

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Valorisation d'une biomasse végétale en
polyphénols et analyse phyto-chimique

Présenté par :
BOUTAIBA Zohra Mouna

Encadré par :
Pr : EL HADI Djamel

Co-promoteur :
MA : HAMITOUCHE Adh'ya-eddine

Année universitaire 2017/2018

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.	LA BIOMASSE	1
1.1.	Définition de la biomasse.....	1
1.2.	Les principales ressources de la biomasse	1
1.2.1.	La biomasse de l'agriculture	1
1.2.2.	La biomasse d'origine forestière	1
1.2.3.	La biomasse d'origine aquatique.....	2
1.2.4.	La biomasse d'origine industrielle	2
1.2.5.	La biomasse d'origine collective.....	2
1.3.	Inconvénients de la biomasse.....	2
1.4.	Valorisation de la biomasse	2
1.4.1.	Valorisation énergétique	3
1.4.2.	L'extraction des huiles	5
2.	PRESENTATION DE MARC DE RAISIN.....	5
2.1.	Les voies de valorisation des sous-produits vinicoles (Marc de raisin).....	6
2.1.1.	Le compostage.....	6
2.1.2.	La production de biodiesel	7
2.1.3.	Production de l'éthanol	7
2.1.4.	Extraction des huiles végétales et composés à valeur biologique	7
3.	PRESENTATION DES POLYPHENOLS.....	10
3.1.	Structure et classification des composés phénoliques.....	10
3.2.	Les composés phénoliques des marcs de raisin et leurs répartitions	11
3.2.1.	Principaux polyphénols dans le marc de raisin	11
3.3.	Répartition cellulaire des composés phénoliques	14
3.4.	Domaines d'applications des polyphénols	14
3.4.1.	Domaine de la santé	14
3.4.2.	Domaine de l'agroalimentaire	15

CHAPITRE 2: MATERIELS ET METHODES

1.	Matériels et produits	16
1.1.	Matériels.....	16
1.2.	Réactifs.....	16

2.	Matériel végétal	16
3.	Préparation de l'échantillon	16
3.1.	Séchage	16
3.2.	Triage	16
3.3.	Broyage	17
4.	EXTRACTION DES POLYPHENOLS PAR SOLVANT	18
4.1.	La délipidation	19
4.2.	Extraction des polyphénols	21
4.3.	Concentration des extraits obtenus	21
5.	DETERMINATION DU RENDEMENT	22
6.	ANALYSES PHYTOCHIMIQUES DES EXTRAITS :	22
6.1.	Dosage des phénols totaux	22
6.1.1.	Mode opératoire	23
1.1.	Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC	24
1.1.1.	Condition opératoires de l'analyse par HPLC	25
7.	EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	26
7.1.	Mesure de pouvoir de piégeage du radical DPPH	26
7.1.1.	Mode opératoire	26
8.	ANALYSE PAR INFRAROUGE ATR	28

CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSIONS

1.	Rendements d'extraction des polyphénols à partir du la pellicule et de de Marc de raisin	30
2.	Teneur en polyphénols des extraits éthanoliques de la peau de la baie de raisin et de pépin	300
3.	Résultats de l'analyse par Chromatographie Liquide à Haute Performance	322
3.	Activité antioxydante	34
4.	Analyse infrarouge des extraits phenoliques	37
	CONCLUSION	41

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Produits provenant du marc de raisin	8
Figure 1.2. Produits provenant de Pépins de raisin.....	9
Figure 1.3: Structure du noyau phénol.....	10
Figure 1.4: Section d'une pellicule de baie de raisin a maturité.....	14
Figure 2.1 : La pellicule de raisin après broyage (Photo originale 2018).....	17
Figure 2.2 : Les pépins de raisin après broyage (Photo originale 2018)	17
Figure 2.3 : Montage de Soxhlet.....	19
Figure 2.4 : Appareil Soxhlet au cours de délipidation (Photo originale 2018)	20
Figure 2.5 : Appareil Soxhlet au cours d'extraction des polyphénols, à gauche début d'extraction et à droite fin de l'extraction (Photo originale 2018)	20
Figure 2.6 : Appareil Rota-vapeur (Photo originale 2018).....	21
Figure 2.7 : Les extraits obtenus de pépin et de la peau de raisin après l'évaporation du solvant par le rota vapeur (Photo originale 2018).....	22
Figure 2.8 : Spectrophotomètre UV/Visible (Photo originale 2018).....	23
Figure 2.9 : Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance	24
Figure 2.10 : Equipement HPLC analytique (Photo originale 2018)	25
Figure 2.11 : Filtration des extraits	26
Figure 2.12 : L'activité antioxydante de l'extrait de la pellicule (Photo originale 2018)....	27
Figure 2.13: L'activité antioxydante de l'extrait de pépins (Photo originale 2018).....	27
Figure 2.14. Principe de la réflectance totale atténuée	28
Figure 2.15 : Equipement infrarouge (ATR) (photo originale 2018)	29
Figure 3.1: Histogrammerekprésente le rendement d'extraction des composés phénoliques à partir de la pellicule et pépin de marc de raisin.	30
Figure 3.2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	31
Figure 3.3 : Histogramme représente le Taux des polyphénols dans les extraits éthanoliques (la pellicule et pépin de marc de raisin).....	31
Figure 3.4 : Chromatogramme HPLC de l'extrait éthanolique obtenu de pépin de raisin ...	33
Figure 3.5 : Chromatogramme HPLC de l'extrait éthanolique obtenu de la peau de baie de raisin.....	33
Figure 3.6 : Activité antioxydante des extraits éthanolique (extrait de pépin et extrait de la peau de raisin) et de BHA.....	35
Figure 3.7 : La concentration inhibitrice à50% des extrais éthanoliques et de BHA	36
Figure 3.8.Spectre FT-IR de l'extrait de pépin	37
Figure 3.9.Spectre FT-IR de l'extrait de pellicule	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. : Principales classes de composés phénoliques	11
Tableau 1.2: Exemples de stilbènes retrouvés dans les marcs de raisin.....	12
Tableau 1.3: Exemples de flavonols retrouvés dans les marcs de raisin.....	13
Tableau 1.4: Exemples d'anthocyanes dans les marcs de raisin.	13
Tableau 3.1 : Teneurs en polyphénols des variétés de raisin.....	32
Tableau 3.2 : Composés phénoliques des extraits éthanoliques de notre étude.....	34
Tableau 3.3 : Activité 50% d'inhibition.....	35
Tableau 3.4: Les nombres d'ondes des pics identifiés dans les extraits peau et pépin (cm ⁻¹).....	39

LISTE DES ABBREVIATIONS

Absblanc : Absorbance de blanc.

Abséch : Absorbance de l'échantillon.

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BHA : Butyl-hydroxy-anisole.

BHT : Butyle hydroxy toluène

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

DIC : Détente instantanée contrôlée

EAG : Equivalant d'acide gallique

GRP : les protéines riches en glycine

HRGP : les glycoprotéines riches en hydroxyprolines

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

mg : Milligramme

min : Minutes

mL : Millilitre

pKa : constante d'acidité

pH : Le potentiel hydrogène

POPE : programmation fixant les orientations de la politique énergétique

PRP : les protéines riches en proline

U.V : ultra-violet-visible

V/V : Volume/ Volume

RESUME

Le présent travail porte sur la caractérisation des composés phénoliques contenus dans la pellicule et le pépin du marc de raisin extrait par la méthode de Soxhlet. La comparaison entre ces deux extraits (pellicule et pépin) porte sur le rendement d'extraction des métabolites visés, l'analyse chromatographique et l'activité antioxydante des extraits obtenus.

Dans un premier temps, l'étude comparative a montré que le rendement d'extraction le plus élevé a été obtenu pour l'extrait de la pellicule. Cependant, les caractéristiques phytochimiques des deux extraits de marc de raisin sont déterminées, les teneurs en polyphénols de la pellicule et du pépin sont respectivement 102,99 mg EAG/g et 112,59 mg EAG/g.

L'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance a permis de mettre en évidence plusieurs types de composés organiques dans les extraits, les aires des pics obtenus montrent, que dans la même variété de biomasse et dans des parties différentes les quantités diffèrent. Par contre l'analyse par FT-IR n'a pas révélé plusieurs informations sur la composition chimiques des extraits.

Dans la dernière partie de ce travail, l'activité antioxydante est déterminée par la mesure de pouvoir de piégeage du radical DPPH qui a montré que la pellicule présente une activité inhibitrice plus importante que celle du pépin.

Mots clés : Polyphénols, marc de raisin, pellicule, pépin.

ABSTRACT

The present work relates to the characterization of the phenolic compounds contained in the skin and the seeds of grape pomace extract by the method of Soxhlet. The comparison focuses on the extraction yield of target metabolites, chromatographic analysis and antioxidant activity of the extracts

First, the comparative study showed that the highest extraction efficiency was obtained for the extract of the skin. However, the phytochemical characteristics of the two extracts are determined, the polyphenol content of the skin and the seeds are respectively 102,99 EAG mg/ g and 112,59 EAG mg/g.

The high performance liquid chromatography analysis was used to identify several types of organic compounds in the extracts, the peak areas obtained show that the amounts differ even for the same variety but different part of the same biomass. However ,the FT-IR analysis could not reveal more information about the chemical composition of the extracts. In the last part of this work, the antioxidant activity was determined by the DPPH radical scavenging power showed that the skin has a higher inhibitory activity than that of the seeds

Key words: Polyphenols, grape pomace, skin, seeds.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تحديد خصائص المركبات الفينولية الموجودة في كل من قشور و بذور العنب المستخلصة بتقنية سوكلسي.و تركز المقارنة على مردود استخلاص هذه المركبات، الفحص الكروماتوغرافي و فعالية المستخلصات المتحصل عليها ضد الاكسدة

أولاً، أظهرت الدراسة أن أعلى مردود استخلاص تم الحصول عليه من مستخلص قشور العنب، وتم تحديد مستوى المركبات الفينولية في قشور و بذور العنب على التوالي (102.99مغ حمض غاليك/غ) و (112.59مغ حمض غاليك/غ)

و قد سمح التحليل باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء بالكشف عن وجود عدة أنواع من المركبات العضوية في المستخلصات مع اختلاف نسبتها من مستخلص إلى آخر في نفس النوع من الكتلة الحيوية لكن في جزء مختلف منها. اما التحليل بواسطة الأشعة تحت الحمراء لم يمكن من الكشف عن مزيد من المعلومات حول المكونات الكيميائية للمستخلص

في الجزء الأخير من هذا العمل، تم تحديد النشاط المضاد للأكسدة و الذي اظهر أن مستخلص قشور العنب لديه نشاط مثبط للأكسدة اعلى من مستخلص البذور

الكلمات المفتاحية: المركبات الفينولية، العنب، قشرة العنب، بذور العنب.

INTRODUCTION GENERALE

Avec le temps qui coure et avec les menaces de pollution de la planète, tout le monde cherche à réduire la quantité de déchets produits [1].

L'agriculture génère des quantités importantes de sous-produits qui ne sont généralement pas dangereux, mais la forte teneur en matière organique, et le fait que la production soit concentrée dans une période particulière de l'année pose des problèmes potentiels de pollution [2].

Pour le monde viti-vinicole la question se pose également et de plus en plus les vignerons essaient non seulement de diminuer leurs déchets, mais aussi de trouver des moyens de valorisation [1]. L'industrie du vin constitue un élément important de l'économie en plusieurs régions du monde, et la vigne (*Vitis vinifera L.*) est l'une des plus importantes cultures de fruits, avec plus de 60 millions de tonnes produites chaque année [3]. Environ 80% des récoltes sont utilisées pour la fabrication du vin, aussi appelée vinification [4]. Des quantités considérables de sous-produits sont générées lors de la vinification. La très grande quantité de biomasse constituée par ces déchets produits à l'échelle planétaire représente une ressource énergétique et chimique très peu exploitée jusqu'à présent.

Le marc de raisin est le principal sous-produit de la vinification. Il est constitué du résidu solide (pulpe, pépins, pellicules et rafles) restant après l'étape de pressurage du vin blanc ou du vin rouge [5]. Il constitue environ 20% du poids des raisins utilisés pour la vinification, ce qui génère presque 9 millions de tonne par an [6,7]. Une large gamme de produits est retrouvée dans ces marcs comme l'éthanol, les tartrates, l'acide citrique et les fibres alimentaires [8]. Les valorisations actuelles de ces sous-produits concernent le compostage à partir des rafles ; l'alimentation animale et le compostage à partir des pellicules ; la production d'huile et l'extraction de protéines à partir de pépins.

Une attention particulière est récemment portée sur la caractérisation quantitative et qualitative des polyphénols issus de ces sous-produits [9,10].

En effet, les polyphénols, métabolites secondaires des plantes, suscitent actuellement un

intérêt croissant en raison, essentiellement, de leur propriété naturelle d'antioxydants.

Ces molécules permettraient, entre autres, de réduire ou limiter le développement de certaines maladies cancéreuses et cardio-vasculaires [11], d'où l'intérêt de les valoriser.

Ce travail est centré sur la valorisation des polyphénols dans des sous-produits vinicoles (le marc de raisin). Il s'inscrit dans la tendance actuelle d'utilisation d'une biomasse d'origine végétale, tant dans le cadre d'applications pharmaceutiques que parapharmaceutiques ou agroalimentaires.

L'objectif de notre travail consiste à extraire, quantifier et identifier les composés phénoliques présents dans la pellicule et dans les pépins triés du marc de raisin. C'est une étude comparative des composés phénoliques de ces deux extraits et cette comparaison porte plus précisément sur la quantité et la qualité des extraits obtenus.

Notre travail est organisé en plusieurs parties:

- 1^{ère} partie : Synthèse bibliographique sur la biomasse végétale étudiée et ses métabolites secondaires, en particulier les composés phénoliques ;
- 2^{ème} partie : partie expérimentale, qui consiste d'abord à présenter les techniques et les méthodes utilisées pour extraire et caractériser les composés phénoliques de marc de raisin (pellicule et pépin) ;
- 3^{ème} partie : consacrée à la description et la discussion des résultats obtenus.

**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

1. LA BIOMASSE

1.1. Définition de la biomasse

La biomasse est la matière végétale dérivée de la photosynthèse, réaction entre le CO₂ dans l'air, l'eau et la lumière du soleil. Typiquement, la photosynthèse convertit moins de 1% de la lumière du soleil disponible [6]. Cette énergie est stockée dans les liaisons chimiques des végétaux.

En toute rigueur, c'est l'ensemble de la matière d'origine vivante. Les textes français et européens donnent différentes définitions qui peuvent varier sur des points de détails. L'article 29 de la loi 2005-781 de programmation fixant les orientations de la politique énergétique dite " POPE", du 13 juillet 2005, la définit ainsi :

« La biomasse est la fraction biodégradable des produits, déchets et résidus provenant de l'agriculture, y compris les substances végétales et animales, issues de la terre et de la mer, de la sylviculture et des industries connexes ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et ménagers ». Elle est ainsi caractérisée par sa composition chimique comportant principalement du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène [12].

1.2. Les principales ressources de la biomasse

La biomasse est donc partout et disponible en grande quantité. Plus précisément, la biomasse exploitable par l'homme peut être classée suivant cinq origines différentes [13]:

1.2.1. La biomasse de l'agriculture

Qui regroupe les cultures alimentaires et énergétiques mais également les résidus, par exemple les tiges non consommables, et les déchets de l'agriculture tels que les surplus et produits non-calibrés pour la consommation et, finalement, les effluents d'élevage comme les déjections et litières animales qui forment les fumiers et les lisiers.

