

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université BLIDA1



Faculté des Science de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

Mémoire

En vue de l'obtention de diplôme de Master

Option : Biotechnologie des plantes aromatiques et médicinales et des produits naturels

Thème

**Etude de quelques activités biologiques des polyphénols
des feuilles de *Vitis vinifera***

Présenté par :

Le : 29/06/2015

M^{elle} BENSALAH Samia

Devant le jury composé de :

| | | | |
|------------------------------|-------|-----------|--------------|
| M ^{me} HOUMANI Z. | Pr | U. BLIDA1 | Présidente |
| M ^r BENDALI A. | M.A.A | U. BLIDA1 | Examineur |
| M ^{me} AYACHI N. | M.A.A | U. BLIDA1 | Examinatrice |
| M ^{elle} CHEBATA N. | M.A.A | U. BLIDA1 | Promotrice |

Promotion : 2014/2015

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier et en premier lieu **ALLAH, le Tout Puissant et Miséricordieux** qui m'a donné la force, la volonté et le courage pour mener à bonne fin ce travail.*

*Mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance vont à mon promotrice **M^{me} Chebata N.** Maître assistante A à l'Université Blida -1-. Pour leurs dévouements, leurs conseils et leurs soutiens tout au long de l'élaboration de ce travail.*

*Mes vifs remerciements à **M^{me} Houmani Z.** Professeure à l'Université Blida -1- d'avoir accepté de présider le jury.*

*J'exprime mes sincères remerciements à **M^{me} Ayachi N.** Maître assistante A à l'Université Blida -1-, et **M^r Bendali A.** Maître assistante A à l'Université Blida -1- pour m'avoir accordé l'honneur d'examiner mon travail.*

J'aimerais également remercier vivement tous les membres de laboratoire de Recherche des plantes aromatiques et médicinales, ainsi que les membres de laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Hassiba Benboulaide et les membres de laboratoire Pharmacotoxicologie (SAIDAL) et Pharmacie galénique pour leurs grandes sympathies et leurs conseils.

Mes pensées vont à tous les enseignants qui ont participé à ma formation.

Je remercie pleinement mes parents qui m'ont encouragé, soutenu pour que je puisse mener à bien mes études.

Une mention spéciale à toute ma famille.

Finalement, un grand merci à tous ceux et toutes celles qui d'une manière ou d'une autre m'ont aidé et soutenu de près ou de loin.

Dédicace

Je Dédie Ce Modeste Travail

Aux lumières qui ont toujours éclairées mon chemin

Aux sources de mon énergie

A ceux que

J'ai le plus chers au monde :

Ma mère et mon père

De m'avoir si bien éduqué et enseigner pour arriver à ce jour et surtout le soutien moral, je tiens à leur dire aussi que je ne pourrais qu'être fière d'eux.

A Mes Adorables Frères: Mohamed Et Abd'Allah.

A mes chers oncles, tantes, cousines et cousine.

A mes amis: Assia, Siham, Amina, Imen, Noussieba, Manel, Hiba, Ahelam, Hayat, Ibtessam, Cherifa, Hamida, Ghezlane, Hadjer, Nadia, Sabrina et à ma chère Wahiba.

A tous mes collègues d'étude.

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

Samia .

Résumé

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à faire une étude phytochimique et analytique et la mise en évidence de quelques propriétés biologiques des polyphénols totaux et des flavonoïdes des feuilles de *Vitis vinifera* provenant de la région de Tipaza. L'extraction des polyphénols et des flavonoïdes par la méthode solide-liquide a donné des rendements de **41.8%** et **28.66%**, respectivement. Le dosage de ces extraits a montré les teneurs suivantes : **352,66 mg EAG/g MS** pour les polyphénols totaux, **68.66 mg EQ/g MS** pour les flavonoïdes. Le screening phytochimique a mis en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins Catéchétique, des glucosides et du mucilage. L'analyse chromatographique des extraits phénoliques par HPLC (High Performance Liquid Chromatography), a révélé la présence de la vanilline (**31.9414%**), l'acide gallique avec **0.4734%**, la catéchine (**0.1145%**) et l'acide tannique (**0.0389%**) dans l'extrait de polyphénols totaux, et la présence l'acide gallique avec **47.3553%** dans l'extrait des flavonoïdes. L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), a permis de constater un effet antioxydant important avec des pourcentages **95.85%** pour les polyphénols et **92.68%** pour les flavonoïdes, en comparant avec l'acide ascorbique (**93.89%**). L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* selon la méthode de diffusion milieu solide. Elle a permis de démontrer que les extraits testés ont manifesté un effet inhibiteur sur les 4 souches, avec des zones d'inhibition qui varient entre **7** et **16 mm**. Nos extraits semblent posséder un effet anti-inflammatoire important avec des pourcentages de réduction de l'œdème de **57,75%** pour polyphénols totaux et **49,78%** pour flavonoïdes, contre un pourcentage de réduction de l'œdème de **63,49%** Pour Diclofenac.

Mots clés : *Vitis vinifera*, polyphénols totaux, flavonoïdes, activité antimicrobienne, activité anti-oxydante, effet anti-inflammatoire.

Abstract

In this work we were interested to make a study of phytochimic, analytical, and the description of some biological properties of total polyphenols and flavonoids of the leaves of *Vitis vinifera* coming from the area of Tipaza. The extraction of the polyphenoles and the flavonoids by the solid-liquid method gave outputs of 41.8% and 28.66%, respectively. The proportioning of the phenolic extracts of the leaves of *Vitis vinifera* with assembled the following contents: **352.66** mg EAG/g ms for total polyphenols, **68.66** mg EQ/g ms for the flavonoïdes. The screening phytochimique prove the presence of the flavonoïdes, Catéchétique tannins, glucosides and mucilage.in addition, The chromatographic analysis of the phenolic extracts by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) revealed the presence of the vanillin (**31.9414%**), the gallic acid (**0.4734%**), the catéchine (**0.1145%**), the tannic acid (**0.0389%**) in the total polyphenol extract, and the presence of the gallic acid with **47.3553%** in the extract of the flavonoïdes. Moreover, the evaluation of the antioxydant activity by the test of DPPH, discovered an important antioxydant capacity with percentages 95.85% for the polyphynoles and 92.68% for the flavonoides, while comparing with the ascorbic acid (93.89%). The antimicrobial activity was given on four bacterial strains: *Escherichia coli*, *Staphilococca aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* according to the method of solid diffusion medium. It allowed showing that extract them tested expressed an inhibiting effect on the 4 bacterial , with zone of inhibition of vary between 7 and 16 mm.Our extracts seem to have an effect important anti-inflammatory drug with percentages of reduction of the œdème of **57,75%** for total polyphenols and **49,78%** for flavonoïdes, against a percentage of reduction of the œdème of **63,49%** For diclofenac.

Key words: *Vitis vinifera*, polyphenols, flavonoïdes, antimicrobial activity, antioxydant activity, anti-inflammatory effect.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى معرفة التركيبة الكيميائية لأوراق كرمة العنب الأحمر المأخوذة من منطقة تيبازة. التقييم الكمي و النوعي للفينولات الكلية ، الفلافونويدات المستخلصين من هذه الاوراق مع دراسة بعض الخصائص البيولوجية لهذين المركبين.

تم استخراج مادة البوليفينول الإجمالي والفلافونويدات بطريقة السائل-الصلب، حيث بلغ مردود العملية 41.8% من البوليفينول الإجمالي و 28.66% من الفلافونويدات.

كما أن التقييم الكمي للفينولات الكلية والفلافونويدات أظهر أن هذه الأخيرة غنية بالمركبات المذكورة سابقا مع تركيز 352,66mg EAG/g MS بالنسبة للبوليفينول الإجمالي و 68.66mg EQ/g MS بالنسبة للفلافونويدات.

أظهرت نتائج الفحص الكيميائي أن هذه النبتة غنية بالمركبات الثانوية: الفلافونويدات (flavonoïdes)، دباغ كاتيشيك (tanin-catéchique)، الغلوكوزيدات (glucosides)، والمخاط (mucilage).

كشفت نتائج التحليل النوعي بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة ذات الفعالية العالية (HPLC) عن وجود: حمض الغاليك (acide gallique)، حمض التانيك (acide tannique) (0.0389%)، الكاتشين (catéchine) (0.1145%) والفانيلين (vanilline) (31.9414%) في البوليفينول الإجمالي، أما بالنسبة للفلافونويد للأوراق فقد استطعنا التعرف على حمض الغاليك (acide gallique).

تقييم نشاط مضادات الأكسدة بواسطة اختبار DPPH، كشف أنمستخلص البوليفينول الإجمالي ومستخلص الفلافونيدات من اوراق كرمة العنب لهما قدرة مضادة للأكسدة هامة مع نسب 95.85% و 68.92% على التوالي مقارنة مع حمض الاسكوربيك (93.89%).

تقييم النشاط المضاد للبكتيريا اظهر أن المستخلصين الاثنين سواء أكان البوليفينول الإجمالي أو الفلافونيدات لهما خاصية منع التكاثر بالنسبة للبكتيريا الأربعة المدروسة *Escherichia coli*, *Staphylocoques aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* مع منطقة تثبيط بين 7 و 16 مم.

كما أظهرت دراسة المستخلصين الاثنين أن لدهما تأثير كبير مضاد للالتهابات مع نسب تخفيض وذمة 57.75% بالنسبة لإجمالي البوليفينول و 49.78% بالنسبة للفلافونيدات ، مقابل تخفيض نسبة وذمة 63, 49% ديكلوفيناك.

الكلمات المفتاحية: *Vitis vinifera*، البوليفينول الإجمالي ، الفلافونويد، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للأكسدة، وتأثير المضاد للالتهابات.

Sommaire

| | |
|--|----|
| Introduction..... | 01 |
| Partie bibliographique..... | 03 |
| I. La vigne | 03 |
| 1. Aperçu systématique | 03 |
| 2. Description botanique | 04 |
| 3. Répartition géographique de la vigne..... | 06 |
| 4. Exigences écologiques..... | 07 |
| 5. Composition chimique de la vigne | 08 |
| 6. Vertus thérapeutiques de la vigne | 09 |
| II. Les polyphénols..... | 09 |
| 1. Généralités | 09 |
| 2. Les différentes classes des polyphénols | 10 |
| 3. Effets biologiques des polyphénols..... | 12 |
| 4. Activité antioxydante..... | 14 |
| 4.1. Le stress oxydatif..... | 14 |
| 4.2. Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène..... | 14 |
| 4.3 Conséquences du stress oxydant | 15 |
| 4.4 Antioxydants..... | 17 |
| 4.4.1 Les antioxydants enzymatiques..... | 17 |
| 4.4.2 Les antioxydant non enzymatiques..... | 18 |
| 4.4.3 Les antioxydants d'origine végétale..... | 18 |
| 5. L'activité anti-inflammatoire | 18 |
| 5.1. L'inflammation..... | 18 |
| 5.2.Evolution de l'inflammation..... | 19 |
| 5.3. Les anti-inflammatoires | 19 |
| 5.3.1 Les anti-inflammatoires conventionnels | 19 |
| 5.3.2 Les Anti-inflammatoires d'origine végétale..... | 20 |
| 6. L'activité antimicrobienne..... | 20 |
| 6.1 Les principales substances antimicrobiennes | 21 |
| 6.1.1 Les antibiotiques..... | 21 |
| 6.1.2 Activité antimicrobienne des substances d'origine végétales..... | 21 |

| | |
|---|----|
| Matériel et méthodes | 23 |
| 1. Matériel..... | 23 |
| 1.1 Matériel végétal..... | 23 |
| 1.2. Matériel animal..... | 23 |
| 1.3. Souches bactériennes | 23 |
| 2. Méthodes | 24 |
| 2.1. Séchage et broyage..... | 24 |
| 2.2. L'extraction | 24 |
| 2.3. Dosage des polyphénols totaux | 27 |
| 2.4. Dosage des flavonoïdes | 28 |
| 2.5. Screening phytochimique..... | 29 |
| 2.6. Analyse chromatographique par HPLC | 30 |
| 2.7. L'Activité bactérienne..... | 30 |
| 2.8. L'activité antioxydante | 32 |
| 2.9. L'activité anti-inflammatoire | 34 |
| Résultats et discussion..... | 36 |
| 1. Rendement et dosages des polyphénole..... | 36 |
| 2. Screening phytochimique | 37 |
| 3. Analyses chromatographiques par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) | 39 |
| 4. Etude de l'activité antibactérienne | 40 |
| 5. L'activité antioxydante | 43 |
| 6. Activité anti-inflammatoire..... | 46 |
| Conclusion..... | 48 |
| Référence bibliographique..... | 50 |

Annexe

Liste des figures :

| | |
|---|----------|
| Figure 1 : Feuilles et fruits de <i>Vitis vinifera</i> | 03 |
| Figure 2 : Photo d'une vigne en fleur | 05 |
| Figure 3 : Structure détaillée d'une grappe de raisin | 06 |
| Figure 4 : Structure générale du noyau des flavonoïdes | 11 |
| Figure 5 : Effets biologiques des polyphénols | 14 |
| Figure 6: Origine des différentes espèces réactives de l'oxygène impliquées en biologie..... | 15 |
| Figure 7: Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées | 17 |
| Figure 8: Protocole d'extraction des polyphénols totaux..... | 25 |
| Figure 9 : Méthode d'extraction des flavonoïdes | 26 |
| Figure 10 : Principe de réaction entre les flavonoïdes et l' $AlCl_3$ | 28 |
| Figure 11. Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH..... | 33 |
| Figure 12 : Pourcentage d'inhibition pour les polyphénols totaux et les flavonoïdes et l'acide ascorbique en fonction des différentes dilutions..... | 44 |
| Figure 13: Pourcentage d'œdème et de réduction d'œdème pour les 4 lots traités..... | 47 |
| Figure 14 : Courbe d'étalonnage l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux..... | Annexe 1 |
| Figure 15 : Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes..... | Annexe 1 |
| Figure 16: Analyse chromatographique de l'extrait des polyphénols totaux par HPLC..... | Annexe 2 |
| Figure 17: Analyse chromatographique de l'extrait des flavonoïdes par HPLC..... | Annexe 2 |

| | |
|--|---------|
| Figure18: Effet inhibiteur des extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i> | Annexe3 |
| Figure19: Effet inhibiteur des extraits sur <i>E. coli</i> | Annexe3 |
| Figure 20 : Effet inhibiteur des extraits sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Annexe3 |
| Figure 21 : Effet inhibiteur des extraits sur <i>Enterococcusfaecalis</i> | Annexe3 |
| Figure 22 : Injection de carraghén..... | Annexe5 |
| Figure 23 : Gavage de l'extrait aqueux..... | Annexe5 |

Liste des tableaux:

| | |
|---|----------|
| Tableau I : Constituants chimiques principaux des feuilles de <i>Vitisvinifera</i> | 08 |
| Tableau II : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées | 24 |
| Tableau III : Concentrations testées dans le test antimicrobien..... | 31 |
| Tableau IV: Rendements obtenus des différents extraits..... | 36 |
| Tableau V : Concentrations des polyphénols totaux, des flavonoïdes obtenus par dosage spectrophotométriques | 36 |
| Tableau VI : Screening phytochimique des feuilles de <i>Vitisvinifera</i> | 38 |
| Tableau VII : Principaux composés chimiques de polyphénols totaux et des flavonoïdes des feuilles de la vigne rouge en fonction du temps de rétention..... | 40 |
| Tableau VIII : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des polyphénols et Flavonoïdes des feuilles de <i>vitisvinifera</i> et de l'amoxicilline | 41 |
| Tableau IX : Les IC ₅₀ l'acide ascorbique et les deux extraits..... | 44 |
| Tableau X: Analyse chromatographique de l'extrait de polyphénols totaux par HPLC en trois longueur d'ondes: $\lambda= 270\text{nm}$, $\lambda= 320\text{nm}$ et $\lambda= 370\text{nm}$ | Annexe2 |
| Tableau XI: Analyse chromatographique de l'extrait de flavonoïdepar HPLC en trois longueur d'ondes: $\lambda= 270\text{nm}$, $\lambda= 320\text{nm}$ et $\lambda= 370\text{nm}$ | Annexe2 |
| Tableaux XII: Résultats des étalons (standards)..... | Annexe2 |
| Tableau XIII: Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique et de l'extrait des feuilles de <i>vitisvinifera</i> | Annexe 4 |
| Tableau XIV : Résultat de l'activité anti-inflammatoire des extraits de polyphénols totaux et de flavonoides des feuilles de <i>Vitisvinifera</i> | Annexe 5 |

Glossaire

Antiathérogènes, Médicament destinés à traité l'athérogenèse.

Anti-carcinogènes Ayant trait à prévenir ou à retarder le développement du cancer.

Anti-thrombotiques, médicament qui ont pour but de prévenir ou de limiter la formation ou l'extension d'un thrombus.

Diclofenac : un médicament à effet anti-inflammatoire.

Expectorant : Fluidifiant bronchique facilitant l'expectoration des sécrétions produites par les voies respiratoires inférieures (trachée, bronches, alvéoles pulmonaires)

Homéostasie : Processus de régulation par lequel l'organisme maintient les différentes constantes du milieu intérieur (ensemble des liquides de l'organisme) entre les limites des valeurs normales.

Neurodégénératives : Qui concerne la dégénérescence du système nerveux (Troubles neurodégénératifs).

Sclérose latérale amyotrophique : affection du système nerveux central au cours de laquelle des lésions des cellules nerveuses provoquent progressivement des paralysies.

Ulcé-rogène : Se dit de ce qui provoque un ulcère, perte de substance de la peau ou d'une muqueuse cicatrisant difficilement.

Ulcères gastro-duodénaux : sont des érosions des muqueuses qui peuvent affecter la paroi de l'estomac ou du duodénum.

Vasodilatateurs Médicament qui augmentent le calibre des vaisseaux par élongation de leurs fibres musculaires.

Vasculoexsudatifs : se traduit par les quatre signes cardinaux de l'inflammation aigue (rougeur, chaleur, douleur, tuméfaction).

Veinotonique : Médicament utilisé dans le traitement des troubles veineux. Egalement appelés phlébotoniques.

(Larousse médicale, 2015)

Depuis l'antiquité, certaines plantes étaient vénérées pour des vertus qu'on leur avait reconnues. Personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissaient, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique. En effet, il est étonnant qu'une feuille, une fleur ou une racine puisse guérir, ou tout au moins soulager un état maladif ou des troubles organiques (**Schauenburg, 1997**).

De nombreux traitements médicamenteux restent insuffisants face aux fléaux tels que: malaria, première cause de mortalité dans le monde, Cancer, Alzheimer, Leishmaniose, infections virales et bactériennes; ainsi que l'apparition de souches de microorganismes de plus en plus résistantes aux traitements connus malgré les progrès réalisés en médecine au cours des dernières décennies. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces fléaux. (**Amiraguebailia, 2007**).

Les plantes renferment une partie importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme appelées métabolites. On distingue ainsi, deux groupes de métabolites: les métabolites primaires (lipide, protéine, glucide) et les métabolites secondaires (**Marc et al., 2002**).

Les métabolites secondaires ont des intérêts multiples. Ils sont mis à profit en thérapie comme anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, antibactériens, anticancéreux, antifongiques, diurétiques...etc. (**Hartmann, 2007**).

Ces métabolites secondaires sont classés en plusieurs composants chimiques dont les plus répandus sont les polyphénols (**Vermerris, 2006**).

La vigne rouge *Vitis vinifera*, est l'une des espèces alimentaires les plus cultivées dans le monde. Elle appartient à la famille des Vitacées et qui possède une teneur élevée en composés phénoliques.

La présente étude a pour objectif la valorisation de *Vitis vinifera* dans le domaine pharmaceutique par l'évaluation de trois activités biologiques des extraits phénoliques des feuilles.

Pour cela nous avons fixés les étapes suivantes :

- Extractions et dosage des polyphénols totaux et des flavonoides,
- Le test de screening phytochimique pour la détermination des différentes classes chimiques.

- Analyse chromatographique de l'extrait phénolique par HPLC pour la détermination des différents composés chimiques de ces extraits.
- L'évaluation de l'activité antibactérienne, anti-oxydante et anti-inflammatoire des polyphénols totaux et des flavonoïdes.

