



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Larbi Tébessi –Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (SNV)

Filière : Sciences Biologiques

Option : Qualité des produits et sécurité alimentaire

**Thème :**

**Contribution à l'étude de l'activité antioxydante d'un  
sous-produit alimentaire : Feuilles de vigne**

Présenté par :

**Cheriet Rihab**

<b>Dr. Taleb Salima</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Larbi Tébessi –Tébessa-</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mlle.Ferhi Salma</b>	<b>MAA</b>	<b>Université de Larbi Tébessi –Tébessa-</b>	<b>Encadreuse</b>
<b>M.Zouaoui Nassim</b>	<b>MAA</b>	<b>Université de Larbi Tébessi –Tébessa-</b>	<b>Examineur</b>

**Date de soutenance : 27 Mai 2017**

**Note : 16/20**

**Mention : Très bien**

2016/2017

## ملخص

كانت أهداف هذا العمل تحديد إجمالي البوليفينول، وقياس النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص المائي والايثانولي من الأصناف الخمسة (أربعة من أصل إيطالي و واحدة جزائرية) من أوراق نبات كرمة العنب الاوروبي.

تم تحديد المحتوى الكلي الفينول مع مقايسة فولين.Ciocalteu.

تم قياس الأنشطة المضادة للأكسدة من قبل اثنين من التقنيات (EPR و محاصرة الجذور الحرة DPPH ).

المحتوى الكلي البوليفينول يتراوح في مستخلص المائي، وبين 27،51-40.44 ملغ / غ مج في مستخلصات الايثانول. استنتجنا أن هناك علاقة وثيقة بين مذب استخراج المستخدمة وعائدات استخراج بين بين 11،63-19،85 ملغ/ غ مج الحصول عليها. أو الإيثانول يسجل أفضل كفاءة استخراج بالنسبة للمياه (تركيز 60٪ إيثانول / 40٪ ماء و 40 درجة )، وأيضا وجود ارتباط وثيق بين مذب استخراج تستخدم ومحتويات من إجمالي البوليفينول PSI مئوية، وضغط من 1500 التي تم الحصول عليها. أو تسجيل الإيثانول أعلى المحتوى الكلي البوليفينول بالمقارنة مع الماء.

من المستخلصات المائية ومقتطفات IC50 وأشارت لدينا النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة أن جذور الهيدروكسيل للمستخلص المائي IC50 الإيثانول تختلف بين 0،81-0،52 ملغ / مل و 0،83-0،27 ملغ / مل على التوالي. في حين أن ويتراوح بين 0،43-0،11 ملغ / مل و 0،39-0،07 ملغ / مل على التوالي.DPPH الكحولي

تظهر أساليب النشاط المضاد للأكسدة أن جميع عينات من النباتات اختبار لديهم خصائص مضادة للأكسدة على مختلف المستويات، وأنه لا يوجد علاقة بين استخراج المذيبات المستعملة ونسب تثبيط الحصول على جذور الهيدروكسيل وآخر تلك تتغير تبعا لتنوع استخدامها.

التي تم DPPH بالإضافة ؛ نستنتج أنه لا يوجد أي ارتباط بين استخراج المذيبات المستخدمة وتثبيط في المئة من الجذور الحصول عليها، وأنها آخر يعتمد فقط على مجموعة متنوعة المستخدمة؛ حيث سجلت أصناف نفس الترتيب رتبة لنسب في حالة مستخلص المائي والكحولي.DPPH تثبيط الجذور.

**كلمات مفتاحية** IC50، والنشاط المضادة للأكسدة، ERP، DPPH، كرمة العنب الاوروبي،

## Abstract

The objectives of this work were the determination of the total polyphenols, the measurement of the antioxidant activity of the aqueous and ethanolic extracts of the five varieties (four of Italian origin and one Algerian) of the grape leaves.

The total phenolic content was determined with the Folin-Ciocalteu assay.

The antioxidant activities were measured by two techniques (paramagnetic resonance spectroscopy by electron EPR and trapping of DPPH free radicals).

The total polyphenol content varies between 11.63 - 19.85 mg EAG / g MS in the aqueous extracts, and between 27.51 - 40.44 mg EAG / g MS in the ethanolic extracts.

We concluded that there is a close correlation between the extraction solvent used and the extraction yields obtained; Or ethanol has the best extraction efficiency In comparison with water (concentration 60% ethanol / 40% water, temperature 40 ° C and pressure 1500 PSI) and also a close correlation between the extraction solvent Used and the total polyphenol contents obtained; Or ethanol has the highest total polyphenol content in comparison with water.

Our results obtained in this study have shown that the IC<sub>50</sub> of hydroxyl radicals by aqueous extracts and ethanol extracts vary between 0.52-0.81 mg / ml and 0.27-0.83 mg / ml respectively. While the IC<sub>50</sub> DPPH of aqueous and ethanolic extracts varies between 0.11 - 0.43 mg / ml and 0.07 - 0.39 mg / ml respectively.

The methods of antioxidant activity show that all the extracts of the plants studied exhibit antioxidant properties at different levels and that there is no correlation between the extraction solvent used and the percentages of inhibition of the hydroxyl radicals obtained and that this latter changes according to the variety used.

In addition; we conclude that there is no correlation between the extraction solvent used and the percent inhibition of the DPPH radicals obtained and that this latter depend only on the variety used; where the varieties have the same order of classification concerning the percent inhibition of DPPH radicals in the case of aqueous and ethanolic extracts.

**Keywords:** grape leaves, DPPH, ERP, antioxidant activity, IC<sub>50</sub>.

## Résumé

Les objectifs de ce travail ont été le dosage des polyphénols totaux, la mesure de l'activité antioxydante des extraits aqueux et éthanoliques des cinq variétés (quatre d'origine italienne et une algérienne) des feuilles de vigne.

La teneur phénolique totale a été déterminée avec le dosage de Folin-Ciocalteu.

Les activités antioxydantes ont été mesurées par deux techniques (la spectroscopie de résonance paramagnétique par électron EPR et le piégeage des radicaux libres DPPH).

La teneur en polyphénol totaux varie entre 11.63 - 19.85 mg EAG /g MS dans les extraits aqueux, et entre 27.51 - 40.44 mg EAG /g MS dans les extraits éthanoliques.

Nous avons conclu qu'il existe une corrélation étroite entre le solvant d'extraction utilisé et les rendements d'extraction obtenus ; ou l'éthanol enregistre le meilleur rendement d'extraction par rapport à l'eau (à concentration 60% Éthanol / 40% eau ; température de 40 °C et pression de 1500 PSI) et aussi une corrélation étroite entre le solvant d'extraction utilisé et les teneurs en polyphénols totaux obtenues ; ou l'éthanol enregistre la meilleure teneur en polyphénols totaux en comparaison avec l'eau.

Nos résultats obtenus dans cette étude ont montrés que l'IC<sub>50</sub> des radicaux hydroxyles par les extraits aqueux et les extraits éthanoliques varient entre 0.52 - 0.81 mg/ml et 0.27 - 0.83 mg/ml respectivement. Alors que l'IC<sub>50</sub> DPPH des extraits aqueux et éthanoliques varie entre 0.11 - 0.43 mg/ml et 0.07 - 0.39 mg/ml respectivement.

Les méthodes de l'activité antioxydante montrent que tous les extraits des plantes étudiées présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux, et qu'il n'existe pas une corrélation entre le solvant d'extraction utilisé et les pourcentages d'inhibition des radicaux hydroxyles obtenus et que ceux derniers changent selon la variété utilisée.

En outre ; nous avons conclu qu'il n'existe pas une corrélation entre le solvant d'extraction utilisé et les pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH obtenus et que ceux derniers dépendent seulement de la variété utilisée ; où les variétés ont enregistré le même ordre de classement concernant les pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH dans le cas des extraits aqueux et éthanoliques.

**Mots-clés** : Feuilles de vigne, DPPH, ERP, activité antioxydante, IC<sub>50</sub>.

## **Remerciement**

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

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mlle Farhi Selma, Maître assistant à la faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, Université Larbi Tébessi à Tébessa pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements et surtout sa patience dans la correction de ce mémoire et la confiance qu'il m'a accordé m'ont permis de réaliser ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Mme Taleb Salima, Maître de conférences à l'Université Larbi Tébessi à Tébessa d'avoir accepté de présider le jury.*

*J'exprime mes vifs remerciements à Mr Zouaoui Nassim, Maître assistant à l'Université Larbi Tébessi à Tébessa pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

*Enfin, que tous ceux qui nous ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, trouvent ici l'expression de notre profonde reconnaissance.*

## ***Dédicace***

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail  
que je dédie :*

*♥A mes chers parents ♥*

*♥ A mon mari ♥*

*♥A ma famille ♥*

*♥A ma belle famille ♥*

*♥ Au meneur de ce travail, l'encadrante M<sup>lle</sup> Farhi Selma ♥*

*♥A toute personne ayant, de près ou de loin, permis d'accomplir ce travail ♥*

## Liste des tableaux

<b>Tableaux</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Tableau 01</b>	Espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques	03
<b>Tableau 02</b>	Les sources exogènes et endogènes du stress oxydant	05
<b>Tableau 03</b>	Les antioxydants endogènes et exogènes	08
<b>Tableau 04</b>	Rôles biologiques des antioxydants exogènes	09
<b>Tableau 05</b>	Les antioxydants primaires et secondaires	10
<b>Tableau 06</b>	Classification des polyphénols	16
<b>Tableau 07</b>	Structure des squelettes des polyphénols	18
<b>Tableau 08</b>	les cinq variétés des feuilles de raisin utilisées	30
<b>Tableau 09</b>	conditions de la procédure d'extraction de l'ASE	31
<b>Tableau 10</b>	Rendements d'extraction des extraits aqueux et éthanoliques des cinq variétés de feuilles de vigne $\pm$ écart type	39
<b>Tableau 11</b>	Teneurs en phénols totaux des extraits aqueux et éthanoliques des cinq variétés de la plante étudiée $\pm$ écart type en milligrammes d'acide gallique / g de poids sec	42
<b>Tableau 12</b>	Valeurs de la concentration IC50 des radicaux hydroxyyles par les extraits aqueux et éthanoliques des cinq variétés de la plante étudiée	44
<b>Tableau 13</b>	Valeurs de la concentration IC50 du radical DPPH par les extraits aqueux et éthanoliques des cinq variétés de la plante étudiée $\pm$ écart type	47

## Liste des figures

<b>Figures</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Figure 01</b>	Les processus de formation des ERO	04
<b>Figure 02</b>	Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les espèces oxygénées réactives	06
<b>Figure 03</b>	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants	08
<b>Figure 04</b>	Représentation schématique d'un extracteur ultrason	21
<b>Figure 05</b>	Représentation schématique d'un extracteur microonde	23
<b>Figure 06</b>	Représentation schématique d'un extracteur par fluide supercritique	24
<b>Figure 07</b>	Le cycle d'extraction de l'ASE utilisé	32
<b>Figure 08</b>	Appareillage de l'ASE (Dionex ASE 350) utilisé.	32
<b>Figure 09</b>	Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	34
<b>Figure 10</b>	Réaction de piégeage des radicaux hydroxyles par DMPO	35
<b>Figure 11</b>	Appareillage La spectroscopie de résonance paramagnétique par électron ( ERP) utilisé	36
<b>Figure 12</b>	Schéma représentatif de la réaction de virement de la couleur mauve de DPPH "réduit" en DPPH jaune "oxydé "en présence d'antioxydant (DPPH).	37
<b>Figure 13</b>	Pouvoir antioxydant des extraits d'étude prouvé par le virement de DPPH en couleur jaune	37
<b>Figure 14</b>	Classement des rendements d'extraction des extraits aqueux de la plante utilisée selon le test Duncan	40
<b>Figure 15</b>	Classement des rendements d'extraction des extraits éthanoliques de la plante utilisée selon le test Duncan	41
<b>Figure 16</b>	Classement des teneurs en polyphénols totaux des extraits aqueux de la plante utilisée selon le test Duncan	43
<b>Figure 17</b>	Classement des teneurs en polyphénols totaux des extraits éthanoliques de la plante utilisée selon le test Duncan	43
<b>Figure 18</b>	Classement des pourcentages d'inhibition des radicaux hydroxyles par les extraits aqueux selon le test Duncan	45
<b>Figure 19</b>	Classement des pourcentages d'inhibition des radicaux hydroxyles par les extraits éthanoliques selon le test Duncan	46
<b>Figure 20</b>	Classement des pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH par les extraits aqueux selon le test Duncan.	48
<b>Figure 21</b>	Classement des pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH par les extraits éthanoliques selon le test Duncan	48



## Liste des abréviations

AAR : activité anti-radicalaire

Abs : Absorbance

ADN : Acide désoxyribonucléique

CAT : Catalase

CI50 : Concentration inhibitrice à 50%

CO<sub>2</sub> : gaz carbonique

Cu : cuivre

DMPO : nitrone 5-diméthyl-pyrroline N-oxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

E : échantillon

EAM : Extraction assistée par micro-ondes

EFS : Extraction par fluide supercritique

EOA : les espèces oxygénées activées

EOR : Espèce oxygénée reactivées

EPR : La spectroscopie de résonance paramagnétique par électron

ESA : Extraction par solvant accéléré

Fe : fer

FeCl<sub>3</sub> : solution aqueuse de Chlorure ferrique

FRAP : Ferric reducing-antioxidant power.

g : gramme

GHz : gigahertz

GPX : Glutathion peroxydase

GRD : Glutathion réductase

GRT : Glutathion ransférase

GSE : grape seed extract

GSPE : extrait de proanthocyanidine de la graine de raisin

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : le peroxyde d'hydrogène

HOCl : l'acide hypochloreux

HPLC : high performance liquid chromatography

IL-6 MCP -1 : protéine chimiotactique monocyttaire-1

K<sub>3</sub>Fe (CN) : solution de ferricyanure de potassium

L : litre

LDL : Lipoprotéines à basse densité (low density lipoproteins)

M : molaire

MEB : Les micrographes électroniques à balayage

mg : Milligramme

mg EAG/g : microgramme d'équivalent d'acide gallique par g de matière sèche

min : Minute

ml : Millilitre

mM : millimole

Mn : Le manganèse

MS : matière sèche.

MW : micro-ave

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : carbonate de sodium

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Solution de carbonate de sodium

nm : nanomètre

NO : L'oxyde d'azote

NO<sup>•</sup> : le monoxyde d'azote :

NO<sub>2</sub> : le dioxyde d'azote

O<sub>2</sub> : Oxygène moléculaire

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : Anion superoxyde

O<sub>3</sub> : l'ozone

OH<sup>•</sup> : Radical hydroxyle

ONOO : le peroxydinitrite

P : poids

POX : Peroxydase

PRX : Peroxyredoxine

PSI : pound per square inch ou une livre par pouce carré

Q10 : le coenzyme

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RO<sup>•</sup>: radicaux oxyle

ROO<sup>•</sup>: peroxyde

S : seconde

Se : selenium

Sec : seche

SH : les groupements thiols

SO<sub>2</sub> : Anhydride sulfureux

SOD : Superoxyde dismutase

tr : tour

UV : Ultra violé

UV-VIS : ultraviolet visible

V : volume

Vit A : Rétinol

Vit B<sub>5</sub> :A.pantothénique

Vit C : vitamines C

vit E : Tocophérols

Vit E : vitamine E

Vit Q : Ubiquinone

Zn : zinc

μl : microlitre

μm : micromètre

% : pourcentage

°C : degré Celsius

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> : le dioxygène singlet

# Sommaire

## Introduction

### Partie bibliographique

#### Chapitre 1 : Le stress oxydant et les espèces oxygénées réactives

I.1.Généralités.....	2
I.2.Définition .....	2
I.3.Les radicaux libres et les especes reactivs oxygenées.....	3
I.3.1. Les modes de production des ERO.....	5
I.3.2.Les principales cibles biologiques des EOA et les actions néfaste de ceux-ci dans les tissus biologiques.....	5
I.4. Les antioxydants.....	6
I.4.1.Généralités .....	6
I.4.2.Définition .....	7
I.4.3.Classification des antioxydants.....	8
I.4.3.1. Selon l'origine.....	8
I.4.3.2. Selon leurs mécanismes d'action .....	10
I.4.3.3. Selon la nature chimique dans les aliments.....	10
I.4.3.3.1. Antioxydants synthétiques .....	11
I.4.3.3.2. Antioxydants synergiques .....	11
I.4.3.3.3. Antioxydants naturels .....	11
I.5.Les antioxydants d'origine végétale (composés phénoliques).....	12

#### Chapitre 2 : Les polyphénols

I.1-Généralités.....	13
I.2-Définition.....	13
I.3. Les principales sources alimentaires.....	14
I.4.Rôles biologiques.....	14

I.5. Classification des composés phénoliques .....	15
--	----

### **Chapitre 3 : Les méthodes d'extraction**

I.1 Généralités.....	19
I.2. Différentes méthodes d'extraction .....	19
I.2.1. Les méthodes classiques .....	19
I.2.2 Les méthodes alternatives.....	20
I.2.2.1. Extraction assistée par ultrason .....	20
I.2.2.2. Extraction assistée par micro- ondes (EAM).....	21
I.2.2.3. Extraction par fluide supercritique (EFS).....	23
I.2.2.4. Extraction par solvant accéléré (ESA).....	25

### **Chapitre 4 : La plante objet d'étude**

I.1. Définition.....	27
I.2. Classification .....	27
I.3. Composition .....	27
I.4. Effets pharmaceutiques .....	27
I.5. Utilisation des polyphénols de raisin.....	28

## **Partie expérimentale**

### **Matériel et méthodes**

I.1. Matériel végétal.....	30
----------------------------	----

I.2. Extraction.....	31
I.2.1. But de l'utilisation de l'ASE.....	31
I.2.2. extraction par solvants accélérée (ASE) .....	31
I.2.3. Calcul de rendement.....	32
I.3. Dosage des polyphénols totaux.....	33
I.3.1. Principe.....	33
I.3.2. Expression des resultats.....	33
I.4. Evaluation de l'activité antioxydante .....	34
I.4.1. La spectroscopie de résonance paramagnétique par électron (EPR) .....	34
I.4.2. Test de piégeage DPPH .....	36
I.4.2.1. Principe .....	36
I.5. Produits chimiques et matériel.....	38
I.6. Analyses statistiques.....	38

## **Résultats et discussion**

### **I. Résultats**

I.1. Les rendements d'extraction des extraits des feuilles de vigne.....	39
I.2. Dosage des polyphénols totaux.....	41
I.3. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de vigne.....	44
I.3.1. La spectroscopie de résonance paramagnétique par électron EPR.....	44
I.3.2. Piégeage du radical libre DPPH.....	47
Discussion .....	50
Conclusion et perspectives .....	55

## **Références bibliographiques**

## Introduction

Depuis la nuit des temps, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition contre les maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria (**Iserin, 2001**).

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et que les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu car l'efficacité des médicaments décroît vue leurs effets secondaires sur la santé publique (**Iserin, 2001**).

Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO). Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le vieillissement et le cancer et indirecte sur la peroxydation des lipides des denrées alimentaires. Quelque soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides. En appuyant sur cette vision, un renouveau de la phytothérapie vers cette vague verte qui produit une foule des antioxydants à fin de contrer et piéger ces oxydants (**Small et Catling, 2000**).

En effet, les antioxydants naturels font l'objet de nombreuses recherches et une nouvelle haleine vers l'exploitation des métabolites secondaires généralement et les polyphénols particulièrement tant dans la santé et vis-à-vis des maladies pernicieuses (cancer) que dans l'industrie agro-alimentaire. Ces composés sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques : antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-carcinogènes. Notant que l'efficacité puissante de ces substances à stopper les réactions radicalaires en neutralisant les radicaux libres est due principalement à leurs structures phénoliques avec la présence des groupements hydroxyles (**Small et Catling, 2000**).

Pour cela, les progrès dans le domaine des antioxydants sont accentués d'où le nombre de plantes médicinales disponibles commercialement est de l'ordre de 1800 espèces aux Etats-Unis (**Small et Catling, 2000**). Entre 1940 et 2002, 40 % des médicaments anticancéreux étaient des produits naturels et leurs dérivés, par contre seulement 8 % ont été synthétiques et même imités de ces produits (**Newman et al., 2003**).

Comparativement des pays du Maghreb, la flore algérienne est représentée par 3000 espèces et 1000 genres (**Hanifi, 1991**), celle de la Tunisie compte 2103 espèces et 742 genres (**Nabli, 1991**), alors que la flore totale marocaine est représentée par 4200 espèces et sous espèces avec 940 genres et 135 familles (**Ibn Tatou et Fennane, 1991**).

Un encouragement à la consommation d'aliments d'origine végétale riches en polyphénols constitue désormais une des principales recommandations en santé publique. Parmi les antioxydants végétaux, les polyphénols apparaissent parmi les plus efficaces quant à leurs effets protecteurs dans l'organisme (**Gee et Johnson, 2001**).