1.2.2. La biomasse d'origine forestière

Elle englobe les forêts soit le bois comme matière première de même que les résidus et déchets issus de l'activité forestière lors de la première transformation du bois.

1.2.3. La biomasse d'origine aquatique

Ce soit les résidus des activités de pêche et d'aquaculture ainsi que les cultures d'algues et de micro- algues.

1.2.4. La biomasse d'origine industrielle

Elle regroupe principalement tous les produits connexes de l'industrie agroalimentaire et de l'industrie du bois de deuxième transformation.

1.2.5. La biomasse d'origine collective

C'est l'ensemble des déchets produit par l'homme et notre société, soit les déchets biodégradables de la communauté comme les boues d'épurations issues des eaux usées, les bois élagués dans les parcs et jardins (déchets verts), et les ordures ménagères [13].

1.3. Inconvénients de la biomasse

La biomasse peut être polluante si elle est mal utilisée. (Exemple : Un hectare de sol absorbe normalement 4 tonnes de dioxyde de carbone par an alors qu'un hectare mal-labouré rejette 1tonne de dioxyde de carbone par an).

Pour produire de la biomasse, il faut des terres agricoles, sauf qu'il n'y a peu disponible.

L'inconvénient majeur de la mise en pratique de la biomasse est que le bois, qui devient source d'énergie après combustion, est souvent surexploité par les industriels. Il y a déforestation. Cela peut avoir des effets nocifs sur la biodiversité. De plus la combustion du bois rejette des éléments néfastes dans l'atmosphère [14].

1.4. Valorisation de la biomasse

Les ressources de la biomasse sont disponibles à grande échelle. La biomasse est une ressource renouvelable lorsqu'elle est utilisée et gérée de façon durable. La biomasse participe au traitement et à la destruction des déchets organiques. Aujourd'hui la biomasse est principalement valorisée par l'homme dans quatre domaines : l'alimentation (pour l'homme et l'animal), l'industrie (chimie végétale), l'énergie (bois de chauffage, biocarburants, ...) et la construction (bois de construction, menuiserie, ...) [15].

1.4.1. Valorisation énergétique

Pour pouvoir utiliser la biomasse en tant que ressource d'énergie, il faut savoir transformer la matière première qui la compose en un vecteur énergétique plus utile et plus facilement stockable et transportable pour en différer l'utilisation dans le temps et l'espace. La biomasse de départ est alors transformée au moyen de processus de conversion en combustibles solides (biomasse solide obtenu par séchage), liquides (les biocarburants) et gazeux (gaz de synthèse et biogaz). Les énergies produites à partir de la biomasse sont de types électrique, calorifique et moteur et sont appelées les bioénergies. Trois types de filières technologiques existent pour la transformation de la biomasse depuis la matière première en produits ressources énergétiques. On distingue les processus thermochimiques et les processus biochimiques ou biologiques et finalement l'extraction mécanique [16].

1.4.1.1. Les conversions thermochimiques

Les conversions thermochimiques incluent la combustion, la gazéification, la pyrolyse et la liquéfaction et la valorisation hydro-thermique. Elles permettent d'utiliser surtout la biomasse dite « sèche » : soit celle-ci possède une teneur en humidité suffisamment basse au départ comme le bois sec et la paille, soit elle doit passer par une phase de séchage.

a. La combustion

Elle reste le moyen de valorisation énergétique le plus simple, le plus rapide et le plus rentable et donc le plus employé. Elle est réalisée en présence contrôlée d'oxygène et produit des fumées chaudes qui soit pourront être directement utilisées comme chaleur, soit, via transformation en vapeur, feront tourner une turbine à vapeur qui produira de la Chaleur et /ou de l'électricité. La biomasse solide peut-être également transformées en chaleur par une Co-combustion avec du charbon

b. La gazéification

Elle est la conversion de la biomasse en gaz combustible. Il s'agit d'une oxydation partielle de la biomasse qui se passe avec une quantité limitée et contrôlée d'air à haute température (800°C-900°C). Les gaz synthétiques produits sont appelés « syngaz ». Ils peuvent fournir de l'électricité et de la chaleur via une turbine à gaz puis une turbine à

vapeur ou directement par un moteur. Ils peuvent également être utilisés directement comme fuel pour les engins au gaz ou produire du gazole de synthèse [17].

c. La pyrolyse

Elle consiste à chauffer la biomasse à une température d'environ 500°C -700°C sans air, c'est-à-dire sans la brûler. Elle a pour but sa décomposition en partie gazeuse, en partie solide (le charbon de bois) et en partie gazeuse condensable (les huiles). On différencie la pyrolyse flash qui favorisera la formation des huiles et la carbonisation (pyrolyse lente) avec prédominance de l'obtention du charbon de bois. Les gaz seront comme lors de la gazéification valorisée en tant que carburant, chaleur ou électricité, les huiles comme carburants et, pour terminer, le charbon comme matière première pour, par exemple, la combustion.

d. La liquéfaction

C'est le procédé hydro-thermique permet de produire, dans une ambiance humide maintenue à haute pression, des hydrocarbures liquides et des huiles qui pourront, après raffinage, être utilisés comme essences synthétiques (méthanol, diesel, kérosène et LPG). Il s'agit des procédés les plus complexes et coûteux que les trois premiers et fournissant de bon rendement. Ils sont donc très peu employés.

1.4.1.2. Les conversions biochimiques

Les conversions biochimiques regroupent la digestion anaérobie et la fermentation. Elles valorisent surtout la biomasse dite « humide » comme les boues, les lisiers et les fumiers. Elles sont inadaptées aux matières contenant de la lignine comme le bois et la paille.

a. La digestion anaérobie -

Elle est également appelée fermentation méthanique, méthanisation ou encore bio-méthanisation, permet la conversion directe de la biomasse en gaz, appelé biogaz, grâce à des bactéries dans un environnement dépourvu d'air. Le reste de la biomasse non convertie en biogaz est appelé le digestat. Il s'agit d'un effluent liquide très utile comme

fertilisant. Le biogaz est un mélange de méthane (CH_4) et de dioxyde de carbone (CO_2) – à peu près deux tiers de CH_4 et un tiers de CO_2 – avec des traces d'autres gaz. Sa composition varie suivant la source fermentée mais plus la proportion de méthane est importante, plus le gaz est « riche ». Il est directement exploitable dans une turbine ou un moteur et peut être aussi exploité après épuration comme fuel gazeux. Il peut également être injecté dans le réseau de gaz naturel [13].

b. La fermentation alcoolique

Elle entraîne la formation d'éthanol à partir des sucres fermentescibles de la biomasse. Ceux-ci sont obtenus par hydrolyse de biomasse tels que les betteraves, les céréales ou encore la canne à sucre. Ainsi, des enzymes transforment l'amidon ou la cellulose en glucose et des levures transforment ce dernier en éthanol. Ce processus entraîne également la formation de dioxyde de carbone et un dégagement de chaleur. L'éthanol, ou bioéthanol, peut être directement valorisé comme biocarburant après distillation et épuration [13].

1.4.2. L'extraction des huiles

L'extraction mécanique d'huiles à partir de la biomasse de type « oléagineuse » ou « aquatique » comme le colza, le tournesol, le soja ou encore les microalgues et les huiles végétales usagées – permet, après estérification ou hydrotraitement, de fournir du biodiésel ou du gazole synthétique. L'extraction mécanique produit aussi un résidu solide appelé « cake » qui peut être utilisé pour le fourrage animalier. Les huiles végétales peuvent également être utilisées pures comme carburants mais cela nécessite des moteurs adaptés qui n'existent pas sur le marché automobile actuel [15].

2. PRESENTATION DE MARC DE RAISIN

La vigne est l'une des plus importantes cultures de fruits, avec plus de 60 millions de tonnes produites chaque année. Le marc de raisin est le principal sous-produit de la vinification, qui peut être riche en composés d'intérêt. Il est constitué du résidu solide restant après l'étape de pressurage du vin blanc ou du vin rouge [18,19]. Les marcs de raisin constituent environ 20% du poids des raisins utilisés pour la vinification [5]. Depuis le 1^{er} janvier 2016, toute entreprise qui produit plus de 10 tonnes par an de déchets est

obligée de les recycler. Aussi, ça concerne les entreprises, les collectivités que les exploitations agricoles. On estime qu'environ 13 millions de tonnes de marc de raisin sont produites à l'échelle mondiale chaque année [20].

Ce qui génère presque de 9 millions de tonne par an [21, 22] d'où la nécessité de découvrir des méthodes de valorisation des déchets du vin.

Ces déchets comprennent les pépins, les tiges, les lies et les peaux de raisin. Tous sont chargés en nutriments. Bien il s'agit de minéraux et de matières organiques qui sont utilisés par des organismes vivants.

2.1. Les voies de valorisation des sous-produits viticoles (Marc de raisin)

La viticulture et l'œnologie sont donc dans l'air du temps par la valorisation des « restes » permettant la diminution de la pollution par des déchets [18].

Les différentes valorisations possibles des « déchets » de l'œnologie pouvant être réalisés sont :

2.1.1. Le compostage

Les composts sont des amendements organiques de couleur brune, livrés en vrac, plus ou moins décomposés selon leur état de maturation et leur affinage éventuel par criblage. Le compostage représente une des solutions possibles pouvant être adoptée pour valoriser le marc de raisins. Il permet en outre l'obtention d'un résidu riche en matières organiques humifiables, en microorganismes et en sels minéraux, utilisable en agriculture comme amendement organique. Si le marc de raisins peut être utilisé brut comme amendement organique dans les sols de vignoble, divers travaux ont montré l'intérêt de la pratique du compostage préalable dans le cas où les apports doivent être faits à un sol de faible activité biologique (cas de la majeure partie des sols viticoles) [23].

Le compostage du marc de raisins a été maintes fois étudié aussi bien dans les aspects physico-chimiques, microbiologiques que technologiques [24,25]. Il constitue une solution locale de valorisation des concentrés de vinasses de lies (potassique, à forte charge organique).

2.1.2. La production de biodiesel

La production de biodiesel est également possible à partir des marcs de raisin. Après séparation mécanique, les graines (pépins) sont pressées pour donner des huiles insaturées qui peuvent être brûlées directement dans des moteurs à combustion interne.

2.1.3. Production de l'éthanol

Les marcs sont utilisés comme une source d'éthanol économiquement intéressante.

2.1.4. Extraction des huiles végétales et composés à valeur biologique

2.1.4.1. Huiles végétales de pépin de raisin

Les pépins de raisin, ces graines qui n'ont plus d'utilité après pressurage dans le procès de vinification, vont pouvoir intéresser d'autres filières. Bien sûr la filière agroalimentaire qui les transformera en huile de pépin de raisin, mais pas seulement, les pépins de raisin peuvent également servir à l'extraction de tanins, qui vont être utilisé toujours dans différentes industries [1].

2.1.4.2. Poudre d'anthocyanes

En effet le marc de raisin peut également être utilisé pour produire des poudres d'anthocyanes. Les anthocyanes sont des molécules colorées rouge-violet, que seront extraites des marcs par des techniques chimiques assez complexes. Elles seront utilisées soit comme colorant dans les cosmétiques ou l'industrie alimentaire, soit comme molécule d'intérêt pour la santé dans les « neutraceutiques » qui sont les alicaments.

2.1.4.3. Composés phénoliques

Les voies de valorisation actuelles des marcs (alimentation animale et fertilisant) ne sont pas satisfaisantes et posent des problèmes économiques et environnementaux aient réduit leur utilisation. De nos jours, une grande importance a été accordée à la valorisation des composés phénoliques du marc du raisin. En fait, les marcs du raisin sont riches en composés phénoliques dotés d'un fort pouvoir antioxydant, les composés constitués principalement des flavonoïdes et des non flavonoïdes [26]. D'où l'intérêt de valoriser ces marcs, tout en optimisant l'extraction de ces composés phénoliques [27] présentant une capacité de réduire le risque des cancers et maladies cardio-vasculaires [28, 29].

Les composés qui peuvent être récupérés à partir des marcs de raisin et leurs utilisations sont présentés dans les figures suivantes (figure 1.1 et 1.2) [30].

