

## CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES FLAVONOÏDES DE LA VIGNE ROUGE DE LA VARIÉTÉ AHMAR BOUAMAR

AGOUAZI Ounissa<sup>1,2\*</sup>, BOUCHENAK Ouahiba<sup>3</sup>, YAHIAOUI Karima<sup>4</sup> et ARAB Karim<sup>2\*</sup>

1. Laboratoires des Ressources Naturelles : Viticulture/Arboriculture, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 15000, Algérie.

2. Laboratoire Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques, Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, 35000, Algérie.

3. Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, 35000, Algérie.

4. Laboratoire de Technologie Alimentaire, Faculté des Sciences de l'Ingénieur, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, 35000, Algérie.

Reçu le 22/05/2019, Révisé le 27/06/2019, Accepté le 29/06/2019

### Résumé

**Description du sujet :** L'étude vise à valoriser le pouvoir antioxydant des flavonoïdes d'un cépage algérien local.

**Objectifs.** Le présent travail rentre dans le cadre d'un projet de recherche sur la valorisation et la conservation de la variété Ahmar Bouamar, de la région de Benchécao (wilaya de Médéa)

**Méthodes :** Les extraits obtenus sont dosés puis caractérisés par une analyse chromatographique liquide à haute performance. L'évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* a été réalisée par des méthodes colorimétriques, à savoir le test de 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), de réduction de fer et celui de décoloration de la bêta-carotène.

**Résultats :** Les molécules bioactives identifiées dans les différentes fractions flavonoïdiques sont la catéchine et l'épicatéchine,  $\alpha$  viniférinol, cis et trans-picéide. Pour une concentration de 1mg/ml, l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique ont présenté le pouvoir anti-radicalaire le plus élevé avec respectivement des valeurs de 72,9  $\pm$  0,45 % et 72,08  $\pm$  0,78 %, proches de celui du control positif utilisé : l'acide ascorbique (95,45  $\pm$  1,47%) ( $p < 0,01$ ). Concernant le test de réduction de fer, l'extrait aqueux et butanolique ont présenté un pouvoir réducteur élevé supérieur à celui exercé par l'antioxydant de référence l'acide ascorbique. Pour ce qui est du test de décoloration de la bêta-carotène, les flavonoïdes et l'acide ascorbique ont inhibé de façon très significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique/ $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif représentant 100% de la peroxydation ( $p < 0,01$ ).

**Conclusion :** Il ressort ainsi que les extraits phénoliques de la vigne rouge peuvent être valorisés dans l'industrie pharmaceutique, afin de pouvoir traiter les pathologies liées aux stress oxydatif.

**Mots clés:** *Vitis vinifera* L., cépage local, flavonoïdes, HPLC, activité antioxydante.

### PHYTOCHEMICAL SCREENING AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLAVONOIDS IN THE RED VINE OF THE AHMAR BOUAMAR VARIETY

#### Abstract

**Description of the subject:** This study aims to promote the antioxidant power of flavonoids of a local Algerian grape variety.

**Objective:** The present work is part of a research project on the valorization and conservation of Ahmar Bouamar variety, from the region of Benchécao (Médéa).

**Methods:** The extracts obtained are assayed and then characterized by a high performance liquid chromatographic analysis. The evaluation of the *in vitro* antioxidant capacity was carried out by colorimetric methods, namely the test of 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), reduction of iron and that of discoloration of beta-carotene.

**Results:** The bioactive molecules identified in the different flavonoid fractions are catechin and epicatechin,  $\alpha$  viniferinol, cis and trans-piceid. At a concentration of 1 mg / ml, the ethyl acetate extract and the butanolic extract had the highest anti-radical content with values of 72.9  $\pm$  0.45% and 72.08  $\pm$  0.78%, close to that of the positive control used: ascorbic acid (95.45  $\pm$  1.47%) ( $p < 0.01$ ). Concerning the iron reduction test, the aqueous and butanolic extract showed a high reducing power superior to that exerted by the reference antioxidant ascorbic acid. With regard to the beta-carotene discoloration test, the flavonoids and ascorbic acid significantly inhibited the coupled oxidation of linoleic acid /  $\beta$ -carotene compared to the negative control representing 100% of the peroxidation ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** It thus appears that the phenolic extracts of the red vine can be valorized in the pharmaceutical industry, in order to be able to treat pathologies related to oxidative stress.

**Keywords :** *Vitis vinifera* L., local varietal, flavonoids, HPLC, antioxidant activity.

\* Auteur correspondant: AGOUAZI Ounissa , E-mail: ounissal@hotmail.fr

## INTRODUCTION

En Algérie, le cépage Ahmar Bouamar est une variété de raisin de table par excellence très recherchée. Une étude ethnobotanique de cette plante a fait ressortir un usage particulier de ses feuilles comme antalgique, vu sa richesse en métabolites secondaires en particulier les flavonoïdes. Chez la plante, ils sont impliqués dans des fonctions essentielles telles que la pigmentation, la reproduction, la croissance et la protection contre les pathogènes. Ces métabolites sont donc à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme humain et méritent l'intérêt croissant que la recherche leur porte. Les travaux réalisés en Algérie se résument à l'activité antimicrobienne des extraits flavonoïdiques et tanniques des feuilles de la vigne sauvage [1], ceux traitant l'activité antiradicalaire de différents extraits de pépins de la vigne rouge [2] et l'étude de [3] portant sur l'effet des extraits de feuilles de la vigne sur les maladies cardiovasculaires. Pour cela, nous nous sommes intéressés dans ce travail à mieux valoriser les cépages autochtones algériens, afin de les préserver et d'assurer un développement durable.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

À maturité optimale, le prélèvement des échantillons (grappes et feuilles) est réalisé au mois de novembre 2016 dans la région de Benchécaou de la wilaya de Médéa. Les feuilles sont séchées à l'abri de la lumière pendant 15 jours puis broyées et tamisées pour récupérer la poudre qui servira pour les différentes analyses.

