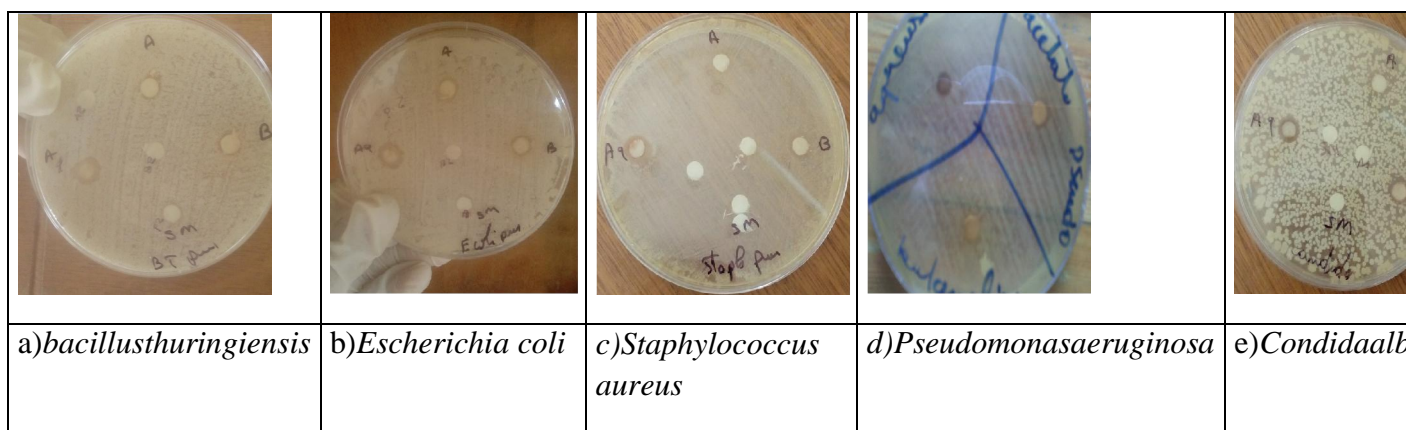


Planche 1 : zones d'inhibitions de ensemble des phases acetate, butanolique, aqueuse

III.5.2.4. Diamètres des zones d'inhibitions de huile des pépins

Tableau 11 : diamètres moyens (mm) des zones d'inhibition de l'huile.

bactérie	Moyenne des diamètre (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,38
<i>BT</i>	-
<i>Condidaalbicans</i>	15,66
<i>Escherichia coli</i>	17,33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,25

Ces résultats (de tableau 11 et planche 2)révèlent une extrême sensibilité des souches *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus*, *BT(bacillus thuringiensis)*, *Condida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*aux huile de pépins

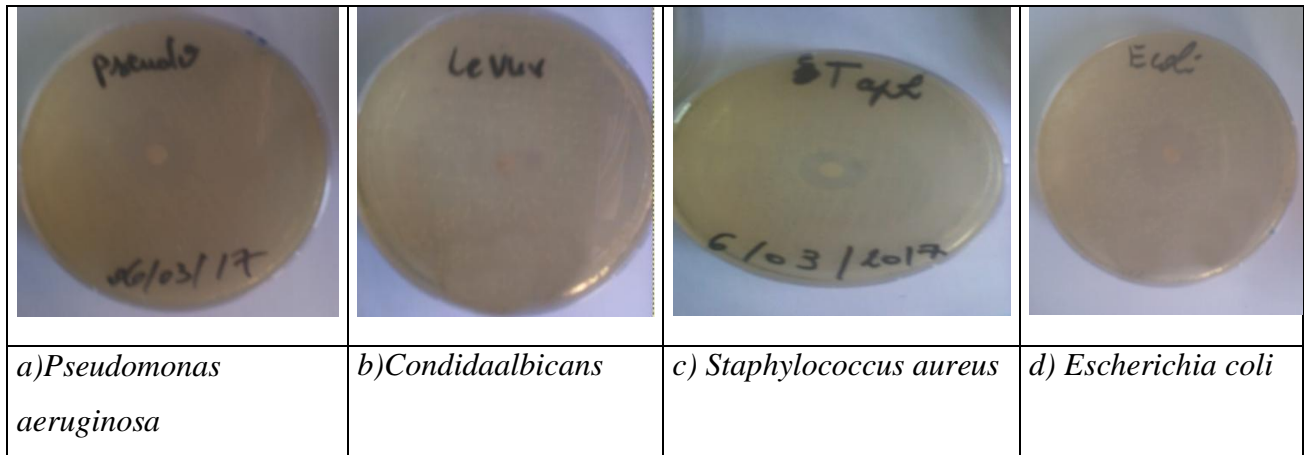


Planche 2: zones d’inhibitions des extraits d’ huiles essentielles de pépins de vigne.

Dans le but de mettre en évidence de façon visuelle les diamètres d’inhibition, nous les avons représenté l’ensemble des résultats de l’activité antimicrobienne de tous les extrait brute vis-à-vis des souches testées est présentée sous forme d’un histogramme.

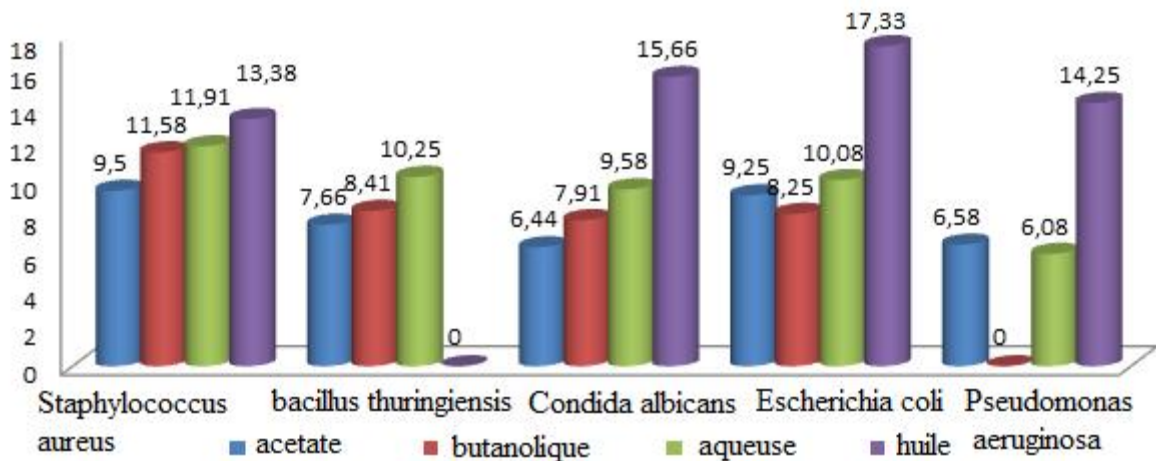


Figure 26 : diamètres d’inhibition obtenus sur les souches testé.