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (**Gee et Johnson, 2001**).

De nombreuses études sont en faveur d'un impact positif de leur consommation sur la santé. En effet, les polyphénols pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme le cancer (**Brown et al., 1998**) , les maladies dégénératives et cardio-vasculaires (**Paganga et al.,1999**).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des antioxydants naturels en évaluant les propriétés antioxydantes des polyphénols de cinq (05) variétés des feuilles de vigne d'origine italienne et algérienne.



# **Partie bibliographique**

### I. Le stress oxydant et les espèces oxygénées réactives :

#### I.1. Généralités :

Certaines recherches scientifiques récentes ont mis en évidence l'existence des facteurs communs responsables aussi bien du vieillissement que de maladies liées au stress oxydant comme le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les maladies neuro-dégénératives (Parkinson et Alzheimer), et aussi certaines allergies et autres maladies chroniques. Ces diverses maladies auraient, entre autres, la même composante qui permet au bois de brûler, à l'huile de rancir, à l'aliment d'altérer ou au fer de rouiller. L'un des principaux acteurs de tout cela est l'oxydation de l'oxygène (**Le Cren, 2004**).

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA). Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers le milieu des années 50, Gerschman et Hartman avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory» pour expliquer le processus de vieillissement (**Delattre et al., 2005**).

En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, la superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des EOA dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants (**Delattre et al., 2005**).

#### I.2. Définition :

Le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants et les systèmes de défenses (antioxydants) (**Pincemail et coll., 2002 ; Sorg., 2004 ; Koechilin., 2006**), en faveur des premiers et impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène (**SIES, 1991 ; Pelletier et al., 2004**). Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme (**Haleng et al. , 2007**), soit d'origine génétique (**Sies H, 1997**).

Un stress oxydatif pourra être induit lors de la surproduction d'espèces réactives et /ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement,

soit par défaut de synthèse (Pelletier et al., 2004). Ce déséquilibre conduit à des endommagements cellulaires et tissulaires souvent irréversibles (Sorg, 2004) allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neuro-dégénératives et le diabète (Lehucher et al, 2001 ; Sorg., 2004 ; Valko et al., 2007).

### I.3. Les radicaux libres et les espèces réactives oxygénées :

Le dioxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une faible partie d'O<sub>2</sub> en métabolites toxiques, nommés radicaux libres organiques (Meziti, 2007).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou électron non apparié) sur leur couche externe (Toussant, 2008). Les espèces oxygénées réactives (EOR), font partie des radicaux libres (Dhalla et al., 2000). Les principales ERO sont des formes réduites de O<sub>2</sub>. Les ERO incluent aussi des espèces non radicalaires qui ne sont pas réactives mais peuvent être des précurseurs de radicaux (Favier, 2003).

**Tableau 1** : Espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.

ERO radicalaires	Symbole	Références
Anion superoxyde Radical hydroxyle radicaux oxyle peroxyde le monoxyde d'azote	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> OH <sup>•</sup> RO <sup>•</sup> ROO <sup>•</sup> NO <sup>•</sup>	<b>Baudin, 2006 ; Aron et Kennedy, 2008.</b>
ERO non radicalaires	Symbole	
le peroxyde d'hydrogène le dioxygène singlet l'acide hypochloreux l'ozone et le peroxydinitrite	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> O <sub>2</sub> HOCl O <sub>3</sub> ONOO <sup>-</sup>	

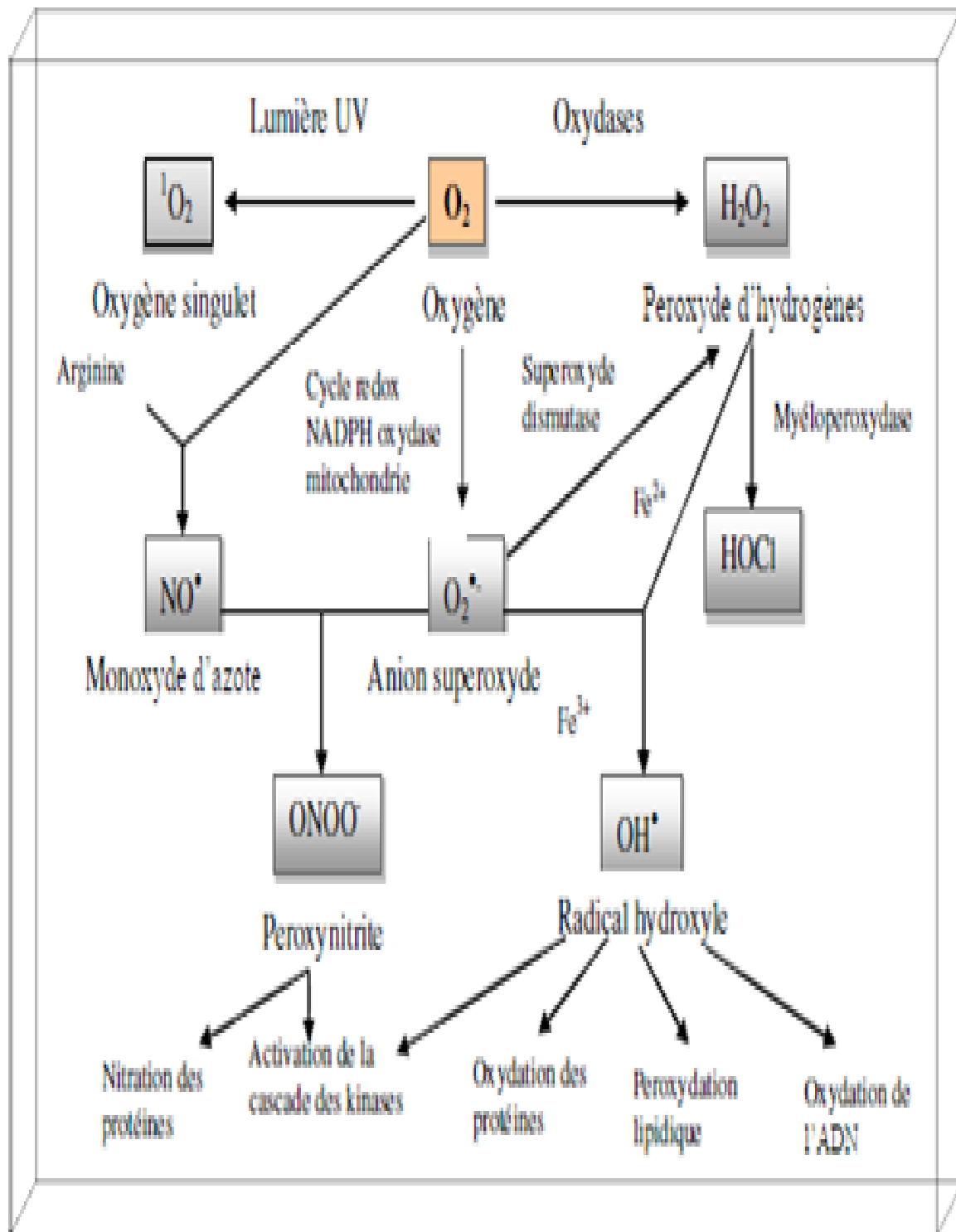


Figure 1 : Les processus de formation des ERO (Favier, 2003).

**I.3.1. Les modes de production des ERO :**

**Tableau 2 :** Les sources exogènes et endogènes du stress oxydant.

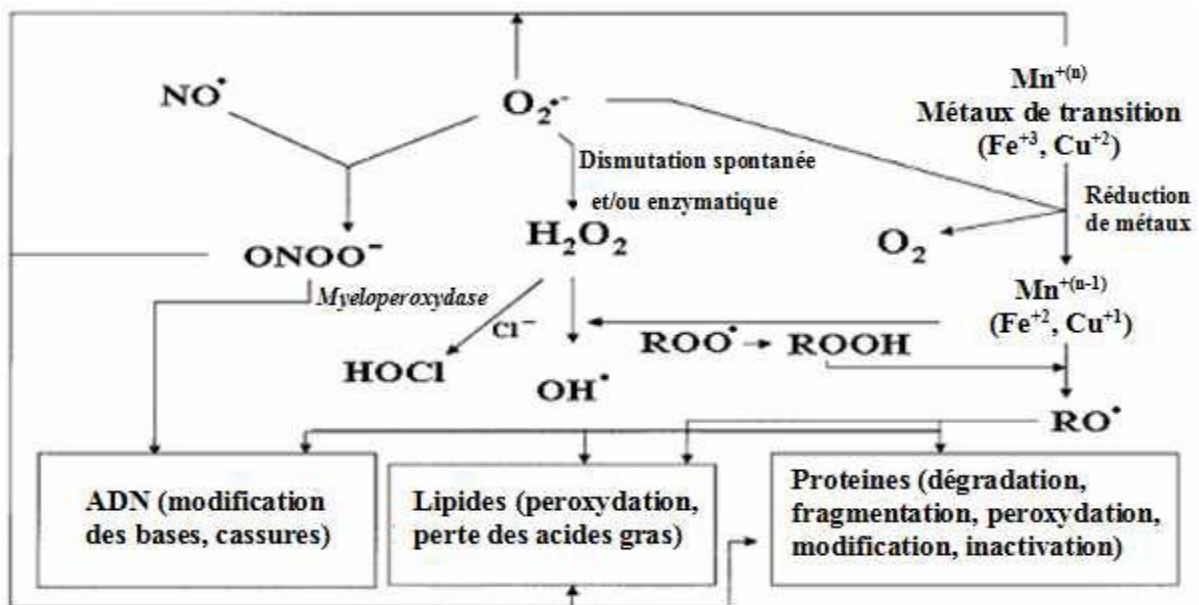
Mode exogène		Mode endogène	Références
Mode de vie	Environnement		
-Tabagisme <sup>1</sup>	-Pollution <sup>1</sup>	-La respiration <sup>1</sup>	<b>1 : Afonso et al. 2007</b> <b>2 : J. Haleng et al., 2007</b> <b>3 : Favier, 2003</b> <b>4 : Beani, 1995</b> <b>5 : Martinez - Cayuela, 1995</b> <b>6 : pincemail, 2002 ; Valko et al., 2006</b> <b>7 : Oldham et al., 1998</b> <b>8 : Bonnefont-Rousselot et al., 2003</b>
-Mauvaise alimentation <sup>1</sup>	-Tabac Pollution <sup>1</sup>	-La réponse immunitaire (la flambée respiratoire) <sup>6</sup>	
-Faible consommation en fruits et légumes <sup>2</sup>	-Soleil <sup>1</sup>	-L'apoptose <sup>6</sup>	
-Alcool <sup>1</sup>	-Ozone <sup>2</sup>	-La xanthine oxydase <sup>7</sup>	
-Médicaments` (antibiotiques et anticancéreux) <sup>2</sup>	-Amiante <sup>1</sup>	-Les ions métalliques (fer et cuivre) <sup>7</sup>	
-Pilule contraceptive <sup>2</sup>	-Silice <sup>3</sup>	-La biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes <sup>7</sup>	
-Exposition au soleil <sup>2</sup>	-Suie, goudron <sup>2</sup>	-Le catabolisme de certains xénobiotiques <sup>7</sup>	
-Effort physique intense <sup>1</sup>	-Contacts avec des substances cancérogènes <sup>2</sup>	- La détoxification des drogues et des produits métaboliques toxiques <sup>8</sup>	
-Stress <sup>2</sup>	- Rayons ultra-violet <sup>1</sup>		
	-Radiations ionisantes X <sup>1</sup> ou gamma <sup>4</sup>		
	-Xénobiotiques (toxines, pesticides et herbicides) <sup>5</sup>		

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), sont également responsables de la synthèse de radicaux libres. L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres (**Favier, 2003**).

Une partie des aliments consommés est oxydée et contient différents types d'oxydants tels que les peroxydes, les aldéhydes, les acides gras oxydés et les métaux de transition (**Ames, 1986**).

**I.3.2. Les principales cibles biologiques des EOA et les actions néfaste de ceux-ci dans les tissus biologiques :**

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation des foetus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppressions (Favier, 2003).



**Figure 2** : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les espèces oxygénées réactives (Kohen et Nyska, 2002).

#### I.4. Les antioxydants :

##### I.4.1. Généralités :

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses anti oxydantes (Haleng et al., 2007). Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité et nos alliés pour lutter contre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres (Bartosz, 2003). On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes,

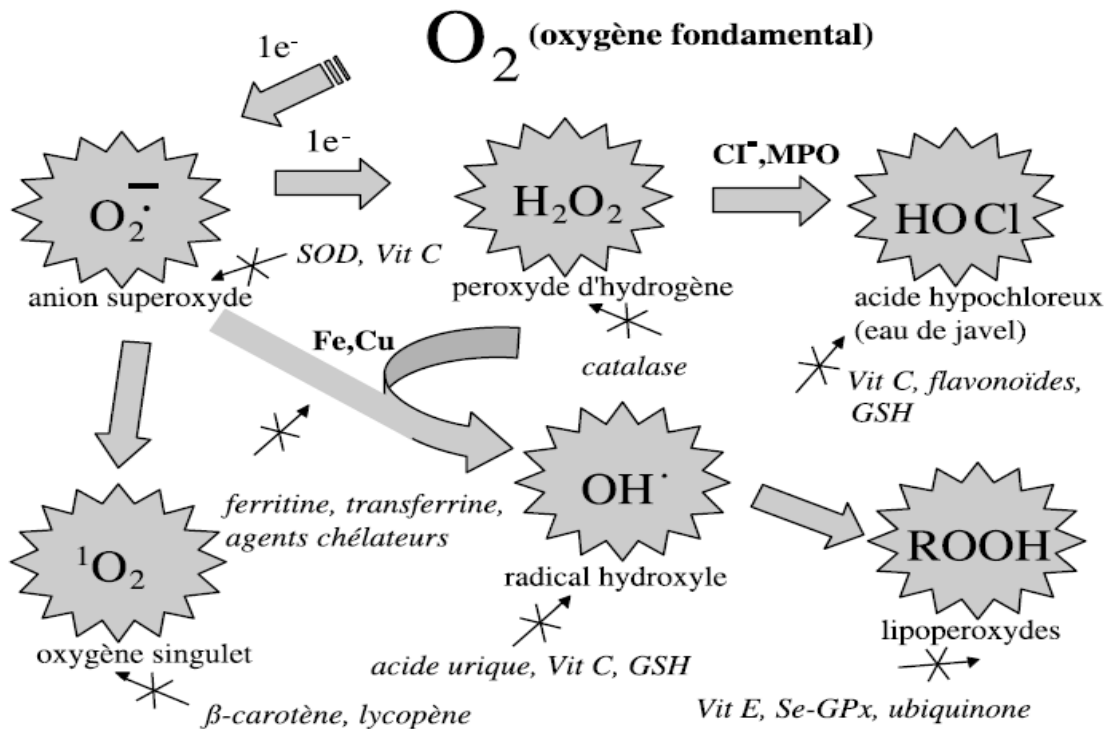
ubiquinone (le coenzyme Q10), flavonoïdes, Les polyphénols, glutathion , histidine dipeptide ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase SOD, les glutathion peroxydase et réductase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes anti oxydantes et l'acide urique et la bilirubine (Haleng et al., 2007).

### I.4.2. Définition :

Les antioxydants sont définis comme «toute substance endogène ou exogène qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat» (Pastre et Priymenko, 2007), par la libération d'un ou plusieurs électrons (Pokorny et al., 2001).

Certains antioxydants sont fabriqués par le corps comme les enzymes, d'autres proviennent de l'alimentation (Pokorny et al., 2001), soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire (Tanguy et al., 2009), l'alimentation qui a une plus grande hétérogénéité comme les vitamines, les minéraux et les métabolites secondaires (les composés phénoliques). D'autres sont à la fois synthétisés en faible quantité par l'organisme et apportés par l'alimentation. C'est le cas par exemple de la cystéine et la Coenzyme Q10 (Pokorny et al., 2001).

Il y a actuellement, un regain d'intérêt pour les composés phytochimiques comme sources d'antioxydants naturels. L'objectif est de les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques afin de remplacer les antioxydants de synthèse, qui sont la cause de risques potentiels pour la santé vu leurs effets carcinogènes ou mutagènes (Le Cren, 2004). De plus, ils sont moins bien absorbés par notre corps que ceux de sources naturelles. Ce qui est le cas par exemple de la vitamine E. Des études ont montré que la vitamine E de synthèse, bloque l'activité de cette vitamine naturelle au niveau cellulaire (Pelli et al., 2003).



**Figure 3** : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Milbury et Richer, 2008).

### I.4.3. Classification des antioxydants :

#### I.4.3.1. Selon l'origine :

Les antioxydants se divisent selon l'origine en antioxydants endogènes et exogènes :

**Tableau 3** : Les antioxydants endogènes et exogènes.

	Superoxyde dismutase (SOD)	Références
Antioxydants endogènes (enzymes ou protéines) <sub>1</sub>	Catalase (CAT)	1 : Mika <i>et al.</i> , 2004 ; Arora <i>et al.</i> , 2002
	Glutathion peroxydase (GPX)	
	Glutathion réductase (GRD)	
	Glutathion transférase (GRT)	
	Peroxyredoxine (PRX)	
	Peroxydase (POX)	



<b>Antioxydants exogènes</b>	<b>Médicamentaires</b>	<b>Probucol</b> <sub>2</sub>	<b>2 : Bossokpi, 2002</b>
		<b>N-acétylcysteine</b> <sub>2</sub>	
	<b>Alimentaires</b>	<b>Vit C</b> <sub>3</sub>	<b>3 : CHEICK TRAORE 2006</b>
		<b>Vit E</b> <sub>4</sub>	
		<b>Caroténoïdes</b> <sub>5</sub>	
		<b>Les oligoéléments (Cu, Zn, Se, Mn, Fe)</b> <sub>6</sub>	
		<b>antioxydants d'origine végétale (les composés phénoliques)</b> <sub>7</sub>	
	<b>4 : Maydani., 2000</b>		
	<b>5 : Causse C., 2005</b>		
	<b>6 : Berger, 2006</b>		
	<b>7 : Bouldjadj, 2009</b>		

Les antioxydants exogènes sont doués de plusieurs rôles dans l'organisme :

**Tableau 4 : Rôles biologiques des antioxydants exogènes.**

<b>Antioxydants</b>	<b>Rôles biologiques</b>	<b>Références</b>
<b>Probucol</b>	Hypocholestérolémiant, prévient de l'athérogénèse <sub>1</sub>	<b>1 : Bossokpi, 2002</b>
<b>N-acétylcysteine</b>	Régénère la glutathion, traite les blessures pulmonaires dues aux ERO <sub>1</sub>	
<b>Vit C</b>	Neutralise les radicaux libres <sub>2</sub> , régénère la vit E <sub>1</sub> , protège les biomembranes et les lipoprotéines <sub>3</sub>	<b>2 : Cheick Traore, 2006</b>
<b>Vit E</b>	Piège les radicaux libres, corrige les conséquences d'un déficit en sélénium, ralentisse le vieillissement et diminue l'athérosclérose <sub>4</sub> , inhibe la peroxydation <sub>5</sub> , efficace en cas d'Alzheimer <sub>6</sub>	
<b>Caroténoïdes</b>	Capte l'oxygène singulet, termine les réactions en chaine de lipopéroxydation, protège la structure cellulaire contre l'agression oxydante <sub>7</sub>	<b>3 : Bouldjadj, 2009</b>
<b>Les oligoéléments (Cu, Zn, Se, Mn, Fe)</b>	cofacteurs aux enzymes antioxydantes <sub>8</sub> , le sélénium protège les cellules et leurs constituants contre l'attaque radicalaire <sub>9</sub> . Le zinc et le cuivre jouent un rôle dans le fonctionnement de SOD. Le zinc protège les groupements thiols (SH) des protéines contre l'oxydation induite par le fer <sub>3</sub>	<b>4 : Maydani., 2000</b> <b>5 : Vergely et rochette. 2003 ;</b> <b>Toussaint et al., 2003</b> <b>6 : Burton et ingold, 1986</b> <b>7 : Allard et al., 1994</b> <b>8 : Berger, 2006</b> <b>9 : Lhuillier, 2007</b>

**I.4.3.2. Selon leurs mécanismes d'action :**

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés (antioxydants primaires ou radicalaires ou vrais) (Frankel *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2005) ou en épurant les radicaux libres oxygénés formés (antioxydants secondaires ou préventifs) (Rolland, 2004). En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (Gardès-Albert, 2003).