### 2. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques réalisés sur la variété Ahmar Bouamar, permettent de rechercher les substances bioactives (métabolites primaires ou secondaires) synthétisées par cette plante. Ils sont effectués soit sur la poudre, soit sur l'infusé à 10 %. Les méthodes de caractérisation utilisées dérivent de celles décrites par Harborne *et al.* [4] et Raaman *et al.* [5]. Les métabolites recherchés sont les tanins totaux, tanins galliques, mucilage, leuco-anthocyanes, saponosides, anthocyanes, caroténoïdes, amidon, glucosides, protéines, sucres réducteurs, flavonoïdes, sésosides, quinones libres, alcaloïdes et lipides.

### 3. Préparation des extraits flavonoïdiques

L'extraction des flavonoïdes est faite selon la méthode décrite par Markham [6]. Ainsi, 30g de poudre végétale sont macérés dans du méthanol 85% (10% W/v) pendant 72 heures. Une fois filtré et évaporé à basse pression (Rota Vapor, Buchi 461) à 55°C, la phase aqueuse est confrontée à plusieurs solvants notamment l'éther de pétrole (v/v), l'éther diéthylique (v/v), l'acétate d'éthyle (v/v) et le butanol (v/v). La phase aqueuse finale renfermant les flavonoïdes est évaporée à 55°C, puis quantifiée. Pour le dosage des flavonoïdes contenus dans l'extrait, la méthode adoptée est celle de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) citée par Bahorun *et al.* [7]. Pour ce test, un mélange composé d'1ml de l'extrait flavonoïdique et d'1 ml de solution de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 2% est incubé à température ambiante pendant 30 min, puis l'absorbance est mesurée à 420 nm. La concentration des flavonoïdes est exprimée en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g).

### 4. Caractérisation des flavonoïdes par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Afin d'identifier les flavonoïdes synthétisés par la vigne rouge, nous avons utilisé une colonne de type Ascentis C18 HPLC (250 mm × 4,6 mm, 5 ml, 5 microns). La première phase mobile (A) est composée d'eau, de méthanol et d'acide acétique (89/10/1). La deuxième phase mobile (B) est un mélange d'eau, de méthanol et d'acide acétique (9/90/1). La détection des composés a été réalisée à 254 nm, en utilisant un détecteur uv/visible de type WATERS 2996 (PDA). L'identification et la quantification des flavonoïdes contenu dans 20 µl d'extrait est faite par comparaison au temps de rétention, et des surfaces des étalons utilisés. Les analyses ont été répétées 3 fois.

### 5. Détermination des activités biologiques

#### 5.1. Effet scavenger du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl)

L'évaluation de l'effet antioxydant par le test de DPPH est faite en se référant à la méthode décrite par Bozin *et al.* [8]. Le test consiste à mélanger 975µl de la solution méthanolique de DPPH (Sigma Chemical Co., Etats-Unis) (0,0024g/l) à 25µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (de 0,06 à 1mg/ml).

A titre comparatif un test négatif est réalisé avec 25µl de méthanol et 975µl de la solution méthanolique de DPPH. Après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurés à 517 nm. Parallèlement, un contrôle positif est préparé par un antioxydant standard, l'acide ascorbique, tout en mesurant l'absorbance dans les mêmes conditions que les échantillons. Le test est répété trois fois pour chaque concentration, et le pouvoir d'inhibition est exprimé en % en appliquant la formule suivante :  $I\% = (1 - \text{Abs contrôle} - \text{Abs test} / \text{Abs contrôle}) \times 100$ . Où : **Abs contrôle** : absorbance moyenne du radical seul ; **Abs test** : absorbance du radical libre en présence d'antioxydant après trente minutes de contact ; **I%** : pourcentage d'inhibition.

### 5.2. Réduction de fer (test FRAP)

Pour ce test, nous avons adopté la technique d'Oyaizu [9]. L'essai consiste à mélanger 1ml des différentes concentrations des extraits de la vigne rouge (0,1 à 1mg/ml) avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain Marie à 50°C pendant 20 min. La réaction est arrêtée en rajoutant 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% au mélange. Après avoir centrifugés les tubes à 3000 rpm pendant 10 minutes, 2,5ml du surnageant sont mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution de chlorure ferrique à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700 nm contre un blanc. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