I. La vigne

1. Aperçu systématique

La vigne fait partie de l'embranchement des Eu-dicotylédones moyennes, et appartient à l'ordre des Vitales qui, constituent la sous-classe des Rosidées.

A l'intérieur des Vitales, la vigne se situe dans la famille des Vitacées et appartient au genre *Vitis*(APG III, 2009). Ce genre est séparé en deux sous-genres **Muscadinia** et **Euvtis**(Huglinet Shneider, 1998). Selon ces derniers, les espèces du sous-genre *Euvtis* sont réparties, selon leur distribution géographique naturelle, en groupes asiatique, groupe américain et groupe euro-asiatique.

❖ **Le groupe asiatique** : comprend un peu plus de 10 espèces, dont la plus commune est *Vitis amurensis*.

❖ **Le groupe américain** : comprend une vingtaine d'espèces, les plus importants de point de vue de leur utilisation viticole, *Vitis labrusca* au sud du Canada et la région atlantique du nord des Etats-Unis, *Vitis riparia* localisé au nord-est des Etats-Unis, *Vitis rupestris* au sud-ouest du bassin du mississipi, *Vitis berlandieri* rencontré au Texas et nord-est du Mexique et *Vitis rotundifolia* au sud-est des Etats-Unis.

❖ **Le groupe euro-asiatique** : ne comporte qu'une seule espèce, *Vitis vinifera* (figure 1), ce dernier se partage en une sous-espèce spontanée, *Vitis vinifera sylvestris* que l'on rencontre au Nord des Alpes, et une sous-espèce cultivée, *Vitis vinifera sativa* qui se divise en milliers de variétés aussi appelées cépages (Huglin et Shneider, 1998)



Figure 1. Feuilles et fruits de *Vitis vinifera* (Vautherot, 2008)

Ghedira, et al. (2012), mentionnent qu'on peut distinguer trois grands types de *Vitisvinifera* à savoir :

- ✓ *Vitisvinifera**pontica*, ancêtre des cépages blancs, dont le foyer initial est situé dans les hautes vallées du Tigre et l'Euphrate, et les pentes méridionales du mont Ararat en Arménie;
- ✓ *Vitisvinifera**occidentalis*, à l'origine des cépages rouges de l'Europe, de type Cabernet ou Pinot, implantée dans la vallée du Haut Nil et le Delta ;
- ✓ *Vitisvinifera**orientalis*, dont proviendraient les cépages européens du type Chasselas ou Gutedel, originaire de la vallée du Jourdain.

2. Description botanique:

La vigne se présente surtout sous la forme d'une liane munie de vrilles (**Retournard, 1997**). Les troncs peu observés dans les vignobles sont le résultat d'une taille annuelle associée à un palissage variant du plus simple au plus complexe (**Huglin et Schneider, 1998**). Ainsi le tronc des vignes est toujours flexueux, tordu autour des supports sur lesquels il grimpe. En dehors de son rôle de support, il joue également un rôle de réservoir pour les substances de réserve qui s'accumulent dans les cellules de bois (**Galet, 1988**).

Chaque année, au printemps des pousses herbacées se développent à partir des bourgeons, ce sont les rameaux. Le rameau est une tige renflée de distance en distance et ce renflement est appelé nœuds ; l'intervalle compris entre 2 nœuds s'appelle mérithalle (entre-nœuds). Les nœuds portent les différents organes : feuilles, bourgeons et inflorescence ou vrille (**Galet, 1988**).

Les feuilles de vigne sont caduques, alternes, simples palmatilobées ou composées palmées ou pennées et sont opposées aux vrilles ou aux raisins. Elles sont munies de stipules et ont un long pétiole. Elles sont d'un vert d'intensité variable, et sont généralement pubescentes au revers (**Botineau, 2010**).

Les feuilles des variétés rouges ou noires sont très riches en composées phénolique et surtout en anthocyanosides qui sont responsables de leur rougissement à l'automne. (**Retournard., 1997**).

L'inflorescence se constitue en grappe ramifiée portant de nombreuses petites fleurs verdâtres qui sont régulières, opposée aux feuilles ou plus rarement terminales.

Les fleurs sont généralement pentamères et peuvent être hermaphrodites ou unisexuées, la plante étant monoïque ou dioïque voire polygame avec pieds à fleurs hermaphrodites et males et/ou femelles(**Botineau, 2010**).

D'après **Huglin(1986)** et **Botineau(2010)**, La fleur normale, hermaphrodite es formé de 5 pièces à savoir :

- Le calice: comprend 5 sépales rudimentaires soudés
- La corolle : constituée 5 pétales soudés à leur sommet, formant ainsi un capuchon.
- L'androcée : formé par 5 étamines opposées aux pétales.
- Le disque nectarifère : composé de 5 nectaires, alterne avec les étamines. Les nectaires se retrouvent sous le renflement basilaire de l'ovaire et secrètent un suc vers l'intérieur.
- Le gynécée : comporte 2 carpelles soudés en un ovaire supère, à placentation axile avec 2 ovules par loge.Les grappes sont composées d'un ensemble de ramifications parmi lesquelles on identifie, le pédoncule de raisin, l'axe principal ou rachis ou rafle et les pédicelles qui portent les baies ou grains(**Huglin et Shneider, 1998**).



Figure 2. Photo d'une vigne en fleur(**Botineau, 2010**).

Les baies sont résultat du développement des tissus de l'ovaire, après fécondation. Elles sont constituées d'une pellicule entourant la pulpe, de faisceaux vasculaires et de pépins.

Le grain ou pépin résultat du développement de l'ovule fécondé, le pépin comprend 3 partie :l'embryon qui se développera en plantule, l'albumen qui contient des réserves pour

la survie de l'embryon et son développement, et le tégument dur qui protège l'embryon et son albumen(Galet, 1988)

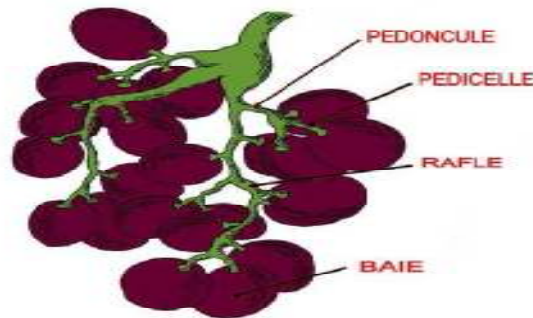


Figure3: Structure détaillée d'une grappe de raisin(Anonyme,2010)

Les racines d'une souche de vigne sont des racines adventives nées en majeure partie sur le nœud inférieur de la bouture ou greffe-bouture(Huglin, Schneider, 1998). Elles ont pour fonction principales de puiser dans le sol, l'eau et les matières minérales nécessaires à la vigne. Elle constitue également un organe de réserve en accumulant les graines d'amidons synthétisés au niveau des feuilles (Galet, 1988).

3. Répartition géographique

D'aprèsQuélénils (2008) etl'OIV(2007),La vigne est originaire d'Asie Mineur.Elle croît spontanément en Europe méridionale, Afrique du Nord, Asie occidentale tempérée.

La vigne présente une large répartition sur les cinq continents avec une superficie d'environ huit million d'hectares. La majorité des surfaces viticoles mondiales sont situées en Europe avec près de 59% du vignoble mondial, pour lesquels les principaux pays d'importance viticole sont la France, l'Italie, l'Espagne, l'Allemagne, le reste étant réparti entre l'Asie avec 22%de vignoble mondiale, localisé en Turquie, l'Iran, la Syrie, l'Afghanistan, la Chine et le Japon. L'Amériqueavec 12,5% de vignoble mondiale principalement en Amérique du Nord avec la Californie et en Amérique du Sud avec l'Argentine et le Chili. L'Afrique avec 4,9% principalement en Afrique du Sud, Tunisie, Algérie, Maroc, et l'Océanie avec 0,7% en Australie et Nouvelle-Zélande. Concernant

Vitis Vinifera, Elle est cultivée en Europe, au Moyen-Orient, dans le Caucase, dans le nord et l'extrême sud de l'Afrique.

L'Algérie, comme les autres pays du bassin méditerranéen, jouit d'un climat et d'une diversité du sol qui lui permet d'accueillir un grand nombre d'espèces fruitières et de vignes sur son territoire(**Anonyme, 1989**).

Durant la période de colonisation française, le vignoble algérien représentait l'une des principales richesses du pays qui, malheureusement, n'a pas pu être maintenue dans le temps. La situation se trouve alors caractérisée par une baisse des superficies et une production faible et fluctuante d'une année à l'autre(**Drifa et Sadat, 2009**).

4. Exigences écologiques

La vigne est l'une des plus vieilles cultures qui a pris naissance il y a quatre mille ans environ; elle possède de grandes facultés d'adaptation aux conditions pédoclimatiques. On la cultive dans les régions chaudes et également sous des climats relativement froids(**Reynier, 1991**).

La température moyenne annuelle ne doit pas descendre en dessous de 9°C, l'optimum doit se situer entre 11 et 16°C, pour que la maturité soit suffisante.

La vigne gèle vers -2,5°C en période de végétation. La résistance au gel d'hiver est plus grande, les dégâts commencent vers -12°C pour les bourgeons et -16°C pour le bois.

Le minimum annuel d'ensoleillement pour la vigne se situe vers 1500 à 1600 heures, dont au moins 1200 heures pendant la période de végétation.

La culture normale de la vigne exige des précipitations annuelles de 600 mm environ. La répartition des pluies et leur rétention par le sol joue un rôle important. Si les précipitations dépassent 900 à 1000 mm, les maladies cryptogamiques telles que le mildiou et la pourriture grise, en particulier, deviennent très virulentes(**Louvieaux, 2004**).

La vigne pousse bien sur tous les types de sol. Il y a des vignobles qui sont implantés sur des roches calcaires ou sur des sols qui contiennent beaucoup de calcaire pour avoir le maximum d'arômes. Les sols fortement argileux ou humides sont à éviter. Ils ont tendance à se compacter facilement et ainsi réduire l'écoulement de l'eau. Le drainage doit être parfait (**Larbi Zerouala,2010**).

5. Composition chimique

La vigne est une plante riche en sucre et en composés phénoliques. En fonction de son stade de développement, la concentration moléculaire des composés chimiques varie, autant dans les baies que dans les feuilles ou dans les ceps. En règle générale les sucres tels que le fructose, le glucose, le lévulose, pectine et polysaccharides et l'eau sont des substances retrouvées à la maturité du raisin. On retrouve également des composés phénoliques tels que: les flavonoïdes représentés par le groupe des flavonols, des aldéhydes (éthanal, propanal, vanilline...etc.), des anthocyanes et des tanins condensés ainsi que des composés non-flavonoïdes représentés par les acides phénoliques et les stilbènes, principalement.

D'autres familles de composés sont également retrouvées, tels que : les lignocelluloses, les acides de type malique, tartrique et citrique, terpènes tels que le citrol, le geraniol..., les inositols (Inositols phosphates et myoinositols..), les vitamines (A, B1, B2, C...), les minéraux(Quélénius, 2008).

Les constituants chimiques principaux des feuilles de *Vitisvinifera* sont consignés dans le Tableau I.

Tableau I. Principaux constituants chimiques des feuilles de *Vitisvinifera* (Ghedira, et al., 2012)

| Familles de constituants chimiques | Constituants chimiques |
|------------------------------------|--|
| Anthocyanosides | O-glucosides du cyanidol et du péonidol |
| Acides phénols | Acides monocaféyl-tartrique, acides phénylpropanoïques |
| Tanins | Tanins hydrolysables (esters du glucose et des acides galliques et déhydrohexahydroxydiphénique) |
| Hétérosides de flavonols | Glucosides de flavonols : quercétine-3-O-β-D-glucuronide, isoquercitrine (quercitrine-3-O-β-glucoside), et kaempférol-3- glucoside |

6. Vertus thérapeutiques

La recherche biomédicale s'intéresse beaucoup aux substances contenues dans la vigne rouge et dans ses produits (**Frankel al., 1993**).

Selon **Xia et al. (2010)**, les composés phénoliques des vignes pourraient avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine car ils ont des propriétés antioxydante, cardioprotective, anticancéreuses, anti-inflammatoire, anti-âge et antimicrobiennes.

L'action thérapeutique de la vigne rouge est différente selon la partie de la plante utilisée.

- Les feuilles sont riches en anthocyanosides. Cette richesse en polyphénols leur confère des actions protectrices vasculaires et veinotonique qui seront intéressantes en cas de varices (**Botineau, 2010**) ; ils sont antidiabétiques (action des procyanidols) et interféreraient sur l'adipogenèse (**Ghedira et al., 2012**).
- Le raisin sec est utilisé comme un adoucissant, émollient, expectorant, laxatif...etc. Egalement, le vinaigre du vin est un antiseptique, astringent, sédatif contre les piqûres d'insectes, les insolation et les douleurs des dents (**Baba Aissa, 2011**).

Par ailleurs, les extraits de la vigne rouge sont spasmolytiques du côlon, antispasmodiques au niveau de la trachée et de l'aorte isolée. L'extrait hydroalcoolique est bronchodilatateur. Il a aussi des propriétés antiallergiques dans le cas des allergies causées par le pollen. L'extrait méthanolique issu des feuilles de vigne exerce des activités antipyrétiques (**Ghedira et al., 2012**).

Aussi les extraits obtenus au chloroforme, à l'acétate d'éthyle, au n-butanol et des fractions aqueuses résiduelles sont responsables d'activité antibactérienne notamment vis-à-vis de souches à Gram positif : *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. Ces mêmes extraits ont montré des propriétés antifongiques sur *Candida albicans* et *Candida parapsilosis* (**Ghedira, et al 2012**).

II. Les polyphénols

1. Généralités

Les polyphénols également dénommés composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal (**Vercauteren et al., 2002**). Ce sont des métabolismes secondaires des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques,

avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures connues différentes **(Bahorun, 1997)**.

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes: racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit **(Dehak k .2013)**. Ils sont élaborés par deux voies principales: la voie shikimate et la voie acétate **(Lugasiet al.,2003)**.

La structure chimique est identique à tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés.

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes différentes selon leur structure chimique de base **(Macheixet al.,1990)**; Ils peuvent s'étendre de molécules simples, tels que les acides phénoliques, aux composés fortement polymérisés, tels que des tannins **(Lugasiet al.,2003)**.

2. Les différentes classes des polyphénols

D'après **Dacoste, (2003)**, les polyphénols sont répartis en plusieurs classes:

- Les phénols simples (C6): un seul noyau phénol comme pour les acides phénoliques (C6–C1).
- Les flavonoïdes (C6-C3–C6): 2 noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.
- Les tanins hydrolysable et non-hydrolysable.
- Les stilbènes (C6–C2–C6).
- Les lignanes, les lignines et les coumestanes : 2 unités de phénylpropane.

2.1. Les acides phénoliques

Ces acides sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales **(Psoťováet al.,2003)**. Parmi les acides phénoliques, figurent l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide férulique et l'acide gallique **(Hale, 2003)**. Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets antioxydants, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est faible et sont considérés, généralement, non toxiques **(Psoťováet al.,2003)**.

2.2. Les flavonoïdes

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

Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones(Figure2). Ce dernier est constitué de deux unités aromatiques; deux cycles en C6 (A et B), reliés par un hétérocycle en C3 (**Bruneton, 1999**).

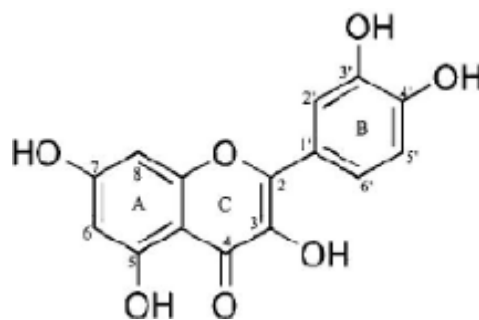


Figure4. Structure générale du noyau des flavonoïdes(D'après **Heim et al.,2002**)

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

2.3. Les tanins

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

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- Les tanins condensés connus sous le nom de proanthocyanidines
- Les tanins hydrolysables, esters des acides phénols et de glucose.

2.4. Les stilbènes

Ces composés sont en très petite quantité dans notre alimentation. Le plus connu d'entre eux est le resvératrol qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses (**El Gharras, 2009**).

2.5. Les lignanes

Ils sont constitués de deux unités de phénylpropane. Les lignanes entrent dans la composition de certaines graines, céréales, fruits et autres légumes, ils sont environ 1000 fois plus concentrés dans les graines de lins (**El Gharras, 2009**).

3. Effets biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques. Ils sont impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques et interviennent dans la qualité alimentaire (**Bahorun, 1997**).

Les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins et les lignanes sont majoritairement présents dans les feuilles, les fleurs et l'écorce de bois. Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections. La couleur des fruits, des fleurs et des feuilles est une des caractéristiques d'une sous-classe des flavonoïdes (**El Gharras, 2009**).

Du point de vue santé humaine (figure 3), ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (**Babar et al., 2007**), anti-allergènes, vasodilatateurs (**Falleh, 2008**) et antioxydants (**Gomez-Caravaca et al., 2006**).

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique (**Crozier et al., 2010**). De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires. Ils agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères (**Manach et al., 2004**). Ils sont regroupés dans la catégorie de veinotoniques et des vasculo-protecteurs (**Ghosh et al., 2009**).

Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il y a un rapport inverse entre la prise d'aliments riches en polyphénols (les fruits et les légumes) et le risque des maladies liées à l'âge comme les maladies neurodégénératives (**Hu, 2003; Bubonja-Sonjeet et al., 2011**). Cette relation est souvent attribuée aux puissantes activités antioxydantes des flavonoïdes

et d'autres polyphénols associées à leurs propriétés redox permettant d'éliminer les effets d'espèces réactives de l'oxygène (**Ketsawatsakulet al.,2000**).

Comme les flavonoïdes les acides phénoliques sont de puissants antioxydants, ils exercent leur effet par capture de ROS et des espèces réactives dérivées de l'azote (**Morton et al.,2000**).

In vitro, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire, c'est ainsi que la myricétine et la quercétine bloquent l'action des cyclo-oxygénase et lipoxygénase à des concentrations relativement élevées. À faibles concentrations, c'est la lipoxygénase qui est inhibée préférentiellement. Certains travaux suggèrent qu'ils posséderaient une bonne activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables de type ulcérogène. L'hespéridine, administrée par voie sous-cutanée (car inactive per os), présente une activité anti-inflammatoire significative chez le rat dont l'œdème a été induit aussi bien par la carraghénine que par le dextran(**Ghedira, 2005**).

Les polyphénols sont des composés principaux antimicrobiens des plantes, ayant des modes d'action diverses et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'une grande catégorie de microorganismes procaryotes et eucaryotes (bactéries et champignons) (**Cowan, 1999**). Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (**Ulanowska et al.,2007**). Aussi il y a un grand intérêt dans l'utilisation des flavonoïdes des plantes pour traiter des maladies humaines et surtout pour contrôler les virus d'immunodéficience qui constituent l'agent causal de SIDA(**Harborne et Williams, 2000**).

Comme les autres types de polyphénols, les tannins sont aussi répandus pour leurs nombreuses activités thérapeutiques notamment ; anti-infectieuses (**Latte et Kolodziej, 2001; Leitao et al.,2005**).

Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Bruneton, 2009**).

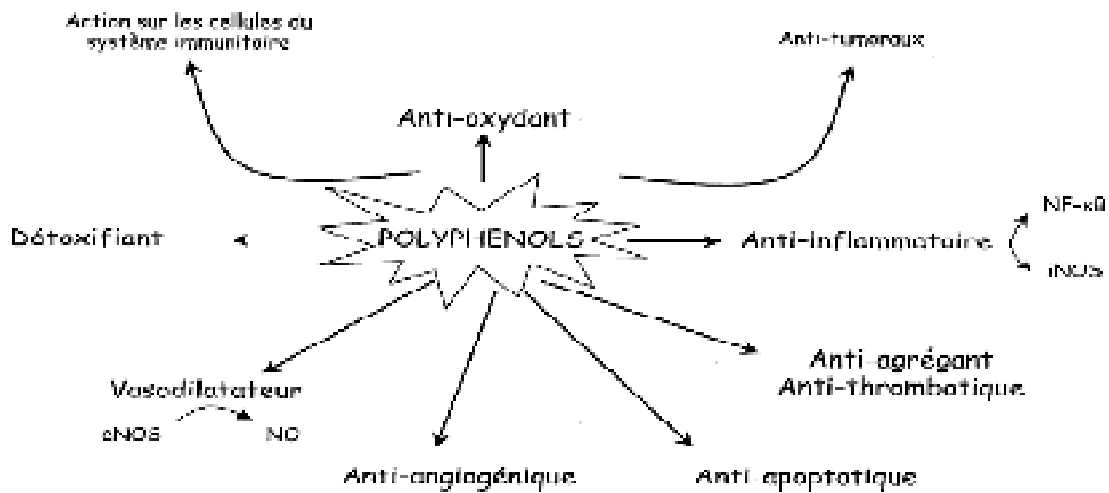


Figure 5. Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

4. Activitéantioxydante

Les radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, **R. Gerschman** puis **D. Hartman** évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et le radical libre pour expliquer le processus du vieillissement. En 1969, les Américains **McCord** et **Fridovich** isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

4.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommagesoxydatifs (**Boyd et al.,2003**).