**Tableau 5 : Les antioxydants primaires et secondaires (Pokorny *et al.*, 2001; Le Cren, 2004).**

Antioxydants primaires	Antioxydants secondaires naturelles		
Enzymes Cytosoliques	Vitamines	Minéraux	Phytochimiques
-GPX (Glutathion Peroxydase)	-Vit C	-Sélénium	-Terpènes
-GRD (Glutathion réductase)	-vit E (Tocophérols)	-Zinc	-Polyphénols
- GRT (Glutathion transférase)	-Vit Q (Ubiquinone)	-Manganèse	
-SOD (Superoxyde Dismutase)	-Vit A (Rétinol)	-Cuivre	
-(CAT) Catalase	-Vit B5 (A. pantothénique)	-Magnésium	
		-Anhydride sulfureux (SO <sub>2</sub> )	

**I. 4.3.3. Selon la nature chimique dans les aliments :**

Les antioxydants sont classés dans trois catégories différentes (naturelles, synthétiques et synergiques) (Pelli et Lyly, 2003).

#### **I.4.3.3.1. Antioxydants synthétiques :**

Les antioxydants synthétiques sont généralement préparés en laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques (**Pelli et Lyly, 2003**). Vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité (**Guo et al, 2006**) par rapport aux antioxydants naturels (**Lisu et al., 2003**), ils sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité (**Guo et al., 2006**). Les antioxydants de synthèses sont introduits dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés et parfois aussi dans des phases aqueuses ou se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases (**Perrin., 1992**). Malgré la puissance de leur activité antioxydante, l'excès de ces antioxydants synthétiques peut être toxique, responsable de mutagenicités et peut même présenter un danger sur la santé humaine (**Williams, 1993, 1994**).

Par conséquent, et vu le désir des consommateurs de retourner à l'utilisation des produits naturels, la recherche des sources naturelles d'antioxydants a provoqué l'intérêt des grands laboratoires spécialisés (**Frankel., 1993**).

#### **I.4.3.3.2. Antioxydants synergiques :**

Les antioxydants synergiques sont des substances qui ne sont guère actives en tant qu'antioxydants, et dont les propriétés apparaissent surtout en présence des autres antioxydants. Il en est ainsi des lécithines, des acides citrique et tartrique, des acides aminés, de certains flavonoïdes. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Certains produits ont un effet inhibiteur de la décomposition des hydroperoxydes, et d'autres semblent régénérer des antioxydants, comme les tocophérols ou les dérivés de l'acide ascorbique à partir de leurs formes oxydées.

C'est sans doute à ce groupe des synergistes qu'il faut rattacher les lipoaminoacides, qui trouveraient leurs applications spécifiques en cosmétologie. Le glutathion a également été proposé en formulation cosmétique (**Marie-claude, 2004**).

### **I.4.3.3.3. Antioxydants naturels :**

Dans l'industrie alimentaire, l'ajout d'antioxydants naturels est une technique complètement nouvelle. Depuis à peu près 1980, les antioxydants naturels sont apparus comme alternative aux antioxydants synthétiques, ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs (**Pelli et Lyly, 2003**). Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo*. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E...etc (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres.

Les antioxydants naturels sont présents dans presque toutes les plantes, tous les micro-organismes, les champignons et même dans les tissus animaux. Le groupe le plus important d'antioxydants naturel comprend la vitamine E (tocophérol), les flavonoïdes et autres composés végétaux (**Pelli et Lyly, 2003**). Les antioxydants naturels représentent déjà un réservoir important de composés pouvant être utilisés de manière pharmacologique. A l'heure actuelle, l'utilisation d'un bon nombre d'entre eux reste limitée à une administration non pharmacologique, ne requérant pas de prescription médicale. Ces produits naturels sont vantés notamment pour leurs propriétés cosmétiques, énergétiques et antvieillessement.. Il en va de même de l'intérêt préventif/thérapeutique de certaines mesures diététiques visant à enrichir l'apport nutritionnel en certains de ces agents antioxydants (**Petrault, Bastide, Cotelle et al., 2004**).

### **I.5. Les antioxydants d'origine végétale (composés phénoliques) :**

Le recours aux plantes médicinales aux propriétés antioxydantes constitue un des plus intéressants axes de recherche à explorer (**Pietta., 2002**). Les polyphénols, représentés par les flavonoïdes, les acides phénolique, les tannins, coumarines, stillibènes et les lignanes, suscitent un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs (**Beecher, 2003 ; Williams et Grayer, 2004; Kueny-Stotz, 2008**). Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication, probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant. Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardio-vasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires (**Hemingway, 1992 ; Rock., 2003 ; Boizot et Charpentier, 2006 ; Bassas et al., 2007**).

### I. Les polyphénols :

#### I.1-Généralités :

Les études épidémiologiques ont clairement montré que les régimes riches en aliments végétaux protègent les humains contre les maladies dégénératives telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires (**Manach et al., 2004**), l'ostéoporose ou les maladies inflammatoires (**Hemingway, 1992 ; Rock., 2003 ; Boizot et Charpentier, 2006 ; Bassas et al., 2007**). Les aliments végétaux contiennent des fibres, vitamines, phytostérols, composés soufrés, caroténoïdes et acides organiques, qui contribuent aux effets sur la santé, mais ils contiennent aussi une variété de polyphénols, qui sont de plus en plus considérés comme agents protecteurs efficaces (**Manach et al., 2004**). Ils suscitent un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs (**Beecher, 2003 ; Williams et Grayer, 2004 ; Kueny-Stotz, 2008**).

On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires. *In vitro*, les composés phénoliques présentent des activités antioxydante, antimicrobienne, antivirale, anti-inflammatoire et anticancéreuse. Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\bullet\text{OH}$ ) et les superoxydes ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) et aussi à leur affinité pour une grande variété de protéines dont certains enzymes et récepteurs (**Bruneton, 2009**).

#### I.2-Définition :

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire (**Mompon et al, 1996 ; Bianco A et al, 2006 ; He., 2008**). Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (**Richter., 1993**) ; racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois à des proportions variables. Les plus représentés sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, et les tanins (**Lugasi et coll., 2003**). Le terme « phénol » englobe approximativement 10000 composés naturels identifiés (**Martin et Andriantsitohaina,2002 ;Druzyuka et al.,2007**). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6

carbones, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (**Bruneton., 1999 ; Balasundram et al.,2006**). Ces structures peuvent également être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures (**Bruneton, 2009**). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (**Harbone, 1993**). Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthonnes et autres phloroglucinols (**Bruneton, 1993**).

### **I.3. Les principales sources alimentaires :**

Les principales sources alimentaires sont Les fruits et les légumes qui contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols. Le thé, le café, le jus de fruits, les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs apportant le reste (**Middleton et al., 2000**).

Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le thé, le cacao, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des EOA et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (**Defraigne, 2005 ; Vincent, Taylor, 2006**).

### **I.4. Rôles biologiques :**

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (**Leong et Shui, 2002**). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires (**Hennebelle et al., 2004**).

**-Chez les végétaux :** Les composés phénoliques participent à deux principaux processus de l'activité des plantes : la photosynthèse et la respiration. De plus, ils interviennent dans d'autres processus tels que : la croissance, la germination, la morphogénèse des tiges et dans le processus de lignification (**Merghem., 2009**), différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation (**Heimeur et al., 2004**), la pigmentation des fleurs (**Crozier., 2003**). Ils jouent un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement, en particulier contre les radiations UV, les attaques microbiennes, lutte contre

les prédateurs... (Moheb *et al.*, 2011), l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ces propriétés antifongique et antibactérienne (Heimeur *et al.*, 2004).

Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies (Brzozowska *et al.*, 1973).

Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur, nous citons : les flavanones sont responsables de l'amertume des *Cistus* et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée (Dubois *et al.*, 1977), les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs.

**-Chez l'homme :** Les polyphénols présents dans les aliments consommés sont en effet capables d'abaisser la pression artérielle, d'empêcher l'oxydation des LDL (lipoprotéines de faible densité), d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, d'empêcher l'agrégation plaquettaire, de stabiliser les cellules immunitaires (Martin et Andrantsitohaina., 2002) et d'inhiber la formation de cellules spumeuses dans les aortes (Manach *et coll.*, 2005). Ils ont été décrits comme antioxydants, des anti-inflammatoires, des anti-allergènes, des anti-thrombotiques et des anti-tumoraux (Hanhineva., 2010), aussi comme réducteurs du risque d'infarctus du myocarde de 11% lors de la consommation de trois tasses de thé par jour (Peters *et al.*, 2001).

**-Dans l'industrie cosmétique :** Les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau (Hennebelle *et al.*, 2004).

**-Dans l'hygiène alimentaire :** Ils assurent une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique (Hennebelle *et al.*, 2004).

**-Chez les animaux :** L'administration aiguë ou chronique de polyphénols chez des modèles animaux a montré des effets hypoglycémiantes sur la glycémie (Dembinska *et al.*, 2008).

### I.5. Classification des composés phénoliques :

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (Clifford., 1999 ; D'Archivio *et al.*, 2007).


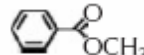
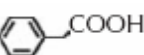
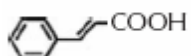
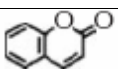
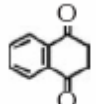
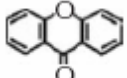
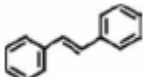
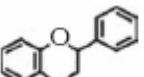
**Tableau 6 :** Classification des polyphénols.

Polyphénols simples		Références	
1.Acides phénoliques <sup>1</sup>	Dérivés de l'A. hydroxybenzoïque <sup>2</sup> (Les plus répandus : l'A. salicylique et l'A. gallique <sup>3,4</sup> )	<b>1 : Bruneton J., 2008</b> <b>2 : Manach et al., 2004</b> <b>3 : Cseke et al., 2006</b> <b>4 : Bruneton, 2009</b> <b>5 : Skerget M et al., 2005</b> <b>6 : Chira et al., 2008</b> <b>7 : Andersen et Markham, 2006</b> <b>8 : Hertog et al., 1992</b> <b>9 : Manach, 1998</b> <b>10 : Ribeiro et al., 1999</b> <b>11 : Vitrac et al., 2005</b> <b>12 : Dean, 1963</b> <b>13 : Harborne, 1998</b> <b>14 : Haslam, 1998</b> <b>15 : Valls et coll., 2009</b> <b>16 : Ignat et coll., 2011</b>	
	Dérivés de l'A. hydroxycinnamique <sup>5</sup> (Le plus répandu : l'A. chlorogénique) <sup>2</sup>		
2.Flavonoïdes <sup>6</sup>	Au sens strict		Chalcones et aurones <sup>7</sup>
			Flavanones (Eriodictyol, Naringénine, Hespéritine) <sup>2</sup>
			Flavonols (Quercétine, Kempférol, Rutine) <sup>8,9</sup>
	Au sens large		Flavanols (catéchines <sup>7</sup> ou dérivés de catéchines <sup>6</sup> )
			Anthocyanes (Pélagonidine, Cyanidine, Malvidine) <sup>10,11</sup>
			Isoflavonoïdes <sup>7</sup>
3.Alcools phénoliques			
4.Phénylpropanoïdes <sup>3,4</sup>	Coumarines (les plus fréquentes : l'umbelliférone, l'aesculetine, la scopoletine) <sup>12</sup>		
	Phénylpropènes <sup>3,4</sup>		
	Lignanes <sup>3,4</sup>		
	Lignines <sup>3,4</sup>		
5.xanthones <sup>4</sup>	/		
6.stilbènes	Résveratrol <sup>3,4</sup>		
7.Quinones et émodoles <sup>13</sup>	Benzoquinones (arthropodes)		
	Naphtoquinones (angiospermes)		
	Quinones isopréniques (photosynthèse et respiration)		
	Anthraquinones		



<b>Polyphénols complexes (tanins)</b>		
<b>Tanins hydrolysables</b> <sup>13</sup>	<b>Tanins condensés (proanthcyanidines)</b> <sup>14</sup> : <b>Procyanidines et prodelphinidines</b> <sup>15,16</sup>	

**Tableau 7** : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de carbone	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides phénols	Acide gallique	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	acétophénones	Gallacetophénone	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acide phénylacétique	Acide <i>p</i> -hydroxyphénylacétique	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinamiques	Acide <i>p</i> -coumarique	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Coumarines	Esculitine	
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinones	Juglone	
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Mangiferine	
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resveratrol	
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes	Naringénine	

### I. Les méthodes d'extraction :

#### I.1.Généralités :

Les substances naturelles connaissent un intérêt croissant pour des applications dans de nombreux produits de consommation. Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. Il existe donc un besoin de production de substances bioactives isolées, concentrées et purifiées, pour une utilisation dans un large champ d'application (cosmétiques, pharmaceutiques, additifs nutritionnels...).

Les procédés d'extraction sont basés sur la différence de solubilité des composés présents dans un mélange et dans un solvant. Nous nous intéressons ici à l'extraction à partir d'un système solide, la plante. Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits à haute valeur ajoutée présents dans les plantes. Ces techniques peuvent être dites conventionnelles (Utilisées depuis longtemps) et nouvelles (développées plus récemment). Une large gamme de technologies est disponible pour l'extraction de composants actifs et Huiles essentielles à partir de plantes médicinales et aromatiques. Le choix dépend de l'économie La faisabilité et l'adéquation du processus à la situation particulière, il existe des différents procédés de production d'extraits de plantes médicinales et d'huiles essentielles (**Luque et al, 1998**).

#### I.2. Différentes méthodes d'extraction :

##### I.2.1.Les méthodes classiques :

Les techniques classiques pour l'extraction par solvants de molécules actives à partir des matrices végétales sont basées sur le choix du solvant couplé à la température et/ou à l'agitation. Les techniques classiques existantes permettant d'extraire ces principes actifs incluent : Soxhlet, l'hydro-distillation et la macération avec un mélange alcool-eau ou une graisse chaude. L'extraction par Soxhlet, qui a été employé pendant longtemps, est une technique standard et la référence principale pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide (**Luque deCastro et Garcia-Ayuso, 1998**).

### I.2.2. Les méthodes alternatives :

L'extraction de Soxhlet est une technique généralement bien établie. Les diverses applications, la bonne reproductibilité, l'efficacité et l'aisance avec laquelle les extraits sont manipulés sont les avantages spécifiques de l'extraction par Soxhlet ; la simplicité de l'équipement permet à cette méthode de se maintenir par rapport à de nouvelles techniques telles que les extractions par ultrasons, assistée par micro-ondes, par fluide super critique ou par solvants accélérées, malgré une meilleure vitesse d'extraction de ces dernières. Le soxhlet souffre également de sa consommation d'une quantité importante de solvant dont quelques uns ont récemment été remis en cause en raison de leur toxicité (**Luque-Garcia et Luque de Castro, 2003**).

Quelques améliorations pourront cependant être envisagées et apportées au système d'extraction par Soxhlet (dispositifs auxiliaires de pompe à vide, unité de séparation par membrane, source d'ultrasons et de micro-ondes, fluides supercritiques) ; elles pourraient en améliorer l'efficacité tout en préservant ses principaux avantages actuels (**Luque-Garcia et Luque de Castro, 2003**).

#### I.2.2.1. Extraction assistée par ultrason :

Les ondes sonores génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. À la différence des ondes électromagnétiques, les ondes sonores peuvent propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion et de compression lors de la propagation dans le milieu. L'expansion peut créer des bulles qui se forment, se développent et s'effondrent dans un liquide. Près d'une surface solide, l'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse. Le jet liquide a un fort impact sur la surface solide (**Luque-Garcia et Luque de Castro, 2003**).

L'extraction par ultrason est une alternative peu coûteuse, simple et efficace aux techniques conventionnelles d'extraction. Les principaux avantages de l'utilisation des ultrasons dans l'extraction de solide-liquide incluent :

- L'augmentation de la cinétique et du rendement d'extraction,
- Réduction de la température de fonctionnement permettant l'extraction des composés thermolabiles,
- Faible coût de l'appareillage et facilité de l'opération par comparaison à d'autres nouvelles techniques d'extraction telles que l'extraction assistée par micro-ondes,

- Possibilité d'utilisation de n'importe quel solvant ce qui permet d'intervenir dans l'extraction d'une large variété de composés naturels (Chemat, Lagha *et al.* 2004; Li, Pordesimo *et al.* 2004 ; Luque-Garcia et Luque de Castro 2004).

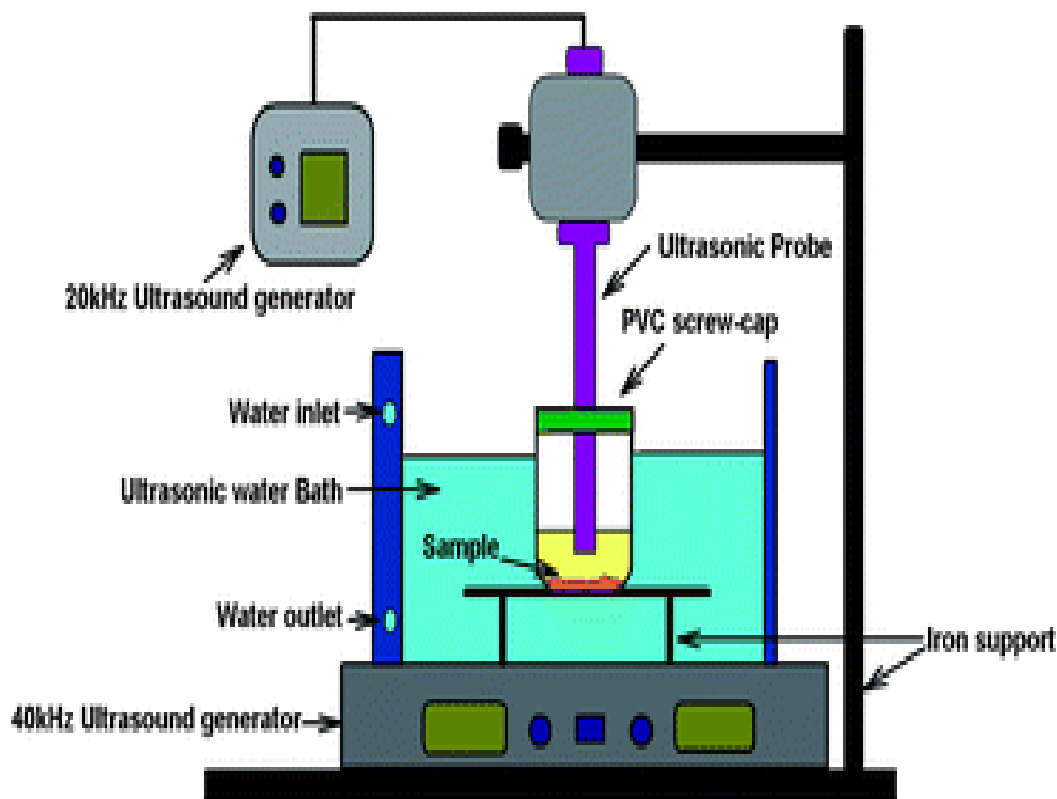


Figure 4 : Représentation schématique d'un extracteur ultrason (Wang et Weller 2006).

#### I.2.2.2.Extraction assistée par micro- ondes (EAM) :

Les micro-ondes sont des rayonnements électromagnétiques de fréquence allant de 0.3 à 300 GHz. Les micro-ondes domestiques et industrielles fonctionnent généralement à 2.45 GHz, mais sont également utilisées à 0.915 GHz aux Etats-Unis et à 0.896 GHz en Europe. Les micro-ondes peuvent pénétrer les matières biologiques et agir sur les molécules polaires telles que l'eau pour leur communiquer un mouvement de fluctuation ce qui se traduit donc par une augmentation de la température de la matière en question à la profondeur de pénétration, l'extraction assistée par Micro-ondes (EAM) offre un transfert rapide d'énergie et un chauffage simultané de l'ensemble « solvant et matrice végétale solide ». En absorbant l'énergie des micro-ondes, l'eau présente dans la matrice végétale favorise la rupture des cellules facilitant ainsi la libération des produits chimiques de la matrice et améliorant leur extraction (Kaufmann, Christen *et al.* 2001).

**Kratchanova, Pavlova et al., 2004** ont observé à l'aide de la microscopie électronique à balayage que le prétraitement par micro-ondes des peaux fraîches d'orange a mené à des changements destructifs du tissu végétal. Ces changements du tissu végétal dus au chauffage par micro-ondes ont donné une augmentation considérable du rendement de pectine extractible. En outre, la migration des ions dissous a augmenté la pénétration du solvant dans la matrice et a ainsi facilité la récupération des pectines. L'effet de l'énergie des micro-ondes dépend ainsi fortement des caractéristiques diélectriques de la matrice solide et du solvant. Il existe deux types de systèmes disponibles d'EAM dans le commerce : les enceintes d'extraction fermées sous pression et température contrôlées, et les fours à micro-ondes à pression atmosphérique (**Kaufmann et Christen 2002**).