### 5.3. Test de blanchissement par la $\beta$ carotène

La méthode utilisée est celle adoptée par Sun *et al.* [10]. L'émulsion de l'antioxydant est préparée en faisant dissoudre 2 mg de  $\beta$  carotène (Fluka, Allemagne) dans 10 ml de chloroforme, puis 1 ml de cette solution est mélangé

avec 20 mg d'acide linoléique purifié (Sigma Chemical Co., Etats-Unis) et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme a été éliminé en utilisant un bain Marie et le résidu obtenu est repris par 50 millilitres de peroxyde d'hydrogène. Un volume de 200 µl d'extrait brut méthanolique ou d'antioxydant de référence (acide ascorbique) à une concentration de 2,5 mg/ml sont ajoutés à 5 ml de l'émulsion. Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, comprenant 5 millilitres de l'émulsion de  $\beta$ -carotène et 200µl de méthanol. Le mélange est bien agité et la lecture de l'absorbance à 470 nm se fait immédiatement à  $t_0$  contre un blanc qui contient l'émulsion sans la  $\beta$ -carotène. Les tubes sont mis dans un bain Marie à 50°C et la lecture de l'absorbance est faite toutes les 10 minutes durant 60 minutes. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la décoloration du  $\beta$ -carotène en employant la formule suivante : % d'inhibition =  $[1 - (A - A_t - A^\circ - A^\circ t)]$ . Où :  $A^\circ$  : absorbance de l'échantillon à  $t_0$  ;  $A_t$  : absorbance de l'échantillon après incubation de 60 minutes ;  $A^\circ$  : absorbance du contrôle négatif à  $t_0$  ;  $A^\circ t$  : absorbance du contrôle négatif après incubation de 60 minutes.

### 6. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été statistiquement analysés à l'aide du test de Student. Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  Erreur Standards à la Moyenne. Le seuil de signification a été fixé à  $p < 0,05$ .

## RÉSULTATS

### 1. Screening phytochimique

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des feuilles de la variété Ahmar Bouamer a donné les résultats représentés dans le tableau 1. Il est à constater que la plante étudiée contient des polyphénols, représentés principalement par des flavonoïdes, des tanins condensés, des anthocyanes, des stéroïdes et des saponines.

Tableau 1 : résultats de screening phytochimique

Métabolites	Observation	Métabolites	Observation
Tanins totaux	+++	Mucilage	+++
Leuco-anthocyanes	+++	Saponosides	+++
Anthocyanes	+++	Caroténoïdes	++
Amidon	-	Tanins galliques	+
Glucosides	+	Protéines	+
Sucres réducteurs	+	Flavonoïdes	+++
Sénosides	-	Quinones libres	-
Alcaloïdes	-	Lipides	-

(-) : absence de substance ; (+) : faible présence de substance ; (++) : moyenne présence de substance ; (+++) : forte présence de substance.

**2. Caractérisation des composés bioactifs par HPLC**

Les composés ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et leurs spectres UV-vis par comparaison avec des chromatogrammes de références dans les

mêmes conditions opératoires. Les profils des flavonols des différentes fractions de l'extrait flavonoidique du cépage étudiés sont représentés dans les figures 1, 2 et 3.

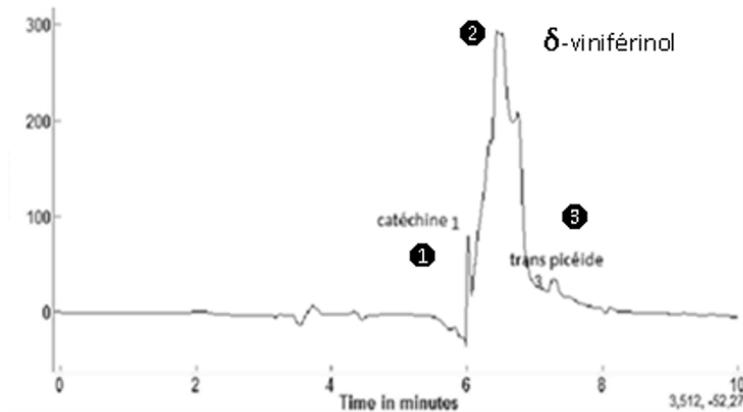


Figure 1 : chromatogramme d'identification des composés de la fraction butanolique  
1 : catéchine ; 2 : α-viniférinol ; 3 : trans-picéide.

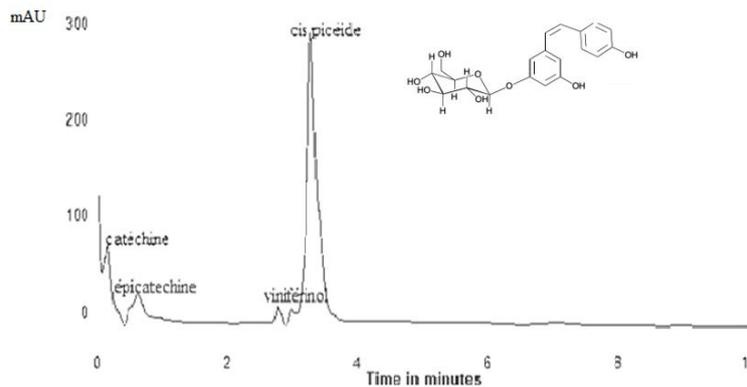


Figure 2 : chromatogramme d'identification des composés de la fraction acétate d'éthyle  
1 : catéchine ; 2 : épicatéchine ; 3 : δ-viniférinol ; 4 : cis-picéide