4.2. Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (**Jacques et André, 2004**), cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre(**Martinez-Cayuella, 1995**).

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO^-$) (Gutteridge,1993; Jacques et André., 2004).

La figure.4résume l'origine des différentes espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.

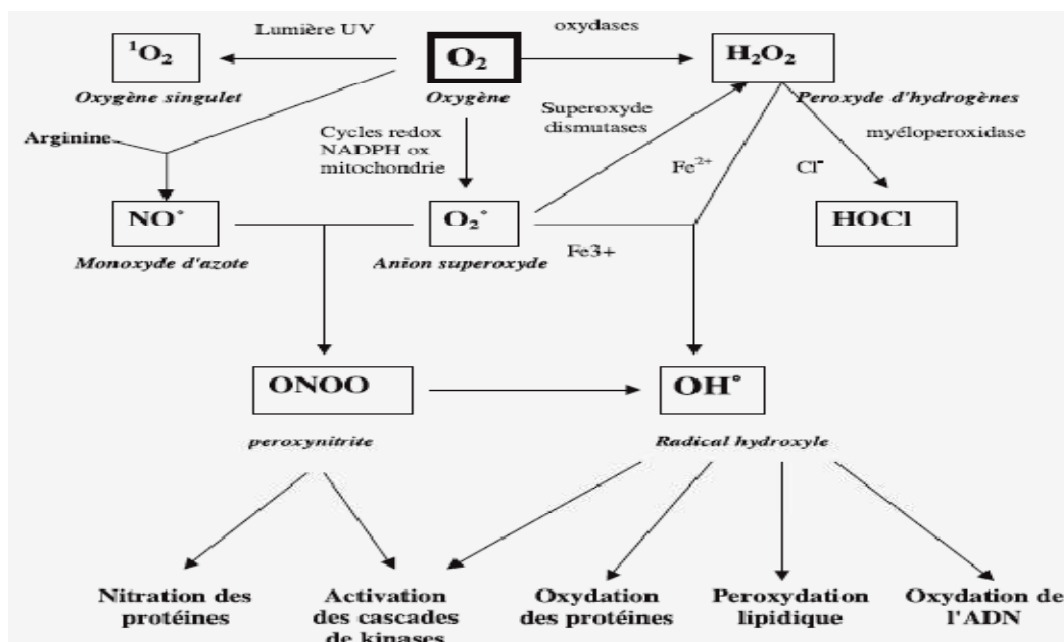


Figure6.Origine des différentes espèces réactives de l'oxygène impliquées en biologie(Favier, 2003).

4.3. Conséquences du stress oxydant

Les radicaux libres sont responsables de dommages sur toutes les molécules biologiques comme les lipides, les protéines, les acides nucléiques, ou les hydrates de carbone (Favier, 2003).

- ✚ Au niveau de l'ADN, les radicaux libres peuvent induire des effets oxydatifs et mutagènes ou un arrêt des réplifications. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins (Shimizu, 2004).
- ✚ Les lipides sont une cible privilégiée des radicaux libres. Ceux-ci provoquent en effet l'oxydation des acides gras poly-insaturés (AGPI) des phospholipides

membranaires (principaux constituants des membranes des cellules), mais aussi des organites cellulaires et des noyaux. Ce phénomène est appelé peroxydation lipidique ou lipopéroxydation aboutissant à la formation de LDL oxydées qui sont captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (**Favier, 2003**).

- Les radicaux libres peuvent aussi agir sur les macromolécules en provoquant des inactivations enzymatiques, des fragmentations de ces molécules (collagène, protéoglycannes, acide hyaluronique) et la formation de dimères ou d'agrégats protéïniques dans les membranes cytoplasmiques (**Shimizu, 2004**).

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes.

Le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies (figure 5): cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**).

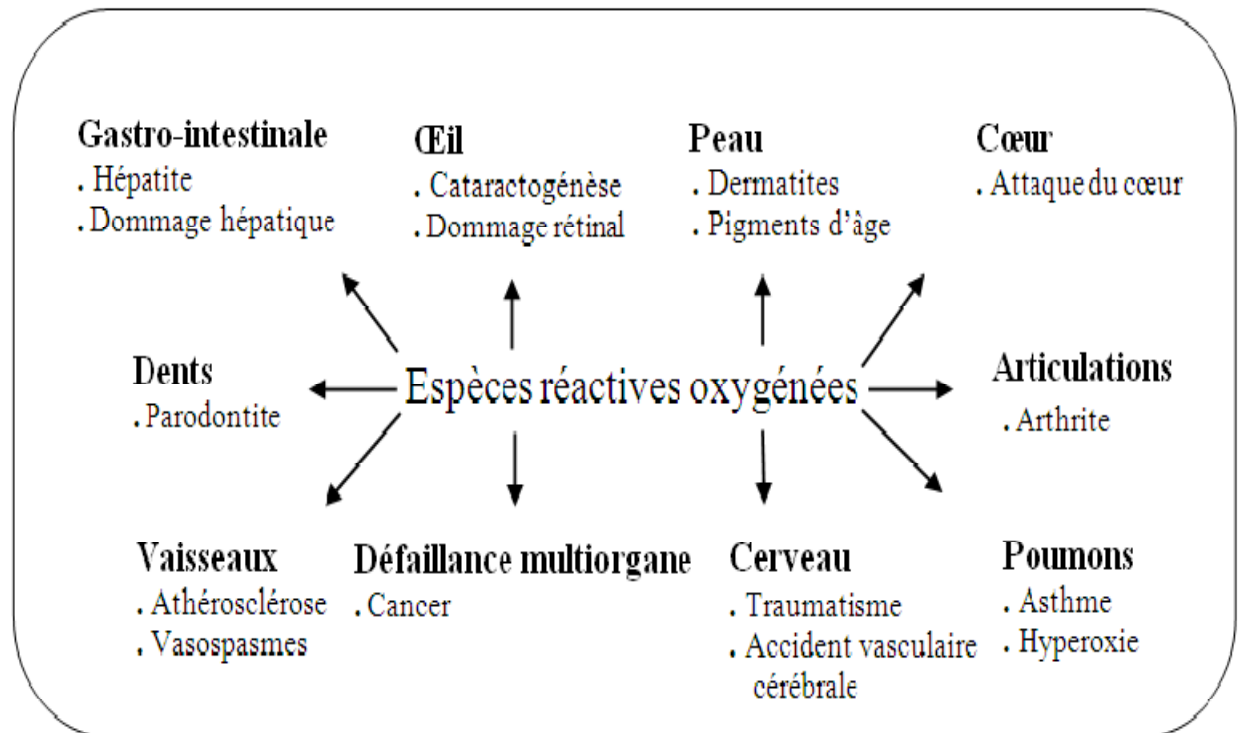


Figure 7. Pathologies associées aux espèces réactives oxygénées (Lee et al.,2004)

4.4. Antioxydants

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. Un antioxydant est défini comme toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Shimizu, 2004). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (Tang et Halliwell, 2010).

Les défenses antioxydants de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques et antioxydants d'origine végétale

4.4.1. Les antioxydants enzymatiques

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxydedismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx)(Avissaret al.,1989). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Marfak, 2003).

4.4.2. Les antioxydant non enzymatiques

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes de faible poids moléculaire qui peuvent être soit des produit de synthèse (glutathion) ou issus du métabolisme cellulaire (acide urique) (**Kohen et Nyska, 2002**). Des protéines tel que la ferritine, la ceruloplasmine et l'albumine contribuent à leur tour dans la défense antioxydante secondaire en chélatant les métaux de transition permettant ainsi de prévenir la formation du radical hydroxyle via la réaction de fenton (**Martinez-Cayuela, 1995**).

4.4.3. Les antioxydants d'origine végétale

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire et pour la santé humaine sont : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols. (**Bouhadjra, 2011**)

Les antioxydants naturels sont étudiés dans le but de trouver de nouvelles structures modèles pour le développement des médicaments thérapeutiques ou protecteurs.

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercétine les flavonoïdes. Lescaroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxyles $\text{RO}_2\cdot$. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydationlipidique, mais d'une manière moins efficace que celle de l' α -tocophérol. En outre, lescaroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygènesingulet $^1\text{O}_2$, ce qui leur permetd'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de lalumière solaire (**Gardès-Albert et al.,2003**).

5. L'activité anti-inflammatoire

5.1. L'inflammation

L'inflammation est un ensemble de phénomènes réactionnels se produisant au point irritépar un agent pathogène. Elle se traduit ordinairement par quatre symptômes cardinaux:chaleur, douleur, rougeur et tuméfaction (**Barton, 2008**).

Selon le même auteur, la réponse inflammatoire se déroule en quatre étapes: la reconnaissance des signaux de danger, le recrutement de cellules sur le site d'infection, l'élimination du pathogène et la résolution de l'inflammation conduisant à un retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé.

5.2. Evolution de l'inflammation

D'après **Charles et al.,2010**, l'inflammation peut évoluer selon deux modes

- **L'inflammation aigue**

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante

- **L'inflammation chronique**

Elle est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causé par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise.

Ce processus de défense de l'organisme peut parfois évoluer de façon anormale et déclencher des maladies auxquelles on oppose des médicaments anti-inflammatoires pouvant être conventionnels ou des anti-inflammatoires d'origine végétale (**Diallo, 2005**).

5.2. Les anti-inflammatoires

5.2.1. Les anti-inflammatoires conventionnels

Les anti-inflammatoires sont nombreux et appartiennent à des familles de médicaments différents puisqu'on y trouve des analgésiques, des corticoïdes, des antihistaminiques (**Yvan, 1997**).

- ❖ **Anti-inflammatoire non stéroïdiens(AINS)**

Ils forment un groupe hétérogène de médicaments qui agissent sur les conséquences de la réaction inflammatoire quelle que soit son origine (**Yvan, 1997**)

Les AINS sont mieux définis comme étant la classe médicamenteuse qui possède les mêmes propriétés pharmacologiques que l'acide acétyle salicylique (Aspirine®) :analgésique, antipyrétique, anti-inflammatoire

Solen les travaux de **Vane(1971)**,le mode d'action commun de tous les AINS est la diminution de la production de prostaglandines du fait de l'inhibition de la cyclo-oxygénase COX. Les prostaglandines sont directement impliquées dans l'inflammation, la douleur et l'hyperthermie.

Cependant, l'usage des AINS est associé à de nombreux effets indésirables tels que : diminution de la protection de la muqueuse gastro-intestinale (responsable d'ulcères gastro-duodénaux) et diminution de l'agrégabilité plaquettaire (responsable d'une augmentation du risque hémorragique)(**Bidaut-Russell, 2001**).

❖ **Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïde constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, (**Barnes, 1998**).

Les corticoïdes agissent sur de nombreux métabolismes et fonctions de l'organisme.

Ils augmentent la production de la lipocortine, inhibant ainsi la phospholipase A2 donc la libération de l'acide arachidonique. Par contre ils diminuent fortement la migration des polynucléaires, monocytes-macrophages vers le site de l'inflammation et la production d'autres médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, les cytokines, les ions superoxydes(**Diallo, 2005**).

Mais l'usage des AIS comme les AINS est associé à de nombreux effets indésirables.

La plupart des effets indésirables des corticoïdes sont inhérents à leurs propriétés pharmacologiques. Leur fréquence et leur gravité dépendent de la posologie quotidienne et/ou de la durée du traitement, mais aussi de la susceptibilité individuelle et du terrain physiopathologique du malade (**Cofer, 2010**)

5.2.2. Les Anti-inflammatoires d'origine végétale

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques telle que les polyphénols stérols, alcaloïdes, saponines, coumarines, terpènes et polysaccharides...etcont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes(**Duwiejua et Zeitlin, 1993**).

6. L'activité antimicrobienne

Dès sa naissance l'Homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes: les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (**Kaufmann, 1997**).

Le terme antimicrobien désigne les différents agents et substances qui tuent (microbicide), ou arrêtent (microbiostatique) la croissance des microorganismes, telles les bactéries (activité antibactérienne), les mycètes ou les champignons (activité antimycosique ou antifongique), les virus (activité antivirale) et les parasites (activité antiparasitaire). **(Frobisher et Fuerst, 1976; Prescott et al.,2003).**

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes **(Billing et Sherman, 1998).**

6.1. Les principales substances antimicrobiennes

6.1.1. Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques **(Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995).**

La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments **(Billing et Sherman, 1998).**

6.1.2. Activité antimicrobienne des substances d'origine végétales

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduits à chercher de nouveau agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien accepté par l'organisme d'autre part sans exercer des effets

délétères sue la santé humaine**(García-Ruiz et al.,2008 ; Kempf et Zeitouni., 2009).**

Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fenel (*Foeniculumvulgare*), peppermint (*Menthapiperita*), thyme (*Thymus vulgaris*), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre lesbactéries mai aussi contre les champignons, les levures et les virus (**Jürgen et al .,2009**) D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industries pharmaceutique, lamédecine alternative, et la thérapie naturelle (**Huang et al.,2008**).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis- à -vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**).

Notre étude expérimentale s'est étalée sur une période de 4 mois de février à mai 2015 au niveau des laboratoires suivants :

- ❖ Laboratoire de recherche des plantes aromatiques et médicinales au Département de Biotechnologie, Faculté SNV, Université de Blida1, pour L'extraction et le dosage des principes actifs, l'étude phytochimiques de la plante et l'analyse chromatographique par HPLC.
- ❖ Laboratoire de bactériologie de l'hôpital Hassiba Benboulaïde de Blida, pour l'étude de l'activité antimicrobienne des composés phénoliques.
- ❖ Laboratoire de pharmacie galénique au Département de pharmacie, Université de Blida1, pour l'étude de l'activité antioxydante.
- ❖ Laboratoire pharmaco-toxicologique du centre de recherche et développement C.R.D groupe SAIDAL (El-Mohammadia, Alger) pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire.

1. Matériel

1.1. Matériels végétal

Notre étude a été réalisée sur les feuilles de *Vitisvinifera*, récoltées en décembre 2014 à la matinée d'une journée partiellement ensoleillée, au niveau de la commune de Bourkika, Wilaya de Tipaza.

1.2. Matériel animal

Nous avons utilisé 24 souris, qui nous ont été fournies par l'institut Pasteur d'El kouba
Les caractéristiques des souris sont les suivantes:

- Genre : *Mus*
- Race : albinos
- Souche : NMRI
- Sexe : male et femelle
- Poids : 17-24g

1.3. Les souches bactériennes

L'activité antibactérienne a été évaluée sur 4 souches bactériennes (Tableau II) de référence ATCC (American Type Culture Collection).

Tableau II. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.

| Souches | Famille | Gram | Références |
|-------------------------------|--------------------|---------|------------|
| <i>Escherichia coli</i> | Enterobacteriacées | Négatif | ATCC 25922 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Enterococcacées | Positif | ATCC 25212 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Staphylococcacées | Positif | ATCC6538 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Pseudomonadacées | Négatif | ATCC 27853 |

2. Méthodes

2.1. Séchage et broyage

Les feuilles de *Vitis vinifera* ont été séchées durant vingt jours à température ambiante dans un endroit sec et à l'abri de la lumière pour mieux conserver les molécules sensibles à la chaleur et à la lumière.

Après séchage, les feuilles ont été broyées à l'aide d'un mixeur jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette dernière est stockée dans un flacon en verre ombrés bien fermé et conservée jusqu'à utilisation.

2.2. L'extraction

☞ Polyphénols totaux

L'extraction des polyphénols totaux a été effectuée selon le protocole d'Owenet Johns (1999).

Protocole expérimental (Figure 6)

L'extraction se fait par l'agitation de 5g de la poudre des feuilles dans 100 ml d'éthanol 70° pendant 24h à l'aide d'un agitateur.

Par la suite la solution est filtrée sur papier Wattman. Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite à 60° C au rotavapour. L'extrait sec obtenu est récupéré par 5 ml de méthanol et conservé à 4°C

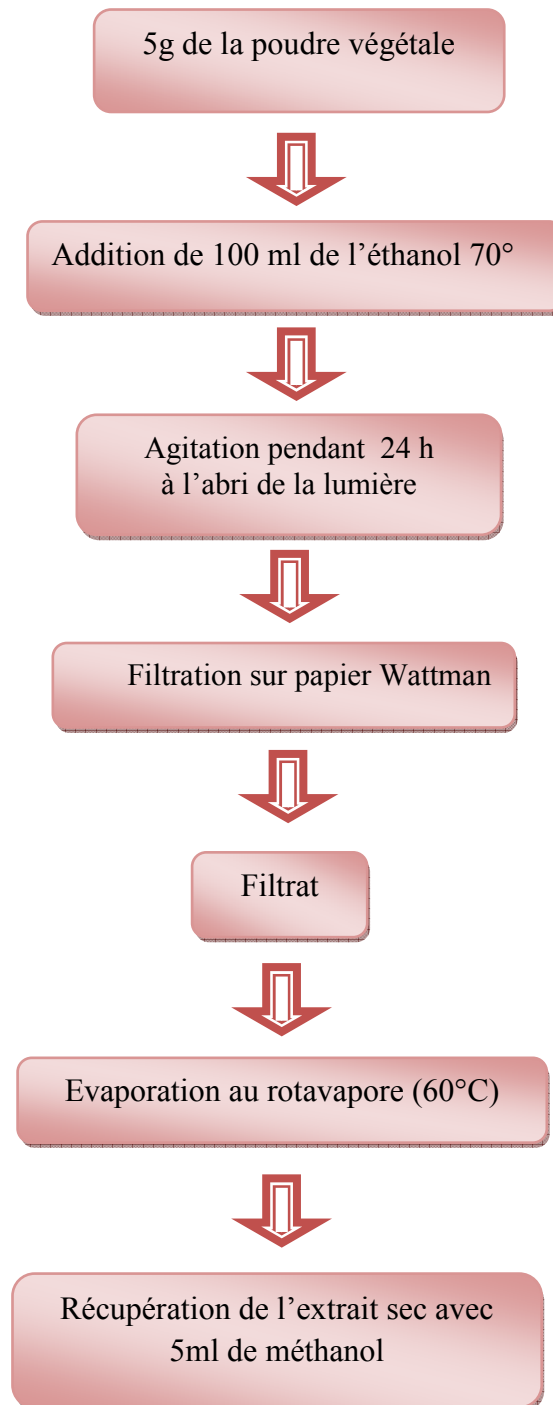


Figure 8. Protocole d'extraction des polyphénols totaux (Owen et Johns, 1999)

☞ **flavonoïdes**

L'extraction effectuée selon la méthode de **Lebron(1993)**.

Protocole expérimental (Figure7)

A 3g de la poudre des feuilles, ajouter 240ml de HCL (2N). Le mélange est mis au bain marie pendant 40min avec insufflation chaque 10min. Filtrez la solution sur papier Wattman. En suit verser le filtrat dans une ampoule à décanter etrajouter 50ml de diéthyl éther. Dégazifier le mélange et laisser décanter pendant 30min. Après la décantation, deux phases se forment : une épiphaseéthérée et une hypophase acide. Récupérer l'épiphaseéthérée et répéter l'opération 3 fois. Evaporer épiphase éthérée à l'air libre.