D'après la figure 26 :

- **Phase acetated'éthyle :** *Staphylococcus aureus*> *Escherichia coli*>*Bacillus thuringiensis*> *Pseudomonas aeruginosa*> *Condidaalbicans*.
- **Phase butanolique :** *Staphylococcus aureus*> *Bacillus thuringiensis*> *Escherichia coli*>*Condidaalbicans*.
- **Phase aqueuse :** *Staphylococcus aureus*> *Bacillus thuringiensis*>: *Escherichia coli*>*Condidaalbicans*> *Pseudomonas aeruginosa*.
- **Extrait d'huile :** *Escherichia coli*>*Condidaalbicans*> *Pseudomonas aeruginosa*> *Staphylococcus aureus*.

III.5.3. Discussion :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents 29 antibiotiques testés, nous a permis de mettre en évidence les différents niveaux d'efficacité de ces composés sur les souches microbiennes. montrent que les zones d'inhibition varie de 17 à 32 mm pour *pseudomonaseaeruginosa* et de 9 à 32 mm pour *Staphylococcus aureus* et de 21 à 46 mm pour *Escherichia coli* selon les antibiotiques.

A travers les résultats obtenu (planche I)surles fraction flavonoidique brute, nous pouvons dire que l'extrait flavonoidique des feuilles de vigne rouge est montrées très efficaces vis-à-vis de certaines bactéries pathogènes comme *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus*, *Condidaalbicans*, *Pseudomonas aeruginosa*.

La comparaison des diamètres d'inhibition de l'huile essentielle des pépins de *vitisvinifera* par rapport à celle d'antibiotiques qui est de 13,38mm pour *Staphylococcus aureus* et de 14,25mm pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Condidaalbicans*avec 15,66 et de 17,33 mm pour *Escherichia coli*.L'huile a provoqué une inhibition inférieure à celle des antibiotiques testées mais avec des diamètres considérables. Elles ont montré une activité antibactérienne moins efficace ou légèrement inhibitrice que celle d'huile par rapport ou antibiotique.

Vu le manque, de travaux menés, sur l'effet antimicrobien des extraits d'huile de pépins et de flavonoïdes des feuilles de *Vitisvinifera*. Les résultats ont été discutés selon la réputation des polyphénols pour leurs effets antimicrobiens et sur quelques travaux réalisés sur *Vitisviniferasativa*. Plusieurs études in vitro et in vivo, ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobiennes des polyphénols. Cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que, de nombreux composés flavonoidiques

(apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*)

En outre, les flavonoïdes est un métabolite secondaire réputé pour son effet antimicrobiens. Cependant, une étude réalisée en Turquie a montré que, les fractions à polarité différentes des feuilles de la vigne à savoir : le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le n butanol et la fraction aqueuse ont exercé un effet inhibiteur contre les bactéries à Gram⁺ (*S.aureus* et *Enterococcus faecalis*) par contre aucun effet n'a été signalé sur les bactéries à Gram⁻ (*E.coli* et *P. aeruginosa*). Par ailleurs, une autre étude a été menée sur les extraits méthanolique des feuilles de *Vitisvinifera*L. provenant des régions de Tlemcen, Aflou et Sidi Bel Abbès, ces extraits ont servi de principe actif pour la préparation de pommade. Cette dernière a montré une activité antibactérienne intéressante vis à vis *E.coli*, *Proteus mirabilis* et *Bacillus cereus*. Alors qu'aucun effet n'a été observé sur *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*

III.6. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Vitisvinifera*

Les consommateurs considèrent plus surs et plus sains les produits élaborés à partir des ingrédients naturels rejetant les additifs synthétiques. Cette situation justifie l'intérêt pour l'identification des nouvelles substances naturelles capables d'être utilisées comme ingrédients alimentaires. Sur la base de nombreuses études réalisées, les antioxydants naturels (extraits d'herbe) sont apparus comme une alternative aux antioxydants de synthèses qui sont de moins en moins utilisés dans les denrées alimentaires. L'activité inhibitrice des extraits d'herbes est attribuée fondamentalement à sa richesse en composés phénoliques. C'est dans ce contexte que nous avons évalué l'activité antioxydante de l'extraits flavonoïdique et l'huile de *Vitisvinifera* par quatre méthodes différentes en l'occurrence la réduction du fer, le piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), et l'activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta carotène. L'acide ascorbique et le BHA sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et sont utilisés comme contrôles positifs.

III.6.1. Pouvoir anti radicalaire par la méthode de DPPH

III.6.1.1. Résultats

Les figures ci-dessous présentent, les résultats du virage de la couleur d'huile et les différentes fractions flavonoidiques.



a) Phase acétate d'éthyle



b) phase butanolique



c) l'extrait d'huile



d) la phase aqueuse

Figure 27 : résultats du virage de la couleur d'huile et des fractions flavonoidiques.

Les résultats du pourcentage d'inhibition du radical DPPH pour les trois fractions flavonoidiques et l'huile sont représentés par la figure 28.

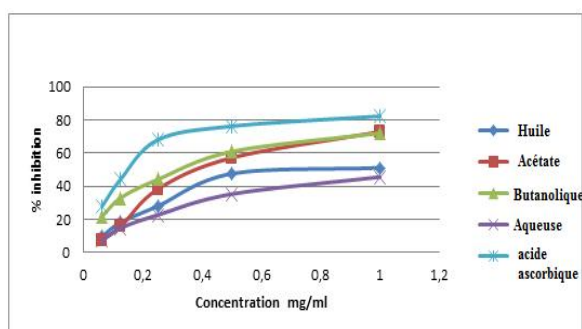


Figure 28: variation du pouvoir anti-radicalaire en fonction des concentrations.

D'après la Figure 28 nous remarquons que les fractions acétate et butanolique présentent une activité importante de piégeage du DPPH avec respectivement 72.09% et 72.08% par comparaison à celle de l'acide ascorbique. La fraction aqueuse reste la moins active avec 45.6%.

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en IC₅₀, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. (Couleur). Ces IC₅₀ sont déterminées à partir des graphes, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage.

Comme il figure dans le tableau ci-dessus nous remarquons que la fraction acétate d'éthyle et butanolique présente une meilleure activité antiradicalaire avec une IC₅₀ de 11.06 et 11.20 mg EC/G Ms qui se rapproche de celle de l'acide ascorbique suivie par l'extrait d'huile avec 17.80mg EC/G Ms. Par contre la phase aqueuse a manifesté une faible activité anti-radicalaire avec 27.19 mg EC/G Ms.

Plus la valeur de l'IC₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

Tableau 12: valeurs des IC₅₀ trouvées pour les différentes fractions et l'huile.