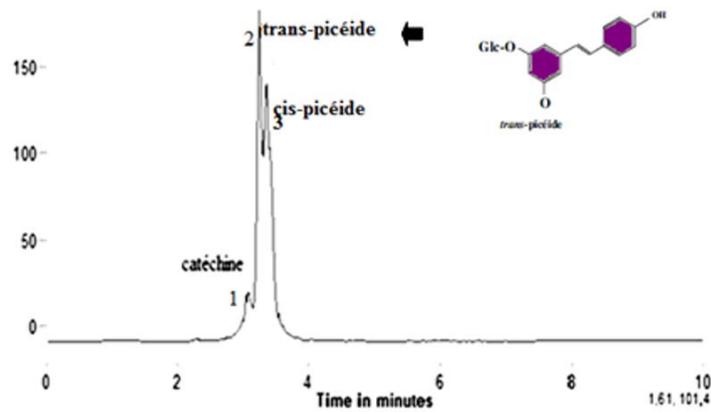


Figure 3 : chromatogramme d'identification des composés de l'extrait aqueux  
 1 : Catéchine ; 2 : Trans-picéide ; 3 : Cis-picéide

Les résultats de l'analyse chromatographique ont révélé la présence de cinq flavonols glucosylés: catéchine, épicatechine, cis-picéide, trans-picéide et le δ-viniférinol, dont la teneur varie significativement d'une fraction à une autre.

**3. Evaluation de l'activité antioxydante in vitro**

L'activité antioxydante *in vitro* peut être estimée par différentes méthodes. Les trois méthodes appliquées dans le présent travail sont : la méthode de piégeage du radical libre DPPH, la méthode de la réduction du fer FRAP, et celle de la décoloration de β carotène.

**3.1. Piégeage du radical libre DPPH**

La méthode DPPH a été choisie, en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité. Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH en présence des échantillons de raisin est représenté dans la Figure 4. On remarque que les fractions butanolique et celles de l'acétate d'éthyle sont des antiradicalaires puissants, avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 70% et des IC 50 respectives de 11,06± 0,1 et 17,19± 0,4 mg/ml. La différence des pourcentages d'inhibitions obtenu entre ces deux extraits et l'acide ascorbique est non significative (p>0,05). En tenant compte de ce paramètre, les capacités du radical sont classées dans l'ordre suivant : acide ascorbique > Extrait d'acétate d'éthyle > extrait butanolique > extrait aqueux.

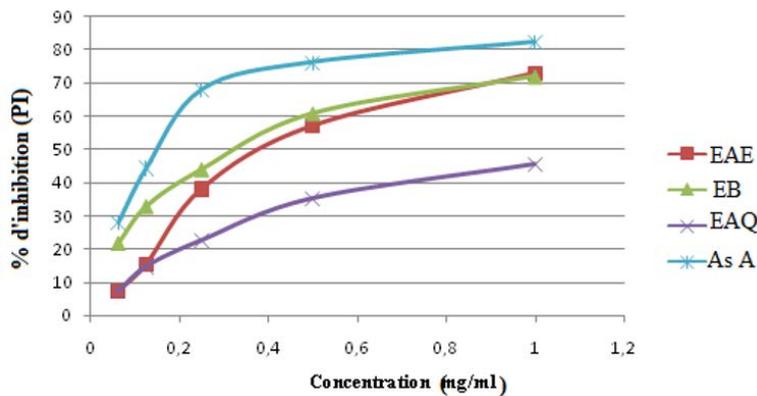


Figure 4. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH  
 EAE : extrait d'acétate d'éthyle ; EB : extrait butanolique ; EAQ : extrait aqueux ; As A : acide ascorbique

**3.2. Méthode de la réduction du fer FRAP**

Les concentrations des extraits des feuilles sont déterminées à partir d'une courbe étalon de BHT exprimée en mg/ml (hydroxytoluènebutyl). Les résultats relevés, d'après la courbe étalon de BHT,

sont 0,072 mg EBHT/g pour l'extrait butanolique et 0,073 mg EBHT/g pour l'extrait d'acétate d'éthyle. Le potentiel antioxydant des différentes fractions est représenté dans la figure 5.

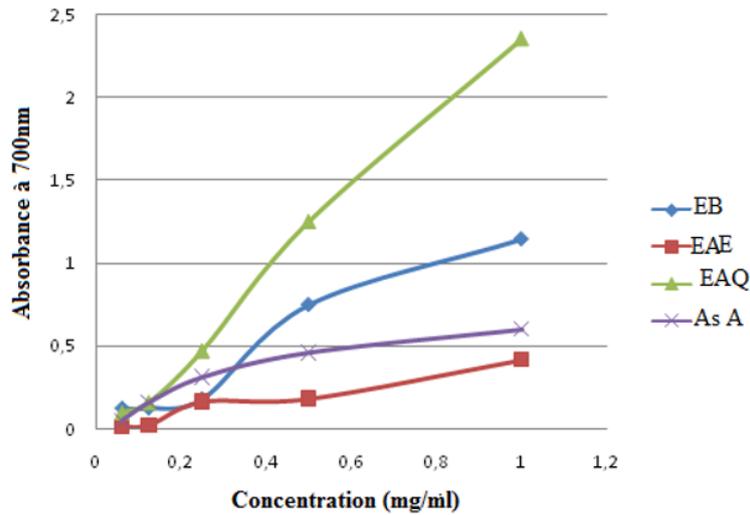


Figure 5 : pouvoirs réducteurs des extraits de feuilles

**3.3. Méthode de décoloration du β-carotène**

Le taux de dégradation ou de décoloration du β-carotène reflète la capacité antioxydante de nos extraits. Les cinétiques du blanchissement du β-carotène des différentes fractions de l'extrait flavonoïdique de la variété Ahmar Bouamar et de l'acide ascorbique sont représentées dans la figure 6.