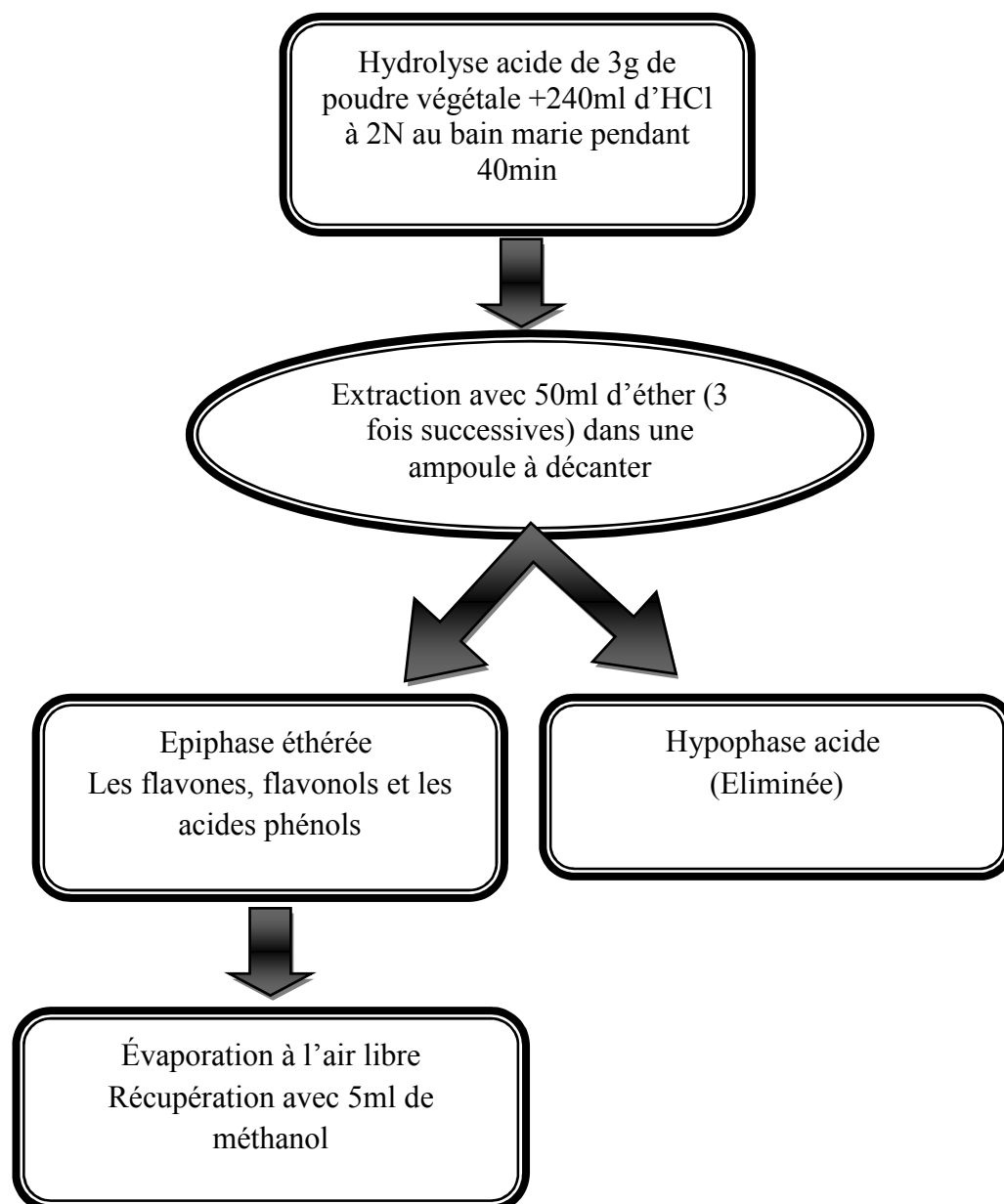


Figure 9. Protocole d'extraction des flavonoïdes, selon **Lebreton (1993)**

2.3. Détermination du rendement

C'est la quantité des composés ou substances pouvant être extraite par un solvant typique dans des conditions spécifiques (**Diallo., 2005**).

Le rendement (**R%**) est déterminé par la formule suivante :

$$R = (P - P_0 / P_T) \times 100$$

Avec :

P : poids en gramme du ballon avec l'extrait sec.

P₀ : poids en gramme du ballon vide.

P_T : poids en gramme de la poudre végétale utilisée.

2.3. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**)

✓ Principe

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie UV visible, selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénolique oxydés (**Boizot et Charpentier, 2006**).

✓ Mode opératoire

- A 100 µl d'extrait ajouter 200 µl de la solution de Folin-Ciocalteu et 3.16 ml de H₂O. le mélange est incubé à température ambiante pendant 3 min. Par la suite 600 µl de la solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) anhydre 10% sont ajoutés au mélange.
- Après 2h d'incubation à la température ambiante, l'absorbance est lue à 760 nm contre un blanc sans extrait.
- Le taux des polyphénols totaux a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$), établie avec des concentrations précises d'acide gallique 50 mg/ml, 150mg/ml et 250mg/ml, comme standard de référence (Figure 12, Annexe 1)

- Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de l'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g MS).

2.4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué selon la méthode décrite par **Marinova et al. (2005)**.

❖ Principe

Le principe de la méthode colorimétrique du Chlorure d'Aluminium est que le Chlorure d'Aluminium forme des complexes acides stables avec le groupe cétonique C-4 et avec le groupe d'hydroxyle de carbone C-3 ou C-5 de flavones et de flavonols (figure 8). En outre, le Chlorure d'Aluminium forme des complexes acides labiles avec les groupes orthodihydroxyl dans le cycle A ou B de flavonoïdes (**Chang et al., 2002**)

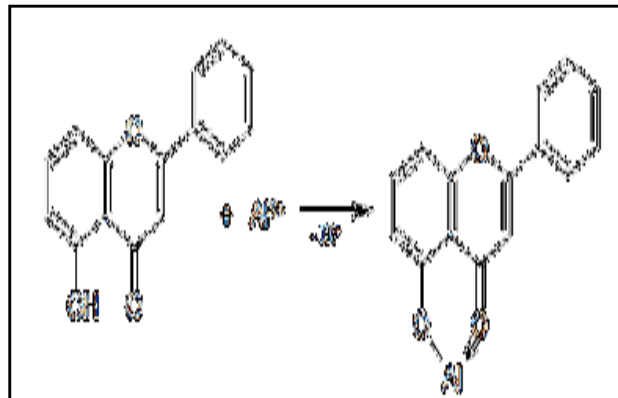


Figure 10. Principe de la réaction entre les flavonoïdes et l'AlCl₃ (**Lagnika, 2005**).

Mode opératoire

- 1 ml de l'échantillon est ajouté à 1ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol), le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm.
- Une courbe d'étalonnage ($y = a x + b$) est établie par des concentrations de la quercitrine (50, 100, 150, 200, 250mg/ml) et réalisée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons. Elle servira à la quantification des flavonoïdes (Figure 13, Annexe 1).
- La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercitrine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g MS).

2.5. Screening phytochimique :

Le Screening phytochimique a été effectué selon la méthode décrite par (**Harlay et al., 2004 ; Paris et Moys., 1976 ; et Branger, 2003 – 2004**)

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé.

Le but de ces tests est de connaître la composition en métabolites secondaires (anthocyanes, leuco-anthocyanes, tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, saponosides, glucosides, coumarines, quinones), ils sont effectués soit sur la poudre, soit sur un infusé (**Bouyer, 1996**).

➤ **Alcaloïdes**

A 1g de poudre végétal ajouter 10ml d'acide sulfurique (10%) et agiter énergiquement pendant 2mn. Après filtration, ajouter au filtrat, le réactif de Dragendorff (quelques gouttes). L'appariation d'un précipité rouge orangé indique la présence des alcaloïdes.

➤ **Composé phénolique :**

Dans un erlenmeyer, introduire 5g de poudre végétal dans 50ml d'eau distillée bouillante. Fermer avec un verre de montre et laisser infuser pendant 15 minutes puis filtrer sur papier filtre et rincer le résidu avec un peu d'eau distillée chaude, de manière à obtenir 100ml de l'infusé.

✚ **Flavonoïdes :**

Introduire dans un tube à essai 5ml de l'infusé, et ajouter 5ml de HCl et un petit fragment de tournure de Mg^+ plus 1 ml d'éthanol. L'appariation d'une couleur rouge orangée indique la présence des flavonoïdes.

✚ **Tanins :**

Introduire dans un tube à essai 5ml de l'infusé, et ajouter goutte à goutte environ 10 ml de solution aqueuse de $FeCl_3$ à 5%.

L'appariation d'une couleur verdâtre indique la présence des tanins catéchiques ou bleu noirâtre pour les tanins galliques.

➤ **Glucosides :**

2gouttes d'acide sulfurique concentré sur une masse de la poudre végétal.L'appariation d'une couleur rouge brique, puis violet indique la présence des glucosides

➤ **Mucilage :**

Introduire dans un tube à essai 1ml de l'infusé, et ajouter 5ml d'éthanol.L'appariation d'un précipité floconneux indique la présence de mucilage.

2.6.Analyse chromatographique par HPLC

Les extraits ont été filtrés avant injection. L'analyse a été effectuée par un appareil HPLC de type Agilent 1260, munie d'un détecteur à barrette de diodes (DAD: Diode ArrayDetectors). La colonne utilisée est une colonne en gel de silice de type C18 (250mm, 4.6mm, 5 μ m). La phase mobile consiste en deux phases : solvant A: 0.2% Acide acétique, solvant B: Acétonitrile. Lescomposés phénoliques ont été élués à un volume de 5 μ l avec un débit de 1ml/min à une température de 22 \pm 0.8°C.La durée de l'éluionest de 30 minutes avec A : 95% et 5% du solvant B. trois longueur d'ondes ont été choisies : λ = 270nm, λ = 320nm et λ = 370nm.

Des standards ont été injectés dans les mêmes conditions expérimentales. Ils permettent l'identification des pics des composés phénoliques en comparant les temps de rétention.

2.7. Activité antimicrobienne :

La recherche de l'activité antibactérienne des extraits consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis à l'action des extraits de plantes. Pour cela, la méthode utilisée pour la détermination de l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles de *Vitisvinifera* est celle de diffusion en milieu solide (antibiogramme) selon le protocole décrit par **DashetMurthy(2011)**.

✓ **Principe**

Cette méthode consiste à utiliser des disques de papier buvard imprégné de la substance à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension du germe étudié. Après 18 heures d'incubation, il s'établit un gradient de concentration de la substance testée, l'interaction entre la souche et la substance testée s'exprime par une zone dite la zone d'inhibition (**Amhis et al., 2001**).Plus le diamètre de

cette zone d'inhibition est grand plus la souche est sensible à la substance testée. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (**Fauchere, 1997**).

✓ **Mode opératoire**

Cette technique s'effectue dans des conditions aseptiques, devant un bec bunsen pour éviter la contamination des milieux ou du matériel.

▪ **Préparation des dilutions des extraits**

Nous avons préparé des dilutions à différentes concentrations des extraits des polyphénols et des flavonoïdes (**Tableau III**).

Tableau III: Concentrations testées dans le test antimicrobien

| | | | | |
|--|---------|----------|------------|-------------|
| Les concentrations en Polyphénols(mg/ml) | P1 = 82 | P1/2 =41 | P1/4 =20.5 | P1/8 =10.25 |
| Les concentrations En Flavonoïdes(mg/ml) | F1 =54 | F1/2 =27 | F1/4 =13.5 | F1/8 =6.75 |

▪ **Préparation du milieu de culture**

Le milieu de culture Mueller Hinton, spécifique pour les bactéries, est fondu au bain-marie et coulé aseptiquement dans les boîtes de Pétri stériles de manière uniforme, environ 4 mm d'épaisseur. Les boîtes de Pétri sont laissées sur la paillasse pour que le milieu se refroidisse et solidifie.

▪ **Préparation de l'inoculum**

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. Ensuite quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester sont raclées à l'aide d'une anse de platine. Par la suite, l'anse est déchargée dans 10 ml d'eau distillée stérile. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 McFarland.

▪ **Ensemencement et dépôt des disques**

Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne. Le faire tourner sur la paroi interne du tube, à fin de le décharger au maximum.

En suit frotter le sur la totalité de la surface gélosé, de haut en bas, en striés serrées. Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Laisser sécher les boîtes fermées pendant quelques minutes à température ambiante.

A l'aide d'une pince stérile, prélever les disques stériles (de 6mm de diamètre), imbibés avec les différents extraits en mettant seulement le bout de disque en contact avec ces derniers; celui-ci absorbe progressivement jusqu'à son imprégnation totale.

Déposer le disque sur la surface de la gélose, appuyer doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.

Préparer en parallèle des boîtes témoins positif avec les disques d'antibiotiques(Amoxiciline) et témoin négatif avec les disques imprégnés en méthanol.

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures dans une étuve à 37°C.

✓ Expression des résultats

Les diamètres des zones d'inhibition (ZI) apparus sous formes de halos claires autour des disques (où il n'ya pas de développement des souches microbiennes) sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle graduée.

D'après **Chifundera et al. (1990)**,les intervalles de la zone d'inhibition sont interprétés comme suit :

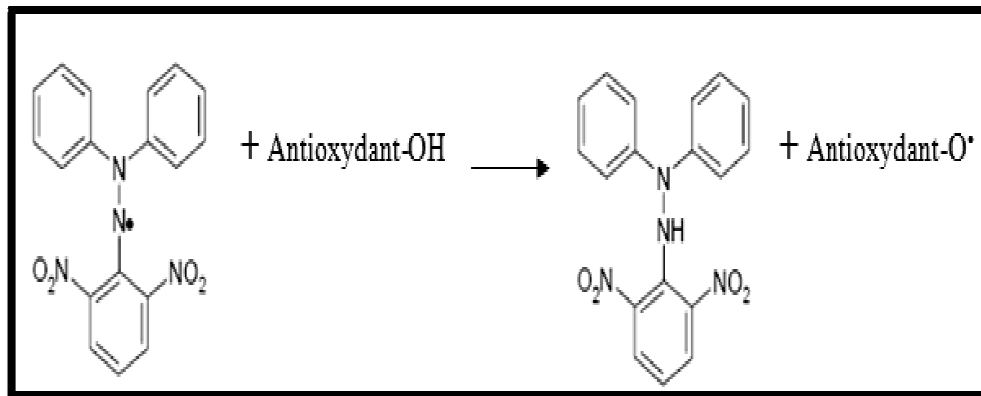
- ❖ 0 à 8 mm : pas d'inhibition ou souche résistante.
- ❖ 9 à 14 mm : souche peu sensible.
- ❖ 15 à 20mm: souche sensible ou intermédiaire.
- ❖ Plus 20 mm : souche très sensible.

2.8. Pouvoir antioxydant :

Pour évaluer l'activité antioxydante des polyphénols des feuilles de *Vitisvinifera*, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2.2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par **Benhammouet al. (2009)**.

✓ **Principe :**

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune(Figure10), le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons(Molyneux, 2004).



DPPH (violet) DPPH réduit (jaune)

Figure 11. Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH(Molyneux, 2004).

✓ **Préparation de la solution DPPH :**

Une solution de DPPH est préparée en ajoutant 100ml du méthanol à 4mg de poudre de DPPH, la solution obtenue est de couleur violette.

Les extraits, précédemment récupérés, servent de solution mère pour chaque extrait dont les concentrations sont de 82mg/ml pour les polyphénols totaux et 54mg/ml pour les flavonoïdes :

✓ **Préparation des dilutions**

5 dilutions ont été préparées pour chaque extrait. Nous avons prélevé 1ml de la solution mère (extrait) à laquelle nous avons rajouté 10ml de méthanol (Dilution1), de cette dernière, nous avons prélevé 1ml que nous avons dilué dans 10ml de méthanol (Dilution2) et ainsi de suite jusqu'à la cinquième dilution.

✓ **Mode opératoire**

Dans des tubes à essais, nous avons introduit 100µl de chaque dilution et 2 ml de la solution méthanolique de DPPH (4mg/100 ml). En parallèle, deux témoins sont préparés, un témoin négatif composé de 100µl de méthanol + 2ml de la solution de DPPH et un témoin positif,

composé de 3mg de poudre d'acide ascorbique dissous dans 1 ml de méthanol. A partir de cette solution, 4 dilutions sont préparées en prélevant à chaque fois 1ml de tube précédent. Les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

✓ Expression des résultats :

La concentration d'inhibition des radicaux libres (**I**) exprimé en pourcentage est calculée selon la formule suivante :

$$I \% = [(Abs\ c - Abs\ d) / Abs\ c] \times 100$$

Avec:

Abs c : Absorbance du contrôle

Abs d: Absorbance pour chaque dilution.

2.7. Activité anti-inflammatoire

La mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode de Levy, (Colot, 1972).

Principe

Le test est réalisé sur l'œdème de pattes postérieures gauches des souris, provoqué par l'injection de lacarraghénine. Cette injection provoque une réaction inflammatoire, qui peut être réduite par un produit anti-inflammatoire.

Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration de doses égales du produit anti-inflammatoire à tester et du produit de référence correspondant.

✓ Mode opératoire

Les souris sont réparties de manière aléatoire en quatre lots à raison de six souris par lot. La veille du test les souris sont mises à jeun.

☞ Au temps T₀

Nous avons administré aux 4 lots les suspensions suivantes (Figure 22, annexe 5)

- Lot T : chaque souris reçoit 0.5 ml d'eau distillée.

- Lot E₁ : chaque souris reçoit 0.5 ml du polyphénol, à une dose de 82mg/ml.
- Lot E₂ : chaque souris reçoit 0.5 ml de flavonoïdes, à une dose de 54mg/ml.
- Lot E₃ : chaque souris reçoit 0.5 ml du produit de référence Diclofenac 200mg.

☞ Au temps T₀+30 mn

Nous avons injecté un volume de 0.025 ml de la solution de carraghénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de chaque souris(Figure 23, annexe 5)

☞ Au temps T₀+4heures

Les animaux sont sacrifiés par rupture de la nuque. Les pattes postérieures sont coupées à hauteur de l'articulation puis pesées avec une balance analytique.

✓ Expression des résultats

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire est exprimée par les pourcentages d'augmentation et de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins.

Les moyennes arithmétiques des poids de la patte gauche et de la patte droite sont calculées pour chaque lot.

- ✚ Le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% œdème) est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{d'œdème} = \frac{\text{Moyenne des poids de la patte gauche} - \text{moyenne des poids de la patte droite}}{\text{Moyenne des poids de la patte droite}} \times 100$$

- ✚ Le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \times 100$$

1. Rendement et dosage des polyphénols

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau IV. Rendements obtenus des différents extraits.

| Extrait | Rendement (%) |
|-------------|----------------------|
| Polyphénols | 41.800 ±0.324 |
| Flavonoïdes | 28.660 ±0.763 |

Au regard des résultats obtenus (Tableau IV), le rendement en polyphénols représente la valeur la plus élevée avec **41.8%±0.324**, alors que, les flavonoïdes donnent un rendement de **28.66% ±0.763**.

Les résultats du dosage spectrophotométriques des polyphénols et des flavonoïdes des feuilles de *Vitisvinifera* sont établis dans le tableau ci-dessous :

Tableau V. Concentrations des polyphénols totaux, des flavonoïdes obtenus par dosage spectrophotométrique

| Extrait | Polyphénols | Flavonoïdes |
|--------------------------------------|---------------|--------------|
| Concentrations (mg EAG /g MS) | 352.66 | 68.66 |

D'après le tableau V, la concentration en polyphénols totaux, dans l'extrait éthanoïque des feuilles de la vigne rouge, est de **352.66** mg EAG /g MS. La concentration en flavonoïdes enregistrée est égale à **68.66** mgEQ/ g de MS.

Discussion

Le rendement en polyphénols totaux obtenu à partir des feuilles de *Vitisvinifera* est de **41,8±0.324** %, ce pourcentage est nettement supérieur à celui obtenu par **Muller(2013)**, qui rapporte un rendement de **13%**. Cette différence pourrait être due à la technique d'extraction. En effet, **Majhenic et al., (2007)**, ont rapporté que l'extraction par solvant à température élevée permet d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs que lorsqu'ils sont obtenus à température ambiante.

Beaucoup de recherches montrent que l'éthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques (Xia et al., 2010; Sahreen et al., 2010; Bouzide et al., 2011).