Les extraits	La Phase Acétate d'éthyle	La Phase butanolique	La phase aqueuse	L'huile	Acide ascorbique
IC ₅₀ mg EC/G Ms	11.06	11.20	27.19	17.80	4.72

III.6.1.2. Discussion

Le DPPH est un radical libre, stable et caractérisé par une couleur violette Brand-Williams et *al*(1995). La substance antioxydante agit en transférant un électron ou un atome d'hydrogène ce qui conduit à la réduction du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration jaune pâle. Ce passage, de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut exprimer le pourcentage de réduction de DPPH Molyneux, (2004) Villano et *al* (2007).

Quelques composés se réagissent très vite avec le DPPH la réduction de molécules de DPPH égale à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant. l'effet antiradicalaire des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libre, avec la présence de la double liaison C2-C3 ce qui renforce l'activité antiradicalaire des flavonoïdes Deghdak hala et Zaiter Rahma (2014).

III.6.2. Résultats par la méthode de réduction de fer (Ferric reducing antioxidant power)

III.6.2.1. Résultats

L'activité antioxydante de nos extraits (l'huile et les fractions flavonoïdique) a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible qui est basée sur la capacité des flavonoïdes à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} .

Dans notre travail, nous avons opté pour tester les différentes fractions de l'extrait flavonoïdique des feuilles et l'huile des pépins de *Vitisvinifera*. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans la figure nous ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons.

Les figures ci-dessous présentent les résultats du virage de la couleur de l'huile des différentes fractions flavonoïdiques.

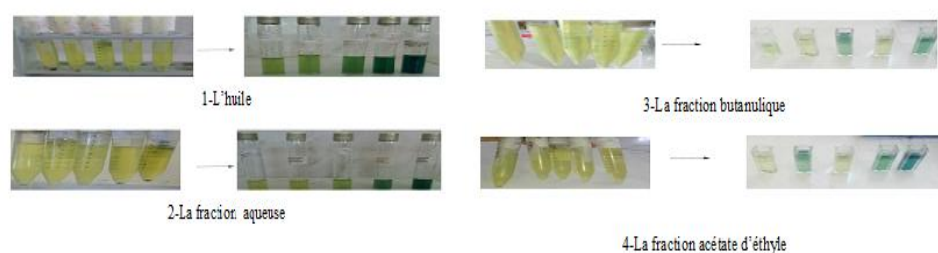


Figure 29 : résultats de l'évaluation de pouvoir réducteur des différentes fractions de l'extrait flavonoïdique et l'huile des pépins.

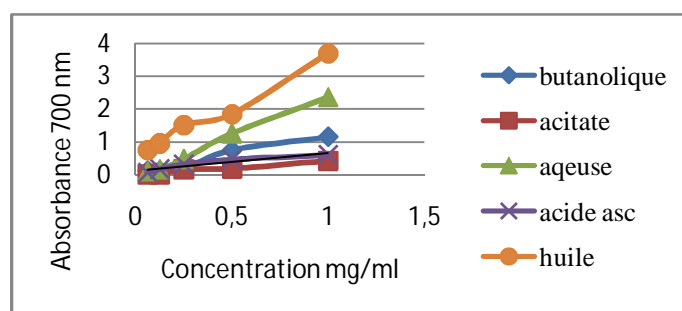


Figure 30: évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Vitisvinifera* par la méthode de FRAP (chaque valeur représente la moyenne de trois essais)

D'après les graphes de la figure 30, nous constatons que la capacité de l'huile à réduire le Fer est largement supérieure à celle de l'acide ascorbique suivi par la phase aqueuse et la fraction butanolique, reflété par les densités optiques obtenues à différentes concentrations (DO maximale = 3.695 pour l'huile contre une DO= 0.603 pour l'acide ascorbique). alors que la phase acétate d'éthyle a présenté un pouvoir réducteur le plus avec une DO=0.41.

III.6.2.2. Discussion

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe_3^+ / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe_2+ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm Bougandoura & Bendimerad (2012). Beaucoup de publications actuelles ont indiqué qu'il y a une relation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes Bentabet et al (2014).

Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés flavonoïdique qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants Bougandoura & Bendimerad, (2012).

A partir des résultats obtenu on remarque que le pouvoir réducteur des extraits de la plante de *Vitisvinifera* dépend de la concentration de nos extraits c'est-à-dire que la capacité de réduction de fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des d'extraits. montre que l'huile de pépin est riche en procyanidines (ou proanthocyanidines) qui sont une famille de flavonoïdes. Ce sont des polyphénols particulièrement antioxydants.

III.6.3. Résultats de test de blanchissement par la β carotène

III.6.3.1. Résultats

Dans ce test l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir de groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder la β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 470 nm Pendant 60 min. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène.

Les résultats de l'effet antioxydant de nos différents échantillons sur la décoloration du β -carotène sont représentés dans le graphes ci-dessous.

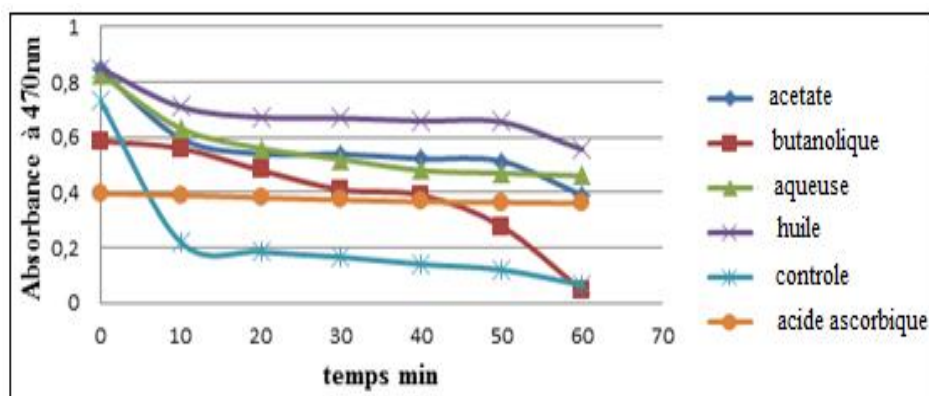


Figure 31: cinétique de la décoloration de β -carotène induite par les différentes fractions et l'huile. acide ascorbique

D'après ces résultats, il est évident que le standard et les extraits testés inhibent d'une manière efficace et significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation et du témoin positif acide ascorbique.

Nous remarquons que les fractions aqueuse et acétate d'éthyle de l'extrait flavonoïdique des feuilles et l'huile inhibent d'une manière significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et de β -carotène par rapport au contrôle négatif. L'inhibition la plus élevée a été fournie par l'huile avec 55,78% suivie par la phase aqueuse avec 44,36 % et la phase d'acétate d'éthyle avec 31,72.

Notons aussi que la fraction butanolique représente la fraction la moins active vis-à-vis de l'inhibition de la décoloration du β -carotène comparée à celle du contrôle positif l'acide ascorbique.

III.6.3.2. Discussion

Les extraits flavonoïdiques sont des extraits polaires par contre l'huile et apolaire. On peut donc expliquer l'activité des extraits apolaires par le paradoxe des phénomènes polaires comme il est décrit par Frankel et ses collaborateurs (1994). Etant donné que le test de blanchissement du β carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau. Frankel et Meyer (2000) ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène.

Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides. Ce qui confirme nos résultats.

Nous nous sommes intéressés à l'évaluation du pouvoir antimicrobien et antioxydant des extraits flavonoidiques des feuilles et l'huile des pépins de la vigne rouge *Vitisvinifera* issue de la région de Benchécao de la wilaya de Médéa.

L'extraction des huiles de pépins et des flavonoïdes à partir des feuilles nous a permis de calculer le rendement de l'extrait huile notamment fraction acétate d'éthyle et butanolique et aqueuse). Au cours des extractions, le rendement le plus important a été obtenu avec l'extrait d'huile (14.08 %) suivi de (6.7 %) de la phase aqueuse et de (5.93 %) et (2.81%) pour la phase butanolique et acétate d'éthyle d'une manière respective.

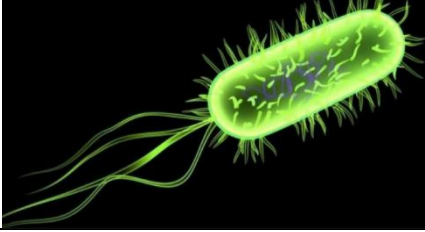


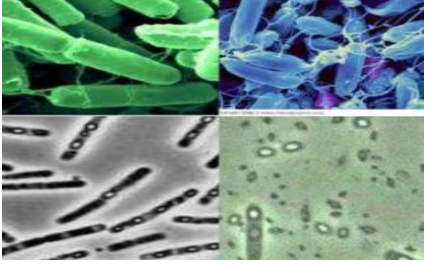
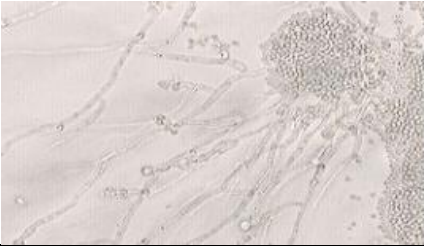
L'analyse quantitative des extraits de *Vitisvinifera* est représentée par un dosage spectral des flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$, qui nous mène à conclure que cette plante contient une quantité considérable en flavonoïdes, qui varie 26.36mg EQ /g de matière sèche pour la phase aqueuse et 24.63mg EQ /g de matière sèche pour l'huile.

L'étude de la composition chimique des fractions flavonoidiques et l'huile des pépins par HPLC, a permis de mettre en évidence la présence de 5 flavonoïdes qui sont la catéchine, α -viniférinol, cis-piciéide, trans-piciéide et épicatechin-3-O-gallate.

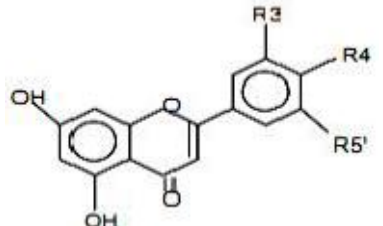
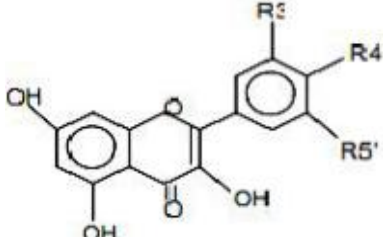
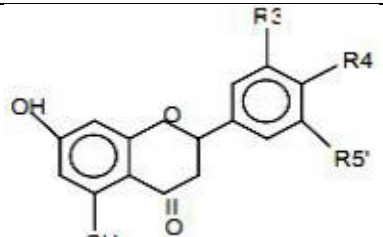
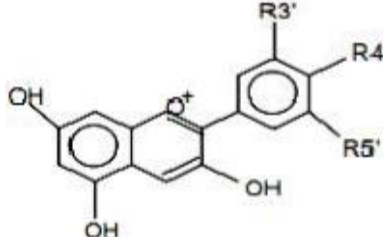
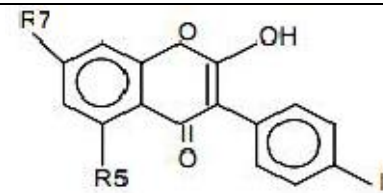
Les potentialités antioxydantes des différentes fractions de l'extrait flavonoidique et l'huile des pépins sont évaluées par divers mécanismes : le piégeage direct des radicaux libres par la méthode du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur et le pouvoir protecteur du β -carotène. Les résultats *in vitro* ont révélé des activités antioxydantes pour l'ensemble des fractions. Un fort pouvoir de piégeage du DPPH et de réduction de fer supérieur à celui de l'acide ascorbique est enregistré chez l'huile.

Il ressort de cette étude que les résultats obtenus *in-vitro* constituent une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Il serait toutefois intéressant d'approfondir les investigations phytochimiques de la vigne rouge et déterminer les spectres de masse des composés flavonoidiques par RMN, et transformer les métabolites une fois purifiés en une forme galénique.

Annexe 1: les souches microbiennes utilisées.

Bactéries	Taxonomie	Caractères généraux
<p>Escherichia coli</p> 	<p>Règne : Bacteria Embranchement : Proteobacteria Classe : GammaProteobacteria Ordre : Enterobacterales Famille : Enterobacteriaceae Genre : Escherichia</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Bacille -Gram négatif -Mobile -Aérobie -oxydase négative -Catalase positive -Fermentaire
<p>Staphylococcus aureus</p> 	<p>Règne : Procaryotae Embranchement : Firmicutes Classe : Bacilli Ordre : Bacilliales Famille : Staphylococcaceae Genre : Staphylococcus</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Coque en amas -Gram positif -Immobile -Non-sporulé -Aérobie -Catalase positive -Oxydase négative
<p>Pseudomonas aeruginosa</p> 	<p>Règne : Procaryotae Embranchement : Proteobacteria Classe : Gamma Proteobacteria Ordre : Pseudomonadales Famille : Pseudomonadaceae Genre : Pseudomonas</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Bacille -Gram négatif -Aérobie strict -Mobile -Oxydase positive -Catalase positive -Non fermentaire
<p>bacillusthuringiensis</p> 	<p>Règne : Bacteria Embranchement : Firmicutes Classe : Bacilli Ordre : Bacillales Famille : Bacillaceae Genre : Bacillus</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Gram positif - aérobies - forme bâtonnet
<p>Levure</p>	<p>Taxonomie</p>	<p>Caractères généraux</p>
<p>Condidaalbicans</p> 	<p>Règne : Fungi Classe : Saccharomycetes Ordre : Saccharomycetales Famille : Saccharomycetaceae Genre : Candida</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Levure diploide -Non encapsulée -Normalement saprophyte -Flore commensale de la muqueuse

Annexe 2:principales classes de flavonoïdes (NKHILI, 2009).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	O H	Myrecétine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictiol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	cyanidine
		OH	OH	O H	Delphénidines
Isoflavones		R5	R7	R4 ,	
		OH	OH	O H	Genisteine
		H	O- Glu	O H	Daidzeine