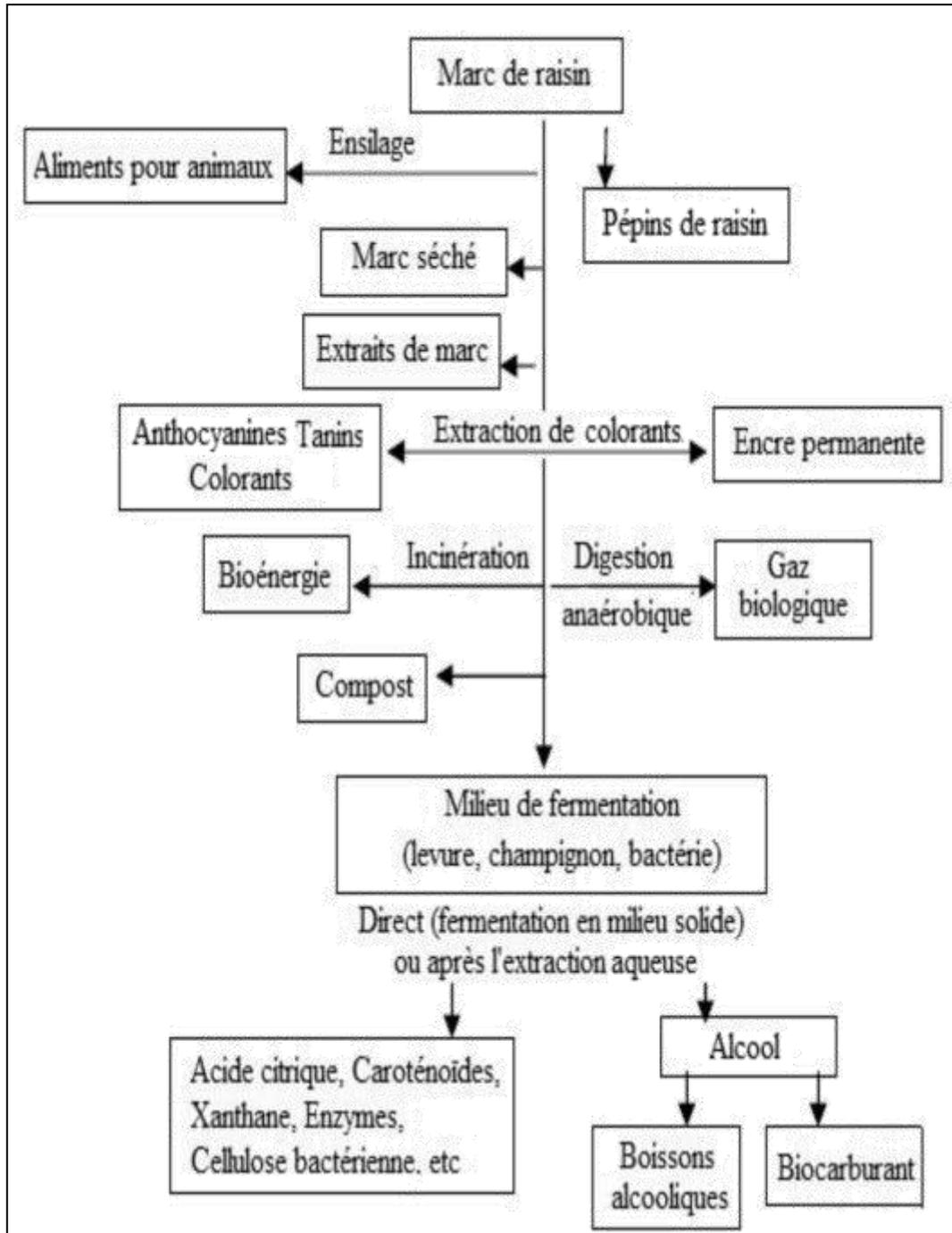


Figure 1.1. Produits provenant du marc de raisin

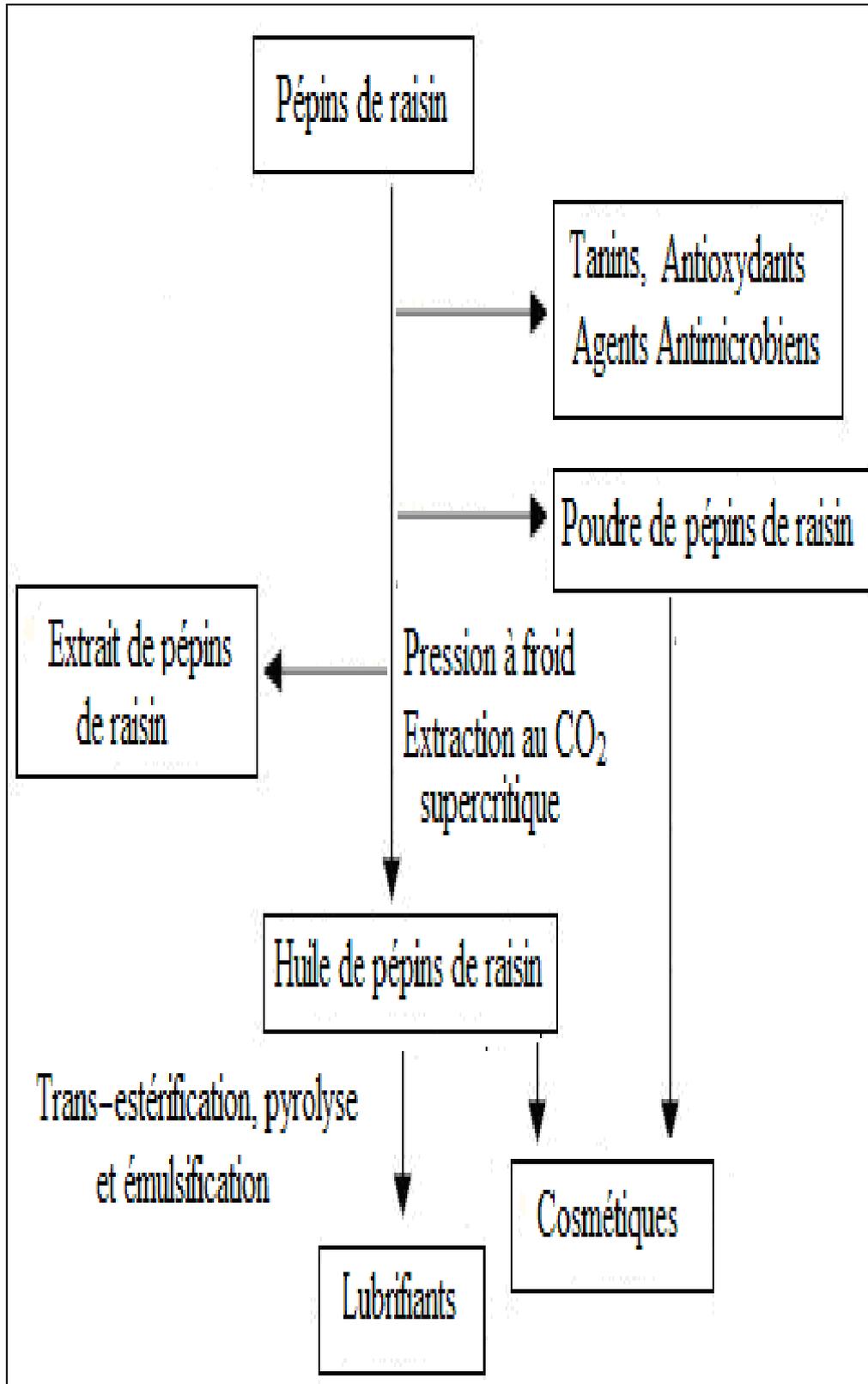


Figure 1.2. Produits provenant de Pépins de raisin

3. PRESENTATION DES POLYPHENOLS

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des substances chimiques possèdent dans leurs structures un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles

OH [21], voir la (Figure 1.3) [31].

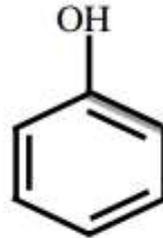


Figure 1.3: Schema du noyau phénol

Ce sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire [15,16]. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal. Cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme [17].

Au niveau végétal, les composés phénoliques sont un moyen de défense contre le rayonnement U.V, les agressions par les pathogènes et ils contribuent à la pigmentation des plantes [18 ,19].

3.1. Structure et classification des composés phénoliques

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux. Il est par ailleurs toujours difficile d'utiliser une nomenclature simple et homogène pour désigner les différents composés phénoliques [22].

Actuellement dans la botanique, on est parvenu à identifier et à isoler plus de 8000 composés phénoliques, ceux-ci sont répartis en différentes classes qui elles-mêmes peuvent être divisées en deux classes suivant la structure chimique du composé : les composés non flavonoïdes et les composés flavonoïdes [32, 33]. Ces composés peuvent être groupés dans le tableau suivant [34 ,35] :

Tableau 1.1. : Principales classes de composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuse espèces
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïque	p- hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamique coumarines	Acide caféique Scopolétine	Pomme de terre, pomme, citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine Daidzeine	Fruits, légumes, fleurs, soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	Proanthocyanidines	Raisin, Kaki

Les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins sont considérés comme les principaux composés phénoliques [36, 37].

Les composés non flavonoïdes sont représentés par les acides phénoliques, qui comprennent les acides benzoïques (acide gallique) [38].

Les composés flavonoïdes sont constitués d'un noyau phénolique porteur d'une chaîne latérale insaturée en C3 (acide caféique) [39].

3.2. Les composés phénoliques des marcs de raisin et leurs répartitions

3.2.1. Principaux polyphénols dans le marc de raisin

Les composés phénoliques présents dans le marc de raisin appartiennent à différents groupes : les dérivés phénoliques simples, les flavonoïdes et les structures phénoliques plus complexes condensés.

3.2.1.1. Les stilbènes

Ce sont les plus classiquement présents dans le marc de raisin [23]. Ils sont situés dans les pellicules des raisins et qui comportent une fonction de protection aux stress biotiques tels que les maladies fongiques, et aux stress abiotiques tels que les rayons ultraviolets du soleil [40 et 41].

Les stilbènes sont également détectés dans les pépins [20 et 26] et les rafles, [26, 27] rapportent des teneurs dans des pépins de Pinot, Chardonnay ou Gamay d'à peine 1mg /kg de resvératrol et picéïde dans des pépins de variétés muscats. Des concentrations plus importantes (jusqu'à 7800 mg/kg [28] sont retrouvées dans les rafles. Le tableau (1.2) présente les différents stilbènes retrouvés dans le marc de raisin [29]

Tableau 1.2: Exemples de stilbènes retrouvés dans les marcs de raisin.

Stilbènes	R ₁
<i>Trans</i> -Polydatine	glucose
<i>Trans</i> -Resvératrol	H

3.2.1.2. Les Composés flavonoïdes

Dans le marc de raisin, les plus représentés sont les anthocyanes, les flavanols et les flavonols.

a. Les Flavonols

Dans les marcs de raisin, les principaux composés retrouvés sont le kaempférol et ses hétérosides, la quercétine et ses hétérosides et quelques hétérosides de l'isorhamnétine [42]. Dans les raisins, les flavonols tels que la myricétines, la quercétine l'isorhamnétine et le kaempférols ont la plupart du temps présents sous forme d'O- glycosides [43, 44].

Les différents flavonols retrouvés dans le marc de raisin sont présenté dans le tableau (1.3) [29]:

Tableau 1.3: Exemples de flavonols retrouvés dans les marcs de raisin.

Flavonols	R ₁	R ₂	R ₃
Kaempférol	OH	H	H
Kaempférol 3- <i>o</i> -glucoside	OH	H	glucose
Quercétine	OH	OH	H
Quercétine 3- <i>o</i> -glucoside	OH	OH	glucose
Quercétine 3- <i>o</i> -galactoside	OH	OH	galactose
Quercétine 3- <i>o</i> -rhamnoside	OH	OH	rhamnose

Les monomères sont essentiellement la catéchine, l'épicatéchine gallate et l'épicatéchine. Ce sont les précurseurs des tanins condensés et on les retrouve en quantité voisine de 200 mg/L dans les pépins mais ces valeurs varient grandement d'un cépage à l'autre.

b. Les anthocyanes

La couleur des raisins est due à l'accumulation des anthocyanes qui sont localisées uniquement dans les vacuoles des cellules de l'épiderme des baies sauf pour les cépages teinturiers où elles sont également présentes dans la pulpe [45, 46]. Les anthocyanes sont les pigments rouges des raisins.

Les principaux anthocyanes présents, aussi bien dans le raisin que dans les marcs de raisin, sont des dérivés glucosylés de cyanidine, de péonidine, de pétunidine, de delphinidine et de malvidine. La teneur globale (de 500 mg/kg jusqu'à 3 g/kg) et les proportions de chaque anthocyanes sont des caractéristiques variétales [47].

Le tableau (1.4) présente les anthocyanes retrouvés dans le marc de raisin [29]

Tableau 1.4: Exemples d'anthocyanes dans les marcs de raisin.

Anthocyanes	R1	R2	R3	R4*
Cyanidine 3- <i>o</i> -glucoside	OH	OH	H	glucose
Delphinidin 3- <i>o</i> -glucoside	OH	OH	OH	glucose
Malvidin 3- <i>o</i> -glucoside	OCH ₃	OH	OCH ₃	glucose
Malvidin 3- <i>o</i> -acetylglucoside	OCH ₃	OH	OCH ₃	acetyl-glucose
Malvidin 3- <i>o-p</i> -coumaroylglucoside	OCH ₃	OH	OCH ₃	<i>p</i> -coumaroyl-glucose
Peonidin 3- <i>o</i> -glucoside	OCH ₃	OH	H	glucose
Petunidin 3- <i>o</i> -glucoside	OCH ₃	OH	OH	glucose

3.3. Répartition cellulaire des composés phénoliques

A l'échelle cellulaire, la répartition des composés phénoliques est très caractéristique. Les polyphénols peuvent se retrouver liés aux polysaccharides de la paroi cellulaire, stockés dans les vacuoles cellulaires ou également associés au noyau cellulaire [48].

La figure (2.4) donne une section d'une pellicule de baie de raisin à la maturation. [49]

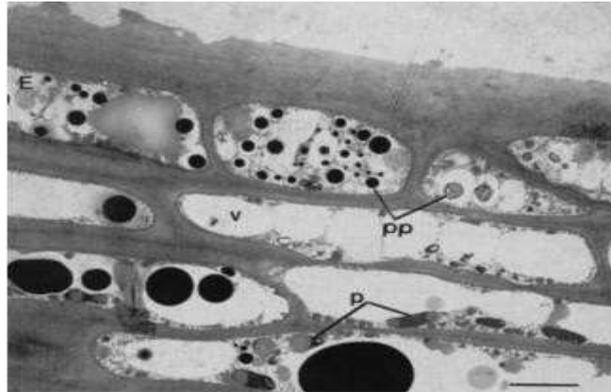


Figure 1.4: Section d'une pellicule de baie de raisin à maturité (amidon et gouttelette de lipide présents dans les plasmides (p), dépôts de polyphénols dans les vacuoles (v) sous forme de gouttelettes réfléchissantes (pp)).

Certains flavonoïdes (quercétine, kaempférol) pourraient être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique [50] mais toujours en très faible concentration. La présence de ces associations pose de nouvelles questions comme par exemple la capacité des polyphénols à protéger l'ADN contre les stress oxydatifs via leurs activités antioxydantes [51].

3.4. Domaines d'applications des polyphénols

Les principaux domaines d'application des polyphénols sont la santé, et l'agroalimentaire plus le domaine cosmétique.

3.4.1. Domaine de la santé

La tendance actuelle vise à valoriser de plus en plus les ingrédients naturels à travers leurs effets bénéfiques pour la santé. De nombreuses études épidémiologiques ont montré l'effet protecteur des polyphénols dans les fruits et légumes contre les maladies dégénératives en raison de leur activité antioxydante. Ainsi, des études ont montré que les composés

phénoliques présentait des activités antivirales, anti-inflammatoires, antitumorales et avaient un rôle bénéfique dans la prévention des cancers et des maladies cardiovasculaires [51-56].

Les polyphénols sont aussi utilisés dans le domaine de l'ophtalmologie. Par exemple, les anthocyanes interviennent pour améliorer la vision nocturne, lors de cas de myopie évolutive et de rétinopathies [57].

3.4.2. Domaine de l'agroalimentaire

Les polyphénols contenus dans les aliments jouent un rôle majeur sur les principales propriétés organoleptiques des produits végétaux frais et transformés. Ils interviennent dans la perception de la saveur du produit alimentaire et tout particulièrement sur les sensations d'amertume et d'astringence. Il existe divers produits pour lesquels l'amertume est à la fois caractéristique et recherchée : café, cacao, limonade, bière... [58]. Certains polyphénols possèdent également une saveur sucrée comme la néo hespéridine qui peut être utilisée en tant qu'édulcorant [59].

Les polyphénols tels que les anthocyanes sont utilisés comme des colorants dans les aliments. Les principales utilisations sont les boissons, la confiserie, les préparations de fruits et les produits laitiers. Les anthocyanes les plus utilisées sont extraites de raisin, d'hibiscus, de sureau et de chou rouge.

Dans la perspective d'augmenter la durée de vie des aliments, des composés phénoliques à propriétés antioxydantes sont rajoutées dans la formulation des produits. Ces antioxydants jouant le rôle de conservateurs [60].

Ainsi, les marcs de raisin renferment des quantités non négligeables de polyphénols. Leurs propriétés intéressantes dont leur puissant pouvoir antioxydant justifient les nombreux travaux mis en œuvre pour extraire ces molécules. D'autre part, la connaissance de la localisation des polyphénols au sein du marc permet de mieux déterminer le type d'extraction approprié. Les polyphénols étant concentrés en grande partie dans la pellicule et les pépins des raisins, plus précisément au niveau des parois et membrane cellulaire [61].

Le travail a été réalisé au niveau de Centre de Recherche et Techniques en analyses Physico-chimique (CRAPC) Bou-Ismaïl Tipaza.

1. MATERIELS ET PRODUITS

Pour la réalisation de ce travail on a utilisé le matériel et les produits suivants :

1.1. Matériels

Soxhlet, Etuve, Chromatographie liquide à haute performance (HPLC), Spectrophotomètre UV-Visible, Rota vaporisateur, agitateur, balance électronique, Fiole jaugées de 10ml, 100ml, Becher de 25 ml, 50 ml, 100 ml et 1000 ml, Pissette de L'eau pure.

1.2. Réactifs

Ethanol, Méthanol, Ether de pétrole, DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), Folin Ciocalteu, Carbonate de sodium, Acide gallique, Eau ultra pure.

2. MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal dans cette étude est le Marc de raisin rouge de la variété « Merlot », récupéré de l'unité de production et de commercialisation du vin située à Amer El-Ain la Wilaya de Tipaza en septembre 2017.