On constate que la fraction butanolique inhibent d'une manière significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β-carotène par rapport au contrôle négatif et l'acide ascorbique, sans négliger que les autre fractions présentent une bonne activité vis-à-vis de la décoloration de la β-carotène. Ces résultats sont bien corrélés avec la teneur élevée en procyanidine monomères (flavan-3-ols) dans ces extraits.

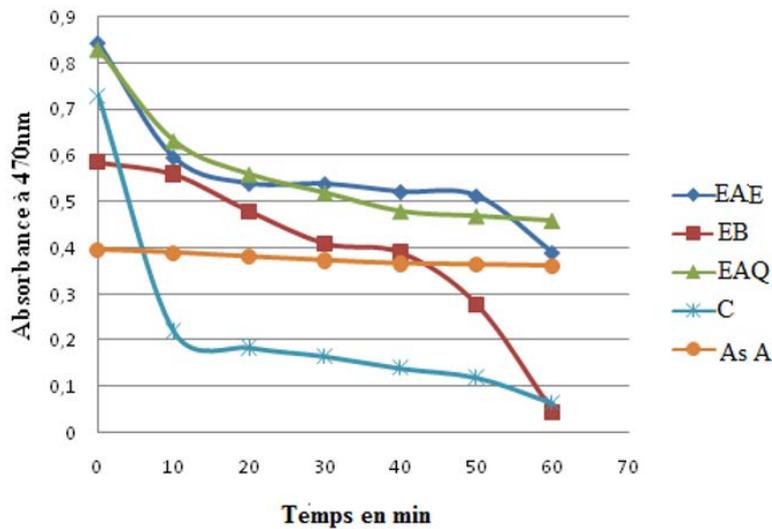


Figure 6 : cinétique de la décoloration du β-carotène induite par les fractions de l'extrait flavonoïdique de la variété Ahmar Bouamar, l'acide ascorbique et le contrôle négatif après 1 heure.

EAE : extrait d'acétate d'éthyle ; EB : extrait butanolique ; EAQ : extrait aqueux ; As A : acide ascorbique ; C : contrôle négatif

**DISCUSSION**

**1. Screening phytochimique**

Il est à constater que la plante étudiée est riche en métabolites secondaires dotés de plusieurs activités biologiques. Cette dernière a été signalée par Kappel [11].

Les résultats de la présente étude sont en accord avec ceux trouvés par Amara et Melouk [1] ayant travaillé sur l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles de la vigne sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*). En effet, ces auteurs signalent la présence des tannins galliques, flavonoïdes,

saponosides et alcaloïdes et l'absence des tannins catéchiques, anthocyanes, leuco anthocyanes, quinones, sénosides et coumarines. Il est à signaler que la présence ou l'absence d'un métabolite secondaire n'est que le résultat de l'influence des conditions abiotiques sur le développement de la plante. Selon Reynier [12] et Baustita *et al.* [13], l'exposition d'une variété de vigne à des environnements différents a influencé la production des métabolites secondaires tant en quantité qu'en qualité. Cette étude a également montré l'existence d'une réelle biodiversité moléculaire, qui confère à la vigne rouge des vertus médicinales importantes à valorisées. Parmi les métabolites secondaires mis en évidence, les flavonoïdes avec de nombreuses vertus médicinales : antioxydantes [14], anti-inflammatoires, inhibiteurs d'enzymes, antiallergiques, antiulcérogènes, et effets protecteurs vasculaires [15], et antimicrobiens [16]. Les tanins avec leurs propriétés anti diarrhétiques, antibactériennes et antifongiques [17]. Les anthocyanes sont des puissants antioxydants [14].

## 2. Rendement d'extraction

Le rendement important en flavonoïdes noté lors de cette étude est dû probablement à la méthode d'extraction utilisée : macération dans le méthanol et dans l'acétate d'éthyle. En effet, Sun *et al.* [18] et Turkmen *et al.* [19], ont montré que ces solvants permettent la dissolution et la précipitation d'un taux élevé de composés phénoliques, ce qui justifie leur choix dans les extractions. La richesse des cépages rouges en composés phénoliques, particulièrement en flavonoïdes, a été confirmée par plusieurs auteurs. Amara et Melouk [1] ont travaillé sur les feuilles de la vigne sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*) récoltés pendant la période de floraison à El Kharoub dans la région de Mefteh (Blida) ont noté un rendement en flavonoïdes de 16,76%. Ces résultats sont proches de ceux trouvés par Yang *et al.* [20], et ceux de Guerrero *et al.* [21], ayant montré pour cinq variétés de raisin rouge cultivées en Andalousie des teneurs en flavonoïdes comprises entre 221 et 538 mg/kg de baies. Dans une autre étude rapportée par Waterhouse et Teissedre [22],

il a été démontré que les vins rouges californiens contenaient entre 1850 et 2200 mg/l de composés phénoliques totaux. Makris *et al.* [23], ont trouvé des teneurs en flavonoïdes variant entre 9,9mg EQ/100g MS et 57,15 mg EQ/100g MS, selon le solvant d'extraction utilisé. Enfin, Lehn [24], mentionne un taux de flavonoïdes de 4% au niveau des feuilles de la vigne rouge. Cette grande différence serait due aux facteurs climatiques qui influent sur le taux des métabolites secondaires des végétaux.