Le rendement en flavonoïdes, obtenu à partir des feuilles de *Vitis vinifera* est de **28.66%±0.763**. Ce rendement est plus élevé que celui obtenu par Lehn (2010), pour la même partie de la plante et qui est de **4%**. Cette différence peut être due aux facteurs climatiques et environnementaux de la zone géographique (Ebrahimi et al., 2008).

La méthode d'extraction constitue un des facteurs influant le rendement en flavonoïdes. En effet, la macération de la poudre végétale dans le HCL (2N) permet de libérer ces composés de la vacuole cellulaire, lieu de leur stockage (Gomez, 2009).

D'une manière générale, le rendement en extrait sec varie d'une plante à une autre selon les paramètres de l'extraction tels que, la température, le solvant d'extraction, la taille des particules de la poudre végétales et le coefficient de diffusion du solvant.

Les concentrations des composés phénoliques dans nos extraits sont **352,66 mg EAG/g MS** pour les polyphénols et **68.66 mg EQ/ g de MS** pour les flavonoïdes. Par contre, Katalinic et al., (2009), signalent que la concentration en polyphénols totaux est de **3338.7 mg EAG/ g MS** et la concentration en flavonoïdes est de **1579.9 EC/ g MS**. Ces concentrations sont élevées par rapport à nos résultats.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la concentration en composés phénoliques. Des études dans le même sens ont montré que les facteurs géographiques, climatiques et génétiques, aussi le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Aganga et Mosase, 2001; Fiorucci, 2006).

2. Screening phytochimique

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur la poudre et l'extrait aqueux des feuilles de *Vitis vinifera* sont regroupés dans le **tableau VI**.

Tableau VI: Screening phytochimique des feuilles de *Vitisvinifera*

| Métabolites secondaires | | Résultat de teste |
|-------------------------|------------|-------------------|
| Alcaloïdes | | Absence |
| Flavonoïdes | | présence |
| Tanins | Catéchétiq | Présence |
| | Galliques | Absence |
| Glucosides | | Présence |
| Mucilage | | Présence |

Le tableauVI, montre que l'extrait aqueux et la poudre de feuilles de *Vitisvinifera*renferme des taninscatéchiqes, des flavonoïdes, des glucosides et dumucilage, avec absence des alcaloïdes et des tanins galliques.

Discussion

Ces résultats sont en accord avec ceuxde**Quelenis, (2008)**,qui mentionne que la vigne est une plante riche en sucre et en composés phénoliques tel que les acides phénolique, les stilébenes et les flavonoïdes. Egalement,**Ghediraetal. (2012)**,notent queles constituants chimiques principaux des feuilles de *Vitisvinifera*sont : les anthocyanosides (O-glucosides)et lesglucosides.Cependant, les mêmes auteurs indiquent la présence des tanins galliques, alors que nos résultatsmontrent leur absence et la présence des tanins catéchiqes.

Les flavonoïdes jouent des rôles très importants dans les plantes. Ils les protègent contre le stress hydrique et génèrent une tolérance des plantes aux métaux lourds présents dans les sols. Hors la plante, les flavonoïdes possèdent plusieurs effets pharmacologiques. Ils sont les promoteurs dans les traitements des troubles veineux et capillaires et les agents responsables de la protection vasculaire (**vierling, 2008**).Les flavonoïdes protègent les aliments d'origine végétale de l'oxydation, ce sont des antioxydants réputés pour leur action anti radicalaire (**Benhayoun et al., 2007**).

Selon **Iserin (2001)**, les tanins permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a

pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation des lipides (Cavin, 1999).

3. Analyses chromatographiques par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

Les résultats de l'identification chromatographique des extraits phénoliques des feuilles de *Vitis vinifera*, en fonction des temps de rétention, sont donnés dans le tableau VII. et tableaux X, XI et les figures 14, 15 (Annexe 2)

Nous avons pu recenser 65 composés pour $\lambda=270\text{nm}$, 50 composés pour $\lambda=320\text{nm}$ et 35 composés pour $\lambda=370\text{nm}$ dans les polyphénols totaux. Concernant les flavonoïdes nous avons identifié 12 composants pour $\lambda=270\text{nm}$, 6 composants pour $\lambda=320\text{nm}$ et $\lambda=370\text{nm}$ (Annexe 2).

Nous avons constatés la richesse de cette plante en composés phénoliques.

En comparant les temps de rétention des molécules à ceux des standards (tableau XII, Annexe 2), nous avons pu identifier 4 molécules pour les polyphénols totaux et 1 pour les flavonoïdes (tableau VII).

Tableau VII. Principaux composés contenus dans les polyphénols totaux et dans les flavonoïdes des feuilles de la vigne rouge en fonction du temps de rétention

| Polyphénols totaux | | | Flavonoïdes | | |
|--------------------|--------------------------|------------|----------------|--------------------------|------------|
| composé | Temps de rétention (min) | Teneur (%) | Composé | Temps de rétention (min) | Teneur (%) |
| Non identifié | 0.346 | 26.6764% | non identifié | 0.915 | 46.8913% |
| Non identifié | 0.838 | 2.6340% | non identifié | 2.366 | 28.5813% |
| Acide tannique | 2.291 | 0.0389% | non identifié | 2.463 | 45.2530% |
| Acide gallique | 2.551 | 0.4734% | Acide gallique | 2.545 | 47.3553% |
| Non identifié | 6.335 | 1.9227% | non identifié | 4.963 | 6.3221% |
| Non identifié | 6.899 | 1.1090% | non identifié | 8.612 | 3.6677% |
| Catéchine | 7.278 | 0.1145% | | | |
| Non identifié | 7.664 | 7.1081% | | | |
| Non identifié | 9.140 | 1.2282% | | | |
| Non identifié | 9.514 | 1.5326% | | | |
| Non identifié | 10.101 | 21.6020% | | | |
| Vanilline | 10.333 | 31.9414% | | | |
| Non identifié | 10.597 | 1.0388% | | | |
| Non identifié | 10.838 | 2.1931% | | | |
| Non identifié | 11.094 | 2.6139% | | | |
| Non identifié | 11.262 | 1.2945% | | | |
| Non identifié | 13.458 | 2.9099% | | | |

Les résultats du tableau VII., montrent la présence au niveau des polyphénols totaux, de la vanilline (**31.9414%**) à 10.333min, l'acide gallique avec **0.4734%** à 2.551min, la catéchine (**0.1145%**) à 7.278 min et l'acide tannique (**0.0389%**) à 2.291min. Néanmoins, d'autres composés majoritaires qui n'ont pas pu être identifiés par manque de standards. En ce qui concerne les flavonoïdes, les résultats montrent la présence de l'acide gallique avec **47.3553%** à 2.545 min et cinq autres composés majoritaires non identifiés.

4. Etude de l'activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de *Vitisvinifera* sont regroupés dans le tableau VIII et les figures 16, 17, 18, 19 (Annexe 3).

Tableaux VII. Diamètres des zones d'inhibition (ZI mm) des polyphénols et Flavonoïdes des feuilles de *Vitisvinifera* et des témoins

| | | les souches bactériennes testées | | | | | | | | Les normes |
|--------------------|---------------------|----------------------------------|-----|-------------------|-----|---------------------|----|-----------------|-----|--------------------------------------|
| | | <i>E.coli</i> | | <i>E.faecalis</i> | | <i>P.aeruginosa</i> | | <i>S.aureus</i> | | |
| [C] (mg/ml) | | ZI(mm) | SG | ZI(mm) | SG | ZI (mm) | SG | ZI(mm) | SG | |
| polyphénols | P1 = 82 | 15±0.873 | ++ | 11.7±1.15 | + | 15.7±0.577 | ++ | 13±2.645 | + | *ZI ≤ 8 mm : Résistante |
| | P1/2 = 41 | 11±0.763 | + | 9.3±1.527 | + | 11±2.081 | + | 10.1±1.1 | + | |
| | P1/4 = 20.5 | 10.5±10 | + | / | - | 7.6±1.527 | - | 8.8±0.721 | - | |
| | P1/8 = 10.25 | 7.4±0.513 | - | / | - | / | - | / | - | |
| Flavonoïdes | F 1 = 54 | 16±0.95 | ++ | 12.2±0.785 | + | 12.9±0.854 | + | 15.06±1.792 | ++ | ZI = 8 à 14 mm : Sensibilité limitée |
| | F 1/2 = 27 | 13±0.763 | + | 10.8±0.721 | + | 9.4±0.513 | + | 13.4±0.503 | + | |
| | F1/4 = 13.5 | 9.4±1.969 | + | 8.3±1.125 | - | / | - | 9.7±1.101 | + | |
| | F1/8 = 6.75 | 7.5±0.503 | - | 7.5±0.45 | - | / | - | 7.93±1.429 | - | |
| Témoin | Amoxiciline 25mg/ml | 22.2±2.474 | +++ | 32.5±2.21 | +++ | / | - | 31.7±2.404 | +++ | *ZI ≥ 20 mm : Très sensible |
| | Témoin négatif | 7.7±0.282 | - | 7.75±1.06 | - | / | - | 7.95±0.07 | - | |

Les valeurs représentent la moyenne ± écart type (n=3), P : polyphénols, F : flavonoïdes, [C] : Concentrations, / : Pas d'effet, SG : Sensibilité du germe, (-) : Résistante; (+) : Sensibilité limitée, (++) : Sensibilité moyenne, (+++) : Très sensible.

D'après les résultats du tableau VII, nous remarquons que les deux extraits (polyphénols totaux et flavonoïdes) présentent, *in vitro*, une activité antibactérienne sur l'ensemble des bactéries testées avec des diamètres d'inhibition qui varient entre **7 et 16 mm**.

En observant ces résultats, nous constatons que pour les concentrations de **82mg/ml** et **41mg/ml** pour les polyphénols et **54mg/ml** et **27mg/ml** pour les flavonoïdes, l'activité antibactérienne sur les quatre souches bactériennes testées est remarquable avec des diamètres allant de **11 à 15mm**. Aussi pour les concentrations de **20.5mg/ml** en polyphénols et **13.5 mg/ml** pour les flavonoïdes les deux extraits de la plante sont actifs sur *Escherichia coli* (**ZI= 10.5** pour les polyphénols et **ZI=9.4** pour les flavonoïdes) et *Staphylococcus aureus* (**ZI= 8.8** pour les polyphénols et **ZI=9.7** pour les flavonoïdes).

Cependant, les extraits les moins concentrés à savoir **20.5mg/ml** et **10.25mg/ml** pour les polyphénols et **13.5mg/ml** et **6.75mg/ml** pour les flavonoïdes, semblent être inactifs sur les quatre souches avec des diamètres inférieurs à **8 mm**.

Nos extraits montrent une faible activité antibactérienne par rapport à celle de l'amoxicilline sur toutes les souches étudiées sauf pour *Pseudomonas aeruginosa* qui montre une résistance vis-à-vis de cet antibiotique (figure 18).

Le témoin négatif n'a exercé aucune activité inhibitrice donc le méthanol ne présente aucun effet sur les souches bactériennes.

On remarque aussi que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sont les plus sensibles à nos extraits par rapport à *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis*.

Discussion :

L'activité antibactérienne des polyphénols et des flavonoïdes extraits de *Vitis vinifera* sur les souches pathogènes montre des diamètres des zones d'inhibition variant entre **7-16 mm** pour *Escherichia coli* (figures 017), et de **7-15 mm** pour *Staphylococcus aureus* et pour *Pseudomonas aeruginosa*, (figures 16 et 18) et **7-12 mm** pour *Enterococcus faecalis* (figures 19).

La sensibilité d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, pourrait être expliquée par l'action antibactérienne des composés phénoliques.

Les travaux rapportés par **Mansouret al.(2013)**, mentionnent que l'extrait aqueux des feuilles de la vigne rouge est efficace contre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, et *Staphylococcus aureus*. De même, **Marfak. (2003)**, indiquent l'effet antibactérien des flavonoïdes.

Plusieurs études ont attribuées l'effet inhibiteur des extraits des plantes contre les bactéries pathogènes, à leur composition phénolique (**Baydar et al., 2004; Rodriguezvaquero et al., 2007**). Ces composés peuvent être utilisés comme agents antimicrobiens naturels (**Ksouri et al., 2009**).

Selon **Scalbert(1991)**, les composés phénoliques possèdent un effet inhibiteur sur les microorganismes par leur adsorption aux membranes cellulaires, par leur interaction avec les enzymes et les substrats, ou par la privation d'ions métalliques.

L'acide gallique et la catéchine ont été étroitement corrélés à l'inhibition de la peroxydation lipidique. En outre, la catéchine, la quercétine et l'acide gallique ont été décrits pour leurs propriétés antibactériennes, ils ont une activité plus marquée contre *E.coli*, *P.aeruginosa* et *S. aureus* (**Rodriguez vaquero et al, 2007**).

D'autres composés tels que l'acide vanillique possèdent également une activité antimicrobienne (**Singh et al, 2006**).

Cet effet pourrait être la résultante de différentes interactions synergiques entre les polyphénols (**Djeridane et al., 2006**).

D'après **Jones et al.(1994)** et **Karouet al. (2005)**, l'activité antibactérienne des flavonoïdes peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, l'inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration des substances nécessaires à la croissance des bactéries...etc. ou encore à une activité bactéricide et bactériostatique en perturbant les métabolismes énergétiques des bactéries.

5. L'activité antioxydante

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits de polyphénols totaux et des flavonoïdes des feuilles de *Vitisvinifera* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH sont illustrés dans la figure 10 et le tableau XIII (Annexe 04)

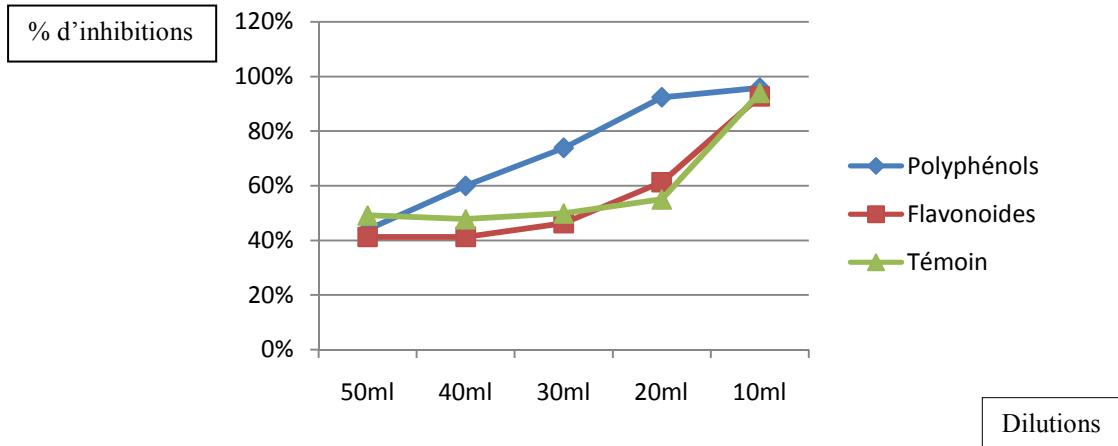


Figure 12. Pourcentage d'inhibition pour les polyphénols totaux et les flavonoïdes et l'acide ascorbique en fonction des différentes dilutions.

D'après ces résultats, nous remarquons que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration.

Les polyphénols totaux des feuilles de la vigne rouge ont montré une activité importante, avec un pouvoir d'inhibition de **95.85%**, en comparant avec l'acide ascorbique dont le pourcentage d'inhibition est de **93.89 %** pour la dilution de 10ml.

Les flavonoïdes ont montré un pouvoir élevé de piégeage du DPPH. Il est très proche à celui de l'acide ascorbique. Nous remarquons qu'à la dilution de 10ml le pourcentage d'inhibition est de **92.68 %** pour les flavonoïdes et **93,89%** pour l'acide ascorbique.

Les IC₅₀ calculés pour nos échantillons sont représentés dans le tableau suivant

Tableau IX : Les IC₅₀ l'acide ascorbique et les deux extraits testés

| Extrait | Acide ascorbique | polyphénols | flavonoïdes |
|--------------------------|------------------|-------------|-------------|
| IC ₅₀ (mg/ml) | 0,42 | 0,37 | 0,41 |

D'après les résultats du tableau IX, les polyphénols totaux montrent une activité antioxydante intéressante avec une IC_{50} de l'ordre **0,37 mg/ml**, par rapport à l'acide ascorbique qui a montré une IC_{50} de l'ordre **0,42 mg/ml** comparable à celle des flavonoïdes dont la IC_{50} est de l'ordre **0,41 mg/ml**. Donc, il semblerait que l'effet antioxydant de polyphénols totaux est plus important par rapport à l'acide ascorbique et les flavonoïdes.

Discussion

Nos résultats indiquent que les polyphénols totaux présentent une activité remarquable vis-à-vis du DPPH avec un pourcentage de **95.85%** pour une dilution de 10ml. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats de **Ech-chrif, (2013)**, obtenus à partir de l'extrait des polyphénols de la même partie de la vigne qui a montré une activité antioxydante élevée avec un pourcentage de **98.33%**.

De plus l'étude de **Fernandes et al. (2013)**, indique que les extraits en composés phénoliques des feuilles de *Vitis vinifera* réduisent les radicaux libres d'un maximum de **80%**.

Un bon pouvoir antioxydant a été enregistré pour les flavonoïdes (92.68 %), mais il reste moins important par rapport à celui obtenu avec l'extrait des polyphénols totaux (**95.85%**).

Les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (**Javanovic et al., 1994**). L'effet de piégeage des flavonoïdes est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend du point de vue thermodynamique capable de réduire les radicaux libres par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle (**Siddhuraju et Becker, 2007**).

Globalement, les résultats obtenus par piégeage du radical libre DPPH dans le présent travail révèlent que les polyphénols totaux et les flavonoïdes présentent un pouvoir d'inhibition très important, cela est probablement lié à la complexité des extraits en substances polyphénoliques y compris les tanins et les flavonoïdes et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

6. Activité anti-inflammatoire

Les résultats obtenus pour l'activité anti-inflammatoire sont représentés dans la figure 11 et le tableau XIV (Annexe 05).

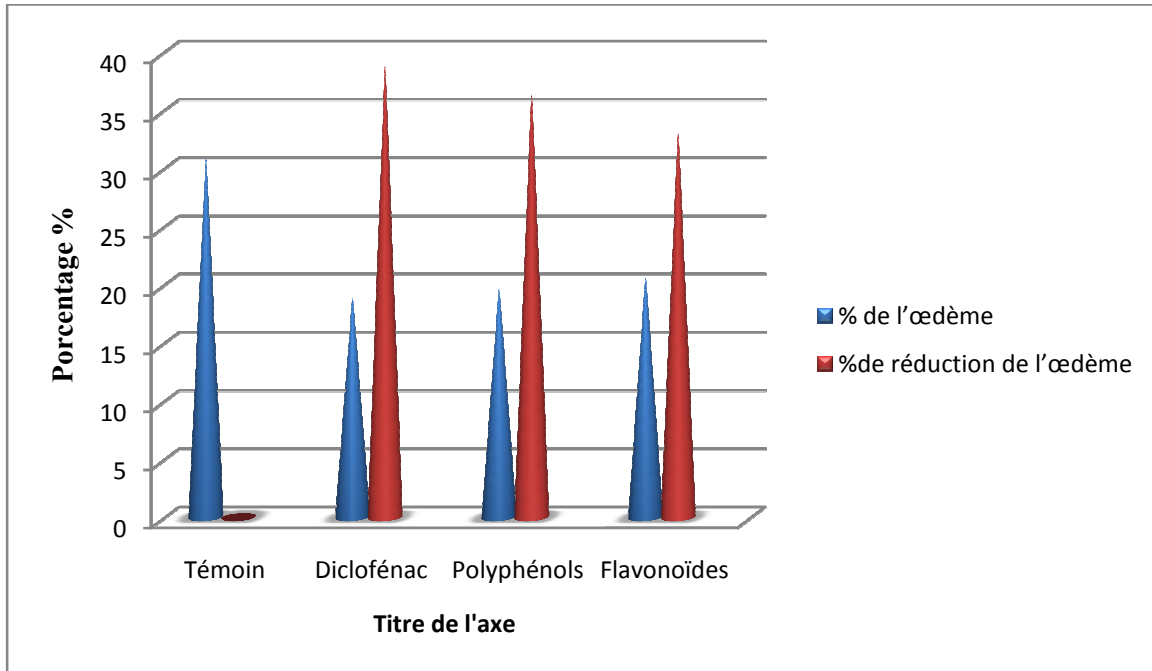


Figure 13. Pourcentage d'œdème et de réduction d'œdème pour les 4 lots traités

D'après la figure 11, nous remarquons que le lot traité avec de l'eau physiologique (témoin) est celui qui présente le pourcentage d'œdème le plus élevé (30.9%) en comparaison avec les 3 autres lots, 18,90% pour Diclofénac®, 19,65% pour les polyphénols et 20,68% pour les flavonoïdes.