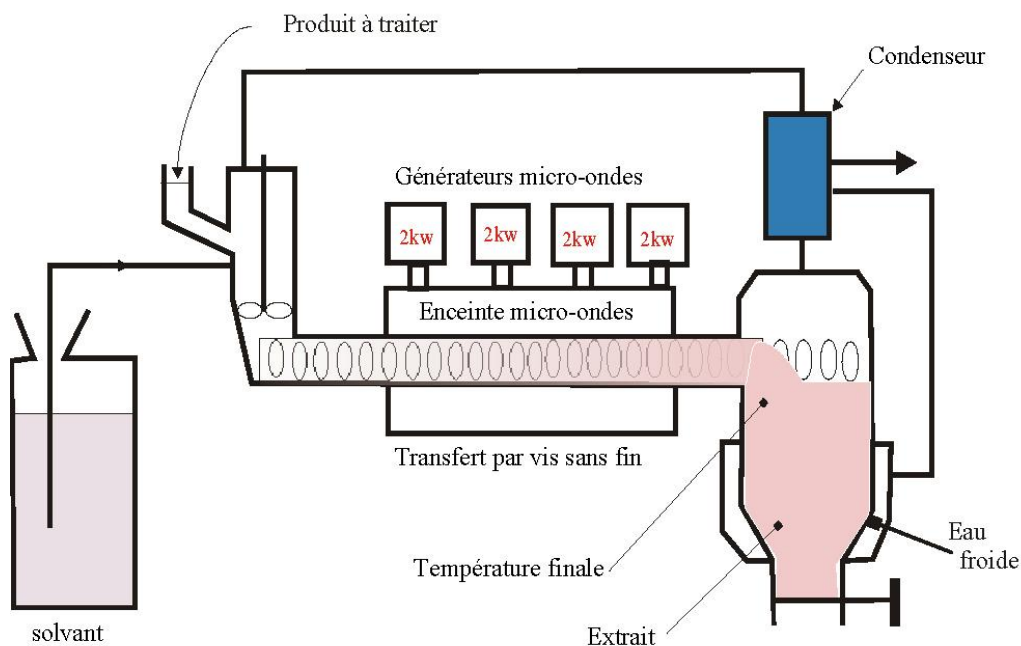
L'EAM a été considérée en tant qu'alternative à l'extraction solide-liquide traditionnelle des métabolites pour plusieurs raisons :

- La réduction du temps d'extraction,
- La réduction de la quantité de solvant utilisée,
- L'amélioration du rendement d'extraction.

Par comparaison avec d'autres techniques modernes d'extraction telles que l'extraction par fluide supercritique, l'EAM présente les avantages de la simplicité d'utilisation et du faible coût.

L'EAM (méthanol à 80%) pourrait nettement réduire le temps d'extraction des saponines de ginseng de 12 h, avec des méthodes conventionnelles d'extraction, à quelques secondes (**Kwon, Belanger et al. 2003**).

Pour l'extraction des polyphénols et de la caféine des feuilles de thé vert, un plus grand rendement d'extraction a été obtenu avec 4 minutes pour l'EAM comparé à 20 h avec une extraction à température ambiante, 90 minutes avec l'extraction assistée par ultrason et 45 minutes pour l'extraction à reflux (**Pan et al., 2003**).



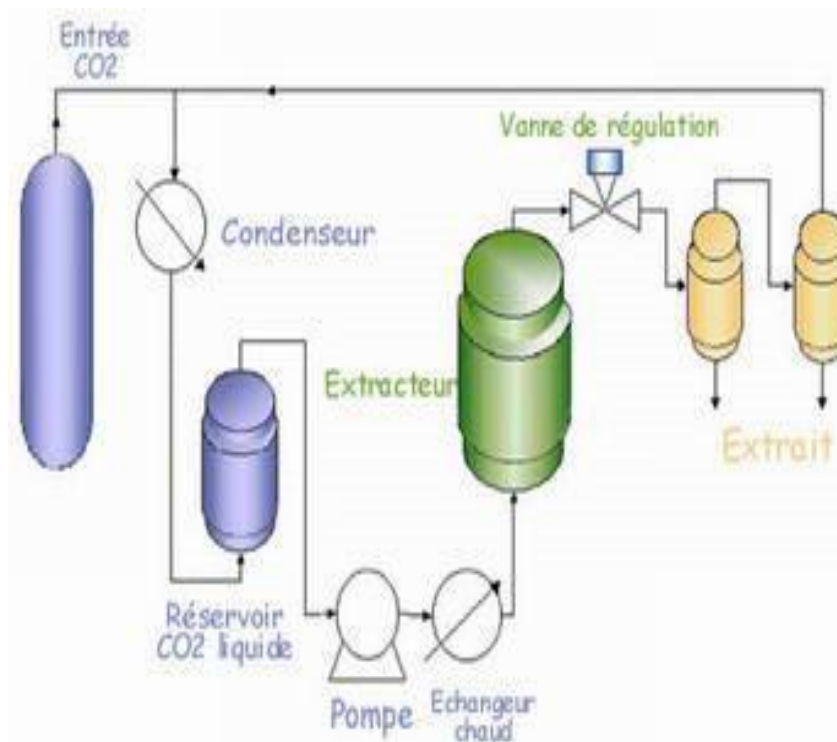
**Figure 5 :** Représentation schématique d'un extracteur microonde (Wang et Weller 2006).

### I.2.2.3.Extraction par fluide supercritique (EFS) :

L'état supercritique d'un fluide est obtenu en menant le gaz au-dessus de sa température critique ou en comprimant le liquide au-delà de sa pression critique. La température critique est la température au-delà de laquelle la phase liquide de la substance ne peut pas exister, quelle que soit la pression ; la pression de vapeur à la température critique est la pression critique (Sihvonen, Jarvenpaa et al. 1999).

Comparé aux solvants liquides, les fluides supercritiques ont plusieurs avantages principaux :

- La puissance de dissolution d'un solvant liquide supercritique dépend de sa densité, qui est fortement réglable en changeant la pression ou/et la température ;
- le fluide supercritique a un coefficient de diffusion plus élevé et une tension superficielle plus faible ainsi qu'une viscosité inférieure à celle d'un solvant liquide, menant à un transfert de masse plus favorable (Sihvonen, Jarvenpaa et al. 1999).



**Figure 6 :** Représentation schématique d'un extracteur par fluide supercritique (Wang et Weller 2006).

Pour développer une EFS réussie, plusieurs facteurs doivent être pris en compte. Ces facteurs incluent :

- le choix du fluide,
- la préparation de la matière végétale
- la définition des conditions d'extraction (Hurren 1999).

Beaucoup de métabolites tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes et les composés glycosidiques sont donc très peu solubles dans le dioxyde de carbone et par conséquent non extractibles. Des techniques visant de surmonter la solubilité limitée des substances polaires dans le CO<sub>2</sub> supercritique ont été proposées (Hamburger, Baumann et al. 2004).

La procédure d'extraction présente des avantages distincts :

- L'extraction des constituants à basse température, qui évite strictement les dommages causés par la chaleur et certains solvants organiques.
- Pas de résidus de solvants.
- Procédure d'extraction respectueuse de l'environnement (Sukhdev et al., 2008).



#### I.2.2.4. Extraction par solvant accéléré (ESA) :

L'extraction par solvant accélérée (ESA) est un processus d'extraction solide-liquide effectué à température élevée, habituellement entre 40 et 200°C et aux pressions entre 10 et 15 MPa. Par conséquent, l'extraction par solvant accéléré est une forme d'extraction par solvant pressurisé qui est tout à fait semblable à l'EFS. L'extraction est effectuée sous pression afin de maintenir le solvant dans son état liquide à température élevée. Le solvant est toujours au-dessous de son état critique pendant l'ESA. La température élevée accélère la cinétique d'extraction et la pression élevée maintient le solvant à l'état liquide, réalisant ainsi une extraction efficace et rapide. En outre, la pression permet à la cellule d'extraction d'être remplie plus rapidement et aide à forcer le liquide dans la matrice solide. Les températures élevées augmentent la diffusivité du solvant améliorant par conséquent la cinétique d'extraction (**Brachet et al ., 2001**).

Bien que le solvant utilisé dans l'ESA soit habituellement les solvants organiques, l'eau chaude pressurisée, ou l'eau sous-critique peuvent également être employées dans un appareillage d'ESA.

L'utilisation des solvants non-toxiques, tels que le dioxyde de carbone et l'eau, présente des avantages économiques et environnementaux. Il a été rapporté que l'extraction supercritique par CO<sub>2</sub> est une technique nouvelle pour l'extraction des métabolites d'origine végétale. Cependant, une quantité considérable de modificateur polaire doit être ajoutée au dioxyde de carbone pour extraire les composés polaires. L'extraction par solvants accélérée est considérée comme une technique alternative et potentielle à l'EFS pour l'extraction des composés polaires (**Brachet et al ., 2001**).

Comparée à l'extraction traditionnelle par Soxhlet, l'ESA implique une grande diminution de la quantité de solvant et du temps d'extraction.

L'extraction par solvant accéléré est habituellement employée pour l'extraction des polluants organiques stables à hautes températures à partir des matrices environnementales. Très peu d'applications d'extraction par solvant accéléré ont été rapportées dans le domaine des molécules végétales.

L'extraction par solvants accélérée a été développée pour l'extraction rapide de la cocaïne et le benzoylecgonine des feuilles du coca en utilisant le méthanol comme solvant. La pression, la température, le temps d'extraction et la dimension particulaire optimaux sont respectivement 20 MPa, 80°C, 10 minutes et 90-150 µm (**Brachet et al ., 2001**).

Les procédés d'extraction assistés par ultrason, assistés par micro-ondes, par fluides supercritiques et par solvants accélérés sont très prometteurs pour l'extraction de principes actifs à partir des végétaux. Cependant, la plupart de ces nouvelles techniques d'extraction ne sont encore conduites avec succès qu'à l'échelle laboratoire ou à l'échelle pilote et leurs applications industrielles restent cependant relativement limitées. Il faudrait encore plus de recherche pour exploiter le grand potentiel réel de ces nouvelles techniques d'extraction à l'échelle industrielle (**Brachet, Rudaz et al. 2001**).

### **I. la plante objet d'étude :**

#### **I.1 Définition :**

*Vitis vinifera* L (Vitaceae), le nom turc, « Asma », est une vigne ligneuse vivace, habituellement grimpante par les vrilles, originaire d'Asie Mineure puis introduit en Europe et dans d'autres continents (**Didem deliorman et al., 2007**).

La valeur médicale et nutritionnelle des raisins a été indiquée pour des milliers d'années. Les Egyptiens ont consommé ce fruit il y a au moins 6000 ans et plusieurs philosophes grecs ont loué le pouvoir curatif des raisins (**Busserolles et al., 2006**).

#### **I.2. Classification de feuilles de vigne (anonyme, 2011) :**

Domaine : Eucaryotes.

Règne : Plantae.

Phylum : Angiospermae.

Classe : Magnoliopsida.

Ordre : Rhamnales.

Famille : Vitaceae.

Genre : *Vitis*.

Espèces : *Vitis vinifera*.

#### **I.3. Composition :**

Les feuilles de vigne contiennent de nombreux composants chimiques tels que les acides phénoliques, la vitamine E, les procyanidines (acide linoléique) (**Vigna et al., 2003**), les flavonoïdes ; y compris les anthocyanines et les proanthocyanidines, les sucres, les stérols, les acides aminés et les minéraux (**Handoussa et al., 2013**).

#### **I.4. Effets pharmaceutiques :**

Le raisin est connu comme la « reine des fruits » en raison des propriétés de nettoyage. Un « cure de raisin » implique de manger 3-6 bords de raisin pour détoxifier et améliorer la fonction hépatique (**Grieve., 1990**). En outre il a été rapporté que le raisin a un rôle important dans le contrôle de certaines maladies du foie, de l'hypertension artérielle et de l'anémie.

Aussi, les fibres et les acides des fruits dans le raisin ont un rôle essentiel dans le nettoyage des fonctions sanguines du système digestif et du rein (Celik et al., 1998).

En Iran, les feuilles de raisin sont utilisées pour traiter la diarrhée et les saignements, les vomissements et le traitement variqueux (Gharib et al., 2006), l'hépatite et les maux d'estomac (Hebash et al., 1991), elles ont été utilisées également en ayurvédique (indienne) dans la médecine traditionnelle comme diurétique, pour apaiser le tube digestif, améliorer la circulation, contrôler l'enflure et les saignements et détoxifier le corps (Grieve., 1990).

Les guérisseurs folkloriques européens ont développé un baume à partir la sève des vignes des raisins pour guérir la peau et les maladies des yeux. Parmi les autres effets bénéfiques, on pense que les composés actifs dans les graines de raisin ont des propriétés antioxydantes (Busserolles et al., 2006).

Les feuilles de vigne constituait l'élément le plus important de paysage botanique de l'Algérie, depuis 1925 (Isnard H., 2000).

Le raisin a une pertinence traditionnelle en tant que nourriture de bien-être et fruit de promotion de la santé en fonction de leur teneur élevée en phénols bioactifs. A cet égard, la consommation de raisins a été soulignée comme bénéfique pour l'inflammation et les pathologies cardiovasculaires ainsi pour les processus pathophysiologiques du vieillissement (Barros et al., 2014).

### **I.5.Utilisations des polyphénols de raisin :**

Plusieurs composés naturels se sont révélés avoir des activités anti-inflammatoire ; parmi les plus importants sont les composés polyphénolique (Handoussa et al., 2013), ce qui peut aider à inhiber les systèmes enzymatiques qui sont responsables de la production de radicaux libres et qui sont associés à des réactions inflammatoires. Les procyanidines interviennent dans la synthèse et la libération de nombreuses substances qui favorisent l'inflammation par exemple l'histamine, la sérine protéase, des prostaglandines et les leucotriènes (Shi et al., 2003), et l'extrait métabolique du feuilles de vigne possède une activité analgésique (Jyoti et al., 2009).

Dans d'autres études, il a été indiqué que l'extrait de proanthocyanidine de la graine de raisin (GSPE) réduit l'expression de IL-6 MCP -1 (protéine chimiotactique monocyttaire-1) et améliore la production de l'adiponectine adipokine anti-inflammatoire et suggère que GSPE peut avoir un effet bénéfique sur les maladies inflammatoires (Matilde et al., 2009).

L'extrait de proanthocyanidine de la graine de raisin GSPE a diverses fonctions biologiques telles que antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, des actions antiallergiques et vasodilatatrices et c'est le composé anti-inflammatoire le plus efficace dans l'extrait de graine de raisin (**Chacon et al., 2009**). nous suggérons l'utilisation de GSE (grape seed extract) comme médicament supplémentaire chez les patients atteints de maladies inflammatoires aiguës ou chroniques (**Hemmati et al., 2010**).

# **Partie expérimentale**

## I- matériel et méthodes

La première partie (Extraction avec ASE, ERP) a été effectuée par l'encadreuse FARHI Selma dans le laboratoire du CNR Conseil National de recherche à Rome ; la deuxième partie (dosage des polyphénols totaux et DPPH) est réalisée au sein de laboratoire des sciences de la nature et de la vie, appartenant à la faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, département de biologie appliquée, Université Larbi Tbessi –Tbessa-.

### I.1. Matériel végétal :

Cinq variétés de feuilles de raisin (quatre variétés endémique de l'Italie et une Algérienne) ont été utilisées. Les feuilles étaient des feuilles complètement matures provenant de la partie apicale recueillies en août, rincées avec de l'eau du robinet et congelées directement dans le champ avec du nitrogène liquide, puis maintenu à -80 °C. Ensuite, elles ont été lyophilisées et écrasées avec un mélangeur commercial suivi d'un broyeur à porcelaine pendant 5 minutes. La poudre résultante a été recueillie et utilisée pour l'extraction. Tous les échantillons en poudre sont stockés à l'obscurité à 5 ° C dans des sacs stériles et sous un vide parfait jusqu'à l'utilisation.

**Tableau 8 :** les cinq variétés des feuilles de raisin utilisées.

Les codes	Variétés de feuilles de vigne
<b>E1</b>	<b>ZIBIBO</b>
<b>E2</b>	<b>VITE NIEDDERA</b>
<b>E3</b>	<b>BARBARA SARDO</b>
<b>E4</b>	<b>Algeria</b>
<b>E5</b>	<b>VERMENTINO</b>

## **I.2. Extraction :**

### **I.2.1. But de l'utilisation de l'ASE :**

L'ASE est un processus d'extraction solide-liquide effectué à température élevée implique une grande diminution de la quantité de solvant et du temps d'extraction, l'extraction est effectuée sous pression afin de maintenir le solvant dans son état liquide à température élevée. Le solvant est toujours au-dessous de son état critique pendant l'ESA. La température élevée accélère la cinétique d'extraction et la pression élevée maintient le solvant à l'état liquide, réalisant ainsi une extraction efficace et rapide. En outre, la pression permet à la cellule d'extraction d'être remplie plus rapidement et aide à forcer le liquide dans la matrice solide. Les températures élevées augmentent la diffusivité du solvant améliorant par conséquent la cinétique d'extraction (**Brachet, Rudaz et al., 2001**).

### **I.2.2 extraction par solvants accélérée (ASE) :**

#### **-Le mode opératoire :**

L'ASE a été réalisée sur un Dionex ASE 350. Les feuilles en poudre (1 g) ont été placées entre deux couches de billes en verre dans une cellule en acier inoxydable Dionex (ASE 350) de 22 ml. Les cellules étaient équipées d'un habillage en acier inoxydable et d'un filtre en cellulose.

**Tableau 9** : conditions de la procédure d'extraction de l'ASE.

<b>Température</b>	<b>40 ° C</b>
<b>Pression</b>	<b>1500 PSI</b>
<b>Nombre de cycles</b>	<b>2</b>
<b>Temps d'extraction d'un cycle</b>	<b>5 min</b>
<b>Concentration d'éthanol</b>	<b>60% Éthanol / 40% d'eau</b>
<b>Type d'eau utilisée</b>	<b>Ultra pure</b>

---



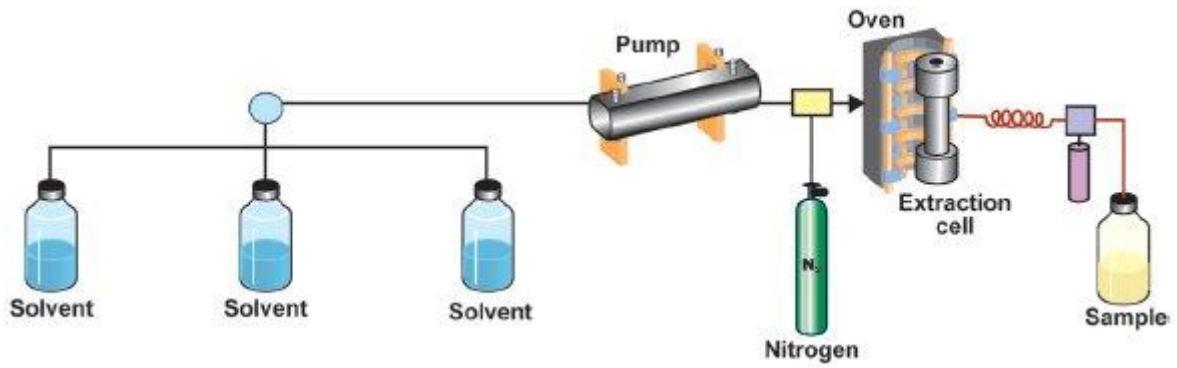


Figure 7 : Le cycle d'extraction de l'ASE utilisé.

### I.2.3.Calcul du rendement :

Le rendement se calcule à partir de l'extrait final par rapport au poids de la plante sèche (Al namer, 2014). Il est exprimé en pourcentage et est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{m}{M} \times 100$$

R : rendement (%)

m : masse de l'extrait après évaporation du solvant.

M : masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

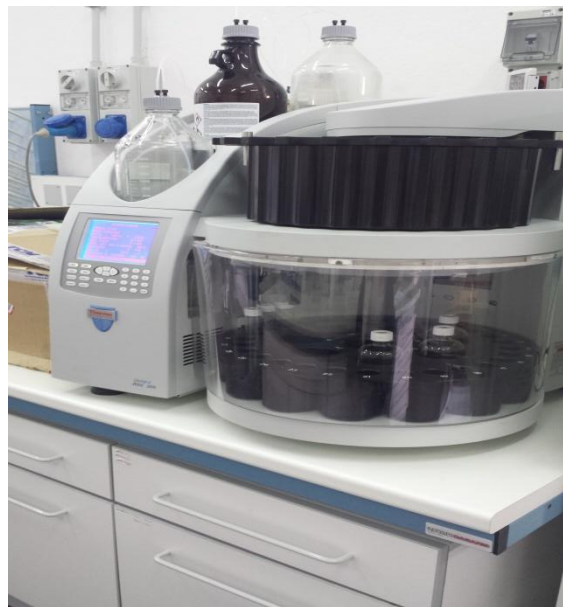


Figure 8 : Appareillage de l'ASE (Dionex ASE 350) utilisé.