3. PREPARATION DE L'ECHANTILLON

3.1. Séchage

Le séchage consiste à éliminer la teneur en humidité dans le marc de raisin afin d'avoir un meilleur transfert de matière lors du processus d'extraction, et éviter le développement des moisissures [62]. Il a été effectué par étalement de la matière première en une couche mince de 1 à 2 cm à l'air libre à température ambiante, pendant 03 semaines, après dans l'étuve à 60°C pendant 48h.

3.2. Triage

Les pellicules et les pépins ont été séparés manuellement à partir du marc de raisin rouge séché.

3.3.Broyage

Le broyage est utilisé comme traitement de référence permettant d'avoir un meilleur transfert de matière et d'augmenter la surface de contact entre le marc de raisin (pellicule et pépin) et le solvant ce qui nous facilite l'extraction des polyphénols.

Le premier broyage des pellicules et de pépins sèches a été effectué à l'aide d'un broyeur ménager, pour diminuer davantage la taille des particules, puis un deuxième, ces dernières ont été finement broyées à l'aide d'un broyeur électrique industriel, et le broyat obtenu a été conservé dans des sacs hermétiques à température ambiante, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière et l'humidité jusqu'à son utilisation.



Figure 2.1 : La pellicule de raisin après broyage (Photo originale 2018)



Figure 2.2 : Les pépins de raisin après broyage (Photo originale 2018)

4. EXTRACTION DES POLYPHENOLS PAR SOLVANT

Dans notre étude l'extraction des polyphénols à partir de la poudre de la pellicule et du pépin a été réalisée par l'appareil Soxhlet.

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première [63].

Cette technique est utilisée pour la molécule peu ou pas volatile et stable. Il est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier filtre, d'un tube siphon et d'un tube de distillation.

Dans le montage (figure 2.3) [64] :

- l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction.
- Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu.
- La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant.
- Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées.
- Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles.
- L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche.

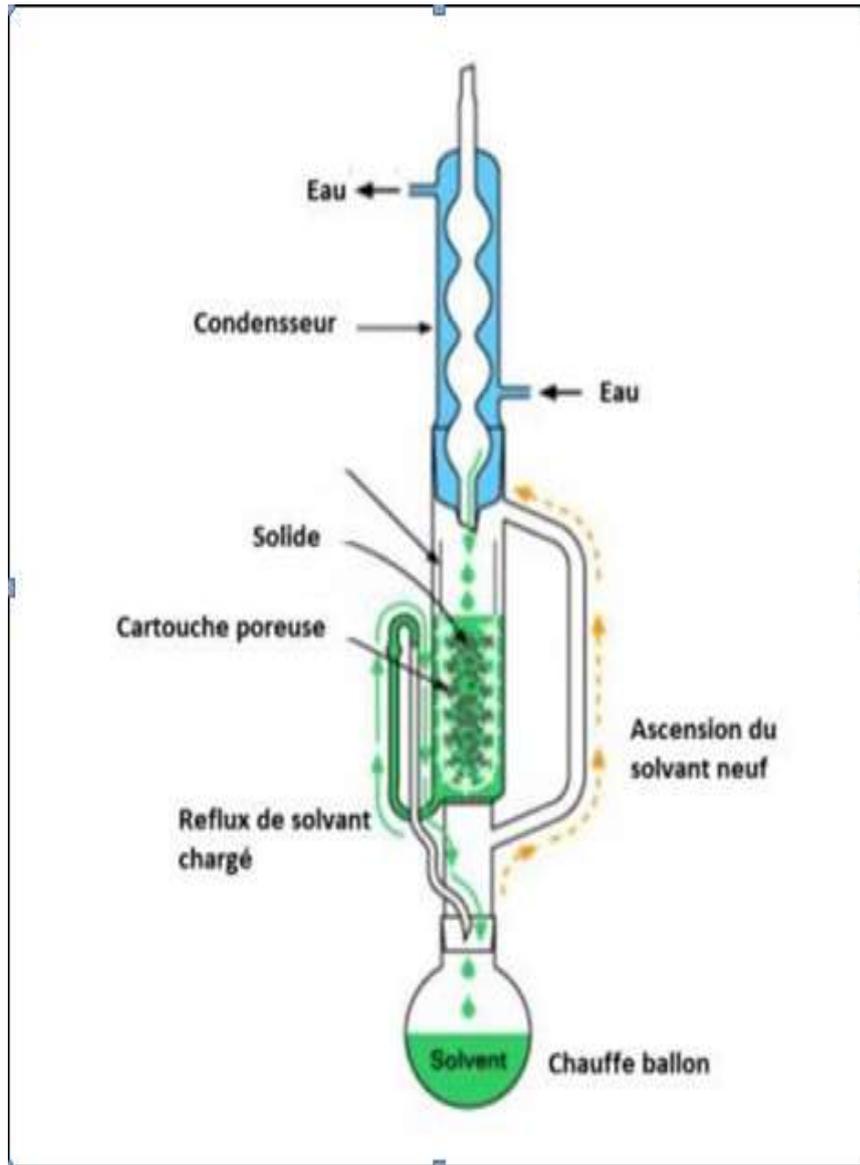


Figure 2.3 : Montage de Soxhlet

En raison de la richesse de pépin de raisin en matière grasse une première étape, la délipidation a été effectuée afin d'éliminer les lipides.

4.1.La délipidation

Cette étape est réalisée en utilisant l'éther de pétrole comme solvant pour extraire la fraction lipidique à partir de la poudre de pépin de raisin et cela à l'aide d'un Soxhlet. Nous avons utilisé un rapport de 1/10 (p/v). (Figure 2.4)



Figure 2.4 : Appareil Soxhlet au cours de délipidation (Photo originale 2018)



Figure 2.5 : Appareil Soxhlet au cours d'extraction des polyphénols, à gauche début d'extraction et à droite fin de l'extraction (Photo originale 2018)

4.2.Extraction des polyphénols

On récupère les cartouches délipidées, on les place une autre fois dans le Soxhlet avec le solvant éthanol pur.

On arrête l'extraction, une fois on a un siphonage clair c'est à dire jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche.

Pendant l'étape d'extraction, certaines précautions ont été prises afin de protéger les polyphénols et d'autres biomolécules particulièrement sensibles à toute dégradation éventuelle, en particulier en les protégeant de la lumière. De ce fait, chaque ballon d'extraction a été entièrement recouvert d'une feuille d'aluminium.

4.3.Concentration des extraits obtenus

Afin de concentrer les extraits obtenus, une élimination du solvant à l'aide d'un rota vapeur est effectuée après l'extraction (Figures 2.6 et 2.7). Dans cet appareil on réalise une évaporation sous vide en utilisant une pompe à vide avec une vanne de contrôle.

Pendant l'évaporation le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon-collecteur de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande et renouvelée permettant donc d'effectuer une évaporation rapide. L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite dans le cas des solvants organiques ($T= 40^{\circ}\text{C}$), évitant ainsi la dégradation thermique éventuelle des composés. C'est une méthode d'évaporation simple, utile, douce et rapide. [63]



Figure 2.6 : Appareil Rota-vapeur (Photo originale 2018)



Figure 2.7 : Les extraits obtenus de pépin et de la peau de raisin après l'évaporation du solvant par le rota vapeur (Photo originale 2018)

5. DETERMINATION DU RENDEMENT

Le rendement de l'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$R\% = \frac{M_{extr}}{M_{éch}} \times 100$$

Où :

M_{extr}: Masse de l'extrait après évaporation d solvant en mg.

M_{éch} : Masse de l'échantillon végétal en mg.

6. ANALYSES PHYTOCHIMIQUES DES EXTRAITS :

6.1. Dosage des phénols totaux

Les polyphénols totaux des extraits ont été déterminés par la méthode de Follin-Ciocalteu. Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi [65]. Ce dosage est basé sur une réaction d'oxydo-réduction. Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungungstène et de

molybdène [66]. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits obtenus.

6.1.1. Mode opératoire

Un volume de 0,1 ml de l'extrait dilué est mélangé avec 1,6 ml eau distillée et 0,1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 minute d'agitation au vortex, 0,2 ml de carbonate de sodium à 20 % est additionné. Le mélange est ensuite, incubé à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance est lue à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (UV Visible) (Figure 2.8).

Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant l'acide gallique comme standard.

La concentration en composés phénoliques totaux est exprimée en mg équivalent de l'acide gallique par g (mg EAG/g) en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique.

Le contenu phénolique total (CPTs) est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{CPTs (mg/g)} = C \times V / M$$

Où C , V , M sont la concentration ($\mu\text{g/mL}$) de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage, le volume de l'extrait (ml) et le poids de l'extrait(mg) respectivement.



Figure 2.8 : Spectrophotomètre UV/Visible (Photo originale 2018)

1.1.Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), est une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide (appelée aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR etc.). Dans nos études, des détecteurs UV basés sur la mesure de la longueur d'onde des composés ont été utilisés.

Le schéma (figure 2.9) présente le principe général de la méthode [63].

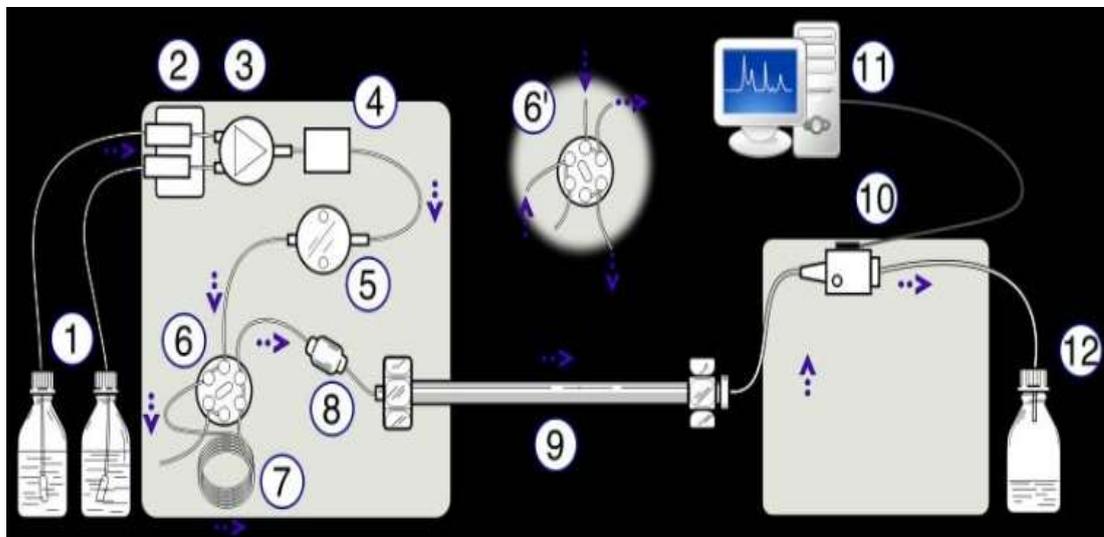


Figure 2.9 : Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance

1-Réservoirs des solvants, 2 - Dégazeur, 3- Valve de gradient d'éluant, 4 - Doseur de phase mobile (ou éluant), 5 - Pompe à haute pression, 6 - Vanne d'injection en position "inject", 6' - Vanne d'injection en position "load", 7 - Boucle d'injection de l'échantillon, 8-Précolonne (éventuelle), 9-Colonne analytique,10-Détecteur, 11 - Acquisition du signal, 12 -Décharge déchets

1.1.1. Conditions opératoires de l'analyse par HPLC

Le dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) de marque YL-9100, couplé d'un détecteur UV- Visible, composé d'une pompe, d'un injecteur à boucle manuelle de capacité 20 μ L et d'un dégazeur pour éliminer les bulles d'air dans la phase mobile.

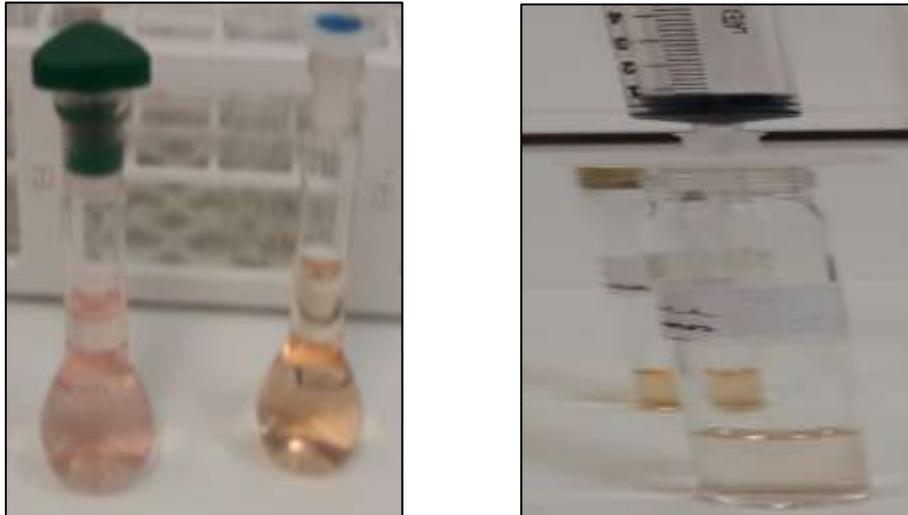
La séparation a été réalisée dans une colonne C18 (Agilent USA) est fixée à une température de 25°C élué par un mélange binaire de solvant A : eau acidifiée à 1% d'acide acétique, et solvant B : méthanol grade HPLC, en utilisant le mode gradient à débit est de :

1 ml/min, réglé à une longueur d'onde de 254nm .Les résultats obtenus ont été traités à l'aide du logiciel YL-Clarity. La composition de la phase mobile en mode gradient est :

Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0	95%	5%
55	5%	95%
60	95%	5%



Figure 2.10 : Equipement HPLC analytique (Photo originale 2018)



**Figure 2.11 : Filtration des extraits (pépin à droite et pellicule à gauche)
(Photo originale 2018)**

7. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

7.1. Mesure de pouvoir de piégeage du radical DPPH

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre, il se caractérise par une coloration violette en état oxydé et une coloration jaune en état réduit [67]. En présence de composés antiradicalaire, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 515 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'extrait.

7.1.1. Mode opératoire

Un volume de 500µl de l'extrait est mélangé avec 375µl d'éthanol et 125µl d'une solution DPPH. Le mélange est incubé à température ambiante et l'abri de la lumière pendant 60 min. L'absorbance est mesurée à 517 nm. Le pourcentage d'activité antioxydant (AA%) est calculé selon la formule suivante :

$$AA(\%) = [(Abs\ blanc - Abs\ éch) / Abs\ blanc] \times 100$$

Abs blanc : Absorbance du DPPH au temps zéro avant l'addition de l'échantillon.

Abs éch: Absorbance de l'échantillon testé après incubation.

Les deux figures suivantes représentent le virage de DPPH avec une gamme de concentration des deux extraits (pépin et pellicule).