Annexe (A) Matériels utilisés

Verrerie et petit matériel

Bécher

Boîte de pétri

Capillaire

Disque d'antibiogramme

Ecouvillon

Entonnoir

Eprouvette graduée

Erlenmeyer

Fiole

Papier filtre

Pipette pasteur

Seringue

Spatule

Tube à essai

Verre de montre

Appareillage

Autoclave

Bain Mari

Blance de présition

Bec bunsen

Broyeur

Etuve

Haute

Micropipette

Pied à coulisse

Plaque chauffante

Réfrigérateur

Rota vapeur

Centrifugeuse

soxlet

Spectrophotomètre

HPLC



a- Centrifugeuse



b-HPLC



c-soxlet

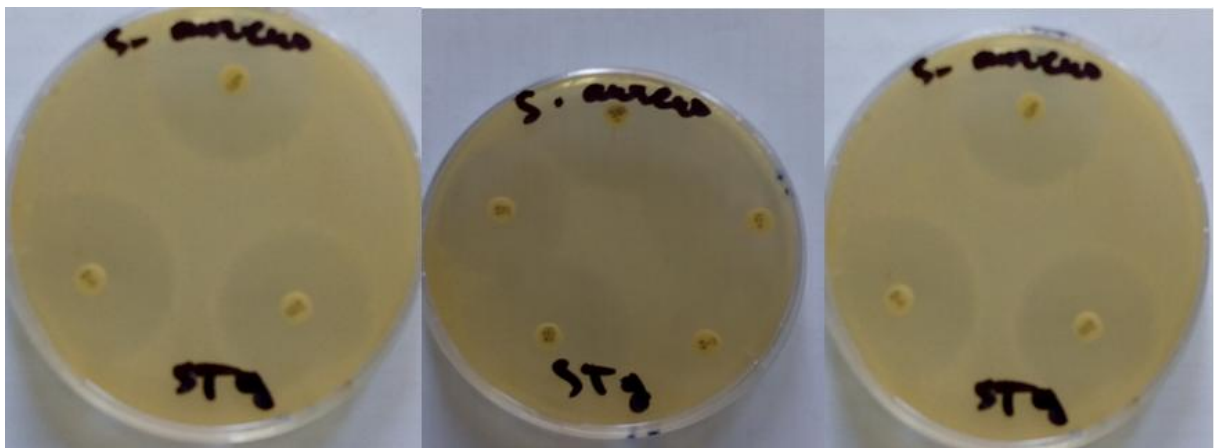


Bec bunsen et Micropipette

Annexe 3: les figures d'antibiogramme



Annexe a : antibiogramme *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853



Annexe b : antibiogramme *Staphylococcus aureus* ATCC25923



Annexe c : antibiogramme *Escherichia coli* ATCC25922

Annexe 4: les concentration de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

concentration de catéchine	4,637	9,274	12,911	18,548	23,185
Absorbance à 510 nm	0,09	0,186	0,264	0,408	0,493

Annexe 5: tableau la moyenne des absorbance des trois essais en fonction des concentrations des fraction flavonoidique et l'huile à 515 nm

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

Annexe 6: tableau de la moyenne des absorbance des trois essais extraits (l'huile , phase acétate d'éthyle , phase butanolique et phase aqueuse) par la méthode FRAP à 700nm

concentration mg/ml	butanolique	acétate	aqueuse	acidascor	huile
0,0625	0,121	0,01233333	0,099	0,055	0,74733333
0,125	0,122	0,02166667	0,16	0,162	0,95233333
0,25	0,17766667	0,163	0,47266667	0,314	1,511
0,5	0,749	0,18033333	1,253	0,463	1,835
1	1,14666667	0,416	2,35733333	0,603	3,695

Annexe 7: tableau des moyenne des trois essais d'absorbance du β -carotène à 470 nm en présence des fractions flavonoidiques et l'huile, l'acide ascorbique et le contrôle négatif.

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

Annexe 8:

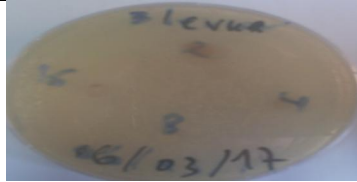
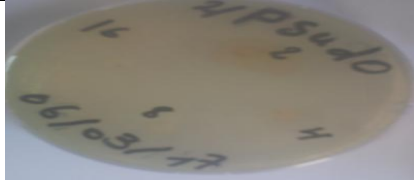
III.5.2.3.1. Diamètres des zones d'inhibitions de la solution mère de la phase aqueuse

Tableau 16 : les diamètres moyens (mm) des zones d'inhibition de la phase aqueuse

bactérie	Moyenne des diamètres (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacillus Thuringiensis</i>	-
<i>Condidaalbicans</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-

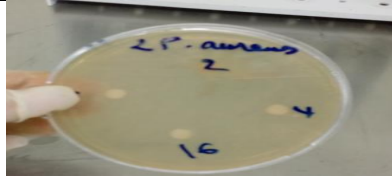
Tableau a : diamètres des zones d'inhibition des dilution de la phase acétate d'éthyle

bactérie	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus Thuringiensis</i>	-	-	-	-
<i>Condidaalbicans</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-



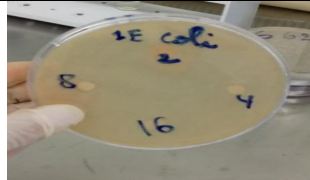
a) *Pseudomonas aeruginosa*

b) *Candida albicans*



c) *Bacillus thuringiensis*

d) *Staphylococcus aureus*



e) *Escherichia coli*

III.5.2.1.1.2. Diamètres des zones d'inhibitions des dilutions de la phase butanolique

Tableau 19 : diamètres des zones d'inhibition des dilution de la phase butanolique

bactérie	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus Thuringiensis</i>	-	-	-	-
<i>Condidaalbicans</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-

Le tableau 19 et la planche 3 révélé une resistente vis-à-vis des dilution de la phase butanolique qui n'a pas empêché la croissance des bactéries testées.