Egalement, nos résultats montrent que les polyphénols totaux et les flavonoïdes administrés par voie orale, marquent une réduction significative de l'œdème des pattes gauches postérieures avec 36.40 % et 33.07% respectivement. Ces taux se rapprochent du taux du produit de référence (Diclofénac®). Ce dernier a induit une réduction de l'œdème de 38.83%.

Discussion

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Ech-*chrif* (2013), qui mentionne que les polyphénols totaux et les flavonoïdes des feuilles des *Vitis vinifera* possèdent un effet

anti-inflammatoire avec des pourcentages de réduction de l'œdème de **80,55 %** et **51,89%**, respectivement.

De même, les travaux **dekiesewetteret et al. (2000)**, ont démontré l'activité anti-inflammatoire des extraits de la vigne rouge.

En effet, des recherches ont montré que plusieurs métabolismes secondaires ont des propriétés anti-inflammatoires telle que la quercétine. Ce composé calme la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils inhibent l'enzyme responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est un déclencheur chimique de l'inflammation. La quercétine agit aussi sur les réactions inflammatoires allergiques (**Lahlah, 2008**).

Aussi **Nkhili (2009)**, mentionne que certains polyphénols sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes par l'action de la quercétine et la myricétine. A fortes doses ils inhibent la cyclo-oxygénase. Cependant à de faibles doses seule la lipoxigénase est affectée.

D'autre étude, affirment l'action inhibitrice des flavonoïdes, sur cyclo-oxygénase enzyme synthétique des molécules impliquées fortement dans la processus inflammatoire (**Gérotti, 2006**)

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Le présent travail a porté sur l'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes à partir des feuilles de *Vitis vinifera*, et l'étude phytochimique et analytique (quantitative et qualitative) ainsi que l'évaluation de quelques activités biologiques de ces extraits.

L'extraction solide-liquide a permis d'obtenir un rendement de **41.8%** pour les polyphénols totaux et de **28.66%** pour les flavonoïdes.

L'estimation quantitative de l'extrait phénolique des feuilles de *Vitis vinifera* a montré des concentrations de **352.66 mg EAG/g MS** pour les phénols totaux et de **68.66 mg EQ/g MS** pour les flavonoïdes.

Le screening phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins catéchiques, les glucosides et le mucilage au niveau des feuilles de la vigne rouge. Ces métabolites secondaires ont une grande valeur thérapeutique.

L'analyse chromatographique des extraits phénoliques par HPLC a révélé la présence de la vanilline (**31.9414%**), l'acide gallique avec **0.4734%**, la catéchine (**0.1145%**) et l'acide tannique (**0.0389%**) au niveau des polyphénols totaux, et la présence de l'acide gallique avec **47.3553%** dans les flavonoïdes.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH a montré que les extraits testés sont pourvus d'un pouvoir antioxydant élevé avec des pourcentages de réduction du DPPH de **95.85%** pour les polyphénols totaux et de **92.68%** pour les flavonoïdes, en comparaison avec produit de référence, l'acide ascorbique qui a montré une réduction de **93.89%**.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur milieu gélosé a montré une efficacité moyenne des extraits testés contre le développement des quatre souches bactériennes testées : *E.coli*, *P.aeruginosa* et *S.aureus*, *E.faecalis* avec des zones d'inhibition variant entre **7 et 16 mm**.

Nous avons également évalué l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des polyphénols totaux et des flavonoïdes par la méthode de l'œdème induit par l'injection de carraghénine, notre essai a montré que les deux extraits ont donné une inhibition de **57,75%** d'œdème pour polyphénols

totaux, et de **49,78%** pour flavonoïdes. Contre un pourcentage de réduction de l'œdème de **63,49%** Pour Diclofenac.

Ces résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur cette plante, à savoir :

La réalisation d'une étude phytochimique approfondie qui consiste à la purification, l'identification et la caractérisation des composés actifs ;

Faire une étude dans le domaine toxicologique afin de mettre à la disposition des populations une plante active avec des posologies précises.

L'évaluation d'autres activités pharmacologiques telles que les activités antiulcéreuse, antidiabétique, cicatrisante et antispasmodique

- Aganga A., Mosase K. (2001).** Tannins contents nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*. **91**:107.
- Amhis W., Benslimane A., Tiout D., Naim M. (2001).** Tests de sensibilité utiles au traitement antibiotique. *Médecine de Maghreb*. **91**: 022-025.
- Amira-Guebailia H. (2007).** Polyphénols des sarments et des rafles de la vigne (*Vitis vinifera L.*) et du vin, purification, dosage et activités biologiques. *Thèse Doctorat en Chimie*. Université badjimokhtar. Annaba, 123p
- Anonyme. (1989).** Guide variétal de la vigne. *Ed. ITAF*. Blida. 34p.
- Anonyme. (2010).** <http://www.viticulture-oenologie-formation.fr>
- APG III. (2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **161**. 105-121
- Avissar N., Whitin J.C., and Allen P.Z. (1989).** Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **2**: 15850-15855.
- Baba Aissa, F. (2011).** Encyclopédie des plantes utiles, *Éd Elmaarif*, 468p.
- Babar Ali, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2007).** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*. **12**: 607-621.
- Bahorun, T. (1997)** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural research council, Réduit, Mauritius. 83-94.
- Barnes P.J. (1998).** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clinical Science*, **94**, 557-572.
- Branger J. (2003 – 2004)** Etude des différentes techniques d'extraction, Cahier de charge- Maîtrise IUP GEPI.

Barton G.M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, **118**, 413-420.

Baydar N.G., Ozkan G., Yasar S. (2007). Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, **18**: 1131-1136.

Benhammou N., AtikBekkaraF.,PanovskaT.K.(2009). Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplexhalimus*. *C. R. Chimie* **12** :1259–1266.

Benhayoun B.A., Batista F., Auer J., Dipietromaria A., L'Hote D., De Baere E., Veitia R.A., (2007). Positive and negative feedback regulates the transcription factor FOXL2 in response to cell stress: evidence for a regulatory imbalance induced by disease-causing mutations. *Hum. Mol. Genet.* **18**: 632–644

Bergogne-Berezin E., Dellamonica P. (1995). Antibiothérapie en pratique clinique. *Ed Masson*, Paris, 486 p.

Berkan T., Ostunes I.,Iermiolu F et Ozer A. (1991). Anti-inflammatory analgesic and antipyretic effets of an aquous extract of neutre, planta medical, 375p.

Bidaut-Russell, (2001). Adverse gastrointestinal effects of NSAIDs: consequences and costs. Department of Health Sciences Research, *Mayo Clinic, Rochester, USA* **5(5)**:739-53

Billing J., Sherman P. W. (1998). Antimicrobial function of spices. *Q Rev Biol.* **73**: 3-49.

Biyiti L.F., Meko'oDJ.L.,Tamzcv., AmvamZollo P.H. (2004). Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, **13**:11-20.

Boizot N., Charpentier J P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 123p.

Bouhadjra K. (2011). Étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, thèse pour l'obtention du diplôme de magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

Bouzid W., Yahia M., Abdeddaim M., Aberkane M.C.,Ayachi A. (2011). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *L'AubepineMonogyne*. *Lebanese Science Journal*, **12(1)**, 59-69.

Bouyer J. (1996). Méthodes statistiques, médecine biologie, 139p.

Botineau M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. *Tec & Doc Lavoisier*, Paris, 1336p.

Boyd B., Ford C., Koepke M.C., Gary K., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. **4 (6):7**.

Bruneton J.(2009) .Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales *4eme Ed Tec et Doc Lavoisier*. Paris, 1288p.

Bubonja-Sonje M, Giacometti J et Abram M.(2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*,**127**, 1821-1827.

Cavin A. (1999). Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire : *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremiaemarginata* (Convolvulacées) et *Oropeaenneandra* (annonacées). *Thèse de Doctorat*, Lausanne, 241p.

Charles N, Serhan, Peter A, Ward and Derek W Gilroy.(2010).Fundamentals of Inflammation.*Cambridge University Press*, 437p.

Chang Q., Zuo Z., Harrison F., Chow M.S.S. (2000). HAWTHORN.*Journal of clinical pharmacology*, **42**: 605-612.

Chifundera K., Balagizi K., Kizungu B. (1990). Les empoisonnements et leurs antidotes en médecine traditionnelle au Bushi, Zaire. *Fitoterapia*.**65**: 307-313.

Cofer N. (2010). Prescriptions et surveillance des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. *Collège Français des Enseignants en Rhumatologie*. France 24p.

Colot M. (1972). Sidal.

Corbeau P. (2008).Coure, syndrome inflammatoire. *Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes*, 8p.

Cowan M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents.*Clin.Microbiol.Rev.***12**: 564-582.

Crozier A., Del Rio D., Clifford M.N. (2010).Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds.*Molecular Aspects of Medicine*, **31**: 446–467.

Dacosta, Y. (2003).Les phytonutriments bioactifs.*Ed Yves Dacosta*. Paris. 317 p.

Dash G. K., Murthy P.N. (2011). Antimicrobial activity of few selected medicinal plants, *International Research Journal of Pharmacy*, 2: 146-152.

Defraigne J et Pincemail C. (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liège*; **63**, 10-19.

Dehak k. (2013). cours : Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles, Polyphénols, *Université KASDI Merbah Ouargla*, 19p.

Diallo A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *syzygiumguineens* WILLD (*MYRTACEAE*). *Thèse Doctoral en pharmacie*. Université de Bamako, Mali. 80p.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97**: 654-660.

Drifa M., Sadat O. (2009). Effets de la position des bourgeons de cinq cépages autochtones sur la réussite des plants greffés sur le porte-greffe, *Thèse d'ingénieur en Agronomie Algérie*, 301p.

Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalihi M.H., Sonboli A., Yousefzadi M. (2008). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*, **110**: 927-931.

Ech-chrif M. (2013). Evaluation du pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire des feuilles de la vigne rouge (*Vitis vinifera* L.). *mémoire de Master*. Blida. 52p

El Gharras H. (2009). "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review." *International Journal of Food Science and Technology* **44**(12): 2512-2518.

En-Qin Xia., Gui-Fang Deng., Ya-Jun Guo et Hua-Bin Li. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes; *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 622-646.

Falle H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*. **331**: 372-379.

Fauchère J.L. (1997). **Bactériofiches** : Techniques en bactériologie clinique. : Clinique Ellipses, *édition marketing S.A.* Paris ? 65-66.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.* 108-115.

Fernandes F., Ramalhos E., Pires P., Verdial J., Valentão P., Andrade P., Bento A., Pereira J.A. (2013). *Vitis vinifera* leaf towards bioactivity. *Industrial Crops and Products.* Portugal? **43** :434– 440

Fiorucci S. (2006). Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. *Thèse de doctorat.* Nice, 211p.

Frankel S et Kanner A. (1993). Inhibitory of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *Ed Lancet.* 843p.

Frobisher M., Fuerst R. (1976). Microbiologie clinique. HRW(Ed). Paris, 507p.

Galet P. (1988). Précis de viticulture. *5ème Ed*, France.

Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martínez-Rodríguez A.J., Pueyo E., Martín-Alvarez P.J., and Moreno-Arribas M.V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control.* **19**: 835–841.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z et Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique.* 91-96.

Ghedira K., Goetz P., Le Jeune R (2012). *Vitis vinifera* var. *tintoria* L. : vigne rouge Ampelidaceae (Vitaceae) *Phytothérapie*, **10**:257–262.

Ghosh, D., Scheepens, A. (2009). Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53** : 322 – 331.

Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **41**: 1220-1234.

Gomez C. (2009). Études des mécanismes de stockage des anthocyanes dans la baie de raisin, caractérisation fonctionnelle des gènes impliqués ces mécanismes. *Thèse du docteur* du centre international d'études supérieures en sciences agronomiques. Montpellier, 202p.

Guingard J. (1996). Biochimie végétale. Lavoisier, Paris, 175-192 p.

Gutteridge J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun*. **19**: 141-158.

Hale A.L. (2003). Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. Office of Graduate Studies of Texas A&M University. *Genetics*: 260 P.

Harborne, J.B., Williams, C A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. **55**: 481-504.

Harlay A., Huard A., Ridoux L. (2004). Guide du préparateur en pharmacie. *Edition Masson*. Paris.

Hartmann P. (2007). Industrial relations in the news media. *Industrial Relations Journal*. **6(4)**: 4-18.

Heim E.K., Tagliaferro A.R. et Bobilya D.J., (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572-584.

Hemingway R W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : Plant polyphenols: synthesis, properties, significance. *Hemingway R W, Laks P. E.* New York 636p.

Hu F B. (2003). Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*, **78**: 544-551.

Huang D., Ou B., et Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J of Agr Food chem*. **53**: 1841-1856.

- Huglin P, Shneider C. (1998).** Biologie et écologie de la vigne, 2eme Édition, Tec & Doc Lavoisier, Paris 370p.
- Iserin P. (2001).** Encyclopedie des plantes medicinales. Ed : Larousse Bourdasse .Paris . p.335.
- Jacques B, and André R. (2004).** Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. 285p.
- Javanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.J. (1994).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. **116**: 4846-4851.
- Jones G.A.T., McAllister I.A., and Cheng K-J.(1994).** Effect of Sainfoin (OnobrychisviciifoliaScop) Condensed Tannins on Growth And Proteolysis by four Satains of RumminalBacteriat .Applied and Environmental Microbiology. **60 (4)**: 1374-1378
- Jürgen R., Paul S., Ulrike S., Reinhard S. (2009).** Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: *Forsch Komplementmed*. **16**: 79–90.
- Karou D., Savadogo A., Canini A., Yameogo S., Montesano C., Simpure J ., Colizzi V., Traore A.S. (2005).** Antibacterial activity of alkaloids from Sidaacuta. *African Journal of Biotechnology*. **4 (12)**: 1452-1457.
- KatalinicV., Generalic I., Skroza D., Ljubenkov I., Teskera A., Konta I., Boban M. (2009).** Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitisvinifera* leaves extracts. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **1 (2)**: 7-15.
- Kaufmann S. H. E. (1997).** Host response to intracellular pathogens. *New York*. 345 p.
- Kempf S. Zeitouni.(2009).** Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences Pathologie Biologie.
- Ketsawatsakul U, Whiteman M and Halliwell B. (2000).** A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **279**: 692-699.

Kiesewetter H., Koscielny J. (2000). Efficacy of orally administered extract of red vine leaf AS 195 (folia *Vitisviniferae*) in chronic venous insufficiency (stages I-II) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arzneimittelforschung* 19p.

Kohen R et Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, **30(6)** : 620-650.

Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaieb K., Bakrouf A., Magné C., Abdelly C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarixgallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol*, **47 (8)**: 2083-2091.

Lagnika L. (2005). Étude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. *Thèse Doctorat en pharmacie*. Université de LOUIS PASTEUR. Strasbourg, 268p.

Lahlah F.Z. (2008). Extraction des flavonides par le butanol, chloroforme à partir de *Silybummarianum*, et étude de leur activité antibactériennes. *Mémoire de magister*. Université de Constantine. 83p.

Larbi Zerouala. (2010). La culture de la vigne au Québec ; *Texte rédigé pour les Journées horticoles des Laurentides*; 450-971-5110, poste 227.

Latte L.P., Kolodziej H. (2000). Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Naturforsch.* 472p.

Le K., Chiu F., Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructuslycii*. *Food Chemistry*, **105**: 353-363.

Lebreton P., Nader S., Barberon M., Gallet C., et b. Hubert. (1993). Sur la structuration biochimique des formations végétales secondaires méditerranéennes. *Revue d'écologie (terre et vie)*. 621p.

Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. et Lee C. Y. (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7292-7295.

Lehn F. (2010). le syndrome métabolique : quand le surpoids devient pathologique, 256p.

Leitao D.P., Polizello A.C., Ito I.Y., Spadaro A.C. (2005). Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J. Med. Food.* 736p.

Louvieaux J. (2004). Mesure de l'efficacité d'extraits d'algues sur la vigne (*Vitisvinifera L.*), en conditions contrôlées et au vignoble, validée par la mesure de l'activité photosynthétique et les analyses chimique. Thèse d'ingénieur en Agronomie. Bruxelles.

Lugasi A., Hovari J., Sagi, K.V et Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta.BiologicaSzegedientsis* 1-4: 119-125.

Macheix J J., Fleuret A., Billot J. (1990). Fruit phenolics. *CRC Press, Inc., Boca.Raton.* 392p.

Majhenic L., kergel M.S., Knez Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, **104**, 1258-1268.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004). "Polyphenols: Food sources and bioavailability." *American Journal of Clinical Nutrition* **79(5)**: 727-747.

Mansour R., Haouas N., Ben Kahla-Nakbi A., Hammami S., MighriZ., MhenniF., BabbaH.(2013). The Effect of *Vitisvinifera*L. Leaves Extract on *Leishmaniainfantum*. *Iran J PharmRes*, **12(3)**: 349–355.

Marc J, Mulner-Lorillon O, Boulben S, Hureau D, Durand G, Bellé R. (2002). Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *ChemResToxicol.* **15**: 326–331.

Marc T., Gerard W., Denis L. (2001). Classification des anti-inflammatoires in Guide pharmacologie. *Etudiants et professionnels paramédicaux. 4eme Edition.* 426 P.

Marfak A.(2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de Leur reactivite avec les radicaux issus des Alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat. Limoges.

Marinova D.,Ribarova F.,Atanassova M. (2005).Total phenolics and total flavonoids in Bulgaria fruits and vegetables. *Journal of the University of ChemicalTechnology and Metallurgy*, **40**: 255-260.

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

Martinez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*. **77**: 147-161.

Medic Sanic M., Jasprića I., Smolčić Bubalo A., Mornar A. (2004). Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoides and phenolic acids. *Croatian chemical acta*. 361-366 p.

Molyneux P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol*, **26 (2)**, 211-219.

Morton L.W., Amsha A., Caccetta R., Puddey I.B., Croft K. D. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds : Relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. **27**:152-159.

Muller A. (2013). Actifs végétaux nouvelle génération, Pharmacie Concentration optimale, Identification analytique, *Pharma-phytamis*. France, 5p.

Nkhili E. (2009). Polyphénols de l'alimentation : extraction, interaction avec les ions de fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Thèse en Co-tutelle pour obtenir le diplôme de doctorat en sciences des aliments pharmacie. 378p.

OIV. (2007). Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Vol **80** :914-916.

Owen P.L., Johns T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory of north eastern North American plant remedies used for gout. *Jornal of ethnopharmacology*. 849P.

Paris R. R., Moyse H. (1976). Précis de matière médicale, Tome I. *Edition MASSON*, Paris.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*. **4(4)** :6-11.

Prescott L., Harley J., Klein D., 2003. Microbiologie. *Ed De boeck*. Bruxelles. 1135p.

- Psotova J., Lasovsky J., Vicar J. (2003).** Metal chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. *Biomed. Papers* 174-153 p.
- Quélénius N, (2008).** Fiche technique n°20, CCI info agro-industrie, la vigne. 31p.
- Retournard D. (1997).** Lavigne. *Éducation Rustica*, Paris, 111p.
- Reynier A. (1991).** Manuel de viticulture. 6eme Ed, Tec & Doc Lavoisier, Paris, 414p.
- Rodríguez-Vaquero, M.J., Alberto, M.R., Manca de Nadra, M.C. (2007).** Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. **18**: 93–101.
- Sahreen S, Khan MR, Khan RA. (2010).** Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of Carissa opaca fruits. *Food Chem.*, **122**:1205-12.
- Sandhar H K, Kumar B , Prasher S, Tiwari P, Salhan M and Sharma P (2011).** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, **1(1)**: 25-41.
- Scalbert A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. **30**: 3875-3883.
- Schauenberg P. (1997).** Guide des plantes médicinales, Paris, 396p
- Shimizu H. (2004).** Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study, *Stroke*, **35 (9)**: 2072-2077.
- Siddhuraju P., Becker K., (2007).** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*. **101(1)**: 10-19.
- Singh N.D., Arndt P.F., Petrov D.A. (2006).** Minor shift in background substitutional patterns in the *Drosophila saltans* and *willistoni* lineages is insufficient to explain GC content of coding sequences. *BMC Biol.* **4**:37.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**: 152–178.
- Tang S Y et Halliwell B. (2010).** Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **394**: 1-5.