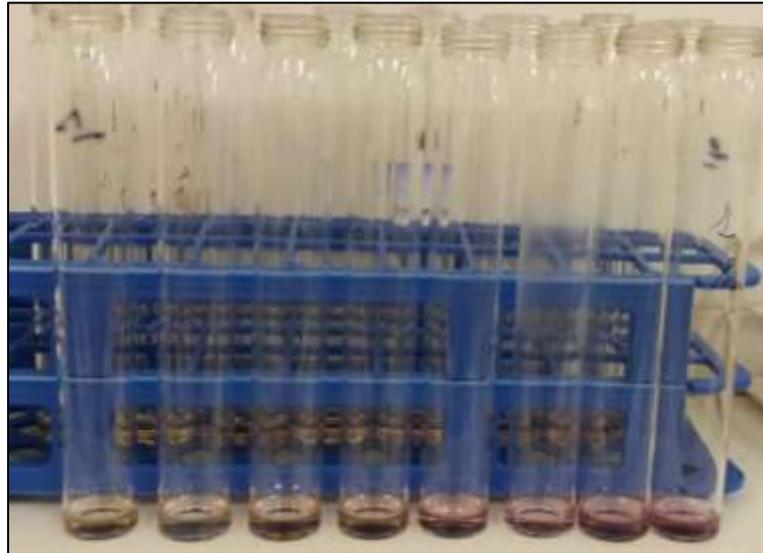


Figure 2.12 : L'activité antioxydante de l'extrait de la pellicule (Photo originale 2018)

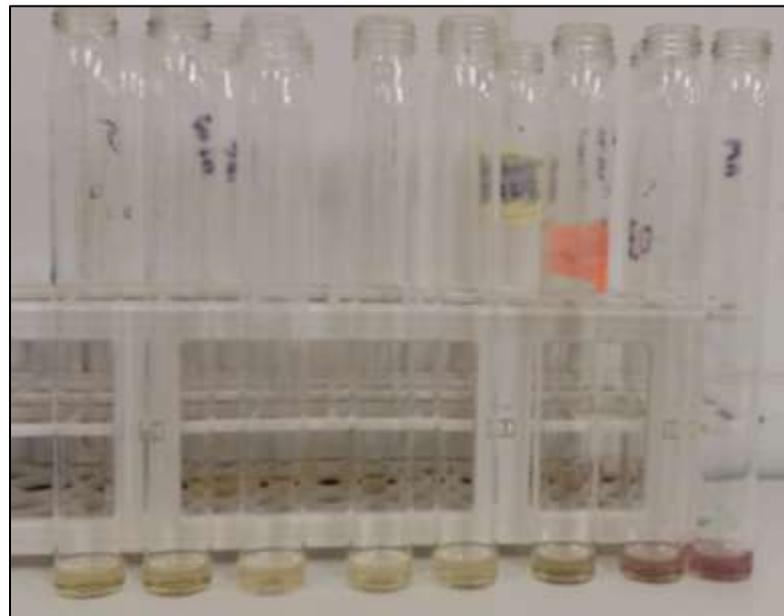


Figure 2.13: L'activité antioxydante de l'extrait de pépins (Photo originale 2018)

8. ANALYSE PAR INFRAROUGE ATR

La réflectance totale atténuée (ATR de l'anglais Attenuated Total Reflection), est une technique en spectroscopie infrarouge [68], ou plus précisément spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), permettant de déterminer les liaisons chimiques d'un échantillon. Elle est basée sur le principe optique de la réflectance, phénomène optique bien connu. Cette méthode ne nécessite que très peu de préparation de l'échantillon, et permet d'analyser aussi bien les liquides que les solides (figure 2.14).

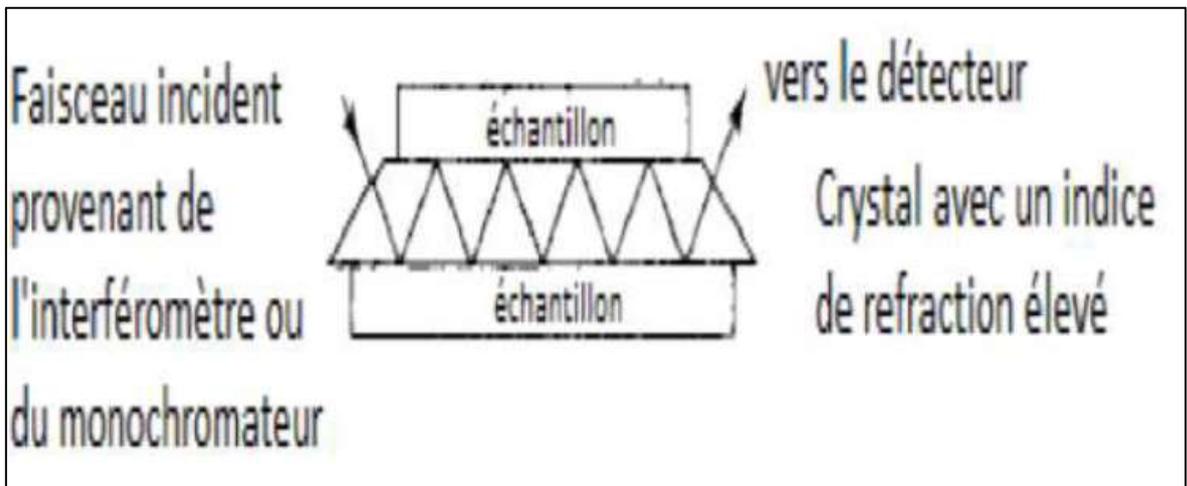


Figure 2.14. Principe de la réflectance totale atténuée

Le schéma montrant un faisceau incident infrarouge subissant une réflectance totale atténuée multiple à travers un cristal avec une fine couche d'échantillon à sa surface.

En infrarouge, un faisceau de longueur d'onde compris entre 2,5 et 25 μm traverse un échantillon. Selon la longueur d'onde et l'analyte, des transitions vibrationnelles peuvent être engendrées, ce qui a pour effet de faire vibrer les liens chimiques. Ceux-ci sont caractérisés par leur bande d'absorption qui est propre à chaque liaison. Ainsi, l'intensité du faisceau émis en fonction de la longueur d'onde permet d'obtenir un spectre de l'analyse.

L'ATR se sert du phénomène de réflexion, lorsqu'un faisceau passe d'un milieu dense à un milieu moins dense. La fraction du faisceau incident réfléchi augmente lorsque l'angle d'incidence devient plus grand. Au-delà d'un certain angle, la réflexion est complète (ou totale). Il a été démontré que durant la réflexion du faisceau, celui-ci pénètre d'une courte

distance dans le milieu le moins dense. La profondeur de pénétration dépend des indices de réfraction des deux milieux, de la longueur d'onde utilisée et de l'angle du faisceau incident vis-à-vis l'interface. L'onde qui pénètre dans le milieu moins dense est appelé l'onde évanescente. Ainsi, lors de la réflexion totale du faisceau incident d'un milieu dense à moins dense, il y a perte d'intensité du signal, dû à l'onde évanescente qui pénètre dans le milieu moins dense, alors la réflexion totale est atténuée. Le milieu dense utilisé en ATR est un cristal d'indice de réfraction élevé, pouvant aller jusqu'à 4.01. Le milieu moins dense est l'échantillon à analyser. Celui-ci est déposé sur le cristal. Ainsi, lors de la pénétration du faisceau incident dans le cristal, celui-ci subit une réflexion totale atténuée à l'interface entre le cristal et l'échantillon, avant d'être capté par le détecteur [69]. La technique permet d'analyser les solides et liquides. Les solides doivent bien épouser toute la surface de contact du cristal. En ce qui concerne les poudres, comme dans le domaine de la pharmacologie, il est possible de les analyser.

La déposition de l'analyte sur le cristal ne pose pas de problème, mais c'est le contact qui pourrait faire défaut et offrir de mauvais résultats. Les paramètres idéaux pour un solide seraient d'être légèrement flexibles pour bien uniformiser la surface de contact avec le cristal. Pour les liquides, les solutions aqueuses, les liquides absorbants, les solutions biologiques, pour ne citer que ceux-ci, sont des exemples de liquides qui pourraient être analysés.



Figure 2.15 : Equipement infrarouge (ATR) (photo originale 2018)

1. RENDEMENTS D'EXTRACTION DES POLYPHENOLS DANS LA PELLICULE ET LE PEPIN A PARTIR DU MARC DE RAISIN

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant à la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale.

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que le rendement le plus élevé a été obtenu pour l'extrait de pépin soit 64.85% par rapport à 59.09% pour la pellicule.

Le rendement d'extraction dépend de plusieurs paramètres tels que: le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon [70].

Le résultat de calcul du rendement des deux extraits est illustré dans la figure ci-dessous (Figure 3.1) :

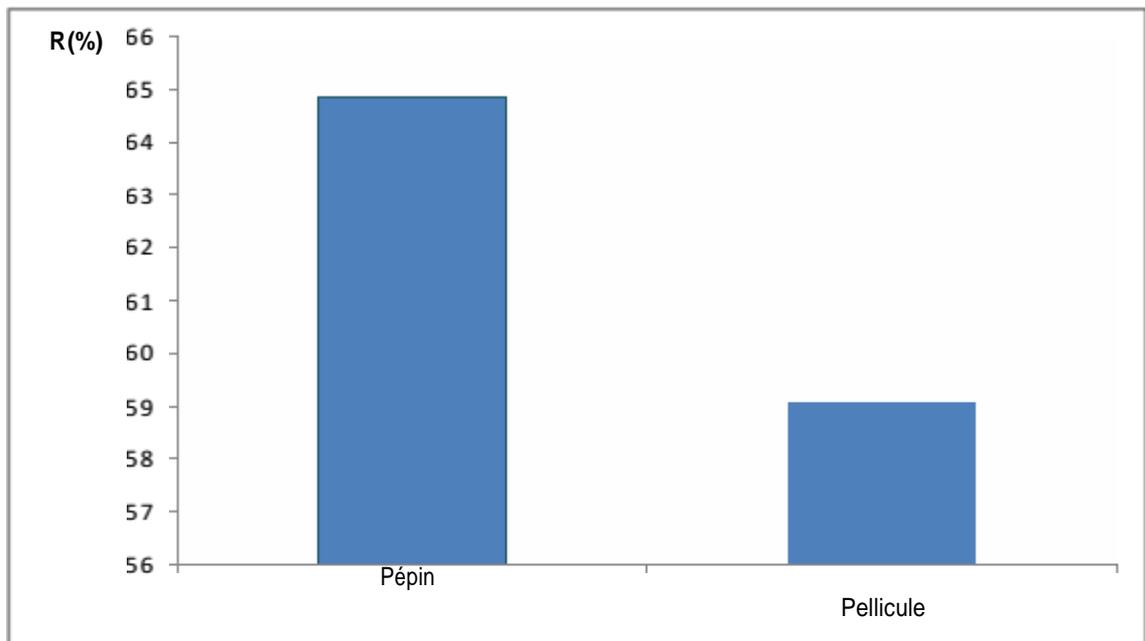


Figure 3.1: Histogramme représente le rendement d'extraction des composés phénoliques à partir de la pellicule et pépin de marc de raisin.

2. TENEUR EN POLYPHENOLS DES EXTRAITS ETHANOLIQUES DE LA PEAU DE LA BAIE DE RAISIN ET DE PEPIN

Le taux de polyphénols totaux dans nos extraits, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire, établie avec des concentrations précises d'acide gallique (20- 100mg/L), (Figure 3.2) comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (figure3.3).

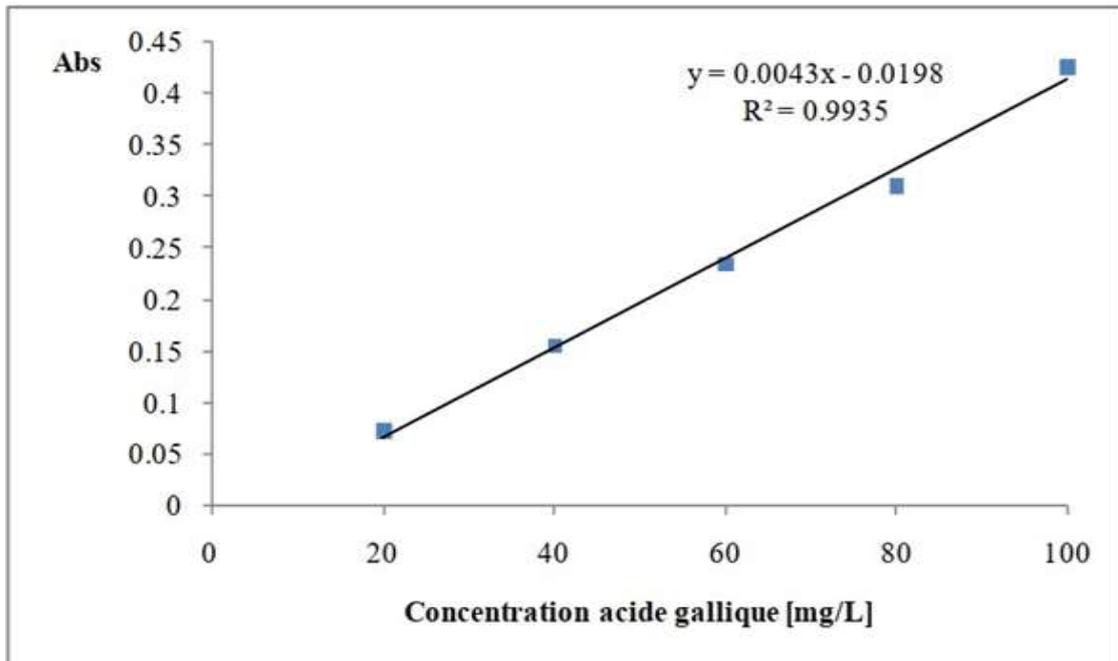


Figure 3.2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

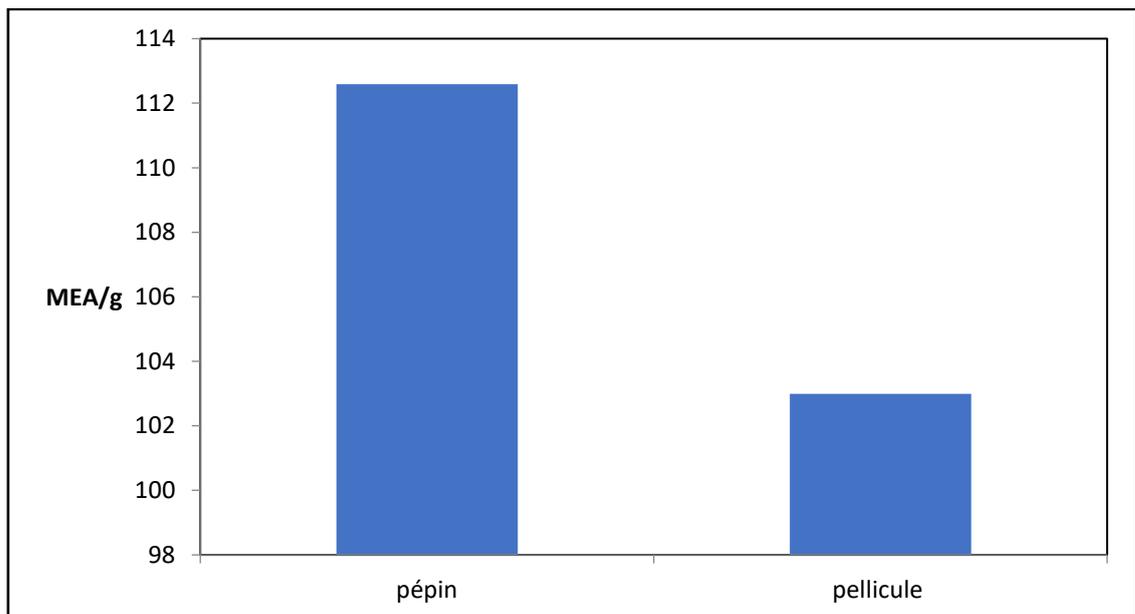


Figure 3.3 : Histogramme représente le Taux des polyphénols dans les extraits éthanoliques (la pellicule et pépin de marc de raisin).