### **I.3. Dosage des polyphénols totaux (selon Folin et Ciocalteu (1927) avec de petits changements selon Singleton et Rossi (1965) :**

#### **I.3.1.principe :**

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présentent dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu (Daels-rakotoarison, 1999).

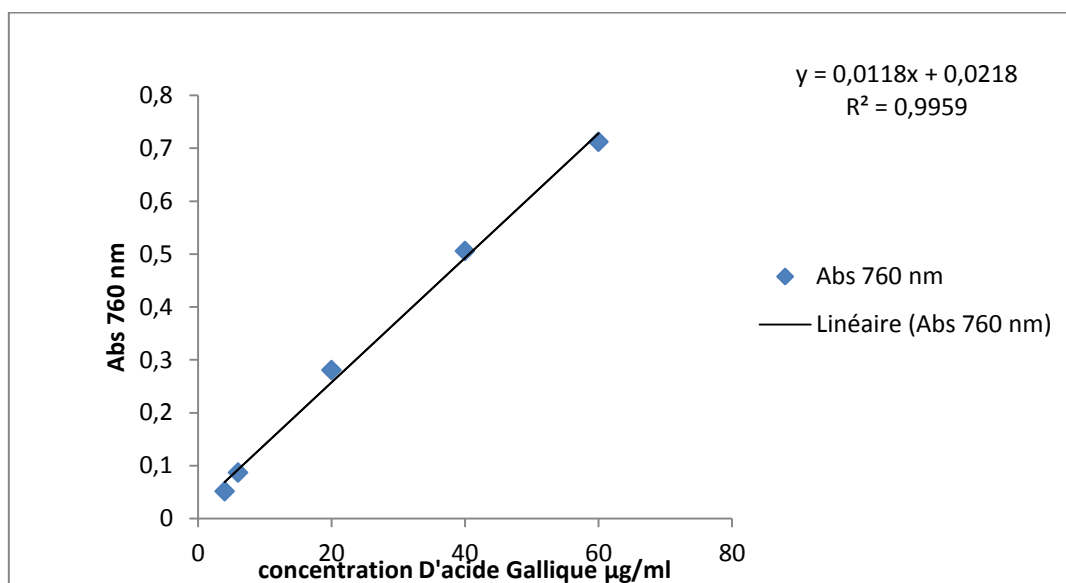
#### **-Le mode opératoire :**

La teneur des polyphenols totaux a été déterminée en utilisant 10 mg de poudre préparée par ESA placée dans un tube de centrifugation de 15 ml et 9,0 ml d'éthanol à froid de 80% (1:10 poids : volume), le tout est bien agité en utilisant de vortex à 1600 tr / min pendant 2 min, ensuite centrifugés à 16 000 g à 4 ° C pendant 15 min. Le surnageant a ensuite été filtré à travers le papier filtre Whatman n ° 2 et maintenu sur la glace jusqu'à ce que le dosage des polyphénols totaux soit effectué.

Pour le dosage, 200 µl de chaque extrait a été dilué dans 1 ml du réactif Folin-Ciocalteu et bien mélangé à vortex. Entre 30 secondes après l'addition du réactif Folin-Ciocalteu mais avant que 8 minutes se soient écoulées, on a ajouté 800 µl de solution de carbonate de sodium (0,075 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mL<sup>-1</sup>) et a été mélangé à nouveau. Ensuite, les échantillons ont été stockés dans l'obscurité pendant une heure à température ambiante (20 ± 3 ° C), puis une incubation d'une heure supplémentaire à 0 ° C. L'absorbance a été lue à 760 nm avec un spectrophotomètre. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'acide gallique / g de poids sec.

#### **I.3.2.Expression des résultats :**

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par mg de matière sèche (mg EAG/g). La courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été préparée avec cinq points de 4 à 60 µg / L avec  $R^2 = 0.996$ .



**Figure 9** : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

#### I.4. Evaluation de l'activité antioxydante :

##### I.4.1. La spectroscopie de résonance paramagnétique par électron (EPR) :

Le principe de la résonance paramagnétique électronique (RPE ou EPR) est commun à toutes les autres formes de spectroscopie et se base sur l'interaction entre matière et rayonnement.

La technique de RPE est utilisée en routine pour étudier :

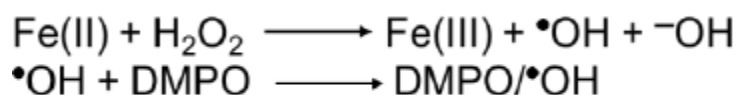
- Les processus radicalaires chimiques et biochimiques et leur modulation par des molécules naturelles et synthétiques.
- L'oxydation catalysée par une enzyme des substrats et sondes d'intérêt.
- L'anoxie / réoxygénation sur des lignées cellulaires primaires ou continues et sur des mitochondries isolées.
- La production des ROS par les cellules inflammatoires (équines ou humaines) et leur modulation par des composés synthétiques et naturels.
- Les radicaux lipidiques à partir des acides gras poly-insaturés par la technique de spin trapping.

Notre expérience est appliquée pour évaluer les propriétés antioxydantes de nos extraits par la méthode de piégeage des radicaux hydroxyles. Elle était réalisée selon **Fadda & al. (2015)**,

avec un petit changement. Les radicaux hydroxyle ont été générés par la réaction de Fenton et piégés avec un piège à spin nitron 5-diméthyl-pyrroline N-oxyde (DMPO).

**-Le mode opératoire :**

La solution stock a été préparée à partir de 20 mg d'extrait solubilisé lyophilisé dans 1 ml d'eau ultra pure dégénérée sous un courant d'azote. Des dilutions en série ont été préparées à partir de la première solution mère et, en fonction des résultats, la concentration correcte pour chaque extrait a été établie. Trois concentrations ont été utilisées pour chaque variété afin de déterminer la IC50 ; La quantité d'antioxydant requise pour inhiber 50% du radical hydroxyle. 100 µL de chaque dilution (eau ou eau //éthanol) ont été mélangés avec 588 µl d'eau, 100 µL de sulfate de fer (II) (0,1 mM), 112 µL de DMPO (26 mM) et 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM). L'addition DMPO-OH résultant a été détectée avec un spectromètre EPR Bruker EMX fonctionnant à la bande X (9,4 GHz) à l'aide d'une cellule capillaire Bruker Aqua-X. L'instrument EPR qui a été réglé dans les conditions suivantes : fréquence de modulation, 100 kHz ; Amplitude de modulation, 1 G ; Gain du récepteur, 1 × 10<sup>5</sup> ; Puissance des micro-ondes, 20 mW. Les spectres EPR ont été enregistrés à température ambiante immédiatement après la préparation du mélange réactionnel. La concentration du produit d'addition spin DMPO-OH a été estimée à partir de la double intégration des spectres.



**Figure 10** : Réaction de piégeage des radicaux hydroxyles par DMPO.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition calculé comme suit :

$$\% \text{ D'inhibition} = 100 \times (\text{A}_0 - \text{A}_s) / \text{A}_0$$

Lorsqu' $\text{A}_0$  est la concentration des produits d'addition de spin sans extrait et,  $\text{A}_s$  c'est la concentration du produit d'addition après la réaction avec l'extrait. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque dilution. Pour le calcul de ces valeurs, le logiciel Microsoft Excel a été

utilisé. Les données ont été exprimées en IC50  $\pm$  écart type.



**Figure 11 :** Appareillage La spectroscopie de résonance paramagnétique par électron ( ERP) utilisé.

### I.4.2. Test de piégeage DPPH :

#### I.4.2.1.Principe :

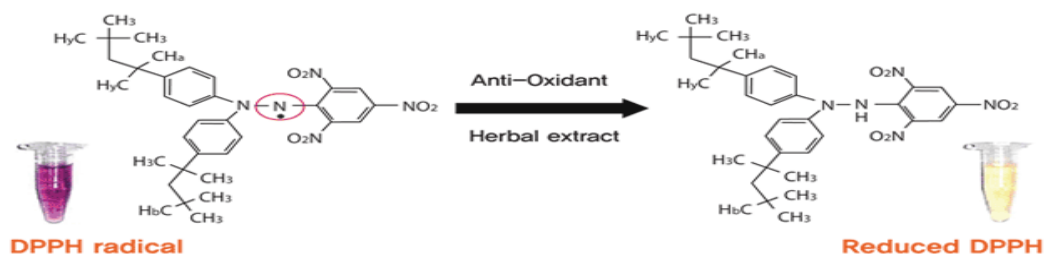
Le DPPH est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 515 nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres (**Brand-Williams et al., 1995**).

L'activité du piégeage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (**Lopes-lutz et al., 2008 ; Athamena et al., 2010**).

#### -Le mode opératoire :

50  $\mu$ l de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanoïque du DPPH (0,025g/l). Parallèlement, un témoin négatif est préparé en mélangeant 50 ml de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH.

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration (Bougandoura, 2013).



**Figure 12** :Schéma représentatif de la réaction de virement de la couleur mauve de DPPH "réduit" en DPPH jaune "oxydé "en présence d'antioxydant (DPPH).



**Figure 13** : Pouvoir antioxydant des extraits d'étude prouvé par le virement de DPPH en couleur jaune.

Les résultats sont exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$I \% = [1 - (\text{Abs Échantillon} - \text{Abs Contrôle négatif})] \times 100$$

I % : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).

Abs Échantillon : Absorbance de l'échantillon.

Abs Contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif (Meddour, 2013).

Lorsque cette manipulation est effectuée à différentes concentrations d'extraits étudiés, la trace d'une courbe de % d'inhibition en fonction de la concentration permet la détermination de la CI50 (concentration permettant l'inhibition de 50% du radical DPPH).

### **I.5. Produits chimiques et Matériels :**

Tube Corning, code britannique 430053, Dionex ASE 350 (Dionex Thermo Fisher Scientific Inc. aux États-Unis), Centrifugeuse ALC 4227R Milan-Italie, vortex, Stuart, Modèle britannique SA8, un spectrophotomètre (Agilent 8453).

Tous les solvants utilisés étaient de qualité HPLC de Merck (Darmstadt, Allemagne) ; L'eau a été purifiée par un système milli-Qplus de Millipore (Milford, MA, USA). Les réactifs employés étaient de qualité analytique ; Le réactif Folin-Ciocalteu, le carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ont été achetés auprès de Carlo Erba (Milan, Italie) ; Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), l'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque) provenaient de Sigma-Aldrich, Inc.

### **I.6. analyses statistiques :**

Les données ont été analysées à l'aide de logiciel (SPSS), versions 20. Dans chaque essai, les données expérimentales représentent la moyenne  $\pm$  écarts-types. Les résultats ont été analysés pour déterminer les différences entre les groupes en utilisant le test ANOVA et le test Duncan (a) pour déterminer les différences significatives entre les moyennes intra-groupe. Les valeurs de P inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

## **Résultats et discussion**



**I. Résultats :**

**I.1. les rendements d'extraction des extraits des feuilles de vigne :**

Après extraction et récupération des extraits aqueux et éthanoliques des cinq variétés des feuilles de vigne, leur rendement a été déterminé par rapport à 100 g de matière végétale sèche exprimé en pourcentage (tableau 10).

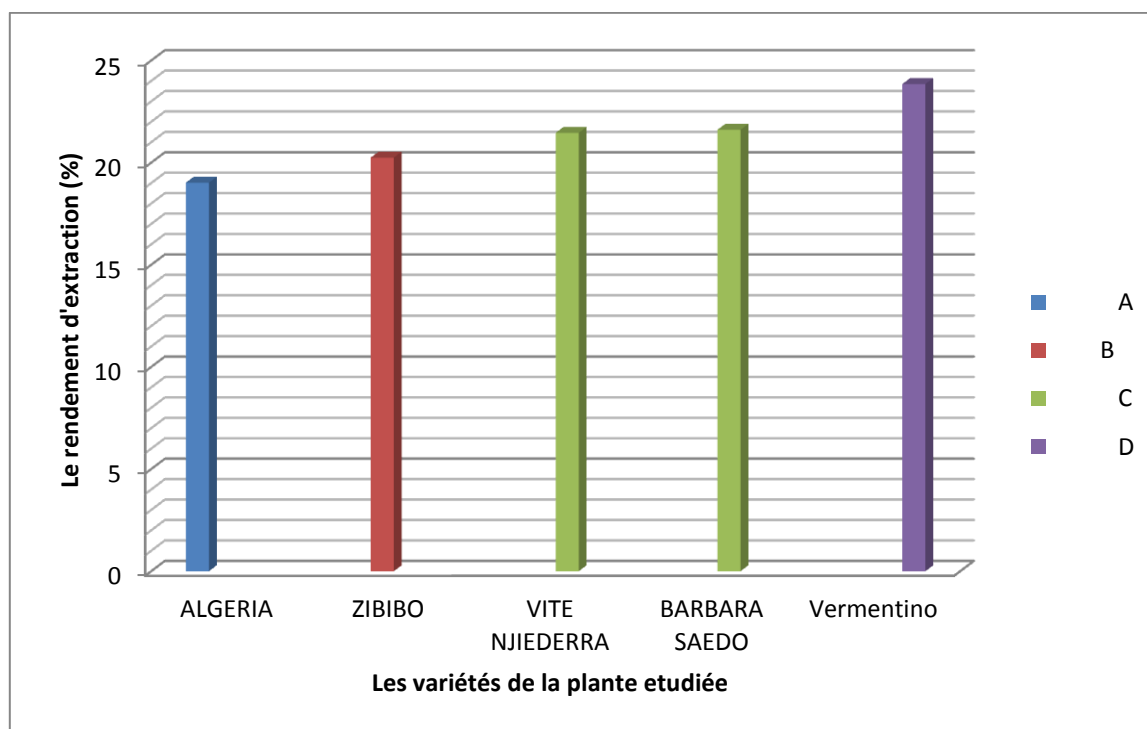
**Tableau 10 :** Rendements d'extraction des extraits aqueux et éthanoliques des cinq variétés de feuilles de vigne  $\pm$  écart type.

Codes	Variétés de feuilles de vigne	Rendement (%) de l'extrait aqueux $\pm$ écart type	Rendement (%) de l'extrait éthanolique $\pm$ écart type
<b>E01</b>	<b>ZIBIBO</b>	20,25 $\pm$ 0.37	26,16 $\pm$ 0.73
<b>E02</b>	<b>VITE NIEDDERA</b>	21,46 $\pm$ 0.85	27,25 $\pm$ 1.21
<b>E03</b>	<b>BARBARA SARDO</b>	21,61 $\pm$ 1.14	22,85 $\pm$ 0.68
<b>E04</b>	<b>Algeria</b>	19,02 $\pm$ 0.67	20,53 $\pm$ 1.12
<b>E05</b>	<b>VERMENTINO</b>	23,85 $\pm$ 0.59	26,24 $\pm$ 0.43

Les résultats obtenus montrent que le rendement d'extraction le plus élevé concernant l'extrait aqueux est celui de la variété **VERMENTINO** (23,85 %  $\pm$  0.59), suivi par l'extrait de la variété **BARBARA SARDO** (21,61 %  $\pm$  1.14) et celui de la variété **VITE NIEDDERA** (21,46 %  $\pm$  0.85). En ce qui concerne les autres extraits, les valeurs des rendements varient entre (20.25%  $\pm$  0.37) à (19.02 %  $\pm$  0.67) correspondant respectivement à l'extrait d'extraction de la variété **ZIBIBO** et celui de la variété **ALGERIA**, ce dernier enregistre le rendement le plus faible.

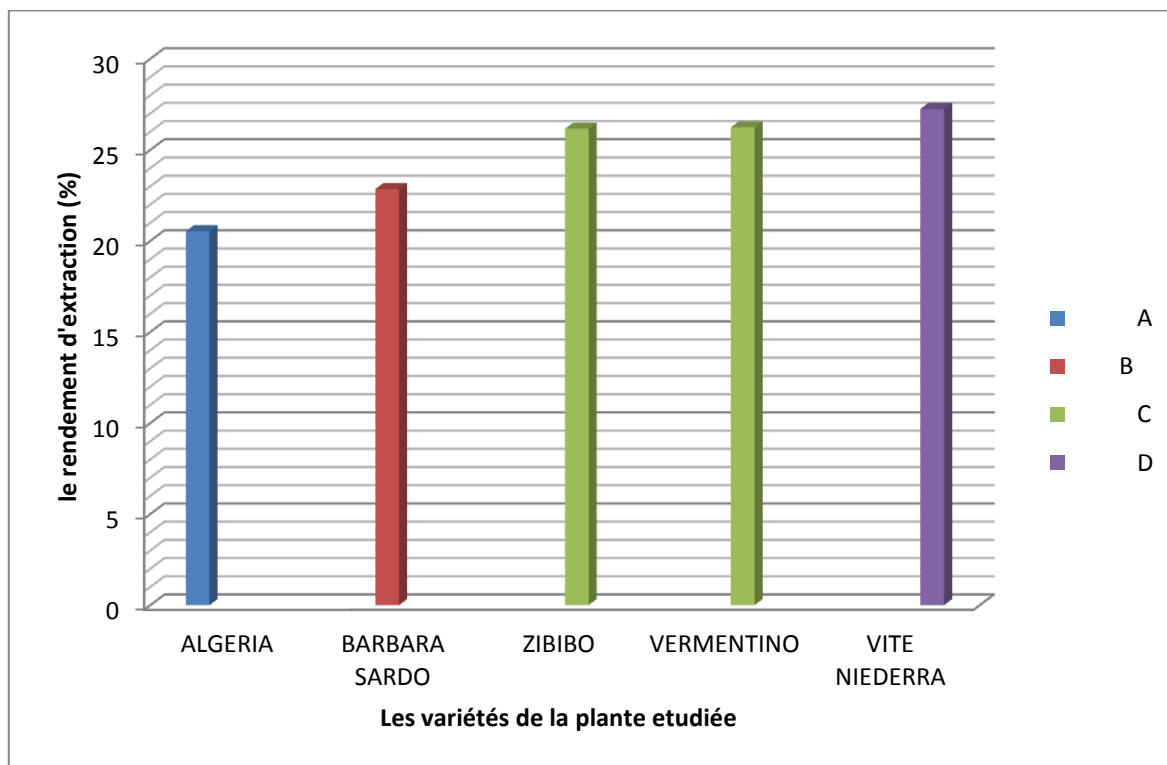
En ce qui concerne les extraits éthanoliques ; le rendement le plus élevé est celui de la variété **VITE NIEDDERA** (27,25%  $\pm$  1.21), suivi respectivement par ceux des variétés **VERMENTINO** (26,24%  $\pm$  0.43), **ZIBIBO** (26,16%  $\pm$  0.73) et la variété **BARBARA SARDO** (22,85 %  $\pm$  0.68) et enfin le rendement le plus faible est enregistré chez la variété **Algeria** (20,53%  $\pm$  1.12).

Nous avons remarqué une différence hautement significative entre les rendements d'extraction aqueuse et éthanolique ( $P=0.00$ ) ; où les rendements d'extraction les plus élevés ont été enregistré chez les extraits éthanoliques.



**Figure 14 :** Classement des rendements d'extraction des extraits aqueux de la plante utilisée selon le test Duncan.

Le test Duncan montre que dans le cas des extraits aqueux un rendement d'extraction maximal par la variété **VERMENTINO** suivi par la variété **BARBARA SARDO**, le moindre rendement d'extraction est donné à la variété **Algeria**. Le test Duncan montre aussi qu'il n'y a pas une différence significative entre le rendement d'extraction enregistré chez les variétés **BARBARA SARDO** et **VITE NIEDDERA**.



**Figure 15 :** Classement des rendements d'extraction des extraits éthanoliques de la plante utilisée selon le test Duncan.

Le test Duncan montre que dans le cas des extraits éthanoliques un rendement d'extraction maximal par la variété **VITE NIEDDERA** suivi par la variété **VERMENTINO**, le moindre rendement d'extraction est donné à la variété **Algeria**. Le test Duncan montre aussi qu'il n'y a pas une différence significative entre le rendement d'extraction enregistré chez les variétés **ZIBIBO** et **VERMENTINO**.

On a conclu qu'il existe une corrélation étroite entre le solvant d'extraction utilisé et les rendements d'extraction obtenus ; ou l'éthanol enregistre le meilleur rendement d'extraction par rapport à l'eau (à concentration 60% Éthanol / 40% eau ; température de 40 °C et pression de 1500 PSI). La variété **Algeria** enregistre le rendement d'extraction le plus faible à la fois dans l'extrait aqueux et éthanolique.

## I.2. Dosage des polyphénols totaux :

La spectrophotométrie a permis de quantifier la concentration moyenne des polyphénols présents dans les extraits préparés de la plante d'étude. Les résultats sont représentés et ont été déterminés à partir de l'équation :  $Y = 0,0118 X - 0,0218$ ,  $R^2 = 0,9959$ .