## 3. Caractérisation des métabolites secondaires par HPLC

L'analyse quantitative par HPLC des flavonoïdes a identifiée cinq composés. Ces flavonoïdes ont été détectés par Jean-Denis [25] dans l'extrait méthanolique de deux variétés de raisin (Chasselas et Solaris). La catéchine et l'épicatéchine ont été aussi identifiés dans les pépins issus de marc de raisins [26, 27, 28]. Une autre recherche réalisée par Amira-Guebailia [29], a apporté un nombre plus important de molécules autre que celle détectée lors de notre étude concernant l'extrait phénoliques des sarments et des rafles de la vigne (*Vitis vinifera* L.). En plus de catéchine, épicatéchine, cis-picéide, trans-picéide et le  $\delta$ -viniférinol, l'extrait renferme le pallidol, le picéide et l'astilbin, le (+) – hopéaphénol, (-) Trans  $\varepsilon$ -viniferin, la trans scirpusin A et le nepalensinol B. La structure chimique de ces composés a été déterminée en utilisant les méthodes spectroscopiques classiques RMN du proton : trans resvératrol ( $C_{14}H_{12}O_3$ ), trans picéide, trans picéatannol ( $C_{14}H_{12}O_4$ ), Picéide ( $C_{20}H_{22}O_8$ ). Il est à signaler que le picéide, glucoside du resvératrol a été trouvé dans les suspensions cellulaires de vigne par Waffo-Teguo *et al.* [30]. Concernant les activités biologiques du picéide, il a été décrit comme anti-inflammatoire [31], anticancéreux [32], et pourraient être liés à l'inhibition de la synthèse d'ADN dans les 50 cellules cancéreuses et à l'inhibition de l'angiogénèse des lignées HUVECs [33].  $\delta$ -viniférine ( $C_{28}H_{22}O_6$ ) est pour la première fois été isolé de *Vitis vinifera* en 1977 par Langcake et Pryce [34]. Il a ensuite à nouveau été isolé de la vigne par Li *et al.* [35]. Ce stilbène dimérique est produit par les processus d'oxydation du resveratrol. La viniférine est aussi produite par la vigne en réponse à l'attaque fongique [36].

La viniférine a non seulement une meilleure activité antifongique mais également de meilleurs pouvoirs antioxydants que le resveratrol [37 et 38]. Selon Piver *et al.* [39], la trans- $\epsilon$ -viniférine a montré des effets inhibiteurs des enzymes des cytochromes P450 humains impliquées dans la bioactivation de nombreux carcinogènes. La trans- $\epsilon$ -viniférine, possède une activité antioxydante [40] et anti-hépatotoxique [41].

#### 4. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

##### 4.1. Piégeage du radical libre DPPH

Il apparaît que les résultats obtenus lors de cette étude concordent avec ceux notés par Jean-Dennis [25] sur le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de la catéchine et de l'épicatéchine des LDL, soit 80%. La même constatation a été faite avec les observations d'El Darra *et al.* [42] où le pourcentage d'inhibition de DPPH par les flavonoïdes et non flavonoïdes extraits de cépage Merlot était de 71%. Par ailleurs, Katalinic *et al.* [43], ont montré que l'extrait méthanolique de différentes variétés du raisin piègent 50% du radical DPPH\* à des concentrations comprises entre 52,8 $\pm$ 3,33 mg/ml et 291 $\pm$ 4,51mg/ml. Il est connu que la réduction des molécules de DPPH est bien corrélée avec la teneur en composés phénoliques [44]. Selon Balasundram *et al.* [45], l'effet antiradicalaire des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libre, avec la présence de la double liaison C2-C3. Lee et Lee [46], signalent que la méthode d'extraction affecte les capacités antioxydantes. Ceci peut expliquer en partie la différence des résultats. De par leur effet antioxydant puissant, les polyphénols trouvent depuis une dizaine d'années un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Ils sont aussi impliqués dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant, telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires, l'ostéoporose ou les maladies inflammatoires [47].

##### 4.2. Réduction du fer FRAP

Le potentiel antioxydant des différentes fractions augmente au fur et à mesure que la concentration en extrait s'élève. Ces résultats confirment ceux trouvés par Derradji-Benmeziane [48] pour les extraits méthanolique du gros noir et du muscat noir,

exprimé en quantité d'antioxydants équivalents en acide ascorbique (EAA), soit respectivement 16,58 $\pm$ 0,07 mg de 11,85 $\pm$ 0,36mg. Barros *et al.* [44], ont rapporté que les propriétés réductrices sont généralement associées à la présence de réductones, qui exercent une action antioxydante en en donnant un atome d'hydrogène, déstabilisant ainsi la chaîne des radicaux libres. En conséquence, les cépages avec un pouvoir réducteur élevé peuvent renfermer des quantités plus élevées de réductones, qui pourraient réagir avec les radicaux libres pour stabiliser et bloquer les réactions radicalaires en chaînes. Ce pouvoir réducteur élevé des polyphénols est signalé par plusieurs auteurs. En effet, Saeed *et al.* [49] et Gonçalves *et al.* [50], ont révélés que l'activité antioxydante des matières végétales est bien corrélée avec la teneur en composés phénoliques.