Les résultats présentés dans la figure ci-dessus montrent que nos extraits (Pépin et Pellicule) donnent des teneurs importantes en polyphénols la meilleure teneur est enregistrée chez l'extrait de pépin (112.59 mg EAG/g de MS).

En se référant à la littérature, les travaux, montrent que le marc de raisin extrait par Soxhlet contient une teneur en polyphénols totaux estimée à 102,99 mg EAG/gde MS [71].

Le marc de raisin contient une teneur très élevée en polyphénols en comparant par d'autre type de fruits, cette teneur élevée peut être expliquée par les oligomères de proanthocyanidin liée par des liaisons covalentes avec les polysaccharides de la paroi cellulaire. Cette teneur varie d'une variété à l'autre, (voir le tableau 3.1) [72].

Tableau 3.1 : Teneurs en polyphénols des variétés de raisin.

Variété de raisin	Teneur en polyphénols (mg EAG/g de MS)
Cabernet Sauvignon	164,9
Syrah	160,0
Monastrell	136,9

Les composés phénoliques du raisin se trouvent essentiellement dans les graines et les peaux avec environ 75% [73].

Cependant, il semble clair que la composition des marcs de raisin est fortement liée à la variété de raisin et le processus industriel appliqués, Le marc de raisin représente une bonne source des composés de valeur biologique pour plusieurs applications médicales, nutraceutiques et alimentaires [74, 75].

Les facteurs environnementaux tels que : la température, la géographie, la durée du jour et les éléments nutritifs, influencent fortement sur la biosynthèse et l'accumulation des métabolites secondaires de la plante [76].

3. RESULTATS DE L'ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

L'analyse par HPLC des extraits éthanoliques nous a permis d'obtenir les chromatogrammes suivants (figure 3.4 et 3.5).

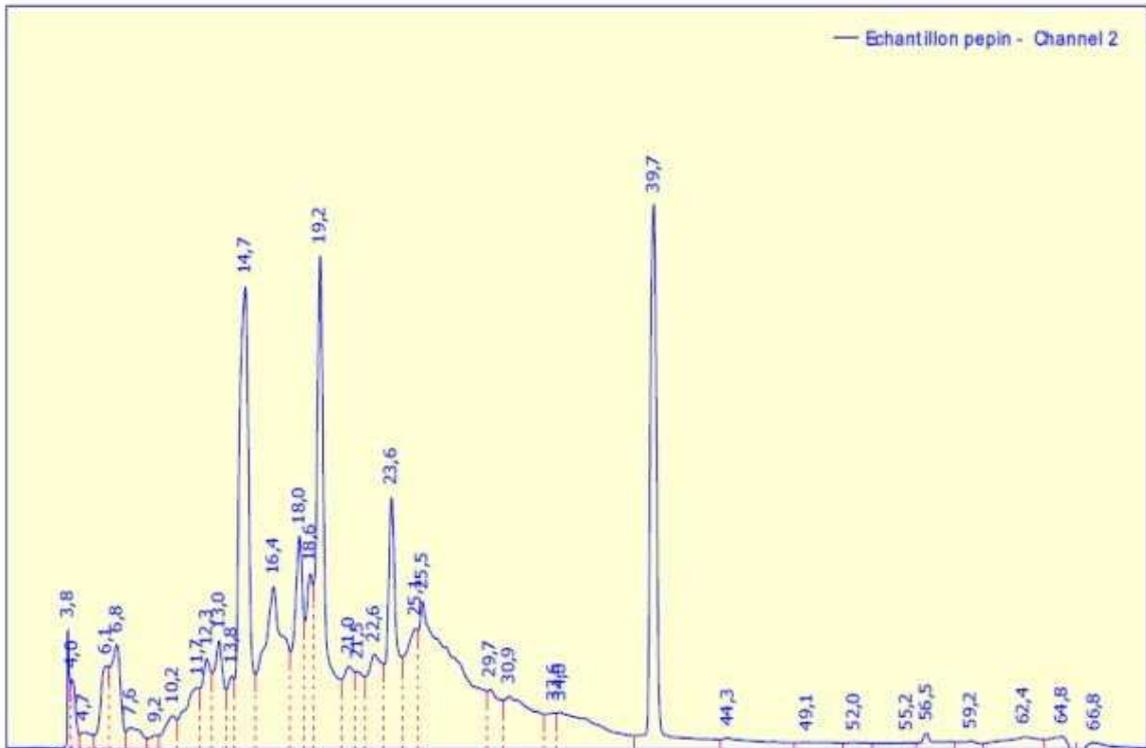


Figure 3.4 : Chromatogramme HPLC de l'extrait éthanolique obtenu de pépin de raisin



Figure 3.5 : Chromatogramme HPLC de l'extrait éthanolique obtenu de la peau de baie de raisin

Basé sur l'analyse HPLC, plusieurs types de composés organiques ont été identifiés dans l'extrait du pépin (Figure. 3.4), cependant, un seul type de composés organiques a été identifié dans l'extrait de la peau (Figure. 3.5).

Les aires des pics obtenus montrent que les quantités diffèrent. Les différences sont très nettes entre les deux chromatogrammes des deux échantillons.

Les composés pouvant être identifiés dans le pépin étaient principalement l'acide ascorbique, l'acide gallique, l'acide vanilline, l'acide Trans-cinnamique et l'acide trans 2,4-diméthoxycinnamique. Il y avait, cependant, de nombreux autres composés qui n'ont pas été identifiés.

Pour l'extrait de la peau le pic principal était situé à 39,6 minutes pour l'acide trans 2,4-diméthoxycinnamique ; tandis que les autres composés ont été nettement plus faibles.

Le tableau suivant présente leurs temps de rétentions (Tr).

Tableau 3.2 : Composés phénoliques des extraits éthanoliques de notre étude.

N°de pic	Temps de rétention (Tr) min	Composé phénolique
01	3,8	Acide ascorbique
02	6,8	Acide gallique
03	22,6	Acide vaniline
04	25,5	Acide Trans-cinnamique
05	39,7	Acide Trans 2,4-diméthoxycinnamique

4.ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante des deux extraits vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Cette activité comparée avec celle d'un antioxydant de référence le BHA.

La figure (3.6) représente les résultats obtenus pour ce dosage.

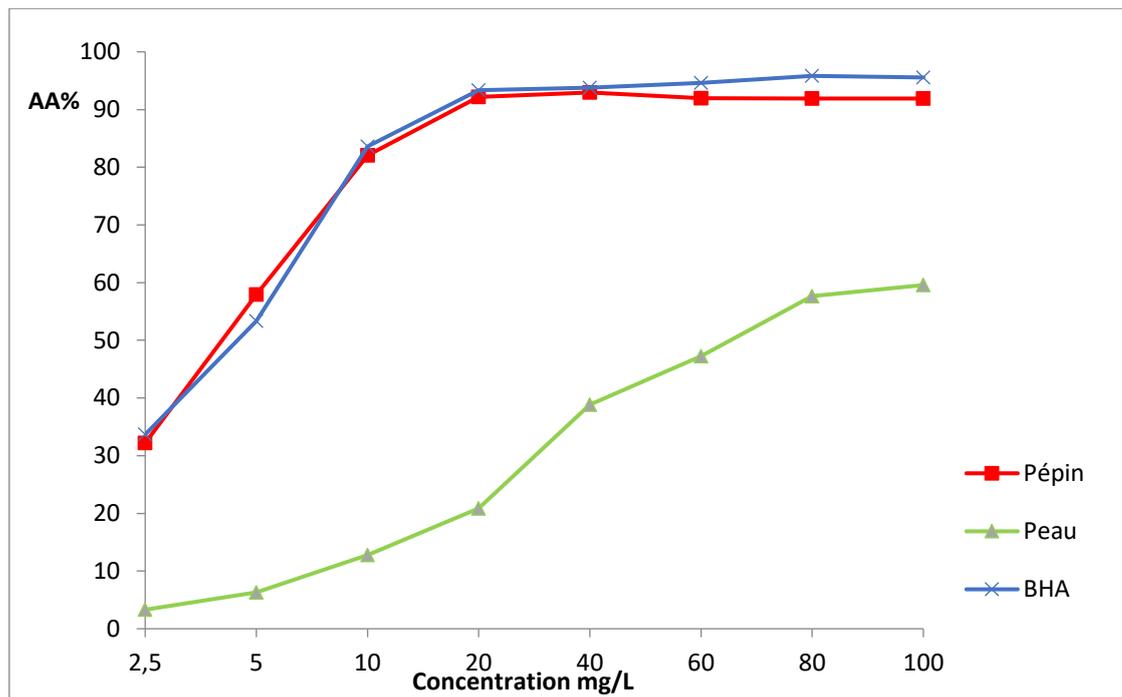


Figure 3.6 : Activité antioxydante des extraits éthanolique (extrait de pépin et extrait de la peau de raisin) et de BHA.

De plus l'activité antiradicalaire (capacité d'éliminer le DPPH) est évaluée par la détermination de la concentration correspondante à 50% d'inhibition (CI50). La valeur de CI50% la plus faible correspond à l'activité antiradicalaire la plus importante. Le tableau et la figure ci-après représentent les valeurs de CI50% enregistrés dans nos extraits en comparant de celle de BHA.

Tableau 3.3 : Activité 50% d'inhibition

Echantillon	CI50 [mg/L]
Pépin	4,32±0,21
Peau	66,29±2,44
BHA	4,97±0

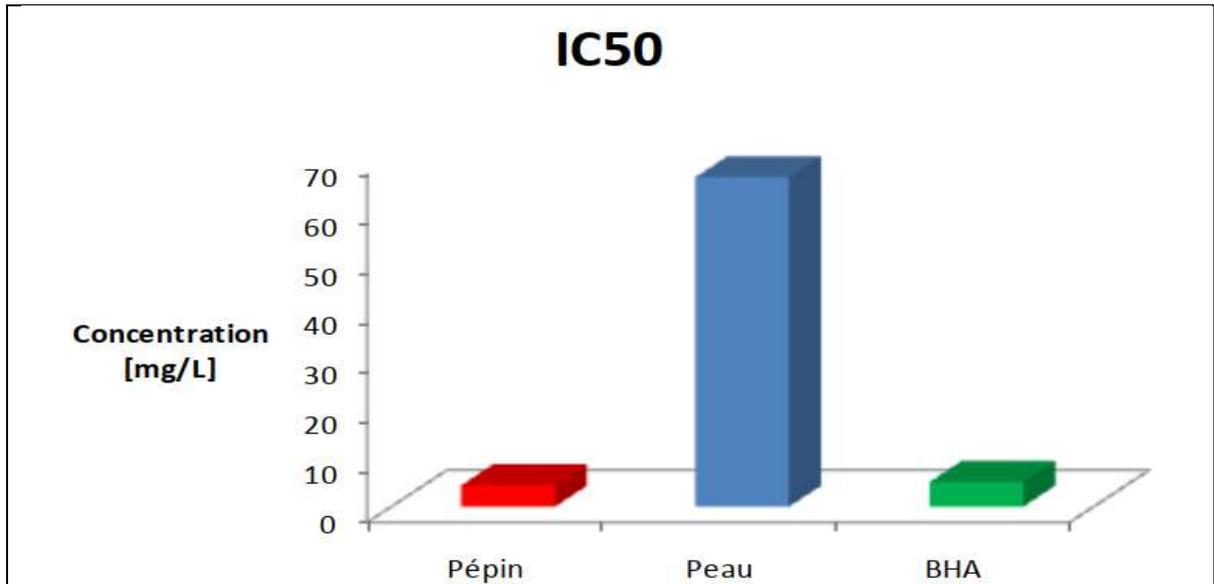


Figure 3.7 : La concentration inhibitrice à 50% des extrais éthanoliques et de BHA

Les résultats montrent une activité remarquable d'inhibition du radical DPPH dans les extraits, l'extrait obtenu à partir de pépin donne une activité inhibitrice plus importante. Les différences dans l'activité antioxydante entre les extraits peuvent être expliquées par les teneurs en substances bioactives. En effet IC₅₀ de pépin est très faible ($4,32 \pm 0,21$ mg/L), elle présente une valeur proche de l'antioxydant de synthèse BHA ($4,97 \pm 0$ mg/L) ce qui nous indique que le pépin est riche en composés phénoliques qui ont des propriétés antioxydants importantes.

A une faible concentration de l'ordre de 50 mg /ml, les composés phénoliques ont pu inhiber l'activité du radical libre DPPH [77].

4. ANALYSE INFRAROUGE DES EXTRAITS PHENOLIQUES

Les spectres FT-IR des extraits des deux échantillons (pépin et pellicule) du marc de raisin sont représentés sur les figures (3.8 et 3.9).