Ulanowska K., Majchrzyk A., Moskot M., Banecka J .B.,Âgrzyn G. (2007) Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, **62**: 132-135.

Vane J.R. (1971).Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for AspirinlikeDrugs.*Nature new biology*, **231**:232-235.

Vercauteren J., Chéze C., Triaud J. (1996). Polyphénols 96.Ed :INRA, Bordeaux, 289p.

Verdan A.M., Wang H.C., García C.R., Henry W.P and BrumaghimJ.L(2011). Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonatedmorin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*,**105**: 1314-1322.

Vermerris W., Nicholson R. (2006).Phenolic compound chemistry.Ed: SPRINGER.1-70.

Vierling E. (2008).Aliments et boissons: filières et produits, Chapitre X : les corps gras. *Editions Doin*.277 p.

Yvan T. (1997). Pharmacologie8ème Edit.Masson.Paris-Milan-Barcelone, 388 P.

Annexe 01 :

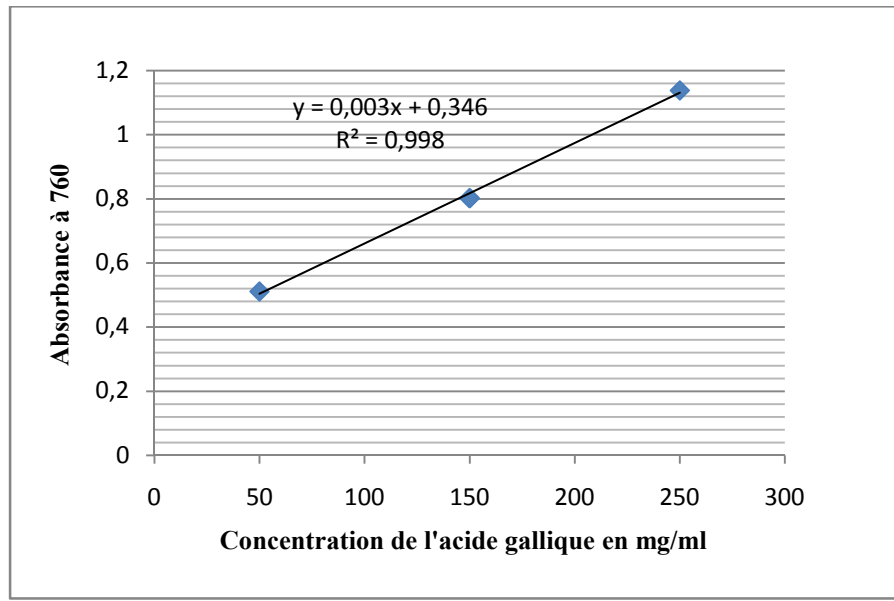


Figure 14: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

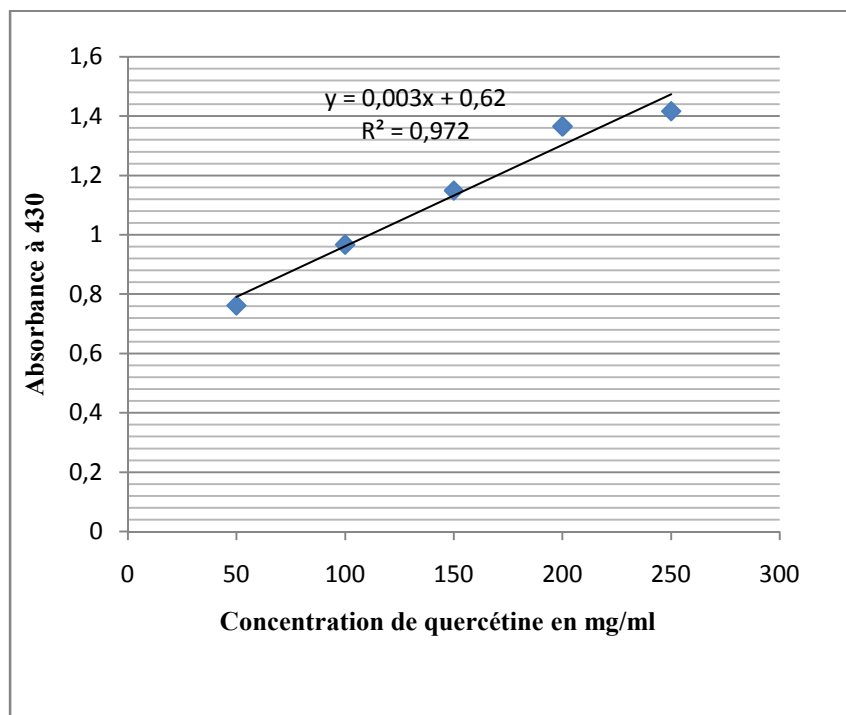


Figure 15: Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Annexe 02

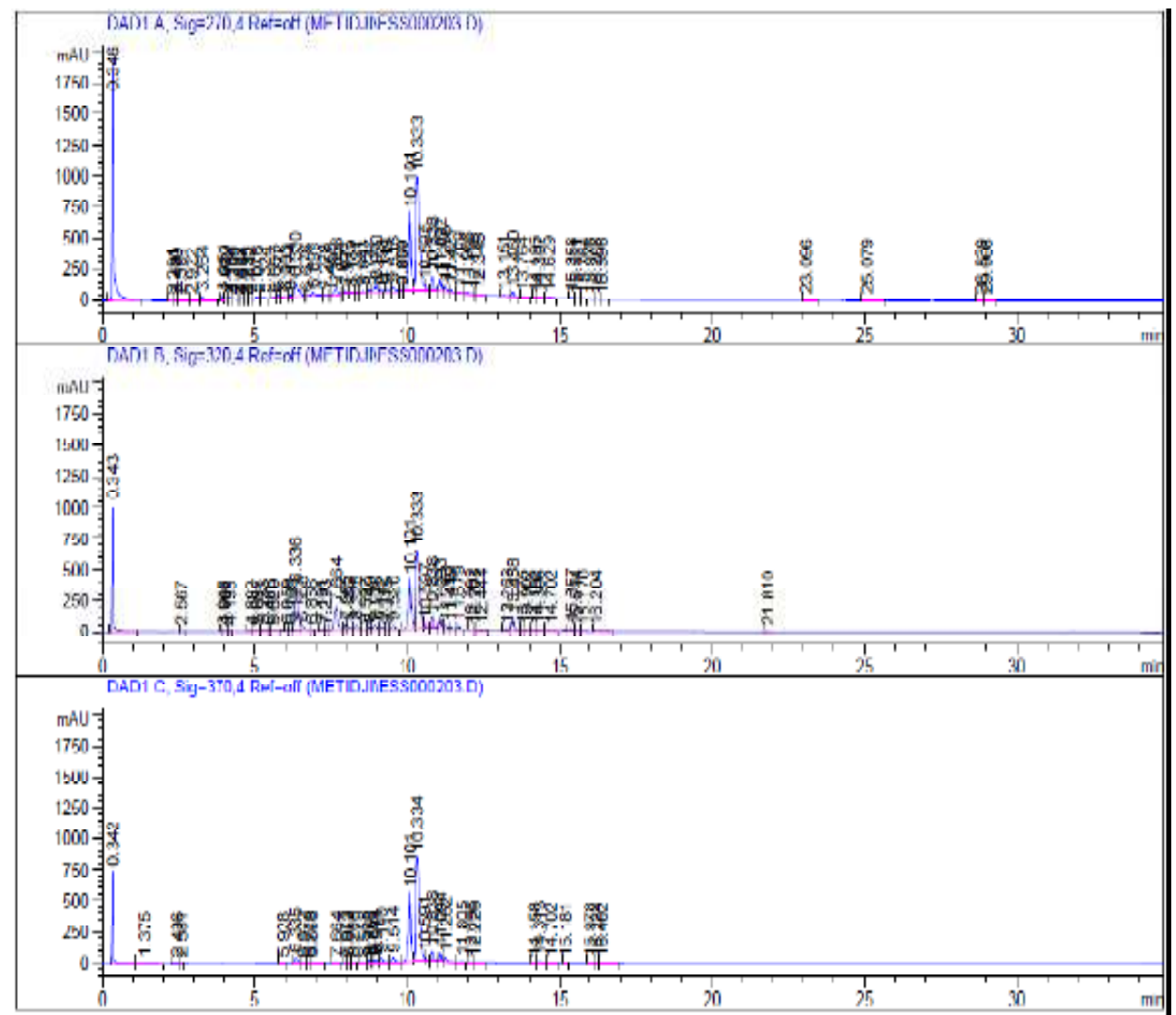


Figure16: Analyse chromatographique de l'extrait des polyphénols totaux par HPLC.

Tableau X: Analyse chromatographique de l'extrait de polyphénols totaux par HPLC en trois longueur d'ondes: $\lambda=270\text{nm}$, $\lambda=320\text{nm}$ et $\lambda=370\text{nm}$.

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=off

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 0.346 | BB | 0.0517 | 6647.74316 | 1952.31128 | 26.6764 |
| 2 | 2.291 | BV | 0.0833 | 9.69554 | 1.68061 | 0.0389 |
| 3 | 2.400 | VV | 0.0652 | 32.66632 | 7.44065 | 0.1311 |
| 4 | 2.551 | VV | 0.1745 | 117.97867 | 8.79429 | 0.4734 |
| 5 | 2.922 | VB | 0.1347 | 20.48543 | 2.15918 | 0.0822 |
| 6 | 3.264 | BB | 0.0565 | 108.17246 | 28.36724 | 0.4341 |
| 7 | 3.951 | BV | 0.0453 | 90.63359 | 31.70691 | 0.3637 |
| 8 | 4.020 | VB | 0.0556 | 58.03498 | 15.52858 | 0.2329 |
| 9 | 4.194 | BV | 0.0692 | 44.24930 | 9.70745 | 0.1776 |
| 10 | 4.309 | VB | 0.0977 | 31.74595 | 5.02283 | 0.1274 |
| 11 | 4.527 | BV | 0.0620 | 11.27759 | 2.73857 | 0.0453 |
| 12 | 4.604 | VB | 0.0691 | 9.80363 | 2.23659 | 0.0393 |
| 13 | 4.735 | BV | 0.0549 | 5.73091 | 1.63605 | 0.0230 |
| 14 | 4.832 | VB | 0.1089 | 15.28922 | 2.31881 | 0.0614 |
| 15 | 5.076 | BV | 0.0844 | 75.55556 | 13.69160 | 0.3032 |
| 16 | 5.324 | VB | 0.1305 | 52.59934 | 5.55594 | 0.2111 |
| 17 | 5.657 | BV | 0.1008 | 37.51455 | 6.36374 | 0.1505 |
| 18 | 5.772 | VB | 0.0721 | 98.77627 | 21.31365 | 0.3964 |
| 19 | 6.003 | BB | 0.0853 | 51.66808 | 9.22978 | 0.2073 |
| 20 | 6.174 | BV | 0.0689 | 80.04358 | 18.35324 | 0.3212 |
| 21 | 6.330 | VV | 0.1355 | 1053.22522 | 110.20242 | 4.2264 |
| 22 | 6.676 | VB | 0.0557 | 5.61932 | 1.57333 | 0.0225 |
| 23 | 6.899 | BV | 0.1891 | 276.34998 | 19.53253 | 1.1090 |
| 24 | 7.278 | VB | 0.0803 | 28.53959 | 5.34741 | 0.1145 |
| 25 | 7.455 | BV | 0.0735 | 29.76628 | 6.49285 | 0.1194 |
| 26 | 7.658 | VB | 0.1231 | 368.56201 | 49.37613 | 1.4790 |
| 27 | 7.856 | BB | 0.0523 | 8.18699 | 2.49152 | 0.0329 |
| 28 | 7.971 | BV | 0.0808 | 112.22901 | 20.84735 | 0.4504 |
| 29 | 8.139 | VV | 0.1171 | 125.98259 | 14.82578 | 0.5056 |
| 30 | 8.321 | VB | 0.0715 | 46.40009 | 9.75814 | 0.1862 |
| 31 | 8.543 | BB | 0.1103 | 68.84925 | 10.53361 | 0.2763 |
| 32 | 8.747 | BV | 0.0866 | 96.38717 | 17.41542 | 0.3868 |
| 33 | 8.970 | VV | 0.1146 | 472.33682 | 57.06465 | 1.8954 |
| 34 | 9.138 | VB | 0.0735 | 104.26043 | 21.91089 | 0.4184 |
| 35 | 9.319 | BV | 0.0867 | 109.27193 | 19.70270 | 0.4385 |
| 36 | 9.516 | VB | 0.0998 | 267.36752 | 38.13818 | 1.0729 |
| 37 | 9.800 | BV | 0.0576 | 23.78290 | 6.67135 | 0.0954 |
| 38 | 9.856 | VB | 0.0630 | 24.90307 | 5.93533 | 0.0999 |
| 39 | 10.101 | BV | 0.0886 | 3788.38574 | 625.73480 | 15.2023 |
| 40 | 10.333 | VV | 0.1336 | 7959.75342 | 913.95758 | 31.9414 |
| 41 | 10.595 | VB | 0.0703 | 223.64099 | 48.09431 | 0.8974 |
| 42 | 10.838 | BB | 0.0724 | 526.74902 | 109.04850 | 2.1138 |
| 43 | 11.092 | BV | 0.0862 | 530.22998 | 96.33781 | 2.1277 |
| 44 | 11.255 | VB | 0.0799 | 186.86902 | 36.38781 | 0.7499 |
| 45 | 11.421 | BB | 0.0678 | 89.40722 | 20.13492 | 0.3588 |
| 46 | 11.709 | BB | 0.1465 | 75.66499 | 7.71206 | 0.3036 |
| 47 | 11.966 | BV | 0.0910 | 39.44510 | 6.30748 | 0.1583 |
| 48 | 12.195 | VV | 0.0820 | 10.98601 | 2.00136 | 0.0441 |
| 49 | 12.345 | VB | 0.1547 | 26.95972 | 2.30050 | 0.1082 |
| 50 | 13.151 | BV | 0.1264 | 79.42061 | 8.54944 | 0.3187 |
| 51 | 13.460 | VB | 0.0903 | 262.62106 | 42.37693 | 1.0539 |

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|--------|
| 52 | 13.764 | BB | 0.1143 | 27.59042 | 3.48813 | 0.1107 |
| 53 | 14.195 | BV | 0.0719 | 9.06293 | 1.89009 | 0.0364 |
| 54 | 14.307 | VB | 0.0947 | 31.22886 | 4.87736 | 0.1253 |
| 55 | 14.629 | BB | 0.1353 | 62.55266 | 6.21897 | 0.2510 |
| 56 | 15.358 | BV | 0.0836 | 31.28862 | 5.73797 | 0.1256 |
| 57 | 15.511 | VB | 0.0870 | 11.44003 | 1.99114 | 0.0459 |
| 58 | 15.764 | BB | 0.0803 | 8.73578 | 1.74917 | 0.0351 |
| 59 | 15.976 | BV | 0.1384 | 9.12300 | 1.00073 | 0.0366 |
| 60 | 16.208 | VV | 0.1103 | 13.95316 | 1.76348 | 0.0560 |
| 61 | 16.396 | VB | 0.1080 | 13.36739 | 1.81380 | 0.0536 |
| 62 | 23.096 | BB | 0.1233 | 12.96883 | 1.55528 | 0.0520 |
| 63 | 25.079 | BB | 0.1457 | 46.33331 | 4.59200 | 0.1859 |
| 64 | 28.839 | BV | 0.1104 | 10.35821 | 1.43173 | 0.0416 |
| 65 | 29.008 | VB | 0.1346 | 10.07840 | 1.08241 | 0.0404 |

Totals : 2.49199e4 4522.11231

Signal 2: DAD1 B, Sig=320,4 Ref=off

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 0.343 | BB | 0.0443 | 2807.76514 | 1015.40308 | 14.6648 |
| 2 | 2.567 | BB | 0.0824 | 17.37140 | 2.87991 | 0.0907 |
| 3 | 3.945 | BV | 0.0439 | 9.35712 | 3.42465 | 0.0489 |
| 4 | 4.006 | VV | 0.0751 | 8.61937 | 1.59405 | 0.0450 |
| 5 | 4.195 | VV | 0.0836 | 8.97319 | 1.59637 | 0.0469 |
| 6 | 4.892 | BV | 0.0959 | 13.90353 | 2.13691 | 0.0726 |
| 7 | 5.097 | VV | 0.1045 | 34.57573 | 4.77135 | 0.1806 |
| 8 | 5.283 | VV | 0.0908 | 87.72270 | 14.45137 | 0.4582 |
| 9 | 5.486 | VV | 0.0828 | 8.73312 | 1.48186 | 0.0456 |
| 10 | 5.620 | VB | 0.1319 | 27.34286 | 2.90250 | 0.1428 |
| 11 | 6.059 | BV | 0.0677 | 12.20540 | 2.86561 | 0.0637 |
| 12 | 6.165 | VB | 0.0624 | 18.21840 | 4.58464 | 0.0952 |
| 13 | 6.336 | BV | 0.1304 | 2875.32544 | 340.92856 | 15.0176 |
| 14 | 6.556 | VB | 0.0913 | 164.93481 | 30.09969 | 0.8614 |
| 15 | 6.856 | BB | 0.0694 | 18.18459 | 4.12354 | 0.0950 |
| 16 | 7.191 | BV | 0.0737 | 21.02253 | 4.25032 | 0.1098 |
| 17 | 7.293 | VB | 0.0626 | 5.54255 | 1.27761 | 0.0289 |
| 18 | 7.664 | BB | 0.1125 | 1360.94165 | 175.39717 | 7.1081 |
| 19 | 7.965 | BV | 0.0752 | 156.95218 | 31.99347 | 0.8198 |
| 20 | 8.052 | VB | 0.0861 | 137.37936 | 22.23182 | 0.7175 |
| 21 | 8.325 | BB | 0.0784 | 153.85381 | 30.72663 | 0.8036 |
| 22 | 8.592 | BB | 0.1053 | 25.01979 | 3.34475 | 0.1307 |
| 23 | 8.749 | BV | 0.0859 | 58.84842 | 10.42436 | 0.3074 |
| 24 | 8.930 | VV | 0.1214 | 249.11797 | 31.11433 | 1.3011 |
| 25 | 9.142 | VB | 0.0806 | 94.31958 | 18.16685 | 0.4926 |
| 26 | 9.315 | BB | 0.0798 | 9.36747 | 1.95818 | 0.0489 |
| 27 | 9.520 | BB | 0.1087 | 207.59027 | 27.30094 | 1.0842 |
| 28 | 10.101 | BV | 0.0967 | 2693.52490 | 399.16235 | 14.0681 |
| 29 | 10.333 | VV | 0.1334 | 5407.78906 | 622.37158 | 28.2445 |
| 30 | 10.597 | VB | 0.0750 | 198.88644 | 39.30947 | 1.0388 |

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|--------|
| 31 | 10.838 | BB | 0.0722 | 419.89996 | 87.18356 | 2.1931 |
| 32 | 11.093 | BV | 0.0848 | 413.80872 | 76.92452 | 2.1613 |
| 33 | 11.263 | VV | 0.0861 | 133.38948 | 22.85949 | 0.6967 |
| 34 | 11.419 | VB | 0.0743 | 72.58404 | 14.52973 | 0.3791 |
| 35 | 11.679 | BB | 0.0923 | 157.54150 | 25.41535 | 0.8228 |
| 36 | 12.092 | BV | 0.0788 | 6.12129 | 1.21407 | 0.0320 |
| 37 | 12.208 | VV | 0.0905 | 12.30216 | 2.03444 | 0.0643 |
| 38 | 12.444 | VB | 0.1152 | 32.05168 | 3.84512 | 0.1674 |
| 39 | 13.263 | BV | 0.1174 | 77.43989 | 10.83383 | 0.4045 |
| 40 | 13.458 | VB | 0.0897 | 557.14130 | 93.26419 | 2.9099 |
| 41 | 13.775 | BV | 0.0864 | 11.60693 | 2.10323 | 0.0606 |
| 42 | 13.902 | VB | 0.0777 | 12.05295 | 2.35513 | 0.0630 |
| 43 | 14.192 | BV | 0.0922 | 42.26436 | 6.64226 | 0.2207 |
| 44 | 14.306 | VB | 0.0887 | 20.14238 | 3.32278 | 0.1052 |
| 45 | 14.702 | BB | 0.1114 | 65.81211 | 8.22226 | 0.3437 |
| 46 | 15.357 | VV | 0.0862 | 122.78471 | 21.63054 | 0.6413 |
| 47 | 15.514 | VB | 0.0838 | 27.04889 | 4.79648 | 0.1413 |
| 48 | 15.770 | BB | 0.0791 | 23.59136 | 4.65506 | 0.1232 |
| 49 | 16.204 | BB | 0.1564 | 36.53083 | 3.08002 | 0.1908 |
| 50 | 21.810 | BB | 0.0918 | 8.83493 | 1.47596 | 0.0461 |