##### 4.3. Décoloration du $\beta$ -carotène

L'activité antioxydante obtenue par le test de décoloration du  $\beta$  carotène est étroitement corrélée avec la teneur élevée en procyanidine monomères (flavan-3-ols) dans les extraits. En effet, Cao *et al.* [51], ont rapportés que les flavan-3-ols présentent une activité antioxydante substantielle. De plus, les résultats obtenus lors de cette étude peuvent être expliqués par la richesse de l'extrait butanolique et de celui d'acétate d'éthyle en antioxydants apolaires. La faible activité rencontrée avec l'extrait aqueux est probablement due à la présence en taux élevé des antioxydants polaires. Ce fait a été signalé par Frankel et Meyer [52]. Selon ces auteurs, les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes, du fait qu'ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides. Ces mêmes auteurs, ont montré que le vin rouge contient naturellement des polyphénols susceptibles de limiter l'oxydation des lipoprotéines.

## CONCLUSION

De par son pouvoir antioxydant, la variété algérienne «Ahmar Bouamar» peut être valorisée pour renforcer l'organisme dans le cas de situation de stress oxydatif.

Il est donc impératif de répéter l'ensemble de ces résultats sur plusieurs saisons afin de confirmer les qualités réelles de ce cépage autochtone et lui garantir la place qui lui revient sur le marché mondial des raisins.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Amara N. et Melouk F.Z. (2016).** Activité Antimicrobienne des Extraits des Feuilles de la Vigne Sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*). *Algerian Journal of Natural Products*, 4(3) : 358 – 366.
- [2]. **Ghouila Z., Laurent S., Henoumont C., Vander Elst L., Muller R.N. and Baalouamer A. (2016).** Rich extract on total polyphenols and antioxidant activity obtained by conventional and non-conventional methods from Ahmer Bouamer grape seed. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 8(3) : 692-711.
- [3]. **Ferhi S., Santaniello S., Zerizer S., Cruciani S., Fadda A., Sanna D., Dore A., Marioli M. and D'hallewin G. (2016).** Total Phenols from Grape Leaves Counteract Cell Proliferation and Modulate Apoptosis-Related Gene Expression in MCF-7 and HepG2 Human Cancer Cell Lines. *Molecules*, 24 (612) : 2-15.
- [4]. **Harborne A.J. (1998).** *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis.* springer science & business media.
- [5]. **Raaman N. (2006).** *Phytochemical techniques.* Ed. Publishing Agency, New Delhi, 306p.
- [6]. **Markham K.R. (1982).** Techniques of flavonoids identification. *Academic Press (London): chap 1 and 2, 1-113.*
- [7]. **Bahorun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin M., Cazin C. and Pinkas M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089
- [8]. **Bozin B., Mimica-Dukic N., Bogavac M., Suvajdzic L., Simin N., Samojlik I. and Couladis M. (2008).** Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* Scheele Essential oils. *Molecules*, 13 : 2058-2068
- [9]. **Oyaizu M. (1986).** Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
- [10]. **Sun J., Blaskovich M.A., Jove R., Livingston S.K., Coppola D. and Sebti S.M. (2005).** Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene*, 24: 3236-3245.
- [11]. **Kappel C. D. (2010).** Biologie intégrative du métabolisme de la baie de raisin. Thèse de doctorat, Université de Vector Segalen Bordeaux, 177p.
- [12]. **Reynier A. (1991).** *Manuel de viticulture.* Ed. Lavoisier, Paris, 360p.
- [13]. **Baustita O., Fernandez F. Lopez R. and Gomes P. (2007).** The effects oenologique practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine color and their dependence on grope characteristic. *Journal of food composition and analysis*, 20: 546-552.
- [14]. **Iserin P. (2001).** *Encyclopédie des plantes médicinales.* London, ypogly Edith Ybert, Tatiana Delasalle- Feat, 335p.
- [15]. **Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4) : 162-169.
- [16]. **Cushnie T.T. and Lamb A.J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5): 343-356.
- [17]. **Bruneton J. (2008).** *Acides phénols. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales.* Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris, 1118p.
- [18]. **Sun T., Powers J.R. and Tang J. (2007).** Evaluation of the antioxidant activity of broccoli and their juices. *Food chem.*, 105: 101-106.
- [19]. **Turkmen N., Velioooglu Y., Sari F. and Polat G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12: 484-496.
- [20]. **Yang J., Martinson T.E. and Liu R.H. (2009).** Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116: 332-339.
- [21]. **Guerrero F.G., Liazid A., Palma M., Puertas B., González-Barrio R., Gil-Izquierdo A., García Barroso C. and Cantos-Villar E. (2009).** Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, 112: 949-955.
- [22]. **Waterhouse A.L. and Teissedre P.L. (1997).** Levels of phenolics in California varietal wines, in ACS Symposium, Series 661, Wine, Nutritions and Therapeutic Benefits. Edited by Tom. Watkins, 12-23.
- [23]. **Makris D.P., Boskou G. and Andrikopoulos N.K. (2006).** Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*, 98: 2963-2967.
- [24]. **Lehn F. (2010).** Le syndrome métabolique : quand le surpoids devient pathologie. *Journal of food*, 20: 204-207.