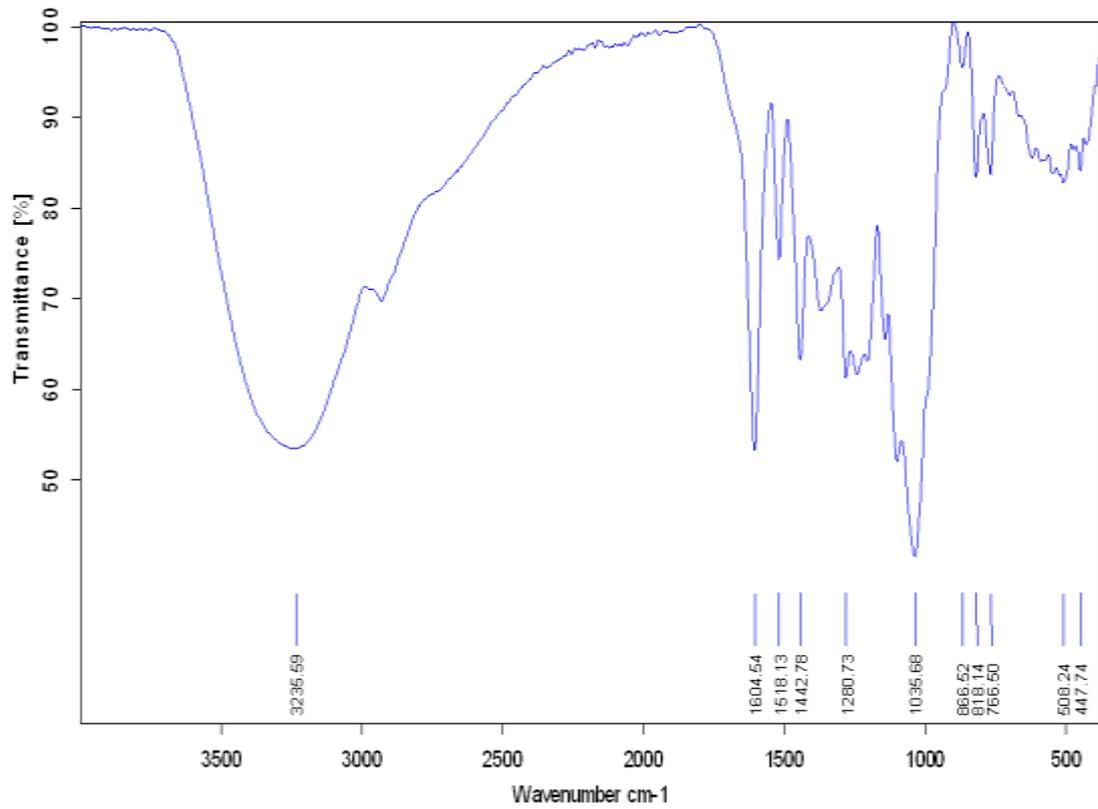


Figure 3.8 : Spectre FT-IR de l'extrait de pépin

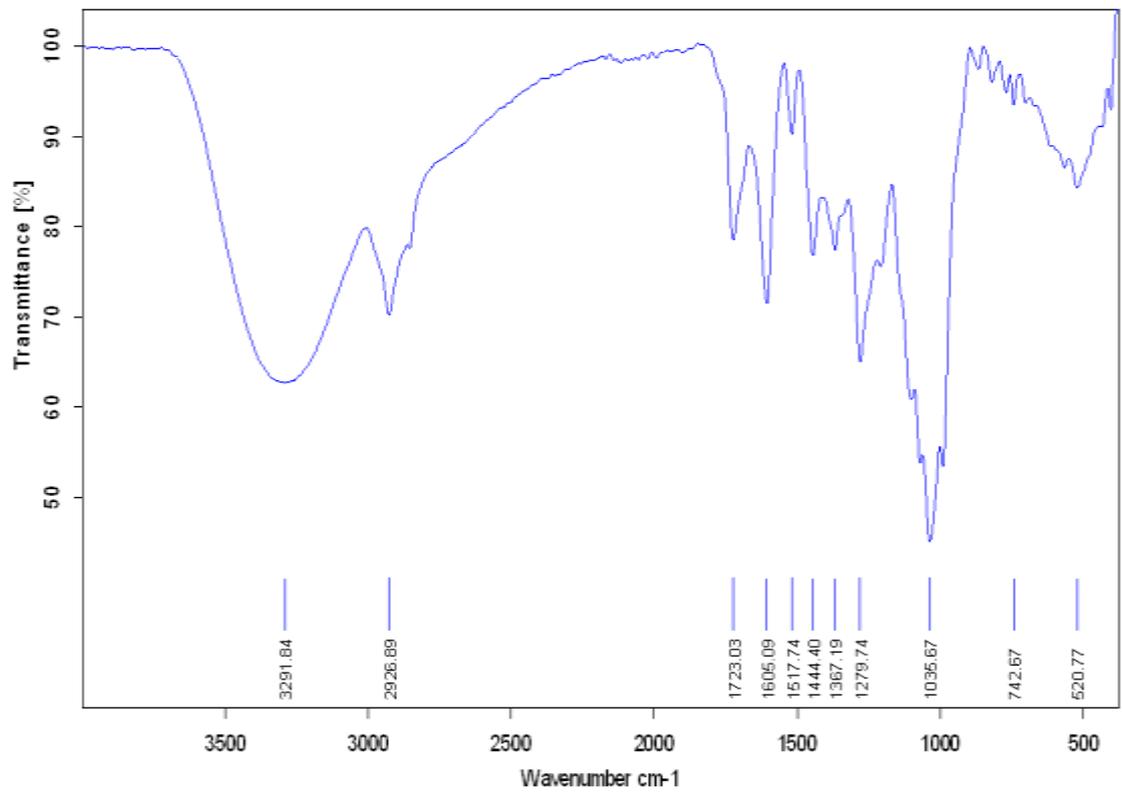


Figure 3.9. Spectre FT-IR de l'extrait de pellicule

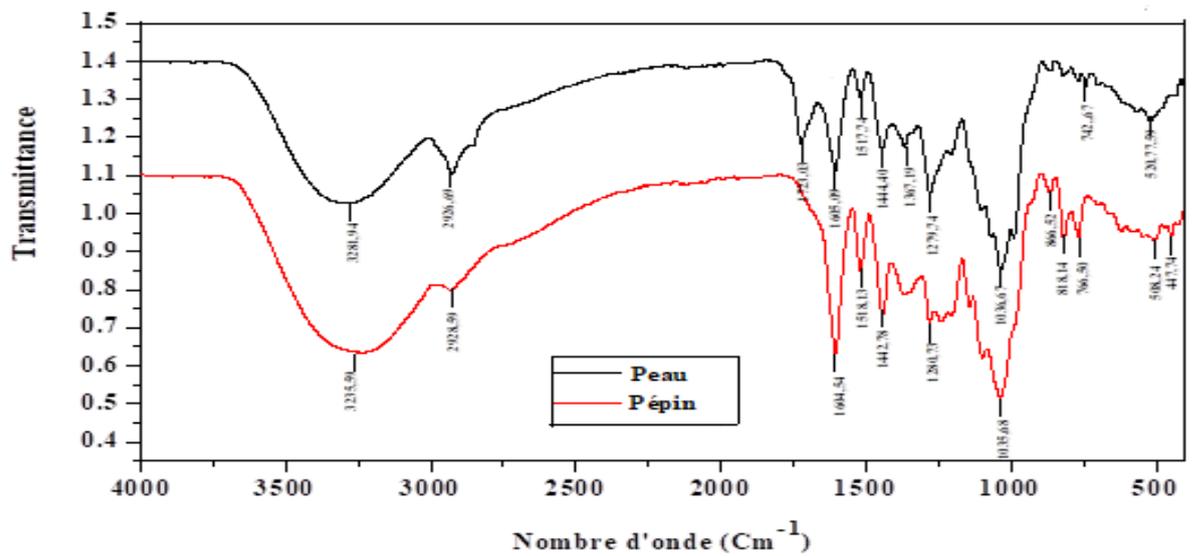


Figure 3.10 : spectres infrarouges des deux extraits pépins et pellicule.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est une technique puissante, rapide, précise et non destructive. Ceci est une alternative aux analyses chimiques conventionnelles particulièrement intéressantes pour la surveillance en temps réel de divers composants comme les polyphénols surtout pour le suivi de la maturité du raisin. Ainsi, plusieurs études réalisées sur les raisins ont montré que les spectroscopies infrarouge (IR) et associée à d'autres analyses (ex : l'HPLC) permettaient d'évaluer l'évolution des principaux paramètres chimiques impliqués dans le traitement des raisins ainsi que les composés phénoliques [78,79,80].

Les mesures FT-IR peuvent fournir des informations très importantes sur la composition chimique des fractions du marc de raisin.

A l'aide de cette technique, les groupes fonctionnels inclus dans la composition de ces fractions : la peau et péricarpe du marc de raisin ont été identifiés et plusieurs données ont été obtenues voir le (tableau 3.4), comme référence pour identifier les composés polyphénoliques [81].

Grâce au spectre FT-IR, il est possible d'identifier les groupes fonctionnels susceptibles de prouver la présence de composés polyphénoliques dans les fractions :

Tableau 3.4: Les nombres d'ondes des pics identifiés dans les extraits peau et péricarpe

Peau de marc de raisin(cm^{-1})	Péricarpe de marc de raisin(cm^{-1})	Fonctions
520	508	C-C alkyl
742	742	C-H Aromatique
1036	1036	C-O Oxygène
1279	1280	C-OH Ester
1605	1605	C= C Aromatique
1723	-	C=O Carbonyle
2926	-	C-H étirement
3291	3235	O-H alcoolique

Bien que les pics spectraux dans les fréquences IR soient généralement nets et bien résolus, il y avait deux problèmes principaux lorsque les composés phénoliques étudiés étaient analysés par spectroscopie FT-IR. La première était que les composés phénoliques considérés (polyphénols, anthocyanes, tanins) sont chimiquement très similaires et a donc montré des caractéristiques d'absorption IR similaires. Le deuxième problème était que la teneur en eau, en acides organiques et en sucres, qui sont les principaux composants du raisin, varie pendant la maturation et qu'ils absorbent tous dans la même région IR [82,83].

La figure (3.10) montre les spectres FT-IR des deux extraits (pépin et peau) sont similaire aux spectres des polyphénols et de tanin :(BFP &BVP) (voir annexe). On peut observer plusieurs pics des tanins condensés et hydrolysables. En effet, le pic à 1605 cm^{-1} est attribué aux mouvements vibratoires de C=C dans la composition aromatique des anneaux [84]. Le pic à 1367 cm^{-1} décrit la présence de substitutions de cycle, ces substitutions d'anneaux peuvent appartenir aux deux tanins (condensés et hydrolysables). Les pics de 818 cm^{-1} et les 766 cm^{-1} décrivent à la fois le brassage d'alcools aromatiques et la flexion hors plan aromatique CH. Ces observations sont cohérentes avec les résultats antérieurs rapportés dans la littérature [85-87]. En effet les pics 1723 cm^{-1} , 1605 cm^{-1} , 1518 cm^{-1} , 1442 cm^{-1} , 1444 cm^{-1} , 1367 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} , 866 cm^{-1} , 818 cm^{-1} , 766 cm^{-1} ont été rapportés dans des études antérieures [88 -90]. Les pics à 1605 cm^{-1} , 1518 cm^{-1} et 1442 cm^{-1} sont attribués aux mouvements vibratoires de C = C dans les anneaux aromatiques [85]. De plus, les pics à 1444 cm^{-1} et 1367 cm^{-1} indiquent la présence de proanthocyanidines et en particulier la gallocatéchine, tandis que le pic de 1517 cm^{-1} montrent la présence de tanins condensés, comme indiqué dans les travaux [86,87], [91et 93].

CONCLUSION

Une étude comparative d'extraction des composés phénoliques du marc de raisin à partir de la pellicule et de pépin, et leur valorisation à travers leur activité antioxydante a été réalisée. La comparaison porte sur le rendement d'extraction des métabolites visés, l'analyse chromatographique et l'efficacité antioxydante des extraits obtenus.

L'analyse phytochimique des extraits du marc de raisin obtenu par une technique d'extraction conventionnelle « Soxhlet » a permis de mettre en évidence une teneur considérable en polyphénols par rapport à d'autres biomasses.

Les résultats de l'étude comparative montrent que le rendement d'extraction des composés phénoliques de pépin est le plus élevé par rapport à l'extrait de la pellicule, ces teneurs sont respectivement : (64.85% et 59.09%).

L'analyse qualitative, par chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC, a permis de mettre en évidence de nombreux composés phénoliques dans les deux extraits. Dans le pépin on a principalement identifié : l'acide ascorbique, l'acide gallique, l'acide vanilline, l'acide Trans-cinnamique et l'acide trans 2,4-diméthoxycinnamique par contre dans la peau l'acide trans 2,4-diméthoxycinnamique, ce qui confirme la présence des composés visés.

Cette étude montre donc que l'extrait de pépin obtenu par la méthode de Soxhlet est plus riche en termes de rendement d'extraction des composés phénoliques et de pouvoir antioxydant. Néanmoins, ce résultat, obtenu par cette méthode d'extraction et ces conditions d'extraction, reste à confirmer pour les autres méthodes d'extraction.

L'activité antioxydante déterminée par le test de DPPH, montre que les composés extraits sont d'excellents antioxydants naturels. Ils possèdent des capacités de neutralisation de DPPH puissantes et inhibent d'une manière efficace l'oxydation dont le pouvoir inhibiteur de l'extrait de pépin est plus élevé que celui de l'extrait de la pellicule.

Grâce au spectre FT-IR, il est possible d'identifier les groupes fonctionnels susceptibles de prouver la présence de composés polyphénoliques. Dans notre cas on n'a pas pu obtenir précisément les composés phénoliques présent dans les extraits. Les pics d'absorption d'eau et d'éthanol provenant de l'étape d'extraction dominant le spectre et étant donné que les composés phénoliques considérés (polyphénols, anthocyanes, tanins) sont chimiquement très similaires et a donc montré des caractéristiques d'absorption IR similaires

En perspective, il est souhaitable :

- D'étudier les autres méthodes d'extractions (Micro-onde, Ultrason...);

- Optimiser les paramètres d'extraction pour obtenir un meilleur rendement ;

- D'appliquer ces extraits aux produits alimentaires en substitution à des antioxydants artificiels comme le BHT (butyle hydroxy toluène) et le BHA (butyle hydroxy anisole) ;

- Utiliser les étalons pour pouvoir identifier les composés recherchés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [01] <http://blog.midi-vin.com/techniques-viticoles/produits-derives-vigne-vin-00806>
- [02] Ping, L., Brosse, N., Chrusciel, L., Navarrete, P., Pizzi, A., (2011). Extraction of condensed tannins from grape pomace for use as wood adhesives. *Industrial Crops and Products*.33,253-257.
- [03] <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- [04] Mazza, G., Miniati, E., (1993). Grapes. In: A.H. Boca Raton (Ed.) *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. CRC Press, London, Tokyo, pp. 149-199.
- [05] Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M., (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*. 87, 167-198.
- [06] Malika, G., Modelisat Ion de l'activité Photo Synthétique de la feuille au Couvert : cas d'une Jachere Post-Culturale. Université Toulouse iii- Paul Sabatier U.F.R sciences de la vie et de la terre, (2006).
- [07] Schieber, A., Stintzing, F.C., & Carle, R., (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401-413.
- [08] Girdhar, N., Satyanarayana, A., (2000). Grape waste as a source of tartrates. *Indian Food Packer*, 54, 59-61.
- [09] Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4360-4367.

- [10] Makris D. P., Boskou G., & Andrikopoulos N. K. (2007). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*, 98(15), 2963-2967.
- [11] Xia EQ, Song Y, Ai XX, Guo YJ, Xu XR, Li HB (2010). A new highperformance liquid chromatographic method for the determination and distribution of linalool in *Michelia alba*. *Molecules*, 15 : 4890-4897.
- [12] L'article 29 de la loi 2005-781 de programmation fixant les orientations de la politique énergétique dite " POPE", du 13 juillet (2005).
- [13] <http://solen-energie.be/medias/files/fiches/SOLENER05.pdf>
- [14] <http://www.ac-Ethan.com> / Elsem / Julien / Mathias.
- [15] Torreggiani A., Tamba M., Trincherò A., Bonora S. (2005). Copper(II)–Quercetin complexes in aqueous solutions : spectroscopic and kinetic properties. *Journal of Molecular Structure*. 744–747. (SPEC. ISS.) 759-766.
- [16] Hynes M.J., O’Coinceanainn M. (2001). The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 85 : 131–142.
- [17] Hynes M.J., O’Coinceanainn M. (2004). The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 98 : 1457–1464.
- [18] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., (2004). Polyphénols : food sources and bioavailability. *Journal of Clinical Nutrition*. 79 (5), 727-747.
- [19] Ignat I., Volf I., Popa V., (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 126, 1821-1835.
- [20] Rentzsch, M.W., Wilkens, A. and Winterhalter, P., (2009). Chapter 9C - Non-flavonoid phenolic compounds. Dans, *Wine chemistry and biochemistry*, Moreno-Arribas, M.V. & Polo, M.C. (Éds.), Springer Science+Business Media, New-York, USA, p. 509–527.