**Tableau 11 :** Teneurs en phénols totaux des extraits aqueux et éthanoliques des cinq variétés de la plante étudiée  $\pm$  écart type en milligrammes d'acide gallique / g de poids sec.

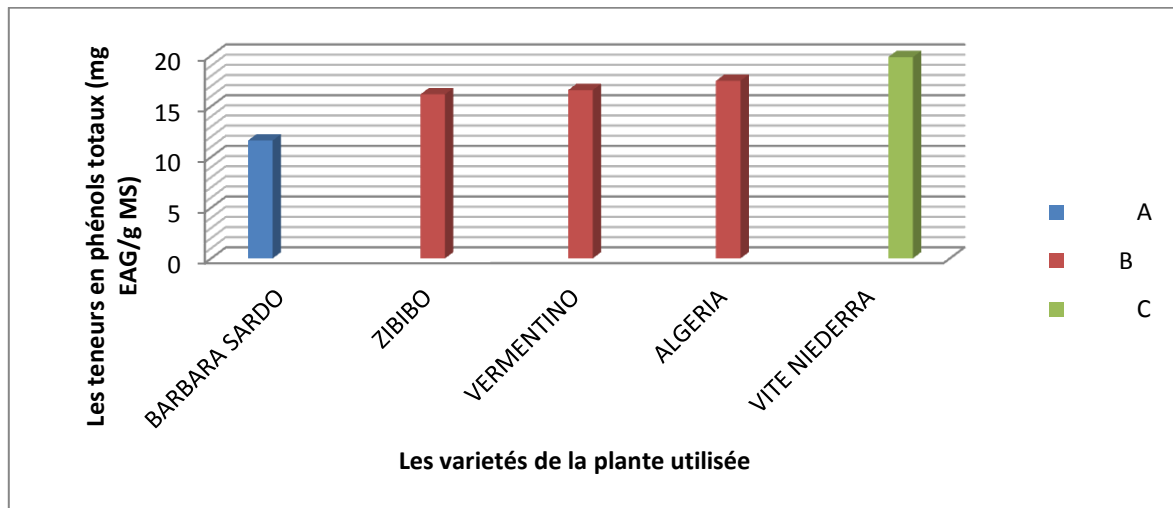
Codes	Variétés de feuilles de vigne	Phénols totaux de l'extrait aqueux $\pm$ écart type	Phénols totaux de l'extrait éthanolique $\pm$ écart type
<b>E01</b>	<b>ZIBIBO</b>	16,18 $\pm$ 0,77	29,92 $\pm$ 0,20
<b>E02</b>	<b>VITE NIEDDERA</b>	19,85 $\pm$ 0,60	40,44 $\pm$ 1,56
<b>E03</b>	<b>BARBARA SARDO</b>	11,63 $\pm$ 0,02	31,63 $\pm$ 0,88
<b>E04</b>	<b>Algeria</b>	17,51 $\pm$ 0,22	37,39 $\pm$ 0,54
<b>E05</b>	<b>VERMENTINO</b>	16,60 $\pm$ 0,89	27,51 $\pm$ 0,58

Nos résultats montrent que la teneur en composés phénoliques varie d'un extrait à l'autre. Suivant le tableau ci-dessus ; les teneurs en polyphénols totaux des extraits aqueux montrent des proportions allant de 19.85  $\pm$  0,60 à 11.63  $\pm$  0,02 mg EAG /g MS; La teneur la plus élevée appartient à l'extrait de la variété de **VITE NIEDDERA** de l'ordre de 19,85  $\pm$  0,60 mg EAG /g MS, suivie respectivement par celles des variétés **Algeria** (17,51 $\pm$  0,22) mg EAG /g MS, **VERMENTINO** (16,60  $\pm$  0,89) mg EAG /g MS , **ZIBIBO** (16,18  $\pm$  0,77) mg EAG /g MS et enfin la variété **BARBARA SARDO** qui représente la fraction la plus pauvre de la teneur en phénols totaux(11,63  $\pm$ 0,02) mg EAG /g MS .

Concernant les teneurs en phénols totaux des extraits éthanoliques; la variété **VITE NIEDDERA** enregistre la valeur la plus élevée (40,44  $\pm$  1,56) mg EAG /g MS ,puis la variété **Algeria** de l'ordre de (37,39  $\pm$  0,54) mg EAG /g MS, la variété **BARBARA SARDO** (31,63 $\pm$  0,88) mg EAG /g MS ensuite les variétés **ZIBIBO** et **VERMENTINO** qui enregistrent respectivement les teneurs (29,92  $\pm$  0,20) et (27,51  $\pm$  0,58) mg EAG /g MS .

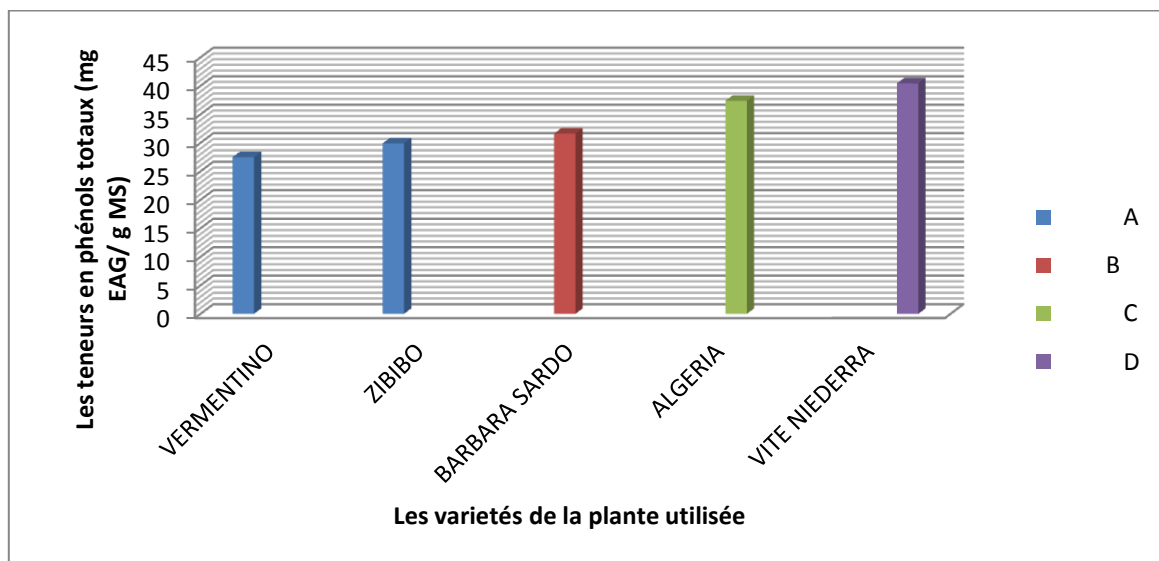
Il existe une différence hautement significative (P= 00) des teneurs en phénols totaux entre l'extraction aqueuse et éthanolique ; où les teneurs les plus élevés ont été enregistré chez les extraits éthanoliques.

Les résultats obtenus concernant les teneurs en phénols totaux des extraits aqueux et éthanoliques montrent une différence hautement significative (P = 00).



**Figure 16 :** Classement des teneurs en polyphénols totaux des extraits aqueux de la plante utilisée selon le test Duncan.

Le test Duncan montre que dans le cas des extraits aqueux une teneur maximale en polyphénols totaux par la variété **VITE NIEDERRA** suivie par la variété **Algeria**, la plus faible teneur en polyphénols totaux est donnée à la variété **BARBARA SARDO**. Le test Duncan montre aussi qu'il n'y a pas une différence significative entre les teneurs en polyphénols totaux enregistrés chez les variétés **ZIBIBO**, **ALGERIA** et **VERMENTINO**.



**Figure 17 :** Classement des teneurs en polyphénols totaux des extraits éthanoliques de la plante utilisée selon le test Duncan.

Le test Duncan montre dans le cas des extraits éthanoliques une teneur maximale en polyphénols totaux par la variété **VITE NIEDDERA** suivie par la variété **Algeria**, la plus faible teneur en polyphénols totaux est donnée à la variété **VERMENTINO**. Le test Duncan montre aussi qu'il n'y a pas une différence significative entre les teneurs en polyphénols totaux enregistrés chez les variétés **ZIBIBO** et **VERMENTINO**.

On a conclu qu'il existe une corrélation étroite entre le solvant d'extraction utilisé et les teneurs en polyphénols totaux obtenues ; ou l'éthanol enregistre la meilleure teneur en polyphénols totaux en comparaison avec l'eau (a concentration 60% Éthanol / 40% eau ; température de 40 °C et pression de 1500 PSI).La variété **VITE NIEDDERA** donne la teneur la plus élevée en polyphénols totaux à la fois dans l'extrait aqueux et éthanolique.

### I.3. Évaluation du pouvoir antioxydant des extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de vigne :

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des plantes a été réalisée par deux techniques chimiques (La spectroscopie de résonance paramagnétique par électron EPR et le piégeage du radical libre DPPH).

#### I.3.1.La spectroscopie de résonance paramagnétique par électron EPR :

**Tableau 12 :** Valeurs de la concentration IC<sub>50</sub> des radicaux hydroxyles par les extraits aqueux et éthanoliques des cinq variétés de la plante étudiée.

Codes	Variétés de feuilles de vigne	IC <sub>50</sub> (mg/ml) des extraits aqueux ± écart type	IC <sub>50</sub> (mg/ml) des extraits éthanoliques ± écart type
<b>E01</b>	<b>ZIBIBO</b>	0,52 ± 0,04	0,83 ± 0,02
<b>E02</b>	<b>VITE NIEDDERA</b>	0,62 ± 0,03	0,60 ± 0,01
<b>E03</b>	<b>BARBARA SARDO</b>	0,60 ± 0,02	0,27 ± 0,01
<b>E04</b>	<b>Algeria</b>	0,81 ± 0,02	0,63 ± 0,02
<b>E05</b>	<b>VERMENTINO</b>	0,56 ± 0,04	0,70 ± 0,02

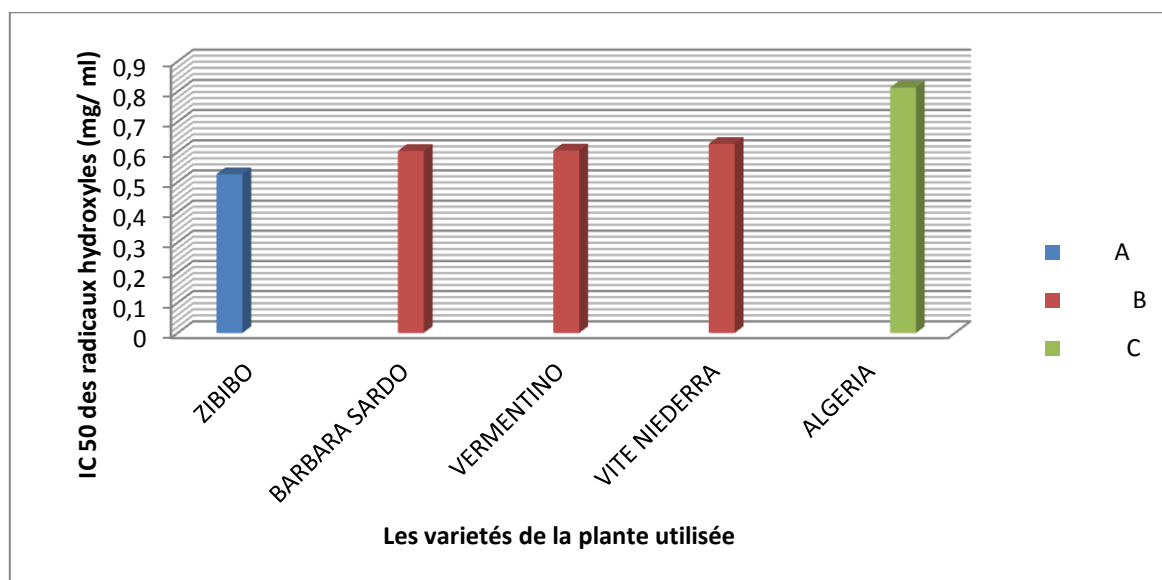
En tenant compte que l'efficacité de piégeage des radicaux hydroxyles est inversement proportionnelle à la valeur IC<sub>50</sub> ; nous avons remarqué concernant les extraits aqueux que la

concentration IC<sub>50</sub> la plus élevée (l'activité antiradicalaire la plus faible) est enregistrée pour la variété **Algeria** à raison de  $0,81 \pm 0,02$  mg/ml et les concentrations IC<sub>50</sub> les plus faibles (les activités antiradicalaires les plus élevées) sont signalées chez les variétés **ZIBIBO** et **VERMENTINO** à raison de  $0,52 \pm 0,04$  mg/ml et  $0,56 \pm 0,04$  mg/ml respectivement. Pour les autres variétés, les valeurs de IC<sub>50</sub> sont de  $0,60 \pm 0,02$  mg/ml pour la variété **BARBARA SARDO** et de  $0,62 \pm 0,03$  mg/ml pour la variété **VITE NIEDDERA**.

Tandis que les résultats des extraits éthanoliques obtenus montrent que la concentration IC<sub>50</sub> la plus élevée (l'activité antiradicalaire la plus faible) est enregistrée pour la variété **ZIBIBO** à raison de  $0,83 \pm 0,02$  mg/ml. Cependant, les concentrations IC<sub>50</sub> les plus faibles (les activités antiradicalaires les plus élevées) sont signalées chez les variétés **BARBARA SARDO** et **VITE NIEDDERA** à raison de  $0,27 \pm 0,01$  mg/ml et  $0,60 \pm 0,01$  mg/ml respectivement. Pour les autres variétés, les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont de  $0,63 \pm 0,02$  mg/ml pour la variété **Algeria** et de  $0,70 \pm 0,02$  mg/ml pour la variété **VERMENTINO**.

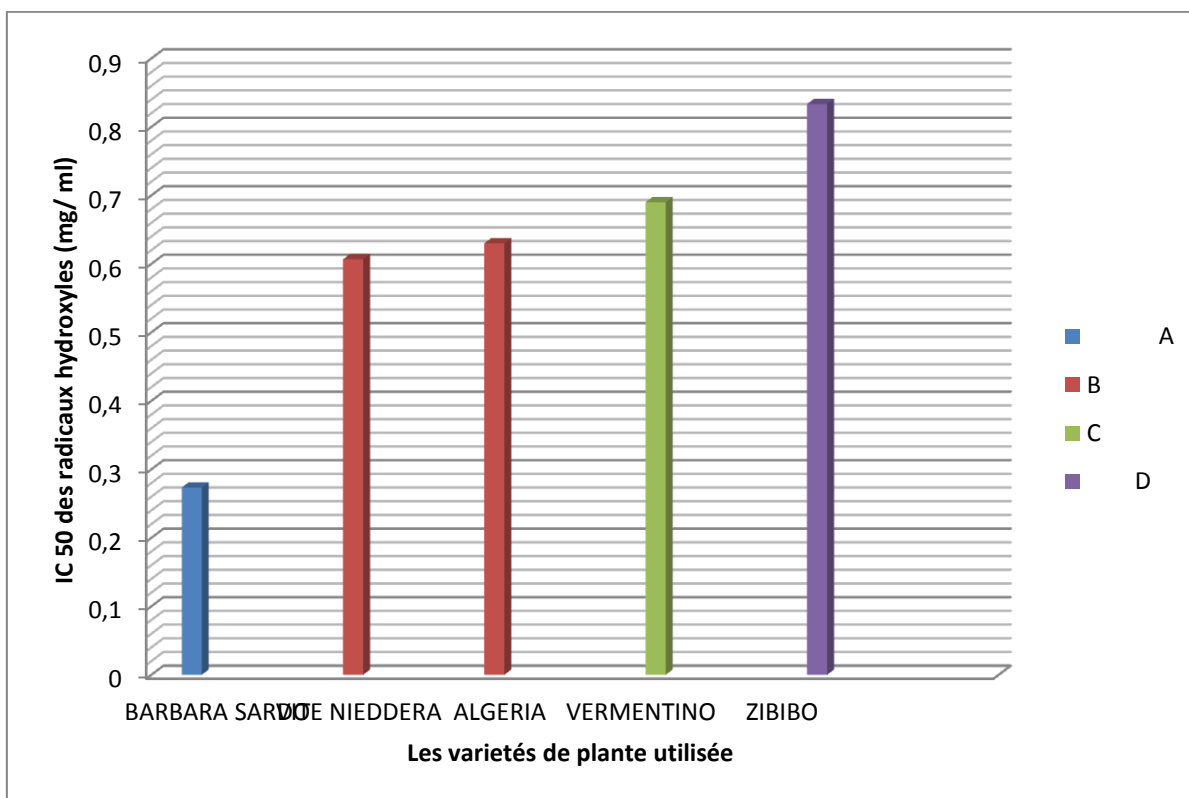
Il n'existe pas une corrélation entre le solvant utilisé et le pourcentage d'inhibition des radicaux hydroxyles.

Les résultats des extraits aqueux et éthanoliques obtenus concernant les pourcentages d'inhibition des radicaux hydroxyles montrent une différence hautement significative entre les cinq variétés ( $P = 00$ ).



**Figure 18 :** Classement des pourcentages d'inhibition des radicaux hydroxyles par les extraits aqueux selon le test Duncan.

Le test Duncan montre que pour les extraits aqueux un piégeage maximal des radicaux hydroxyles par la variété **ZIBIBO** suivie par la variété **BARBARA SARDO**, le moindre piégeage des radicaux hydroxyles est donné à la variété **Algeria**. Le test Duncan montre aussi qu'il n'y a pas une différence significative entre les piégeages des radicaux hydroxyles enregistrés chez les variétés **BARBARA SARDO**, **VITE NIEDDERA** et **VERMENTINO**.



**Figure 19 :** Classement des pourcentages d'inhibition des radicaux hydroxyles par les extraits éthanoliques selon le test Duncan.

Le test Duncen montre que pour les extraits éthanoliques il existe une activité antiradicalaire maximale des radicaux hydroxyles par la variété **BARBARA SARDO**, suivie par la variété **VITE NIEDDERA**. Le moindre piégeage des radicaux hydroxyles est donné à la variété **ZIBIBO**. Le test Duncan montre qu'il n'y a pas une différence significative entre les piégeages des radicaux hydroxyles chez les variétés **Algeria** et **VITE NIEDDERA**.

On a conclu qu'il n'existe pas une corrélation entre le solvant d'extraction utilisé et les pourcentages d'inhibition des radicaux hydroxyles obtenus et que ceux derniers changent selon la variété utilisée.



**I.3.2. Piégeage du radical libre DPPH :**

**Tableau 13 :** Valeurs de la concentration IC<sub>50</sub> du radical DPPH par les extraits aqueux et éthanoliques des cinq variétés de la plante étudiée ± écart type.

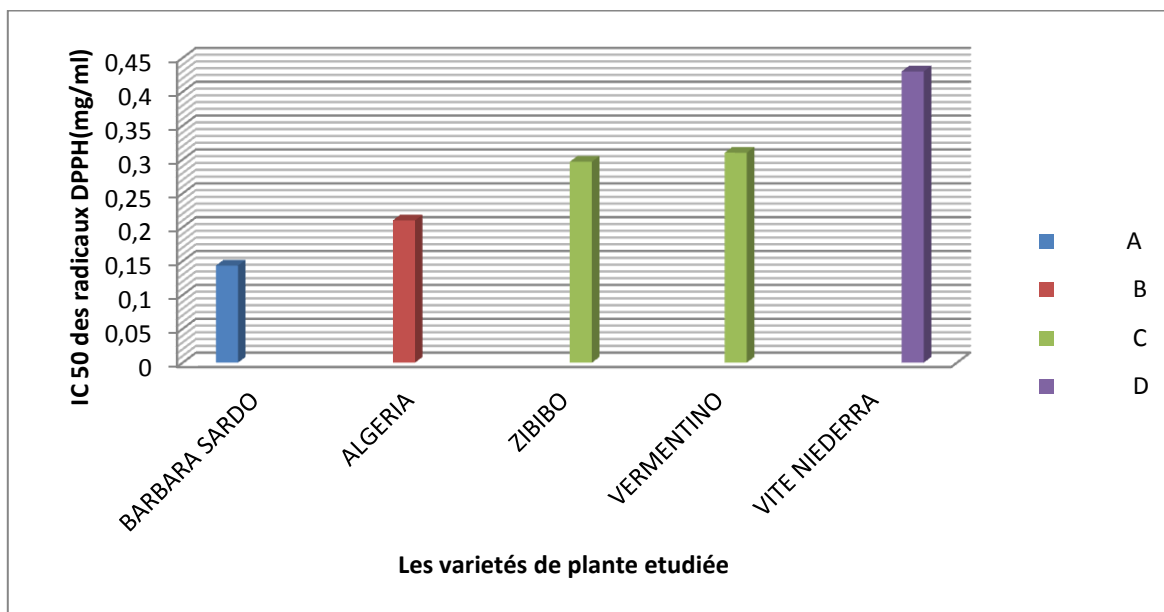
Codes	Variétés de feuilles de vigne	IC <sub>50</sub> (mg/ml) des extraits aqueux ± écart type	IC <sub>50</sub> (mg/ml) des extraits éthanoliques ± écart type
<b>E01</b>	<b>ZIBIBO</b>	0,30 ± 0,01	0,18 ± 0,01
<b>E02</b>	<b>VITE NIEDDERA</b>	0,43 ± 0,02	0,39 ± 0,01
<b>E03</b>	<b>BARBARA SARDO</b>	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,01
<b>E04</b>	<b>Algeria</b>	0,23 ± 0,02	0,09 ± 0,02
<b>E05</b>	<b>VERMENTINO</b>	0,31 ± 0,01	0,38 ± 0,01

En tenant compte que l'efficacité de piégeage du radical libre DPPH est inversement proportionnelle à la valeur IC<sub>50</sub>; on a observé concernant les extraits aqueux que les concentrations IC<sub>50</sub> les plus faibles (les activités antiradicalaires les plus élevées) sont signalées chez les variétés **BARBARA SARDO** et **Algeria** à raison de 0,11 ± 0,02 mg/ml et 0,23 ± 0,02 mg/ml respectivement. Pour les autres variétés, les valeurs de IC<sub>50</sub> sont de 0,30 ± 0,01 mg/ml pour la variété **ZIBIBO** et de 0,31 ± 0,01 mg/ml pour la variété **VERMENTINO**. En effet, la concentration IC<sub>50</sub> la plus élevée (l'activité antiradicalaire la plus faible) est enregistrée pour la variété **VITE NIEDDERA** à raison de 0,43 ± 0,02 mg/ml.