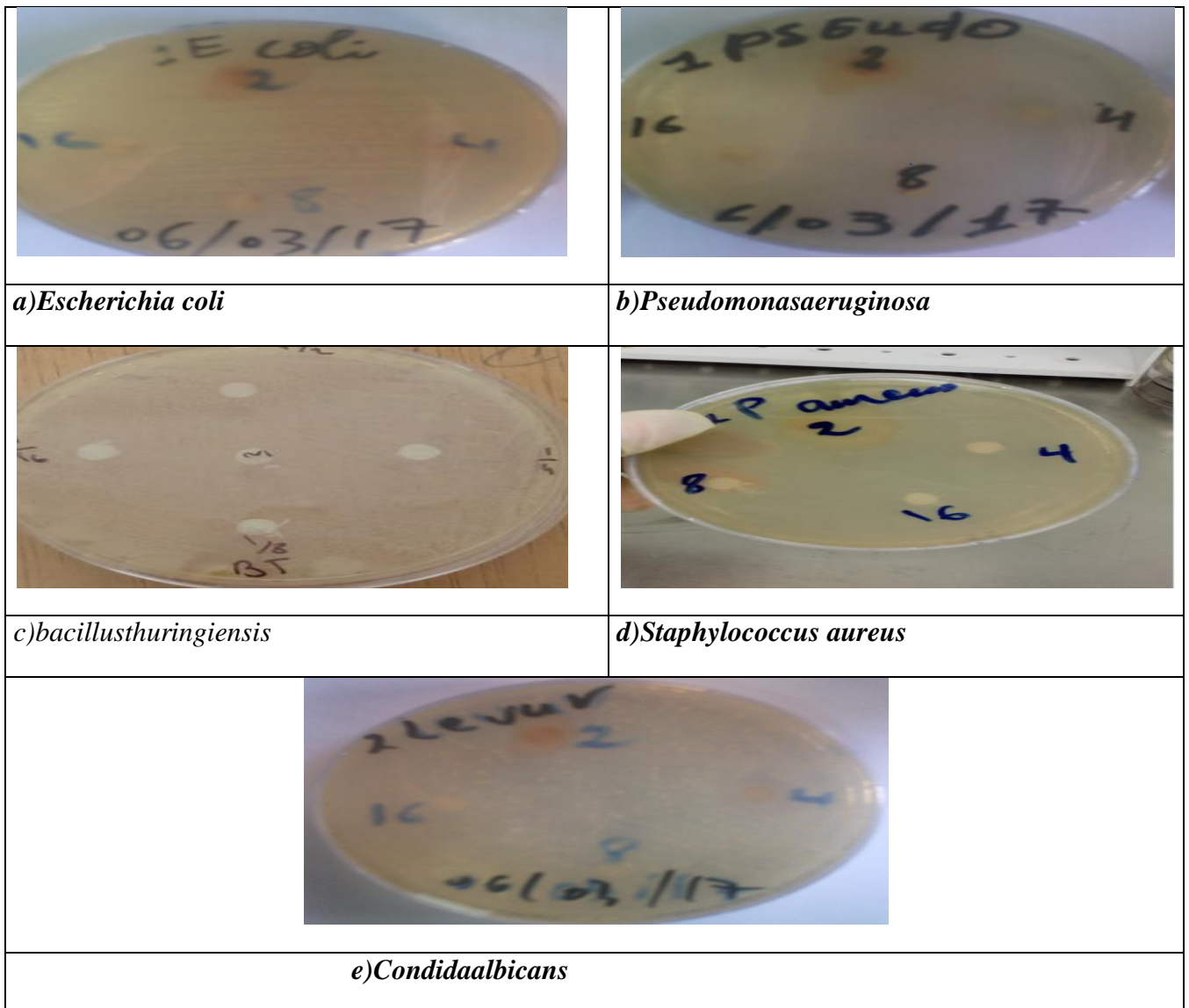
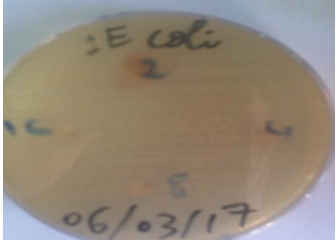
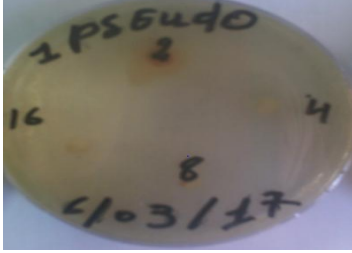
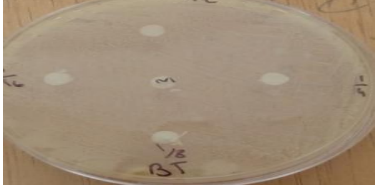
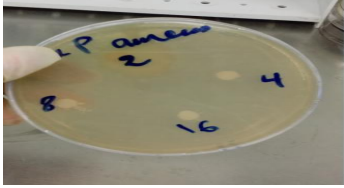
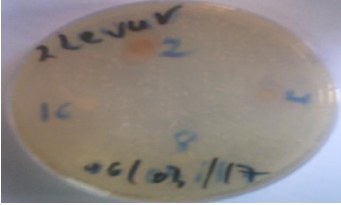


Planche 4: zones d'inhibitions des dilutions de la phase butanolique

	
<p>a) <i>Escherichia coli</i></p>	<p>b) <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>
	
<p>c) <i>Bacillus Thuringiensis</i></p>	<p>d) <i>Staphylococcus aureus</i></p>
	
<p>e) <i>Conidia albicans</i></p>	

ملخص

يهدف هذا العمل الى دراسة خصائص مضادات الاكسدة ومضادات المكروبات في مستخلص الفلافونويد لأوراق وبذور العنب. العائد من المركبات الفلافونويدية التي تم الحصول عليها هي 2.81% بواسطة اسيتاتالايثيل و 5.93% بواسطة البوتانول و 6.7% للحالة السائلة. أما عن عائد الزيت فيساوى 14.08%. ويستند الفحص الطيفي بالكروستين ان نبتة العنب غنية بالمركبات الفلافونويدية واطهر التحليل بالأشعة تحت الحمراء لزيت و مركبات الفلافونويد وجود جماعات وظيفية وروابط مزدوجة. واما عن فعالية مضادات المكروبات كُشف عن وجود نشاط مثبط للنمو المكروبات. وبينت الدراسات للمضادة الاكسدة عن طريق DPPH وعن طريقة β كاروتين والدراسة الكمية عن طريق تقنية FRAP الى جانب التحليل اللوني العالي الاداء على الطبقة السائلة الذي يكشف عن وجود العديد من مشتقات الفلافونويد.

كلمات المفاتيح: الفلافونويد, جزء الفلافونويد, المضادة للأكسدة ونشاط مضادات الميكروبات

Résumé

Le présent travail a pour objectif l'évaluation *in vitro* des propriétés antioxydantes et antibactériennes de l'extrait flavonoïdique des feuilles et d'huile des pépins de raisin. Le rendement des fractions flavonoïdiques obtenus est de 2.81% pour la fraction d'acétate d'éthyle et de 5.93% pour la phase butanolique et 6.7% pour la phase aqueuse. Les pépins ont donné un rendement de 14.08%. Le dosage des flavonoïde fait à la base de la Quercétine indique leur teneur en composés flavonoïdique. L'analyse par infrarouge des fractions flavonoïdique et l'huile, a révélé la présence des groupements fonctionnels et des double liaisons. L'activité antimicrobienne, a montrée l'existence d'une activité inhibitrice de la croissance microbienne. Le potentiel antioxydant des échantillons a été évalué en utilisant trois techniques complémentaires, l'inhibition du radical libre DPPH, le test du β -carotène/Acide linoléique et la technique de FRAP. L'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance révèle la présence de plusieurs dérivées flavonoïdique.