- [25]. **Jean-Denis J.B. (2005).** Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.). Thèse de Doctorat, Univ. de Neuchâtel, 284 p.
- [26]. **Kammerer D., Achim C., Reinhold C. and Andreas S. (2004).** Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52: 4360-4367.
- [27]. **Maier T., Schieber A., Kammerer D.R. and Carle R. (2009).** Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 112: 551-559.
- [28]. **Xu C., Zhang Y., Wang J. and Lu J. (2010).** Extraction, distribution and characterization of phenolic compounds and oil in grapeseeds. *Food Chemistry*, 122: 688-694.
- [29]. **Amira-Guebailia H. (2007).** Polyphénols des sarments et des rafles de la Vigne (*Vitis vinifera* L.) et du vin, purification, dosage et activités biologiques. Thèse de Doctorat en chimie, Univ. d'Annaba, Algérie, 123p.
- [30]. **Waffo-Téguo P., Lee D., Cuendet M., Mérillon J. M., Pezzuto J. M. and Kinghorn A. D. (2001).** Two new stilbene dimer glycosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *J. Nat. Prod.*, 64: 136-138.
- [31]. **Kimura Y. et Okuda H. (2000).** Effects of naturally occurring stilbene glycosides from medicinal plants and wine, on Tumor growth and Lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing Mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52: 1287-1295.
- [32]. **Ulrich S., Wolter F. and Stein M. (2005).** Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 452-461.
- [33]. **Kimura Y. (2005).** New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants. *In Vivo*, 19(1): 37-60.
- [34]. **Langcake P. and Pryce R.-J. (1977).** A new class of phytolalexins from grapevines. *Experientia*, 33: 151-152.
- [35]. **Li W.W., Ding L.S., Li B.G. and Chen Y.Z. (1996).** Oligostilbenes from *Vitis heyneana*. *Phytochemistry*, 42: 163-165.
- [36]. **Langcake P. (1981).** Disease resistance of *Vitis* spp.v and the production of stress metabolites resveratrol, c-viniferin, f-viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology*, 9: 77-86.
- [37]. **Baderschneider B. and Winterhalter P. (2000).** Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2681-2686.
- [38]. **Bala A.E.A., Kollman A., Ducrot P.-H., Majira A., Kerhoas L., Leroux P., Delorme R. and Einhorn J. (2000).** Cis c-viniferin: A new antifungal resveratrol dehydrodimer from *Cyphostemma crotalariodes* roots. *J. Phytopathology*, 148: 29-32.
- [39]. **Piver B., Berthou F., Dreano Y. and Lucas D. (2003).** Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by c-viniferin, the dimer of resveratrol :comparison with resveratrol and Polyphenols from alcoholised beverages. *Life Sci.*, 73: 1199-1213.
- [40]. **Privat C., Telo JP. and Bernardes-Genisson V. (1976).** Antioxidant properties of trans-epsilon- viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and no aqueous media. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 1213-1217.
- [41]. **Langcake P. and Pryce R.J. (1976).** The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.*, 9: 77-86.
- [42]. **El Darra N., Tannous J., Bou Mouncef P., Palge J., Yaghi J., Vorobiev E., Louka N. and Maroun R.G. (2012).** A comparative study on antiradical and antimicrobial properties of red grapes extracts obtained from different *Vitis vinifera* varieties. *Food and Nutrition Sciences*, 3: 1420-1432.
- [43]. **Katalinic V., Mozina S.S., Generalic I., Skoza D., Ljubenkovic I. and Klancnik A. (2010).** Phenolic Profile, Antioxidant Capacity, and Antimicrobial Activity of Leaf Extracts from Six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties*, 16 (1): 45-60.
- [44]. **Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira ICFR and Baptista P. (2007).** Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 103: 413-419.
- [45]. **Balasudram N., Sundram K. and Summan S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri- industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 9: 191-120.
- [46]. **Lee O-H. and Lee B-Y. (2003).** Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101(10): 3751-3754.

- [47]. **Rock E. (2003).** Stress oxydant, micronutriments et sante. Université d'été de Nutrition Clermont-Ferrand, 35-38.
- [48]. **Derradji-Benmeziane F., Djamai R. and Cadot Y. (2014).** Antioxidant capacity, total phenolic, carotenoid, and vitamin c contents of five table grape varieties from Algeria and their correlations. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 48: 153-162.
- [49]. **Saeed N., Khan M.R. and Shabbir M. (2012).** Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *Complementary and Alternative Medicine*, 12: 221-233.
- [50]. **Gonçalves S., Gomes D., Costa P. and Romano A. (2013).** The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 43: 465- 471.
- [51]. **Cao G., Sofic E. and Prior R.L. (1997).** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*, 22(5): 749-760.
- [52]. **Frankel E.N. and Meyer AS. (2000).** The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.*, 80(13): 19-25.