Tandis que les résultats des extraits éthanoliques obtenus montrent que les concentrations IC<sub>50</sub> les plus faibles (les activités anti radicalaires les plus élevées) sont signalées chez les variétés **BARBARA SARDO** et **Algeria** à raison de 0,07 ± 0,01 mg/ml et 0,09 ± 0,02 mg/ml respectivement. Pour les autres variétés, les valeurs de l'IC<sub>50</sub> sont de 0,18 ± 0,01 mg/ml pour la variété **ZIBIBO** et de 0,38 ± 0,01 mg/ml pour la variété **VERMENTINO**. Alors que la concentration IC<sub>50</sub> la plus élevée (l'activité anti radicalaire la plus faible) est enregistrée pour la variété **VITE NIEDDERA** à raison de 0,39 ± 0,01 mg/ml.

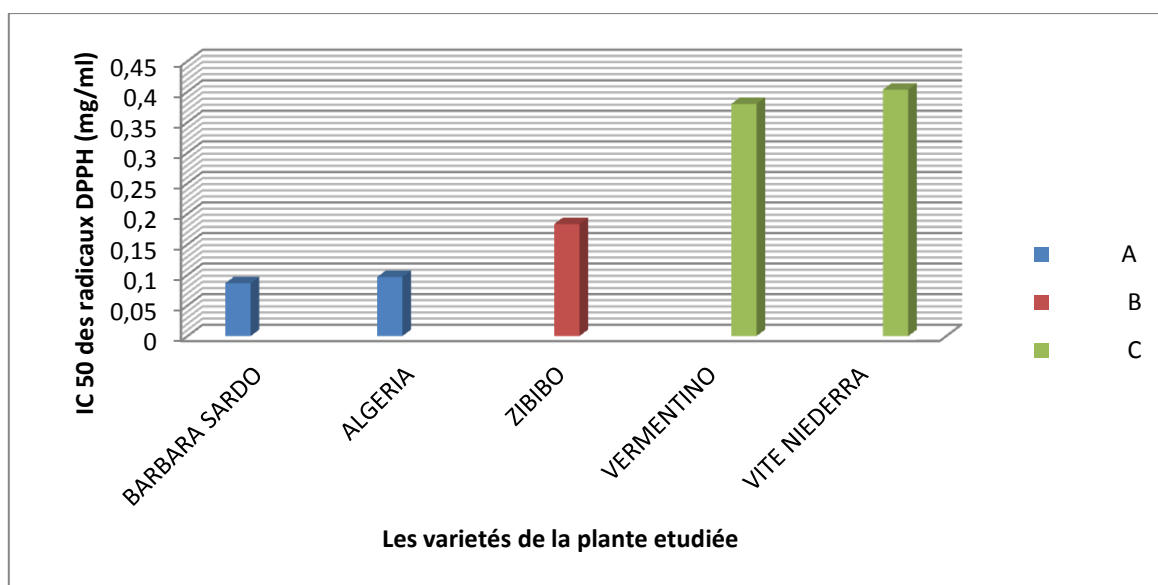
Il n'existe pas une corrélation entre le solvant utilisé et le pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH.

Les résultats des extraits aqueux et éthanoliques obtenus concernant les pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH montrent une différence hautement significative en fonction du solvant d'extraction (P = 00).



**Figure 20 :** Classement des pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH par les extraits aqueux selon le test Duncan.

Le test Duncan montre que pour les extraits aqueux un piégeage maximal des radicaux DPPH par la variété **BARBARA SARDO** suivie par la variété **Algeria**, le moindre piégeage des radicaux DPPH est donné à la variété **VITE NIEDDERA**. Le test Duncan montre aussi qu'il n'y a pas une différence significative entre les piégeages des radicaux DPPH enregistrés chez les variétés **ZIBIBO** et **VERMENTINO**.



**Figure 21 :** Classement des pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH par les extraits éthanoliques selon le test Duncan.

Le test Duncan montre que les extraits éthanoliques présentant un piégeage maximal des radicaux DPPH par la variété **BARBARA SARDO** suivie par la variété **Algeria**, le moindre piégeage des radicaux DPPH est donné à la variété **VITE NIEDDERA**. Le test Duncan montre aussi qu'il n'y a pas une différence significative entre les piégeages des radicaux DPPH enregistrés chez les variétés **BARBARA SARDO** et **Algeria** et aussi entre les variétés **VITE NIEDDERA** et **VERMENTINO**.

On a conclu qu'il n'existe pas une corrélation entre le solvant d'extraction utilisé et les pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH obtenus et que ceux derniers dépendent seulement de la variété utilisée ; où les variétés ont enregistré le même ordre de classement concernant les pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH dans le cas des extraits aqueux et éthanoliques.

### **Discussion :**

La phytothérapie est définie comme le traitement des maladies par les plantes ou par leurs extraits (**Bordeaux, 2009**). Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel, spécialement dans le traitement des maladies chroniques. Les plantes sont bien souvent appréciées pour leurs qualités aussi bien médicinales que nutritives. Aujourd'hui il est devenu possible d'extraire et d'isoler les substances chimiques que les plantes contiennent. En effet les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique (**Iserin et al., 2001**). Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Elqaj et al., 2007**).

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. La phytothérapie propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme (**Millogo et al., 2005**).

En Algérie, la phytothérapie est utilisée depuis toujours dans le secteur de la médecine traditionnelle. Les pharmacopées s'inspirent principalement de la médecine arabe classique et de l'expérience locale des populations en matière de soins. Aujourd'hui les plantes jouent encore un rôle très important dans les traditions thérapeutiques et la vie des habitants. En effet sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces ont des vertus médicinales (**Millogo et al., 2005**).

Selon OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale, surtout dans les pays sous-développés, ont recours au traitement traditionnel pour faire face aux problèmes de la santé et de soins primaires (**Farnsworth, 1994**).

Les polyphénols, largement distribués dans les plantes, les fruits, les légumes, les feuilles et les aliments sont des antioxydants naturels qui protègent contre les dommages oxydatifs, en inhibant ou en retardant l'oxydation de des molécules biologiques (**Faller et Fialho, 2010**). Parmi les fruits, le raisin est mis en évidence l'une des plus grandes sources de composés phénoliques, qui sont les principaux flavonoïdes (anthocyanines et flavanols), stilbènes (resvératrol) et acides phénolique (dérivés des acides cinnamique et benzoïque) (**Francis 2000**). Les polyphénols végétaux ont été démontrés de l'activité antibactérienne potentielle, antifongique et antivirale (**Chávez et al., 2006**).

Les feuilles des raisins sont riches en composés phénoliques et ont montré une activité antioxydante significative in vitro et In vivo (**Monagas et al., 2006, Kosar et al., 2007, Orhan et al., 2007, Pari et Suresh 2008, Dani et al., 2010, Oliboni et al., 2011**). Des études récentes ont montré que les extraits de feuilles de vigne de la variété Bordo (*V. labrusca*), empêchent les dommages causée par le peroxyde d'hydrogène (elles ont réduit les taux de la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines, en plus modulant l'activité des enzymes antioxydantes) dans différents tissus (Foie, rein, cœur et tissus cérébraux) de Wistar Rats (**Dani et al., 2010, Oliboni et al., 2011**). En outre, une autre étude a montré que l'extrait éthanolique de feuilles de vigne a des effets hépatoprotecteurs (**Orhan et al., 2007**).

En Iran, les feuilles de raisin sont utilisées dans un aliment traditionnel (feuille de vigne Dolma) et pour le traitement de la diarrhée et des saignements (**Zargari, 1993**). Les feuilles de raisin avec activité antioxydante ont été rapportés pour traiter l'Insuffisance veineuse chronique chez l'homme et la néphrotoxicose induite par la citrine (**Bilgrami et al., 1993 ; Kiesewetter et al., 2000**).

De plus, les raisins sont parmi les fruits les plus consommés. Un certain nombre d'études in vivo et in vitro ont été menées sur le matériel végétal et ont révélé que les feuilles de vigne exercent diverses activités biologiques, y compris effets antibactérien, spasmodiques, hypoglycémisants et vasorelaxants (**Montvale, 2002 ; Orhan et al., 2006**).

En outre, la feuille de raisin a été utilisée pour le syndrome de fatigue chronique (SFC), la diarrhée, les saignements menstruels lourds, les saignements utérins. Il a également été utilisé comme un laxatif doux pour la constipation (**Kapoor, 1990 ; Hebash et al, 1991**). En Europe, les feuilles de Vivigne sont documentées dans la littérature traditionnelle pour leurs propriétés astringentes et homéostatiques où elles sont utilisées dans le traitement de la diarrhée, l'hépatite, les maux d'estomac, saignement, hémorroïdes, varices et autres maladies cardiaques et circulatoires (**Balík et al., 2008, Bombardelli et al , 1995**).

Peu d'études ont été menées sur les effets biologiques des feuilles de vigne. l'extrait aqueux de ces feuilles possède des activités antidiabétiques, antioxydantes et antibactérienne (**Nilüfer et al., 2007**). L'activité anti-leishmaniale de l'extrait aqueux et éthanolique des feuilles de vigne a également été déterminée (**Kong et al., 2003**).

L'ASE nous a permis de réaliser une extraction extrêmement rapide (a 10 min, par contre toutes les autres techniques ont besoin de 24 heures et plus), facile (technique automatisée),

simple (non fatigante), sûre (sans danger, exposition rapide au solvant), peu coûteuse (utilisation d'une quantité très faible de solvant par rapport aux autres techniques) et nous a garanti une meilleure productivité (des rendements d'extraction des polyphénols très proches aux résultats des littératures et mêmes supérieurs aux autres qui ont réalisé l'extraction par d'autres techniques dans un temps allant de 24 heures et plus) ; donc il est très intéressant d'avoir le même rendement ou un rendement supérieur dans un temps extrêmement court par rapport aux travaux précédents. Elle a fourni un énorme avantage à notre étude. Il faut signaler aussi que notre étude est la première de son genre ; c'est la première fois dans le monde entier que l'extraction des polyphénols des feuilles de vigne est effectuée par la technique de l'ASE.

Des auteurs ont montré que l'éthanol reste le solvant le mieux choisi pour extraire les antioxydants d'une plante (**Sun et al., 2007**) ce qui est en accord avec nos résultats et ceci du fait que l'éthanol est un solvant polaire qui solubilise correctement les composés phénoliques polaires. Donc la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé.

Les quantités en phénols totaux des cinq extraits aqueux des feuilles de vigne varient entre 11,63 et 19,85 mgEAG/ g MS. Les teneurs en phénols totaux dans des extraits aqueux trouvées par (**Didem et al., 2014**) sont proches à nos résultats de l'ordre de 12,25 et 19,06 mgEAG/ g MS. Nos teneurs en phénols totaux des cinq extraits éthanoliques des feuilles de vigne varient entre 27,51 et 40,44 mgEAG/ g MS. Les teneurs en phénols totaux trouvées par (**Balga et al., 2015**) sont proches à nos résultats à raison de 18,32 et 40,78 mgEAG/ g MS, alors que les teneurs trouvées par (**Helena et al., 2012**) qui sont de l'ordre de 16,2 et 22,9 mgEAG/ g MS sont faibles par rapport à nos résultats ; ce qui permet de conclure la richesse de nos extraits en polyphénols totaux, ce résultat était en accord avec (**Monagas et al., 2006, Kosar et al., 2007, Orhan et al. 2007, Pari et Suresh 2008, Dani et al. 2010, Oliboni et al. 2011**) qui ont signalés que les feuilles de raisin sont riches en composés phénoliques .

La composition phénolique dans le raisin varie largement et est habituellement déterminée par plusieurs facteurs, tels que : la variété de raisin et les conditions dans lesquelles ils étaient cultivés : sol, emplacement géographique, exposition à la lumière, température, exposition au soleil et météo. En outre ; La quantité et les types de composés phénoliques présents dans une feuille de raisin particulière peuvent varier et sont fortement influencés par le processus d'extraction, ainsi que par la source et la variété (**Xu et al., 2011**).

Les IC<sub>50</sub> des radicaux hydroxyles par ERP de nos extraits aqueux et éthanoliques varient respectivement entre 0,52 - 0,81 mg/ml et 0,27 - 0,83 mg/ml. En tenant compte l'absence des

résultats des travaux d'évaluation d'IC50 des radicaux hydroxyles par ERP ; nous n'avons pas pu comparer nos résultats avec d'autres.

Nos résultats enregistrent des IC50 des radicaux DPPH dans les extraits aqueux et éthanoliques qui varient entre 0,11- 0.43 et 0.07- 0.39 mg/ml respectivement .Ces résultats sont moyennement proches a ceux obtenus par **(Balga et al., 2015)** qui sont de l'ordre de 0.6 – 0.23 mg/ml.

Ce qui concerne la corrélation entre la richesse des extraits étudiés en polyphénols et leurs activités antioxydantes obtenues ; ces dernières ont prouvé que les polyphénols sont très actifs comme antioxydants ce qui montre l'efficacité de nos extraits, cette conclusion est en accord avec **(Monagas et al., 2006)** .

Les meilleurs rendements d'extraction ont été enregistrés chez les variétés **VERMENTINO** ( $23,85 \pm 0.59$  %) puis **BARBARA SARDO** ( $21,61 \pm 1.14$  %) pour les extraits aqueux, et **VITE NIEDDERA** ( $27,25 \pm 1.21$  %) puis **VERMENTINO** ( $26,24 \pm 0.43$ %) pour les extraits éthanoliques. Alors que les variétés **VITE NIEDDERA** et **ALGERIA** ont enregistré respectivement les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux à la fois dans les extraits aqueux et éthanoliques. Cependant les meilleures activités antioxydantes évaluées par ERP ont été signalés chez les variétés **ZIBIBO** et **BARBARA SARDO** respectivement pour les extraits aqueux et les variétés **BARBARA SARDO** puis **VITE NIEDDERA** pour les extraits éthanoliques. Les variétés **BARBARA SARDO** et **ALGERIA** ont montré les meilleurs pouvoirs antioxydant par piégeage des radicaux DPPH pour les extraits aqueux et éthanoliques à la fois ; ce qui rend ces variétés les plus intéressantes pour l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique. En effet pour une meilleure sélection des variétés ; nous devons effectuer des études plus approfondies telles que les analyses phytochimiques et des tests in vivo.

Parmi les méthodes que nous avons choisies pour l'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols ; c'est la spectroscopie de résonance paramagnétique par électron (EPR) car c'est une technique d'analyse très sensible qui ne concerne que les espèces paramagnétiques, comme les radicaux libres et les métaux de transition. Elle nous a assuré une meilleure identification et quantification des RL. C'est le moyen préféré de détecter et d'analyser les électrons à radicaux libres pour de nombreuses raisons ; elle est très rapide, souvent en quinze à vingt minutes, et a fournit une analyse précise des activités des radicaux libres. De même, les résultats d'ERP sont très faciles à comprendre et peuvent être enregistrés lorsque les électrons à radicaux libres sont étudiés.

En outre, alors que d'autres techniques de spectroscopie peuvent identifier les radicaux libres et les électrons appariés, la spectroscopie ERP identifie les radicaux libres seulement, une fonction qui est très importante dans l'étude des électrons non appariés (**Molinié et al, 2001**).

Enfin, Les extraits de feuilles de vigne obtenus par la méthode ASE peuvent être considérés comme une source naturelle riche en composés phénoliques avec de bonnes propriétés antioxydantes.



## Conclusion et perspectives

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquelles on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes et des capacités antioxydantes. Les composés antioxydants font l'objet de nombreux travaux car, en plus de leur utilisation comme des conservateurs dans les denrées alimentaires en remplaçant les antioxydants de synthèse, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies. Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vue les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des antioxydants de synthèse.

Les recherches scientifiques ont confirmés la richesse de la vigne en composés phénoliques ; pour cela et dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des composés phénoliques et l'évaluation des propriétés antioxydantes des dix extraits des feuilles des cinq variétés de feuilles de vigne ; dont quatre variétés sont d'origine italienne et une algérienne.

- La première partie de cette étude concerne l'extraction par l'ASE qui a fourni un énorme avantage à notre étude, elle a permis de réaliser une extraction extrêmement rapide (à 10 min, par contre toutes les autres techniques ont besoin de 24 heures et plus), facile (technique automatisée), simple (non fatigante), sûre (sans danger, exposition rapide au solvant), peu coûteuse (utilisation d'une quantité très faible de solvant par rapport aux autres techniques) et nous a garanti une meilleure productivité (des rendements d'extraction des polyphénols très proches aux résultats des littératures et mêmes supérieurs aux autres qui ont réalisé l'extraction par d'autres techniques dans un temps allant de 24 heures et plus) ; donc il est très intéressant d'avoir le même rendement ou un rendement supérieur dans un temps extrêmement court par rapport aux travaux précédents. Il faut signaler aussi que notre étude est la première de son genre ; c'est la première fois dans le monde entier que l'extraction des polyphénols des feuilles de raisin est effectuée par la technique de l'ASE.

-La deuxième partie quantification des phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu.

Les résultats obtenus ont montré la teneur en polyphénole totaux des extraits des cinq variétés de la plante utilisée qui varie entre 11.63 - 19.85 mg EAG /g MS dans les extraits aqueux, et entre 27.51 - 40.44 mg EAG /g MS dans les extraits éthanoliques.

Nous avons conclu qu'il existe une corrélation étroite entre le solvant d'extraction utilisé et les rendements d'extraction obtenus ; ou l'éthanol enregistre le meilleur rendement d'extraction par rapport à l'eau (à concentration 60% Éthanol / 40% eau ; température de 40 °C et pression de 1500 PSI) et aussi une corrélation étroite entre le solvant d'extraction utilisé et les teneurs en polyphénols totaux obtenues ; ou l'éthanol enregistre la meilleure teneur en polyphénols totaux en comparaison avec l'eau.

- La troisième partie est l'étude de l'activité antioxydante des dix extraits de feuilles de raisin en utilisant ainsi deux techniques : piégeage du radical DPPH et piégeage des radicaux hydroxyles.

Nos résultats obtenus dans cette étude ont montré que l'IC<sub>50</sub> des radicaux hydroxyles par les extraits aqueux et les extraits éthanoliques varient entre 0.52 - 0.81 mg/ml et 0.27 - 0.83 mg/ml respectivement. Alors que l'IC<sub>50</sub> DPPH des extraits aqueux et éthanoliques varie entre 0.11 - 0.43 mg/ml et 0.07 - 0.39 mg/ml respectivement.

Les extraits utilisés ont montré une teneur élevée en polyphénols totaux et un haut pouvoir antioxydant par le piégeage des radicaux libres (DPPH) et hydroxyles ; Ce qui rend nos résultats intéressants.