- [21] J. Bouayed (2007). Etude de la corrélation anxiété / statut oxydatif des granulocytes chez la souris et évaluation des effets antioxydants / neuroactifs des polyphénols extraits de *Prunus domestica* L. Thèse de doctorat, Université de Paul Verlaine-Metz. (P 10 14-69- 72- 74).
- [22] Collection sciences et techniques agro-alimentaire Pascale Sarni-Manchado.Véronique Cheynier coordinatrices : Les polyphénols en agroalimentaire Edition TEC et DOC Lavoisier (2006) (p : 2)
- [23] Ribéreau-Gayon, P., (1965). Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *V. vinifera*. CR Acad Sci, pp. 341-343.
- [24] Siemann, E.H., Creasy, L.L., (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. Am. J. Enol. Vitic., 43, 49-52.
- [25] Craft, B.D., Kerrihard, A.L., Amarowicz, R., Pegg, R.B., (2012). Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 11, 148–173.
- [26] Ector B., Magee J., Hegwood C. et Coign M Resveratrol concentration in muscadine berries ,juice ,pomace , purees, seeds, and wines .Am .J.Enol.Vitic .,(1996),47,57-62
- [27] Sun B., Ribes A., Leandro M., Belchior A., & Spranger M. (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. Analytica chimica acta, 563(1–2), 382-390.
- [28] Jeandet P., Bessis R., Sbaghi M. et Meunier P. Production of the phytoalexin Resveratrol by Grapes As A Response to Botrytis Attack Under Natural conditions. Journal of phyto-pathol., (1995b), 143,135-139.
- [29] Püssa T., Floren J., Kuldepp P. et Raal A.Survey of grapevine *Vitis vinifera* Stem polyphenols by liquid chromatography- diode array detection -tandem mass spectrometry .J.Agric. Food Chem., (2006) ; 54,7488-7494

- [30] Nerantzis, E.T., Tataridis, P. (2006). Integrated Enology-Utilization of winery by-products into high added value products. E-Journal of Science & Technology (1, 79-89.)
- [31] Sarni-Manchado P. et Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier. pp : 02-11.
- [32] Srivasatava, N., Shwarupa, S., Bhagyawant, S.S., (2011). Comparative Study On the Anti Termite, Antimicrobial And Antioxidant Activity Of Leaf And Root Extracts Of Pothos Aurea (*Epipremnum aureum* L.). J. Pharm. Res. Clin. al Pract. 1, 1–11.
- [33] Veluri, R., Weir, T.L., Bais, H.P., Stermitz, F.R., Vivanco, J.M., (2004). Phytotoxic and Antimicrobial Activities of Catechin Derivatives. J. Agric. Food Chem. 52, 1077–1082.
- [34] Harbone JB, Dey PM (1989). Methods in plants Biochemistry .Academic Press, New York.
- [35] Macheix J.J., A. Fleuriet & J. Billot, (1990). Fruit phenolics. Boca Raton, 378p.
- [36] A. Madi (2008). Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de Magister Université de Constantine. p 12-15-18-19- 42-47-49.
- [37] H. Meghri, H. Hajlaoui, A. Akrouf, H. Najjaa, M. Neffati , C. R. Chimie 13 (2010) 380-386
- [38] Guignard J.L., (1996). Abrégé de biochimie végétale, Ed. Masson, Paris, 160 p.
- [39] Malagas D., (1992). Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. ACCT - Karthala, p. 232.
- [40] Ignat, I., Radu, D.G., Volf, I., Pag, A.I., Popa, V.I., (2013). Antioxidant and antibacterial activities of some natural polyphenols. Cellul. Chem. Technol. 47, 387–399.

- [41] Navarre, C. et Langlade, F., (2010). L'oenologie, 7ème éd., Tec et Doc, Lavoisier (Eds). Paris, France, 433 pages.
- [42] Chira K., SuhJ-H., Saucier C. et teissède P.-L. les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* (2008),6,75-82.
- [43] Khan M.K., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A.S., Dangles O., Chemat F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*. 119 : 851–858.
- [44] Kammerer, D., Kljusuric, J.G., Carle, R., Schieber., A., (2005). Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet mitos) using a polymeric adsorber resin. *European Food Res. Techno.*, 220, 431-437.
- [45] Hemingway, R.W., McGraw, G.W., (1983). Kinetics of acid-catalysed cleavage of procyanidins. *J. Wood Chem. Techn.*, 3, 421-35.
- [46] Darné G., (1991). Recherche sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de vignes. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux. Department of Viticulture and Oenology University of Stellenbosch., 1996. Firmness meter for grape berries: How firm are our table grapes really? *Deciduous Fruit Grower*, 46, 379-383.
- [47] Baldi, A., Romani, A., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Casetta, B.L., (1995). HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera*. *J. Agr. Food Chem.*, 43, 2104-2109.
- [48] Souquet, J.-M., Labarbe, B., Le Guerneve, C., Cheynier, V., Moutounet, M., (2000). Phenolic composition of grape stems. *J. Agri. Food Chem.*, 48, 1076-1080
- [49] Ficarra, R., Tommasini, S., Raneri, D., Calabrò, M.L., Di Bella, M.R., Rustichelli, C., Gamberini, M.C., Ficarra, P., (2002). Study of flavonoids/[beta]-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *J. Pharmaceutical Biomed. A.*, 29,1005-1014.
- [50] Markham, K.R., Gould, K. S., Winefield, C. S., Mitchell, K. A., Bloor, S. J., Boase, M. R., (2000). Anthocyanin vacuolar inclusions-Their nature and significance in flower colouration. *Phytochem.*, 55, 327-336.

- [51] Hardie, W.J., O'Brien, T. P., Jaudzems, V.G., (1996). Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape *Vitis vinifera* L. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2, 97-142.
- [52] Peer, W.A., Brown, D. E., Tague, B. W., Muday, G.K., Taiz, L., Murphy, A. S., (2001). Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 126, 536-548.
- [53] Latruffe, N., (2010). Notions d'alimentation humaine - Les polyphénols de la vigne et du vin et leur intérêt nutritionnel. Tech. L'ingénieur base docum.
- [54] Timberlake, C.F., Henry, B.S., (1988). Anthocyanins as natural food colorants. *Prog Clin Biol Res*, 280, 107-121.
- [55] Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R., (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem.*, 64 (5), 923-933.
- [56] Meiers, S., Kemeny, W., Wetand, U., Gastpar, R., Von Angerer, E., Marko, D., (2001). The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growthfactor receptor. *J Agric Food Chem*, 48, 958-962.
- [57] Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N., et Boskou, D., (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange-peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, 94, 19-25.
- [58] Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B., Vieira, W., Virador, V.M., (2001). Effects of Wine Phenolics and Sorghum Tannins on Tyrosinase Activity and Growth of Melanoma Cells. *J. Agri. Food Chem.*, 49, 1620-1624.
- [59] Lea, A., (1990). Bitterness and astringency: the procyanidins of fermented apple ciders. In : R. Rouseff (Ed.) *Bitterness in foods and beverages. Developments in food science* 25. Elsevier, Amsterdam, pp. 123-143.
- [60] Scharbert, S., Holzmann, N., Hofmann, T., (2004). Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *J Agric. Food Chem.*, 52, 3498-3508.

- [61] Mazza, G., Brouillard, R., (1987). Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem*, 25, 207-225.
- [62] Moussaoui R. (2007). Valorisation des sous-produits de l'huile d'olive : grignons, margines. Thèse de Doctorat en Chimie, Département des Sciences, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie.
- [63] Penchev, P.I. Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse doctorat. Université de Toulouse. (2010).
- [64] Genta-Jouve, G. Préparation des échantillons pour l'analyse en LC-MS. Cours Université Paris Descartes.
- [65] Singleton.V. L ; Rossi.J. A, (1965) : Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 : 144-158.
- [66] Ribereau-Gayon P., (1968). Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, Paris, p254.
- [67] Parejo, I ; Viladomat, F ; Bastida, J ; Rosas-Romero, A ; Flerlage, N ; Burillo,J; Codina C., 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6882-6890.
- [68]^{a et b} Milosevic M., *Applied spectroscopy reviews*, (2004), vol.39 n° 3, p. 365-384.
- [69]^{a et b} Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R., *Principles of instrumental analysis*, 6th Edition, p. 243-244.
- [70] Quan V Vuong., Hirun S., Paul D.Roach., Michael C.Bowyer., Phoebe A. Phillips and Christopher J.Scarlett. (2013) Effect of extraction conditions on total phenolic compound and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts, *journal of herbal medicine*. 3 : 104–111.).

[71] Drosou, C., et al., A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Ind. Crops Prod.* (2015),

[72] Rafael Apolinar-Valiente , Inmaculada Romero-Cascales, Encarna Gómez-Plaza, José Maria Lopez-Roca, José Maria Ros-Garcia Cell wall compounds of red grapes skins and their grape marcs from three different winemaking techniques *Food Chemistry* 187 (2015) 89–97

[73] Ghafoor, K., Park, J., Choi, Y.H., (2010). Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *JT Innov. Food Sci. Emer. Technol.* 11, 485–490.

[74] Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44, 2712–2720.

[75] Tseng, A., & Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*, 138, 356–365.

[76] Dugald C., Closea B.C., Arthura B.L., Pietrzykowskia E. et Patersona S., (2004). Evaluating effects of nursery and post-planting nutrient regimes on leaf chemistry and browsing of eucalypt seedlings in plantations. *Forest Ecology and Management.* 200,101-112.

[77] Anthony Ojeil, Nada El Darra, Youssef El Hajj, Paulette Bou Mouncef 1, Toufic J. Rizk2 et Richard G. Maroun. Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin chateau ksara *Lebanese Science Journal*, Vol. 11, No. 2, (2010).

[78] Cozzolino, D.; Kwiatkowski, M.J.; Parker, M.; Cynkar, W.U.; Damberg, R.G.; Gishen, M.; Herderich, M.J. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* (2004), 513, 73–80.

- [79] Di Egidio, V.; Sinelli, N.; Giovanelli, G.; Moles, A.; Casiraghi, E. NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* (2010), 230, 947–955.
- [80] Goshen, M.; Damberg, R.G.; Cozzolino, D. Grape and wine analysis—Enhancing the power of spectroscopy with chemometrics. A review of some applications in the Australian wine industry. *Aust. J. Grape Wine Res.* (2005), 11, 296–305.
- [81] Oana-Roxana BANCUTA, Andrei CHILIAN, Iulian BANCUTA, Rodica-Mariana ION, Radu SETNESCU, Tanta SETNESCU, Anca GHEBOIANU, Marius LUNGULESCU. (2015). FT-IR and uv-vis characterization of grape extracts used as antioxidants in polymers. *Rev. Roum. Chim.*, 60(5-6), 571-577
- [82] Boulet, J.; Doco, T.; Roger, J. M. Improvement of calibration models using two successive orthogonal projection methods. Application to quantification of wine mannoproteins. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* (2007), 87, 295–302.
- [83] Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; Rondeau, P. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared analysis of the fermentation process of pineapple. *Anal. Chim. Acta* (2005), 545, 99–106.
- [84] Mo, K.H., Alengaram, U.J. and Jumaat, M.Z. (2014) A Review on the Use of Agriculture Waste Material as Lightweight Aggregate for Reinforced Concrete Structural Members. *Advances in Materials Science and Engineering.*
- [85] Socrates, G. (2000) *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. 3rd Edition, John Wiley & Sons.
- [86] Jensen, J.S., Egebo, M. and Meyer, A.S. (2008) Identification of Spectral Regions for the Quantification of Red Wine Tannins with Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3493-3499. <https://doi.org/10.1021/jf703573f>
- [87] Ragupathi Raja Kannan, R., Arumugam, R. and Anantharaman, P. (2011) Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analysis of Seagrass Polyphenols. *Current Bioactive Compounds*, 7, 118-125. <https://doi.org/10.2174/157340711796011142>

- [88] Veloz-García, R., Marín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, R., Rodríguez-Guerra, R., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M. M. and Loarca-Piña, G. (2010) Antimicrobial Activities of Cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) Phenolics-Containing Extract Against Fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Industrial Crops and Products*, 31, 134-138. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.013>
- [89] Gonultas, O. and Ucar, M.B. (2012) Chemical Composition of Some Commercial Tannins Produced in Turkey. *Proceedings of the 55th International Convention of Society of Wood Science and Technology*, 1-9.
- [90] Senvaitiene, J., Beganskiene, A. and Kareiva, A. (2005) Spectroscopic Evaluation and Characterization of Different Historical Writing Inks. *Vibrational Spectroscopy*, 37, 61-67
- [91] Kassim, M.J., Hussin, M.H., Achmad, A., Dahon, N.H., Suan, T.K. and Hamdan, H.S. (2011) Determination of Total Phenol, Condensed Tannin and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of *Uncaria Gambirextracts*. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 22, 50-59.
- [92] Özacar, M., Şengil, İ.A. and Türkmenler, H. (2008) Equilibrium and Kinetic Data and Adsorption Mechanism for Adsorption of Lead onto *Valonia Tannin Resin*. *Chemical Engineering Journal*, 143, 32-42.
- [93] Ogata, T. and Nakano, Y. (2005) Mechanisms of Gold Recovery from Aqueous Solutions using a Novel Tannin Gel Adsorbent Synthesized from Natural Condensed Tannin. *Water Research*, 39, 4281-4286.

Remerciements

Ce modeste travail a été effectué aux laboratoires du Centre de Recherche Scientifique et Technique des Analyses Physico-Chimiques « CRAPC » à Bou-Ismaïl.

En premier lieu, permettez moi d'exprimer mon plus vif remerciement à Dieu le tout puissant pour sa volonté, la foi, la santé et le courage qu'il m'a donné et sans les qu'elles mon travail n'aurait jamais vu le jour.

Je tiens vivement à remercier mon promoteur **Mr El HADI Djamel** Professeur à l'université Blida 1, Qu'il reçoit toute l'expression de ma reconnaissance d'avoir proposé ce sujet de recherche, pour la confiance qu'il m'a accordé, pour ses efforts et sa disponibilité, et je saisis cette occasion pour lui exprimer toutes mes sincères considérations et gratitude.

Je tiens également à adresser mon profond remerciement à mon Co-promoteur **Mr HAMITOUCHE Adh'ya-eddine** maître de recherche A, chef de département de suivi des activités de recherche en analyses physico-chimiques et chef d'équipe traitement des effluents liquides par voie biologique - division chimie de l'environnement au CRAPC pour ces précieux conseils, sa disponibilité son aide et son dynamisme.

Mes chaleureux remerciements s'adressent également au Directeur du CRAPC

Mr BACHARI Khaldoune et au Directeur adjoint **Mr CHEBOUT Redhouane**, et au Directeur de l'UR-ADTE **Mr LADJI Riyad** de m'avoir donné l'avis favorable de réaliser ma recherche au sein des laboratoires du CRAPC.

C'est également avec un grand plaisir que j'adresse mes remerciements à **M^{elle} GHALIAOUI Nora** Attachée de Recherche au CRAPC d'avoir suivie et dirigée assidument ce travail et pour toute sa patience, sa gentillesse et ses compétences scientifiques qui m'ont permis de mener à bien cette recherche, et que j'exprime toute mes reconnaissances.

Mes sincères remerciements et toutes mes reconnaissances vont s'adresser à **M^{elle} SAADOUNE Zineb** Doctorante à l'université de Blida pour sa collaboration, son aide, sa disponibilité, ces différentes implications, sa patience, le suivi et l'orientation de ce travail.

Mes remerciements vont s'adresser à **Mr DJEZIRI Mourad** attaché de recherche au CRAPC pour sa contribution, et son aide.

Je ne manque pas d'exprimer mes remerciements à **Dr LARIBI.H** enseignante à l'université de Blida 1, pour ces précieux conseils, ses encouragements et sa collaboration et à **Pr BOUTOUMI Hocine** pour sa contribution, à **Mr MEKHALEF BEN HAFSA Fouad** ingénieur de recherche et chef d'atelier d'analyse chromatographiques et élémentaires pour sa compréhension et sa patience durant ce travail, et à **Mr SAID OTHMANI Faycel**, à **M^{me} TOUATI Souad**, à **Mr HADJAJ Mohamed** à **M^{elle} ZEMMACHE SAFIA** et **M^{elle} HAZAM Souad** ingénieurs soutient à la recherche au CRAPC pour leurs aides et encouragements .

C'est avec un grand plaisir que j'adresse mes remerciements au président et aux membres de jury, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de présider et examiner ce travail.

Un grand merci à ce qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, et surtout le corps technique au CRAPC.