Mots clés : *Vitisvinifera*, fraction flavonoïdique, activité antioxydante et antimicrobienne.

Abstract

The present work aims at the evaluation *in vitro* of antioxidant and antibacterial of Flavonoid compounds of Leaves and grape seeds oil. The yield of the flavonoid obtained is 2.81% for the ethyl acetate phase and 5.93 for butanolic phase, The aqueous phase with 6.7%. Concerning the yield of oil is 14.08%. The dosage of the flavonoid made at the base of the quercetin to indicate the content of flavonoic compounds. Infrared analysis of Flavonoid Fractions and essential oil showed of functional groups and Double bonds. The antimicrobial activity showed the existence of a inhibitory activity of microbial growth. The antioxidant potential of flavonoic compounds was evaluated using three complementary techniques inhibition of free radical DPPH, the test of β -Carotene/linoleic acid and FRAP technique Allowed us to have a great inhibitory effect. Analysis of high pressure liquid chromatography reveals the presence of several flavonoid derivatives.

Key words: *Vitisvinifera*, flavonoid fraction, antioxidant and antimicrobial activity.

1. **AmraniJouteik.,Glories Y,1996** -Isolement des protoplastes de pellicules de raisin et optimisation de leur rendement .j.Intern. Sci. Vigne Vin ,30,41-45p.
2. **Attiaf., 2007** - Effet du stress hydrique sur le comportement ecophysiologique et la maturité phénolique de la vigne *Vitisvinifera* L: étude de cinq cépages autochtones de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse. 185p.
3. **Baggiolini, M., 1952**-Les stades repérés dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. Rev. romande Agrie. Vitic. Arboric, 8: 4-6.
4. **Bahorun, T.,1997** - Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius, 83-94
5. **Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H. &Buchbauer, G.,2008** - Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. Food Chemistry 108,1122–1132.
6. **B AmraniJoutei K. &Glories Y., 1995** - Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. Rev. franc. Œnol. 153, 28–31.
7. **Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R. and Rome, S. 1998** - Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Viciafabacvs* differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. Plant and Soil 203 (1): 27–36.
8. **Benhammou N, AtikBekkara F, KadifkovaPanovskaT .,2007** - Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacialentiscus* L and *Pistaciaatlantica*Desf. Adv Food Sci, 29(3): 155-16.
9. **Biemont E.,2008** -Spectroscopie moléculaire : structure moléculaire et analyse spectral.Ed.De Boeck,Bruxelles,428p.
10. **Blouin, J. and Guimberteau, G., 2000** - Maturation et maturité des raisins. Ville: Bordeaux, Feret.
11. **Borie, F., Rubio, R., Rouanet,J.L, Morales, A., Borie, G., Rojas,C. 2006** - Effects of tillage systems on soil charactectics, glomalin and mycorrhizalpropagules in a Chilean Ultisol. Soil Till. Res. 88: 253- 261.

12. **Basile A, Giordano S, Lopez SaezJa, CobianchiBc., 1999** -Antibacterial activity of pure flavonoïds isolated from mosses. *Phytochem.* 2 (8): 1419-82.
13. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C.,1995- Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LebensmittelWissenschaftund Technologie*, 28, 25-30.
14. **Bravo L. ; 1998**-Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.*Nutr. Rev.*, 56 (1), 317-333
15. **Brichee., 2011** - Changement climatique dans le vignoble de Champagne : Modélisation thermique à plusieurs échelles spatio-temporelles (1950-2100). Université Paris Diderot-Paris 7 École doctorale : E.E.S.C."Économie, Espaces, Sociétés, Civilisations. 263p.
16. **Bruneton J., 1999** - Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3e édition revue, Paris. extraits des graines de *Nigellasativa*. Mémoire de magister .Setif.
17. **Bruneton T., Gressier B.,Trozin F.,BruneteC.,Dine T., Vasseur J.,Gazin J.C.,Pinkas M.,Luycky M.et Gazine M.,1996** -Oxygen species scavenging activity of phenolic extart form hawthron fresh plant organs and pharmceutial preparation.*Arzeimittel-Forshung*,46 :1086-1089.
18. **Cadot Y .,2006** - Le lien du vin au terroir : complexité du concept de typicité. *Revue des Oenologues* 118, 9-11.
19. **Carmona, M., De Magalhaes, C., and Hammond, L., 2008** - Public Space: The Management Dimension. London, UK: Routledge.
20. **Celiktas, O. Y., E. E. H. Kocabas, E. Bedir, F. V. Sukan, T. Ozek and K. H. C. Baser.,2007** - Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinusofficinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, 100, 553-559 CSIR: Medicinal and Aromatic Plants of India. Council of Scientific and Industrial Directorate, Jammu-Tawi, India (1986).
21. **Cheynier V., 2006** - Flavonoids in wine. Dans *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and applications*; Andersen Ø. M. et Markham K. R., Eds.; CRC Press, Taylor and Friends Group: Boca Raton FL; pp 263-318.

22. **CushnieTp, HamilthohVes, Lamb Aj.,2003** - Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoïds and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.* 158(4): 281-9.
23. **Darné, G. 1991** - Recherches sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de vigne. PhDThesis, University of Bordeaux I – France.
24. **Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB.,2005** -ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neuroscipp* 752–758.
25. **Dicarlo JJ, Johnson Ko.,1999** - Velocity invariance of receptive field structure in somatosensory cortical area 3b of the alert monkey. *J Neurosci* 19:401–419.
26. **Dong, H. P., D. Z. Wang, M. H. Dai, L. L. Chan, Andh. S. Hong. 2009** -Shotgun proteomics: Tools for the analysis of marine particulate proteins. *Limnol. Oceanogr. Meth.* 7: 865–874.
27. **Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB.,2005** -ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* pp 752–758.
28. **Deghdak hala et ZaiterRahma ;2014**- Evaluation de l'activité antioxydante et anti inflammatoire de la plante médicinal algérienne *Inula.viscosa*.
29. **Elicoh-Middleton, J.r ., Chithan, K ., Theoharis, C. 2000** - Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 4(52): 673-751.
30. **Esna-AshariM,ZolfigolMA,ShiriM,Mahmoodi-Pour A,Hesari M.,2008** - Analysis of trans-resveratrol in Iranian grape cultivars by LC.Chromatographla 67,1017-1020.
31. **Faostatdata .,2010, 2011**- <http://faostat.fao.org>.
32. **Frankel, E. N., Huang, S.-W., Kanner, J., German, J.B.,1994**- Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 42:1054-1059.
33. **Frankel, E.N., Meyer, A.S.,2000**- The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1925-1940.
34. **Freedman DJ, Riesenhuber M, Poggio T, Miller EK.,2001** - Categorical representation of visual stimuli in the primate prefrontal cortex. *Science* 291:312–316.