Totals : 1.91463e4 3248.66195

Signal 3: DAD1 C, Sig=370,4 Ref=off

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 0.342 | BB | 0.0428 | 1941.65503 | 734.95905 | 12.9977 |
| 2 | 1.375 | BB | 0.2452 | 18.86597 | 1.05189 | 0.1263 |
| 3 | 2.436 | BB | 0.1577 | 26.08595 | 2.38338 | 0.1746 |
| 4 | 2.581 | BB | 0.0766 | 11.52308 | 2.21811 | 0.0771 |
| 5 | 5.928 | BB | 0.0834 | 7.62367 | 1.36045 | 0.0510 |
| 6 | 6.335 | BV | 0.1274 | 287.21860 | 35.13367 | 1.9227 |
| 7 | 6.572 | VB | 0.0789 | 20.48863 | 3.80069 | 0.1372 |
| 8 | 6.779 | BV | 0.0541 | 8.79154 | 2.43665 | 0.0589 |
| 9 | 6.866 | VB | 0.0986 | 35.28016 | 5.10981 | 0.2362 |
| 10 | 7.664 | BB | 0.1013 | 15.47806 | 2.21993 | 0.1036 |
| 11 | 7.973 | BV | 0.0684 | 12.20852 | 2.72044 | 0.0817 |
| 12 | 8.052 | VB | 0.0621 | 6.60194 | 1.60094 | 0.0442 |
| 13 | 8.208 | BB | 0.0860 | 11.59608 | 2.11317 | 0.0776 |
| 14 | 8.558 | BB | 0.1323 | 26.88316 | 2.79209 | 0.1800 |
| 15 | 8.750 | BV | 0.0939 | 61.90792 | 10.05199 | 0.4144 |
| 16 | 8.855 | VV | 0.0723 | 38.63704 | 7.72890 | 0.2586 |
| 17 | 8.971 | VV | 0.0855 | 79.55527 | 13.36170 | 0.5326 |
| 18 | 9.140 | VB | 0.0921 | 183.46758 | 28.89361 | 1.2282 |
| 19 | 9.514 | BB | 0.0976 | 235.93275 | 35.46442 | 1.5794 |
| 20 | 10.101 | BV | 0.0875 | 3226.99951 | 541.70868 | 21.6020 |
| 21 | 10.334 | VV | 0.1339 | 7343.67383 | 840.56158 | 49.1597 |
| 22 | 10.591 | VB | 0.0619 | 136.04485 | 33.13226 | 0.9107 |
| 23 | 10.838 | BV | 0.0778 | 393.48398 | 74.26557 | 2.6340 |
| 24 | 11.094 | VV | 0.0897 | 390.47882 | 67.30000 | 2.6139 |

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|----------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|--------|
| 25 | 11.262 | VB | 0.0818 | 193.38184 | 35.33869 | 1.2945 |
| 26 | 11.805 | BB | 0.1237 | 26.48855 | 2.92337 | 0.1773 |
| 27 | 12.096 | BV | 0.0928 | 9.96365 | 1.64222 | 0.0667 |
| 28 | 12.226 | VB | 0.1337 | 25.99339 | 2.71473 | 0.1740 |
| 29 | 14.158 | BV | 0.1052 | 7.46528 | 1.12837 | 0.0500 |
| 30 | 14.313 | VV | 0.1092 | 65.49741 | 8.76448 | 0.4384 |
| 31 | 14.702 | VB | 0.1191 | 20.51056 | 2.36705 | 0.1373 |
| 32 | 15.181 | BV | 0.0848 | 16.67627 | 3.00455 | 0.1116 |
| 33 | 15.978 | BV | 0.1100 | 12.28445 | 1.66662 | 0.0822 |
| 34 | 16.224 | VV | 0.0990 | 10.36239 | 1.56950 | 0.0694 |
| 35 | 16.402 | VB | 0.1297 | 29.29580 | 3.17387 | 0.1961 |
| Totals : | | | | 1.49384e4 | 2516.66240 | |

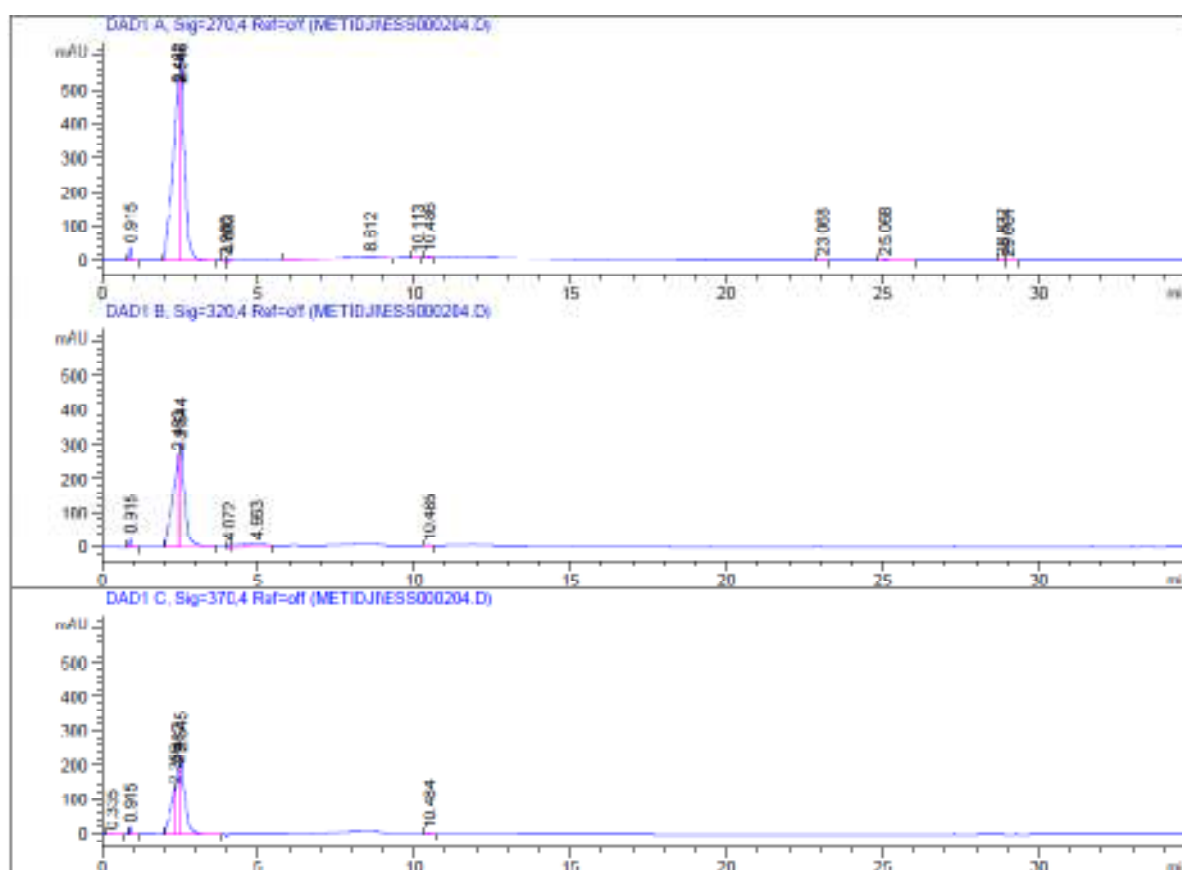


Figure17: Analyse chromatographique de l'extrait des flavonoïdes par HPLC

Tableau XI: Analyse chromatographique de l'extrait de flavonoïde par HPLC en trois longueur d'ondes: $\lambda = 270\text{nm}$, $\lambda = 320\text{nm}$ et $\lambda = 370\text{nm}$.

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=off

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 0.915 | BB | 0.0470 | 123.16184 | 41.04702 | 0.8298 |
| 2 | 2.462 | VV | 0.1655 | 6960.06201 | 536.07373 | 46.8913 |
| 3 | 2.545 | VB | 0.1613 | 7028.92236 | 605.98560 | 47.3553 |
| 4 | 3.960 | BB | 0.0769 | 23.87278 | 4.57561 | 0.1608 |
| 5 | 4.063 | BB | 0.0859 | 49.16344 | 8.20528 | 0.3312 |
| 6 | 8.612 | BB | 0.9876 | 545.88818 | 7.25723 | 3.6778 |
| 7 | 10.113 | BB | 0.1041 | 9.32851 | 1.29439 | 0.0628 |
| 8 | 10.486 | BB | 0.0979 | 16.66970 | 2.56064 | 0.1123 |
| 9 | 23.068 | BB | 0.1233 | 11.62271 | 1.39409 | 0.0783 |
| 10 | 25.068 | BB | 0.1555 | 53.06496 | 4.85389 | 0.3575 |
| 11 | 28.832 | BV | 0.1119 | 11.28040 | 1.53184 | 0.0760 |
| 12 | 29.001 | VB | 0.1281 | 9.92446 | 1.11193 | 0.0669 |

Totals : 1.48430e4 1215.89125

Signal 2: DAD1 B, Sig=320,4 Ref=off

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 0.915 | BB | 0.0435 | 73.96698 | 27.35744 | 0.9407 |
| 2 | 2.463 | VV | 0.1677 | 3558.17236 | 270.01450 | 45.2530 |
| 3 | 2.544 | VB | 0.1673 | 3665.91553 | 307.11340 | 46.6233 |
| 4 | 4.072 | BV | 0.1125 | 56.82635 | 7.66045 | 0.7227 |
| 5 | 4.963 | VB | 0.7935 | 497.09735 | 8.41065 | 6.3221 |
| 6 | 10.485 | BB | 0.0973 | 10.85644 | 1.68267 | 0.1381 |

Totals : 7862.83501 622.23912

Signal 3: DAD1 C, Sig=370,4 Ref=off

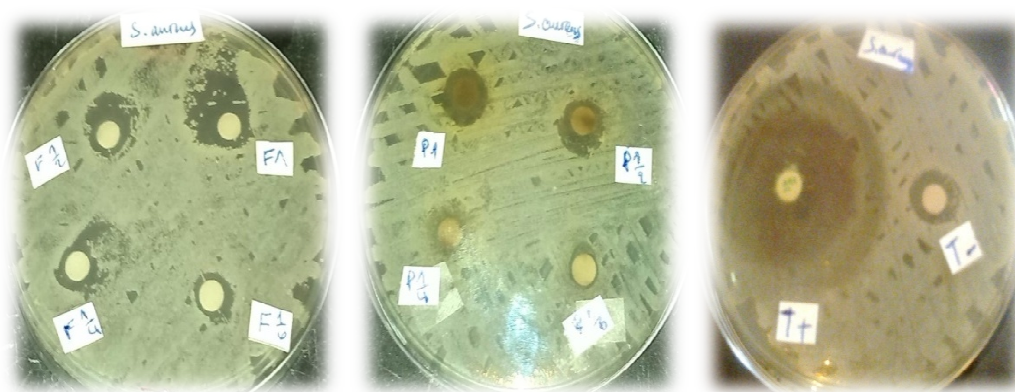
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1 | 0.335 | BB | 0.2313 | 16.42742 | 1.11886 | 0.3098 |
| 2 | 0.915 | BB | 0.0424 | 53.23305 | 20.43609 | 1.0038 |
| 3 | 2.366 | BV | 0.1447 | 1515.74548 | 135.30714 | 28.5813 |
| 4 | 2.467 | VV | 0.0696 | 917.38904 | 194.37041 | 17.2985 |
| 5 | 2.545 | VB | 0.1699 | 2784.65161 | 228.99449 | 52.5082 |
| 6 | 10.484 | BB | 0.0996 | 15.82546 | 2.37939 | 0.2984 |

Totals : 5303.27207 582.60638

Tableau XII: Résultats des étalons (standards)

| Etalon | Temps de Rétention | | |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | $\lambda = 270\text{nm}$ | $\lambda = 320\text{nm}$ | $\lambda = 370\text{nm}$ |
| Ac salicylique | 13.629 | 13.629 | Abs |
| Accoumarique | 14.505 | 14.490 | 14.502 |
| Ac gallique | 2.507 | 2.505 | Abs |
| Ac ascorbique | 2.305 | Abs | Abs |
| Catéchine | 7.262 | 7.313 | 7.273 |
| Quercitine | 13.041 | 13.040 | 13.041 |
| Rutine | 9.436 | 9.417 | 9.414 |
| Vaniline | 10.327 | 10.331 | 10.330 |
| Accholorogénique | 8.137 | 8.137 | 8.137 |
| Ac caféique | 2.827 | 2.821 | 2.821 |
| Acide tannique | 2.338 | 2.34 | Absence |

Annexe 03

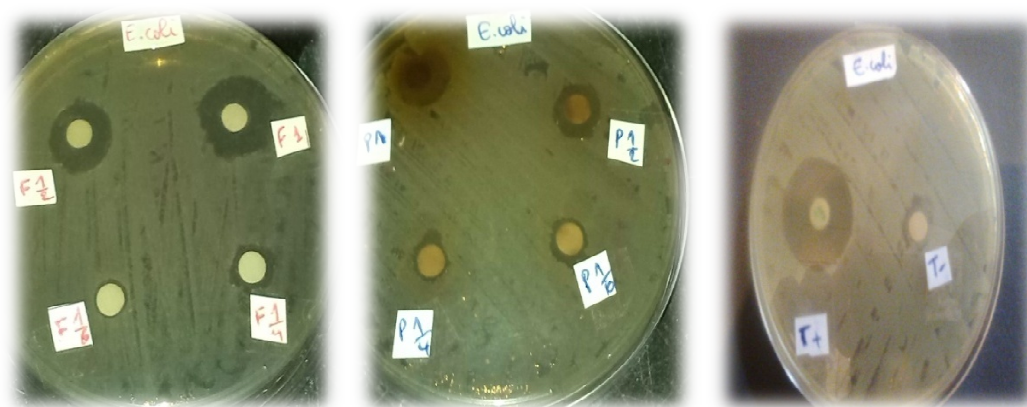


A

B

C

Figure18 : Effet inhibiteur des extraits sur *Staphylococcus aureus*
(A : flavonoïdes ; B : polyphénols ; C : témoin).

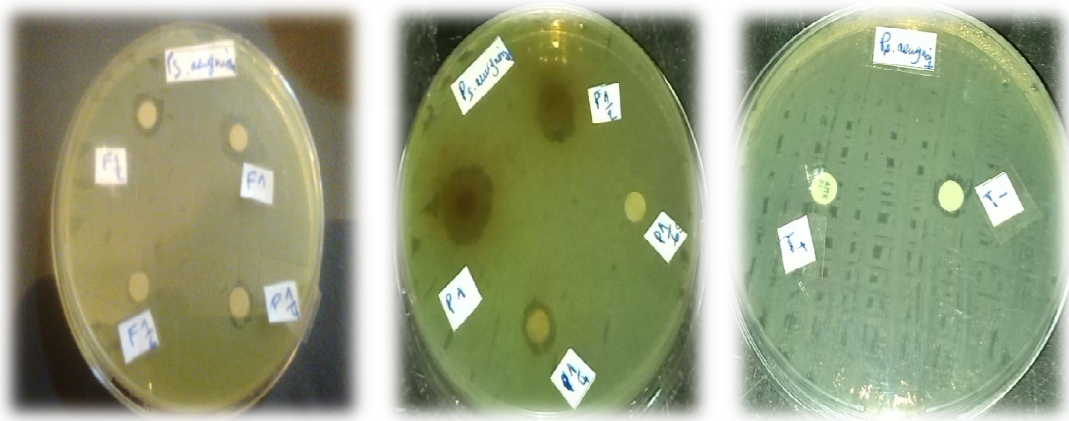


A

B

C

Figure19: Effet inhibiteur des extraits sur *E. coli*
(A : flavonoïdes ; B : polyphénols ; C : témoin).



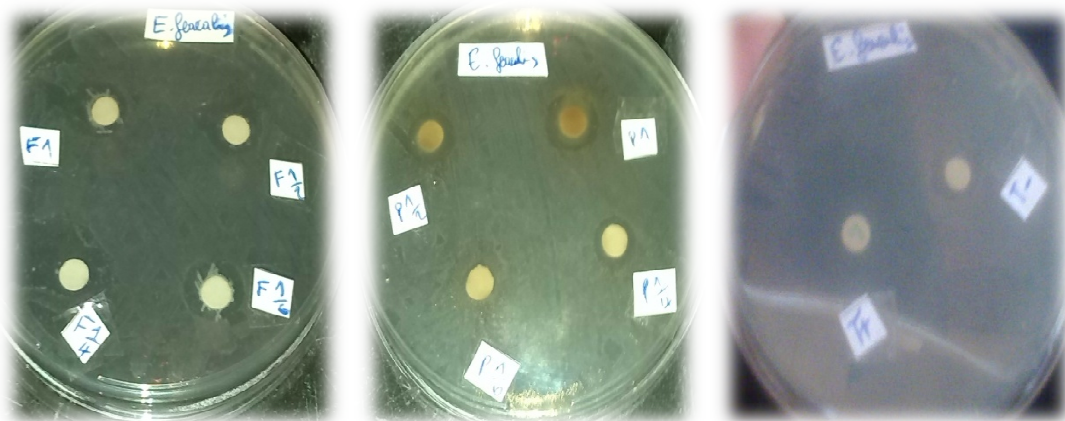
A

B

C

Figure20: Effet inhibiteur des extraits sur *Pseudomonasaeruginosa*

(A : flavonoïdes ; B : polyphénols ; C : témoin).



A

B

C

Figure21: Effet inhibiteur des extraits sur *Enterococcusfaecalis*

(A : flavonoïdes ; B : polyphénols ; C : témoin).

Annexe 04

Tableau XIII : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique et de l'extrait des feuilles de *vitisvinifera*

| Dilution | Acide ascorbique | | Polyphénols | | Flavonoïdes | |
|----------|------------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|
| | DO | % d'inhibition | DO | % d'inhibition | DO | % d'inhibition |
| 10ml | 0.122 | 93,89 | 0.082 | 95.85 | 0.146 | 92,68 |
| 20ml | 0.879 | 54,98 | 0.152 | 92.31 | 0.773 | 61,24 |
| 30ml | 1.002 | 49,82 | 0.517 | 73.84 | 1.074 | 46,25 |
| 40ml | 1.044 | 47,72 | 0.792 | 59.93 | 1.173 | 41,26 |
| 50ml | 1.017 | 49,07 | 1.121 | 43.86 | 1.174 | 41,21 |

Annexe 05

TableauXIV : Résultat de l'activité anti-inflammatoire des extraits de polyphénols totaux et de flavonoides des feuilles de *Vitisvinifera*

| Lots traités | Dose | la moyenne de poids des Patte postérieure en g | | % de l'œdème | % de réduction de l'œdème |
|-----------------------------------|------------|--|-------|--------------|---------------------------|
| | | PD | PG | | |
| Témoin (l'eau physiologie) | - | 0.110 | 0.144 | 30.9% | - |
| Lot de référence (Diclofinale) | 12.5 ml/mg | 0.095 | 0.113 | 18.9% | 63.49% |
| Lot essais 1 (polyphénols totaux) | 82 mg/ml | 0.117 | 0.141 | 19.65% | 57.75 % |
| Lot essais 2 (flavonoides) | 54 mg/ml | 0.126 | 0.152 | 20.63% | 49.78% |



Figure 21: Gavage de l'extrait **Figure 22:** Injection de carraghénine