Il serait intéressant de développer cette recherche de point de vue opérationnel ; de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Faire des analyses chimiques HPLC et RMN sur les extraits utilisés pour avoir les compositions chimiques détaillées ;
- Avoir des antioxydants naturels qu'on peut utiliser dans l'industrie agroalimentaire comme conservateurs ou aussi des compléments nutritifs ;
- Elargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques : antitumorale, anticancéreuse et anti-inflammatoire ;
- Caractériser et isoler les principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques ;

- Isolement et caractérisation des composés actifs dans les différents extraits par des méthodes plus spécifiques ;
- L'exploitation de ces antioxydants naturels dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique ;
- Evaluation d'autres effets biologiques *in vitro* comme *in vivo* des extraits bruts et de leurs composés actifs en utilisant différentes techniques.

# **Références bibliographiques**

## A

- Abd El-Rahman, H.H., Mohamed, M.I., Gehad, A.E.A., Awadallah, I.M. (2006).** Ameliorating the Anti-nutritional factors effect in *Atriplex halimus* on sheep and goats by ensiling or polyethylene glycol supplementation. *Int. J. Agr Biol*, 8 (6): 766–769.
- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A, 2007.** Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4): 324-329.
- Ahsan H, Ali A, Ali R (2003).** Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and experimental immunology*, 131, 398-404.
- AL Namer Rashad Mohammed Musleh.(2014).** Valorisation Pharmacologique de *Rosmarinus Officinalis* et de *Lavandula Officinalis*: Toxicité aigue ,Potentiel Psychotrope et Antibactéries. Thèse de doctorat, Pharmacologie et Toxicologie. Université Mohammed V – AGDAL.
- Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008).** Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int*, 41: 1–15.
- Ames B N (1986).** Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res*, 206, 3-32.
- Andersen MØ, Markham KR, 2006.** FLAVONOIDS, Chemistry, Biochemistry and Applications. Natural Products from Plants. Edition Taylor & Francis Group, LLC.
- Aron P. M. et Kennedy J. A. (2008).** Flavan-3ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*. **52**: 79-104.
- Arora A., Sairam R. and Srivastava G. 2002.** Oxydative stress and antioxydative system in plants. *Current Science*. 82. Pp:11227-1238.

## B

- Bahorun, T. (1997).** Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. *Food. Agric. Res. Council, Réduit, Mauritius*, 83-94.
- Balasundram N., Sundram K. et Samman S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. **99** : 191–203.
- Barros A., Girones-Vilaplana A., Teixeira A., et al. (2014).** Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly) phenolic compounds: A comparative study. *Food Research International*. Vol :65, p : 375-384.

- Bartosz G.2003.** Generation of reactive oxygen species in biological systems ; comments on Toxicology.9.Pp : 5-21.
- Baudin B. (2006).** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio.* **2** (1): 43-52.
- Beani J. C. (1995).** Actions biologiques du rayonnement solaire sur la peau. *Revue Internationale de Pédiatrie*, 259, 2-7.
- Berger M (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : etat des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20, 48-53.
- Bianco A., Chiacchio M.A., Grassi G., Iannazzo D., Piperno A et Romeo R. (2006).** Phenolics compounds of *Olea europaea* : Isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemisty.* **95**: 562-565.
- Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000).** Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol*, 13: 135.
- Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J (2003).** Radicaux libres et anti-oxydants. In : Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Delattre J, Durand, G, Jardillier J C. Eds, Flammarion (Paris), pp: 59-81
- Bossokpi, I.P.L. (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). *Thèse de pharmacie, Bamako*, p 133.
- BOULDJADJ R., 2009.** étude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux lyophilisé d'Artemisia herba alba Asso. Université de Constantine p.
- Brachet, A., S. Rudaz, et al. (2001).** "Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves." *Journal of Separation Science* 24 : 865- 873.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.* **28** : 25-30.
- Bruneton J, 2009.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique & Documentation, 4ème Edition. Paris.
- Bruneton J. (1999).** Phytochimie. Plantes médicinales. Pharmacognosie. *3eme édition, Paris,France.* pp : 125165.
- Bruneton J. (2008).** Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris.* pp 198-260.
- Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

**Brzozowska, J., Hanower, P., Tanguy, J. (1973).** Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, 12: 2353-2357.

**Busserolles J., Gueux E., BalasinSska B., et al. (2006).** In vivo antioxidant activity of procyanidin-rich extracts from grape seed and pine (*Pinus maritima*) bark in rats. *Int J Vitam Nutr Res*. Vol: 1, p: 22-27.

### C

**Causse, C.,(2005).**Les secrets de santé des antioxydants,*Edition ALPEN s.a.m.*, p 95.

**Celik, H., Agaoglu, Y.S., Fidan, Y., et al. (1998).** General Viniculture. Sun Fidan A.S. Professional Books Series No. 1, 1-253

**Chacon M., Arola L., Mateo S., et al. (2009).** Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes in vitro. *Cytokine*. Vol:47, p:137-142.

**Cheick traore M., 2006.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako : 72p.

**Chemat, S., A. Lagha, et al. (2004).** "Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds." *Flavour and Fragrance Journal* 19: 188-195.

**Chen, S.S. (2004).** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59 : 113-122.

**Chira K., Such J., Saucier C., Teissèdre L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Ed :Springer*. 6 :75-82.

**Clifford M.N. (1999).** Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea *Washington, DC, CRC Press, Boca Raton Florida*. 41 (5): 393-397.

**Colette E., 2003.** Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako : 147 P.

**Crozier A. (2003).** Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In *Plants' Diet and Health*". *Ed. Goldberg*. pp: 27- 48.

**Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006).** *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Edt Blackwell Publishing Ltd.

**Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber SL, Duke JA, Brielmann HL, 2006.** Natural Products from Plants. 2eme Edition. Taylor & Francis Group, LLC.

▷

**D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. et Masella R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dellIstituto-Superiore-di-Sanità*. **43**(4) : 348-361.

**Daels-rakotoarison D. (1999).** Extraits polyphénoliques d'aubepine, de cola et d'eglantier. Thèse de doctorat. Université de Lille II. France. 172 (64).

**Dean, F.M., 1963.** Naturall occuring Oxygen Ring Compounds. Butterworths. Londres. Pp 148.

**Defraigne J-O.**— Un mécanisme physiopathologique central à l'origine des complications du diabète ,*Rev Med Liege*, **2005**, **60**, 472-478.

**Delattre J, Beaudeau J-L, Bonnefont-Rousselot D. 2005**— *Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques*. Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 547 pages.

**Delattre J., Beaudeau et J.L., D. Bonnefont., Rousselot. 2005.** Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. P 87 .108.

**Dembinska-Kiec A., Mykkänen O., Kiec-Wilk B., Mykkänen H. (2008).** Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*. **99**: ES109-ES117.

**Densiov E T, Afanas'ev I B (2005).** Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds, Taylor & Francis Group (U.S.A), pp: 703-861.

**Dhalla N.S. (2000).** Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* . 18 : 655-73.

**Didem deliorman O., Ender ergun B., Ergun F., et al. (2007).** Hepatoprotective effect of *Vitis vinifera* L. leaves on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol :112, p :145-151.

**Druzynka B., Stepniewska A. et Wolosiak R. (2007).** The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientarum Polonorum Technologia Alimentaria*. **6**: 27-36.

**Dubois, G.E., Grosbay, G.A., Saffron, P. (1977).** Non nutritive Sweeteners: Taste structure.



## F

**Fadda angela, Bernardo pace, Alberto angioni, Antonio barberis, Maria cefola.2015.**

Journal of Food Processing and Preservation .P 04-05.

**Favier A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*.17: 501-512.

**Frankel E N; Meyer A S. 2000.** "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants". *Journal of Science and FoodAgriculture*. P 80: 1925-1941.

**Frankel E. N. (1993).** In search of better methods to evaluate natural antiooxidants and oxidative stability in foods lipids. *Trends in Foods Sci. technol.* 4: 220-225.

**Frankel, E, N. 1996.** Antioxidants in lipids and their impact on the food quality. *Food chem.* 57. 51-55.

**Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE, Kozukue N, 2006.** Antimicrobial activities of tea catechins and the aflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 69(2): 354-361.

## G

**Gharib N., Zarei M., Amiri O., et al. (2006).** Spasmolytic effect of *Vitis vinifera* leaf extract on rat colon. *Daru J. Pharm. Sci.* Vol: 14, P: 203–207.

**GRIEVE, M. (1990).** Role of free radicals and catalytic metalytic ions in human disease; an overview. *Methods in Enzymology*. P :185-186

**Guo, L., Xie, M. Y., Yan, A. P., Wan, Y. Q., & Wu, Y. M. (2006).** Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC-MS Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386(6), 1881-1887.

## H

**Hamburger, M., D. Baumann, et al. (2004).** "Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants-Effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances." *Phytochemical Analysis* 15: 46-54.

**Handoussa H., Hanafib R., Eddiastyb I., et al. (2013).** Anti-inflammatory and cytotoxic activities of dietary phenolics isolated from *Corchorus olitorius* and *Vitis vinifera*. *Journal of functional foods*. Vol :5, p :1204–1216.

**Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H., Poutanen H. (2010).** Impact of Dietary Polyphenols On Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol. Sci*, **11**: 1365-1402.

**Harbone, J.B. (1993).** Introduction to Ecological Biochemistry, 4th Ed; Academic Press: London.

**Harborne JB, 1998.** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition.

**Haslam, E., 1998.** Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action, Cambridge University Press, Cambridge, pp 422.

**He Z., Xia W. et Chen J. (2008).** Isolation and structure elucidation of phenolics compounds in Chinese olive (*Cnarium album L.*) fruit. *European Food Research and Technology*. **226**: 1191-1196.

**Hebash K., Soliman M. (1991).** Volatile components of grape leaves. *Journal of Islamic Academy of Sciences*. Vol: 4, p: 26–28.

**Heimeur, N., Idrissi Hassani, L.M., Amine Serghini, M. (2004).** Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). *Reviews in Biology and Biotechnology*, 3 (1): 37-42.

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

**Hemmati A., Arzi A., Tamri P., et al. (2010).** Anti-inflammatory effect of grape seed (*Vitis vinifera*) extract on formaline-induced edema in rat paw. *biological sciences 5*. Vol: 12, p:760-763.

**Hertog M.G.L., Hollman P.C.H, Van de Putte B. (1993).** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **41**: 1242-1246.**45**: 287-306.

**Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Katan M.B. (1992).** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **40**: 2379-2383.

**Huang D., Rior R L. 2005.** "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (6): 1841-1856.

**Hurren, D. (1999).** "Supercritical fluid extraction with CO<sub>2</sub>." *Filtration and Separation* 36: 25-27.

I

**Ignat I., Volf I., Popa I.V. (2011).** A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry* 126: 1821-1835.

**Iserin, P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2nd edition, Dorling Kindersiey Limited, Londres

**Isnard, H. (2000).** La Vigne en Algérie, étude géographique. Précis de viticulture. P: 561.

J

**J. Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle, 2007;** *Revue Médecine Liège.*, 62: 10: page 628.

**Jyoti S., Ajay K., Anand S., et al. (2009).** Analgesic and anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Vitis vinifera* leaves. *Pharmacologyonline*. Vol :3, p :496-504.

K

**Kaufmann, B. and P. Christen (2002).** "Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction." *Phytochemical Analysis* 13: 105-113.

**Kaufmann, B., P. Christen, et al. (2001).** "Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides." *Phytochemical Analysis* 12: 327-331.

**Knekt P., Kumpulainen J., Jarvinen R., Rissanen H., Heliovaara M., Reunanen A et al. (2002).** Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*. 76: 560-568.

**Koehlin-Ramonatxo C (2006).** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*, 20,165, 177.

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

**Kratchanova, M., E. Pavlova, et al. (2004).** "The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin." *Carbohydrate Polymers* 56: 181-186.

**Kwon, J. H., J. M. R. Belanger, et al. (2003).** "Application of microwave-assisted process (MAP TM) to the fast extraction of Ginseng saponins." *Food Research International* 36: 491–498.

## L

**Le Cren F, 2004.** Les antioxydants, la révolution du XXIe siècle, 2eme édition.

**Lehucher-Michel M.P, Lesgards J F, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. La Presse médicale, 30, 1076-1081.

**Leong, LP., Shui, G. (2002).** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76: 69-75.

**Lhuillier A. (2007).** Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* hook.f ex oliver, *agauria polyphylla* Baker (*ericaceae*), *tambourissa trichophylla* Baker (*monimiaceae*) et *embelia concinna* Baker (*myrsinaceae*). Doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, spécialité : sciences des Agroressources, p 214.

**Li, H., L. Pordesimo, et al. (2004).** "High intensity ultrasoundassisted extraction of oil from soybeans." *Food Research International* 37: 731-738.

**Lugasi A., Hovari J., Sagi K.V., Biro L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica Szegedensis*. 1-4.125-119.

**Luque de Castro, M. D. and L. E. Garcia-Ayuso (1998).** "Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future." *Analytica Chimica Acta* 369: 1-10.

**Luque-Garcia, J. L. and M. D. Luque de Castro (2003).** "Ultrasound: A powerful tool for leaching." *Trends in Analytical Chemistry* 22: 41-47.

**Luque-Garcia, J. L. and M. D. Luque de Castro (2004).** "Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment-Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds." *Journal of Chromatography A* 1034: 237-242.

## M

**Manach C. (1998).** Biodisponibilité des flavonoïdes. Thèse: Clermont-Ferrand: Université Blaise Pascal.

- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. **79**: 727-747.
- Marie-Claude M., 2004.** Les antioxydants. Actifs et additifs en cosmétologie .Ed.Tec & Doc : 337 -352.
- Martin S., Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angiologie* **51**, 304-315.
- Martinez-Cayuella M (1995).** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, **77**, 147-161.
- Marvin E, 2005.** Les antioxydants dans la tourmente. *Phytothérapie*, **3(6)**: 271-273.
- Mason, T. J., L. Paniwnyk, et al. (1996).** "The uses of ultrasound in food technology." *Ultrasonics Sonochemistry* **3**: 253-260.
- Matilde R., Victoria C., Mallafrea E., et al. (2009).** Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes in vitro. *Cytokine*. Vol: **47**, p: 137–142.
- Maydani M. (2000).** Vitamine E and prevention of heart disease in high risk patients. *Nutr. Rev*,**58**, 278-281.
- Middleton, E., Kandasnami, C., Theoharides, T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*,**52**: 673-839.
- Merghem R. (2009).** Eléments de biochimie végétale. Edition Bahaeddine: 107-133.
- MEZITI .A., 2007.** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Etude in vitro et in vivo. Mémoire de Magister Université de Batna.p 30-35-49-67.
- Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Luthje S., 2004.** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*. (3):173-193.
- Milbuty P., Richer A., 2008.** Understanding the Antioxidant Controversy. Ed. Praeger: 81p.
- Mohammedi Z., 2013.** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie. université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen Algérié. p 60.
- Mompon B., Lemaire B., Mengal P. et Surbel D. (1996).** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. IN « Polyphénols 96 ». *Ed INRA*. 31-35.

**Muanda F., 2010.** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat en chimie organique. Université Paul Verlaine-Metz : 55p.

## N

**Nakazawa H C ; Genka et al., 1996.** Pathological aspects of active oxygens / free radicals. Japanese journal of physiology . P 15-32-46.

## O

**Oldham KM, Bowen PE, 1998.** Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial. *Journal of the American Diet Association*, 98(9): 1001-1008.

## P

**Pal Yu B (1994).** Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiopathological Reviews*, 74, 139-155.

**Pan, X., G. Niu, et al. (2003).** "Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves." *Chemical Engineering and Processing* 42: 129-133.

**Pastre J., Priymenko N., 2007.** Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Méd. Vét.* (4) :187p.

**Pelletier E., Campbel P., Denizeau F., 2004.** Ecotoxicologie moléculaire. Ed. Presses de l'université du Québec.canada : 182p.

**Pelli K., Lyly M., 2003.** Les antioxydants dans l'alimentation. VTT Biotechnology Finlande.(3) :9p.

**Perrin J.L. (1992).** Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. *Revue française des corps gras*. N0 39. P 25-32.

**Peters U., Poole C., Arab L. (2001).** Does tea affect cardiovascular disease? A metaanalysis. *American Journal of Epidemiology*. **154**: 495-503.

**Petrault O, Bastide M, Cotel N et al. 2004.** The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivate di-tert-butylhydroxyphenyl is parallel to the preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction. *Arch Pharmacol*;370:395-403.

**Pietta P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. **63**: 1035- 1042.

**Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. (2002).** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **16**: 233-239.

**Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, 2001.**Antioxidants in food, Practical applications. *Woodhead Publishing Limited*.

potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med.Chem*, **11**: 1135– 1146.

## R

**Ribeiro M T., Waffo-Teguo P., Teissèdre PL. (1999).** Determination of stilbenes (transastringin, cis and trans piceid, and cis and trans resvératrol) in portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47**: 266-267.

**Richter G. (1993).** Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie. *Ed Presse polytechnique et universitaire romande*. pp: 317-339.

**Rolland Y., 2004.** Actualités des lipides en cosmétique .Antioxydants naturels végétaux. OCL. Vol 11(6) : 419 - 424.

## S

**Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jimenez L. ( 2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

**Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**: 3875-3883.

**Shi J., Pohorly J., Kakuda Y., et al. (2003).** Polyphenolics in grape seeds biochemistry and functionality. *Med. Food*. Vol: 6, p:291-299.

**Sies H.,** Antioxidant in disease mechanisms and therapy, *Advances in Pharmacology*, Academic Press, New York, **1997**, 38.

**Sihvonen, M., E. Jarvenpaa, et al. (1999).** "Advances in supercritical carbon dioxide technologies " *Trends in Food Science and Technology* **10**: 217-222.

**Singleton VL.,Orthofer R.,Lamuella-Raventos . ,1999.** «Analysis of total phenols and other oxidants substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.*Methods Enzymol* **299**: 152-178.

**Skerget M., Kotnik P., Hadolin B., Hras A.-R., Simonic M. et Knez Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. **89**: 191-198.

**Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M. (2004).** Lipoic acid as a

**Smyth T, Ramachandran VN, Smyth WF, 2009.**A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5): 421-426.

**Sole M.J. (2002).** Conditioned nutritional requirements : therapeutic relevance to heart failure.*Hers*27, 174-8.

**Sorg O. (2004).** Oxidative stress : a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. **327**: 649-662.

**Stevanovic T. (2005).** Chimie du bois. CHM-22170. Université Laval. Québec.

**Sukhdev Swami Handa, Suman Preet Singh Khanuja, Gennaro Longo, Dev Dutt Rakesh, 2008.**Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants.p 26.

T

**Tanguy M., 2009.** Antioxydants Première partie : Les antioxydants dans l'alimentation .Médecine. Vol 5 (6):256-260.

**Tanguy M., 2009.** Antioxydants Première partie : Les antioxydants dans l'alimentation. Médecine. Vol 5 (6):256-260.

**Toussaint, J-F.,Jacob, M-P., Lagrost , L., chapman. J.(2003).**L'athérosclérose :physiopathologie, diagnostic, thérapeutique.*Edition Masson*, 776p.

**Toussant B., 2008.** Oxygène et stress oxydants, Faculté de Médecine de Greenble (UJF), Université Jose Ph.Furier :19p.

V

**Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.

**Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*.

**Valls J., Millan S., Marti M.P., Borrás E., Arola L. (2009).** Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of chromatography A*, 1216:7143-7172.

**Vergely, c .,et Rochette, L.(2003).**stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire.*Medecine therapeutique cardiologie*,volume 1,Numero 3,131-139.



**Vermerris W, Nicholson R, 2006.** Phenolic Compound Biochemistry, *Springer*, Dordrecht.  
Paris M, Hurabielle M, 1981. Abrégé de matière médicale- Pharmacognosie. Tome 1. Edition  
Masson, Paris. p.182

**Vigna G., Costantini G., Catapano A., et al. (2003).** Effect of a standardized grape seed  
extract on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in heavy smokers.  
*Metab.clin.exp.* Vol: 52, p:1250-1257

**Vincent HK, Taylor AG.—** Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced  
oxidant stress in humans. *Int J Obesity*, **2006**, **30**, 400–418.

**Vitrac X., Bornet A., Vanderlinede R. (2005).** Determination of stilbenes (Delta-viniferin,  
trans-astresin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, epsilon-niferin) in Brazilian wines.  
*Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53** (14): 5664-5669.

## W

**Wang, L. and C. L. Weller (2006).** "Recent advances in extraction of nutraceuticals from  
plants." *Trends in Food Science & Technology* 17(6): 300-312.

**Williams, G. M. (1993).** Inhibition of chemical-induced experimental cancer of synthetic  
phenolic antioxidants. In G. M. Williams, H. Sies, G. T. Baker III, J. W. Erdmann, Jr., & C. J.  
Henry (Eds.), *Antioxidants: Chemical, physiological, nutritional and toxicological aspects*  
(pp. 202-208). Princeton, NJ: Princeton Scientific Press.

**Williams, G. M. (1994).** Interventive prophylaxis of liver cancer. *European Journal of  
Cancer Prevention*, 3, 89-99.