35. **Giovanelli, G., Brenna, O., 2007-** Evolution of some phenolic components, carotenoids and chlorophylls during ripening of three Italian grape varieties. *European Food Research and Technology* 225, 145–150.
36. **Ghedira K (2005)-**Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and therapeutic uses. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
37. **Harborne JB, Williams CA ., 2000 -** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
38. **HavsteenBh .,2002 -** The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, 96: 67-202.
39. **Hoffmann, W. A. ; Lucatelli, V. M. P. C. ; Silva, F. J. ; Azeuedo, I. N. C. ; Marinho, M. da S. ; Albuberque, A. M. S. ; Lopes, A. de O. ; Moreira, S. P., 2004 -** Impact of the invasive alien grass *Melinis minutiflora* at the savanna-forest
40. **Hubert J., Paul F., Daydé J., Berger M.,2006 -** Composition variability in soy-derived dietary supplements designated for menopausal symptom prevention. *O.C.L.*, 13(4):in press.
41. **Huglin P., Schneider C., 1998 -** Biologie et écologie de la vigne. Ed Lavoisier Tec &Doc . 2^{ème} Ed. . 365p.
42. **Huglin P et Schneider T.,1991 -** Biologie et écologie de la vigneEd.Payot.Lausanne.370p.
43. **KeningY.,Vincenzo D. L et Normand B.,1995 -**Creation of a merabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the subsceptibility of potato to phytophtorainfestans
44. **Khan N., 2006 -** Mise en évidence de la stabilisation de la couleur par différents tannins de pépins de raisin. *Revue des oenologues*, 118, 33-36.
45. **Langcake, P. ;Cornford, C. A. ; Pryce, R. J. ; 1979 -**Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves . *Phytochemistry* 18, 1025-1027.
46. **Lorenz, K. H. ; Schneider, B. ; Ahrens, U. ; Seemijller, E. ; 1995 -** Detection of the apple proliferation andpeardeclinephytoplasmas by PCR amplification of ribosomal andnonribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771-776.
47. **Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. 2004 -** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*;79:727– 47.
48. **Martini A, Katerere DR, Eloff JN., 2004 -** Seven flavonoïds with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J. Ethnopharmacol.* 93 (2-3): 207-12.

- 49. Mazza G., Miniati E., Introduction. 1993** - in: Anthocyanins in fruits, vegetables and grain CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, pp. 1–28.
- 50. Mebarki A.,2010** - La région du Maghreb face à la rareté de l'eau. L'exemple du défi algérien : mobilisation et gestion durable des ressources. ICID+18 2nd International Conference « Climate, Sustainability and Development in semi-arid regions» August 16-20, 2010, Fortaleza - Ceará, Brazil.
- 51. Mesplede J,2004** -Chimie organique PC.Ed. Bréal,Rosny-sous-bois,416p.
- 52. Middleton, E.Jr.;Kandaswami, C. &Theoharides, T.C.,2000** -The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Reviews, Vol.52, pp. 673-751.
- 53. Modak B., 2001**-Actividadantibacteriana de flavonoïdesaislados des exudadoresinosid de Heliotropiumsinnuatum. Efecto del tipo de estructura. Bol. Soc. Quim.,47 (1): 366-421.
- 54. Molyneux, P.,2004**- The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol., 26, 211–219.
- 55. Moreira M.R., Ponce A.G., de Valle C.E., Roura S.I.,2005**-Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. Lebensmittel-Wissenschaftund -Technologie-LWT, 38: 565–570.
- 56. NaçiraAmara ; Fatma Zohra Melouk.,2016**- Article Algerian journal of naturalproductes .Activite antimicrobienne des esextraits des feuilles de la vigine sauvage (vites viniferasylyvestris).
- 57. OkigboRn, Mbajinka Cs, Njoku Co.,2005**- Antimicrobial potentials of (UDA) Xylopiiiaethopica and Occinumgratissimum L. some pathogenous of man. Int. J. Mol. Med. Adv. Sci. 1 (4): 392-7
- 58. Oyaizu, M.,1986** - Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307–315.
- 59. Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R. and Akev, N. 2008** -Antioxidant activity of Smilax excelsa L. leaf extracts. Food Chemistry 110: 571–583.
- 60. Rossetr., Caude M., Jardy A., 1991** -Chromatographie en phase liquide et supercritique. Paris : éd. Masson, 919 pages.

- 61. Revilla E., Ryan J.M.,2000** - Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 881: 461–469.
- S
- 62. Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F., 1998-** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76, 270-276.
- 63. Simon J-L., Eggenberger W., Koblet W., Mischler M., Schwarzen-Bach J., 1992-** Viticulture. Ed. Payot, Lausanne.
- 64. Skandrani, I., Limem, I., Neffati, A., Boubaker, J., Ben, SM., Bhouiri, W., Bouhleb I, Kilani, S., Ghedira, K., Chekir, GL.,2010** - Assessment of phenolic content, free-radical-scavenging capacity genotoxic and antigenotoxic effect of aqueous extract prepared from *Moricandiaarvensis* leaves. *Food ChemToxicol* 48: 710- 715.
- 65. Snyder, C.S., T.W. Bruulsema, T.L. Jensen, and P.E. Fixen. 2009** - Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 133:247–266.
- 66. Souquet, J. M; Cheynier, V; Brossaud, F; Moutounet, M.,1996-** Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43, 509–512.
- 67. Sun, B., and R. S. Bradley.,2005** - Reply to comment by N. D. Marsh and H. Svensmark on “Solar influences on cosmic rays and cloud formation: A reassessment,” *J. Geophys. Res.*, 109, D14206, doi:10.1029/2003JD004479.
- 68. Spranger, I., Sun, B., Mateus, A.M., De Freitas, V. & Ricardo-Da-Silva, J.M. 2008** - Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chemistry* 108, 519–532.
- 69. Touil A., Rhouati, S., Creche.,2006** - Flavonoid glycosides from *Pituranthoschloranthus*. *Chemistry of compounds*, 42(1):104-105.
- 70. U lanowska K, Traczyk A, Konopa G, Wegrzym G., 2006** - Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.* 184 (5): 271-8.
- 71. Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, GarciaParilla MC 2007-** Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230–235.
- 72. Walalyloudyid.El.,Skirdj A., Hassan E., 2003** - Le bananier, la vigne et les agrumes. *Transfert de technologie en agriculture N°109*.pp 1-4.

- 73. Waterhouse, A. L.; Lamuela-Raventó's, R. M.1994-** The occurrence of piceid, a stilbeneglucoside, in grape berries. *Phytochemistry*,37, 571-573.
- 74. Woodman OL, Chan Ech 2004 -** Vascular and anti-oxidant of flavonols and flavones. *Clin ExpPharmacolPhysiol* 31: 786-790.
- 75. Yi, O.S., Meyer, A.S. & Frankel, E.N.,1997 -** Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1301- 1307.
- 76. Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999 -**The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64:555–559.